



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

ROBERTA STRÖHER

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À DEPRIVAÇÃO MATERNA
E/OU DIETA HIPERCALÓRICA EM PARÂMETROS
DE DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR, PONDERAIS,
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM RATOS**

PORTO ALEGRE
2018

ROBERTA STRÖHER

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO À DEPRIVAÇÃO MATERNA
E/OU DIETA HIPERCALÓRICA EM PARÂMETROS
DE DESENVOLVIMENTO NEUROMOTOR, PONDERAIS,
COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, em Farmacologia e Terapêutica.

Orientadora: Prof. Dra. Iraci LS Torres

Coorientadora: Prof. Dra. Isabel Cristina de Macedo

PORTO ALEGRE

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Ströher, Roberta

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos. / Roberta Ströher. -- 2018. 158 f.

Orientadora: Iraci Lucena da Silva Torres.

Coorientadora: Isabel Cristina de Macedo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Deprivação materna. 2. Alimento palatável. 3. Comportamento. 4. Interleucinas. 5. Neurotrofinas. I. Torres, Iraci Lucena da Silva, orient. II. de Macedo, Isabel Cristina, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

BANCA EXAMINADORA

Dra. Rosane Souza da Silva
(PPGBCM- PUCRS)

Dr. Fernando Benetti
(PPGFisio – UFRGS)

Dr. Angelo Piato
(PPGFT – UFRGS)

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas.

Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura
para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

Aos meus pais e

Ao meu noivo

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha professora orientadora Dra. Iraci Lucena da Silva Torres, pela paciência, confiança e dedicação por toda essa jornada.

À minha coorientadora Dra. Isabel Cristina de Macedo pelas contribuições nesse trabalho e pelo conhecimento compartilhado.

À professora Dra. Vera Maria Vieira Paniz pelos ensinamentos e confiança depositados no início de minha formação profissional, da qual serei eternamente grata.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Bilógicas: Farmacologia e Terapêutica/UFRGS pelos ensinamentos compartilhados durante o mestrado.

Aos queridos colegas, amigos e parceiros Dra. Vanessa Leal Scarabelot, Dr. Jeferson Ferraz Goullarte e Ms. Bettega Costa Lopes, que foram fundamentais para a realização desse trabalho. Agradecimento especial à Dra. Carla de Oliveira pelo suporte, carinho e dedicação durante esse percurso.

À amizade e parceria das colegas Ms. Mayra Zancanaro, Ms. Gabriela Gregory Regner e Ms. Lisiane Santos Silva.

À Dra. Andressa de Souza pela paciência e empenho depositados nesse trabalho, além da confiança em mim depositado.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-clínicas pelo ótimo convívio e contribuições ao longo desse período.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – GPPG/HCPA, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto (16-0558) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado durante minha formação.

À Unidade de Experimentação Animal (UEA), Unidade de Análises Moleculares e Proteína (UAMP) e ao Laboratório de Hepatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre onde foram desenvolvidas as diversas etapas desse trabalho.

À minha família, meus irmãos Rafael e Christiano Ströher e especialmente aos meus pais, Roberto Fischer Ströher e Maria Silvia Ströher, pelo amor, incentivo, investimento e apoio incondicional nesta longa jornada.

Ao meu noivo William de Aguiar Toledo pelo companheirismo, incentivo e compreensão ao decorrer de todos esses anos.

Às minhas professoras e amigas da Unisinos e do ITT NUTRIFOR, que foram essenciais para minha formação superior. Um agradecimento especial para as professoras Dra. Carolina Didonet Pederzoli, Dra. Juliana de Castilhos, Dra. Rochele Cassanta Rossi e Dra. Denize Righetto Ziegler.

Por fim, agradeço a todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha formação e que me incentivaram nesta conquista. Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
APRESENTAÇÃO	14
RESUMO	15
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 Estratégias para Localizar e Selecionar Informações	27
2.2 Controle Alimentar	28
2.3 Modelos de Dietas Hipercalóricas em Roedores.....	34
2.4 Parâmetros de Desenvolvimento Ponderais.....	37
2.5 Deprivação Materna em Roedores.....	38
2.6 Avaliação do Comportamento Exploratório e do Tipo Ansioso.....	40
2.7 Biomarcadores	43
2.8 Diferenças entre Gêneros	46
3 JUSTIFICATIVA	49
4 HIPÓTESE	49
5 OBJETIVOS	51
5.1 Objetivo geral	51
5.2 Objetivos específicos	51
6 ARTIGOS CIENTÍFICOS	53
6.1 Artigo I.....	55
6.2 Artigo II.....	90
7 DISCUSSÃO GERAL	127
8 CONCLUSÕES	139
9 REFERÊNCIAS	141
10 APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	155
11 PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O MESTRADO	157
11.1 Artigos Publicados	157
11.2 Resumos Publicados em Anais de Congresso	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre a composição nutricional da ração padrão Nuvilab e o leite condensado.....	36
--	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma das pesquisas realizadas nas principais bases de dados.....	27
Figura 2. Comportamento alimentar e peso corporal alterados por lesões bilaterais do hipotálamo de ratos.	29
Figura 3. Fórmula para cálculo do Índice de Massa Corporal (IMC).....	37
Figura 4. Fórmula para cálculo do Índice de Lee	38
Figura 5. Desenho esquemático das arenas de Campo Aberto (CA).....	41
Figura 6. Desenho esquemático do aparato de <i>Elevated Plus-Maze</i> (EPM).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH - hormônios estimuladores de melanócitos

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

AgRP - peptídeo relacionado a Agouti

ANOVA – análise de variância (do inglês analyses of variance)

BDNF – fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês brain-derived neurotrophic factor)

CA-campo aberto

CART - transcrito relacionado à cocaína e à anfetamina (do inglês cocaine- and amphetamine-regulated transcript)

CCA - córtex cingulado anterior

CCK –colecistocinica (do inglês cholecystokinin)

COF - córtex orbitofrontal

CRH – hormônio liberador de corticotrofina (do inglês Corticotropin-releasing hormone)

DH- dieta hipercalórica

DM – deprivação materna

DMDH- deprivação materna e dieta hipercalórica

ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay (termo em inglês)

EPM- elevated plus-maze (termo em inglês)

EV - estriado ventral

GABBA - ácido gama-aminobutírico (do inglês gamma-aminobutyric acid)

GPPG – Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

GLP-1- peptídeo semelhante ao glucagon 1 (do inglês Glucagon-like peptide-1)

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HD- hypercaloric diet (termo em inglês)

HHA- hipotálamo-hipófise-adrenal

HL - hipotálamo lateral

HMV - hipotálamo ventromedial

HP- hot plate (termo em inglês)

IL-6 – interleucina 6

IL-10 – Interleucina 10

IMC - índice de massa corporal

MD – maternal deprivation (termo em inglês)

NAc – núcleo accumbens (termo em latim)

NGF– fator de crescimento neuronal (do inglês nerve growth factor)

NPHD - non-protected head dipping (termo em inglês)

NPY – neuropeptídeo Y

OFT- open field test (termo em inglês)

PF – palatable food (termo em inglês)

PHD - protected head dipping (termo em inglês)

PQ- placa quente

POMC - pró-opiomelanocortina

PV - pallidum ventral (termo em latim)

PVN – núcleo paraventricular (do inglês paraventricular nucleus)

SN - substância nigra

SNC – sistema nervoso central

TFL- tail flick test (termo em inglês)

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa (do inglês tumor necrosis factor)

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em 3 partes:

- Parte I - Introdução, Revisão da Literatura, Justificativa, Hipótese e Objetivos;
- Parte II - Materiais e Métodos, Resultados e Discussão na forma de dois artigos científicos: o primeiro demonstrando os efeitos da deprivação materna a curto e longo prazo por meio da análise comportamental dos animais (endireitamento postural, geotaxia negativa, campo aberto, *elevated plus-maze*, placa quente, *tail-flick*); e o segundo avaliando os efeitos tardios da deprivação materna e a exposição à dieta hipercalórica após o desmame dos animais mediante análises bioquímicas (BDNF, NGF, TNF- α , IL-6, IL-10).
 - **Artigo 1:** *Maternal deprivation alters neuromotor reflex, anxiety-like behavior and nociception in a gender dependent manner in rats.*
 - **Artigo 2:** *Gender and maternal deprivation affects rats' neurotrophins and neuroinflammatory levels more than palatable food.*
- Parte III – Discussão Geral, Conclusões, Referências, Aprovação da Comissão de Ética e a Produção Acadêmica Durante o Período de Mestrado.

Observação: Detalhes técnicos mais precisos sobre a metodologia empregada em cada um dos trabalhos apresentados podem ser encontrados nos artigos científicos.

RESUMO

O consumo de dieta ocidental altamente palatável e hipercalórica expõe os indivíduos, desde a primeira infância, a uma alimentação obesogênica. Essa dieta aumenta o prazer relacionado ao consumo alimentar estimulando o sistema de recompensa e alterando vias de sinalização do sistema nervoso central (SNC). Esses eventos são relacionados à perda do controle adequado do apetite. Por outro lado, exposição ao estresse também tem importante relação com controle alimentar. Uma importante fonte de estresse é a deprivação materna (DM) no período neonatal, trazendo prejuízos ao indivíduo ao longo da vida. Estudos em animais têm demonstrado que o estresse induzido pela DM nesse período provoca alterações neuroquímicas. Essas alterações têm sido relacionadas a transtornos mentais como ansiedade e depressão, assim como, obesidade na idade adulta. Considerando a relevância do tema, nessa dissertação avaliamos o efeito da DM no período neonatal e/ou exposição à dieta hipercalórica (leite condensado) após o desmame sobre parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos *Wistar* adultos jovens machos e fêmeas. Foram utilizados 64 ratos *Wistar* machos e fêmeas distribuídos em quatro grupos: Controle (C) – sem DM e exposto à dieta padrão; Deprivação Materna (DM)- animais submetidos à DM (P1-P10) e exposto à dieta padrão; Dieta Hipercalórica (DH) - sem DM e exposto à dieta hipercalórica (alimento palatável/leite condensado); e Deprivação Materna e Dieta Hipercalórica (DMDH)- animais submetidos à DM (P1-P10) e expostos à dieta hipercalórica (alimento palatável/leite condensado). Os efeitos da DM nos padrões de reflexos iniciais nos filhotes foram avaliados por meio dos testes de geotaxia negativa e endireitamento postural, assim como seus efeitos sobre a resposta nociceptiva avaliada por meio do teste da Placa Quente (PQ) e do Tail-Flick (TFL). Avaliamos também o comportamento do tipo ansioso por meio do teste do Labirinto em Cruz Elevado - *Elevated Plus Maze* (EPM) e a atividade locomotora pelo teste de Campo Aberto (CA) antes do desmame (P21). A partir de P21, os animais dos grupos DH e DMDH foram expostos a uma dieta hipercalórica/alimento palatável (leite

condensado) por três semanas e novamente avaliados a resposta nociceptiva, o comportamento do tipo ansioso e a atividade locomotora. Salientamos que foi analisado o efeito do gênero sobre todos os parâmetros analisados. Após a segunda leva de testes comportamentais, os animais foram mortos (P44) e retirados córtex cerebral, hipocampo e hipotálamo para a realização de dosagens bioquímicas. Foram dosados níveis do fator de desenvolvimento neuronal do encéfalo (BDNF), fator de crescimento neuronal 1 (NGF-1) e de citocinas pro-inflamatórias (IL6 e TNF- α) e anti-inflamatória (IL10). Nossos resultados demonstram que a exposição à DM induz, em curto prazo (entre P20 e P21), alterações no desenvolvimento motor inicial, resposta nociceptiva térmica (aumento do limiar nociceptivo –PQ e TFL-fêmeas), aumento da atividade locomotora de fêmeas devido ao maior número de cruzamentos externos e do tempo de *grooming* em machos, o que pode estar relacionado a alterações em sistema dopaminérgico (teste CA); aumento no tempo de permanência nos braços abertos dos animais deprivados sugerindo um efeito ansiolítico dessa intervenção, aumento no número de *non-protected head dipping* (NPHD) em machos, comportamentos relacionados à atividade exploratória e avaliação de risco (teste do EPM). Os efeitos tardios da DM, avaliados entre P42 e P43, foram observados na resposta nociceptiva (diminuição do limiar nociceptivo dos machos -TFL) e no teste EPM apenas os machos apresentaram maior número de *rearings*, indicativo de aumento na atividade exploratória dependente de gênero da DM. Quando expostos à DH, os machos apresentaram maior ganho de peso e índice de Lee. A DH induziu um aumento no peso relativo de tecido adiposo, independente do sexo. Foram observados efeitos tardios da DM e do gênero sobre os níveis de BDNF nas estruturas cerebrais avaliadas. Efeito da exposição à DH foi observado apenas nos níveis hipotalâmicos de NGF-1. Fêmeas apresentaram níveis mais elevados de BDNF e IL-6 em hipocampo e hipotálamo, e de TNF- α em hipotálamo. Em níveis corticais de IL10 houve interação entre gênero e DM. Concluindo, esses achados contribuem para um maior entendimento dos possíveis efeitos da exposição precoce a um estressor e/ou ao alimento palatável na

infância/adolescência, demonstrando diferentes respostas de acordo com gênero às intervenções propostas. Além disso, diferenças entre o gênero *per se* foram observadas, sugerindo a importância de incluir ambos os sexos nas investigações pré-clínicas a fim de trazer maior translacionalidade aos estudos.

Palavras-chave: roedor, separação materna, leite condensado, alimento palatável, comportamento, interleucinas, neurotrofinas.

ABSTRACT

The consumption of a highly palatable and hypercaloric Western diet exposes individuals, from early infancy, to an obesogenic diet. This diet increases the pleasure related to food consumption by stimulating the reward system and altering Central Nervous System (CNS) signaling pathways. These events are related to loss of adequate appetite control. On the other hand, stress exposure also has important relation with food control. An important source of stress is maternal deprivation (MD) in the neonatal period, causing lifetime impacts. Animal studies have shown that stress induced by MD causes neurochemical changes. These changes have been related to mental disorders such as anxiety and depression, as well as obesity in adulthood. Considering the relevance of this topic, in this dissertation we evaluated the effect of MD in neonatal period and / or exposure to hypercaloric diet (condensed milk) after weaning on neuromotor, ponderal, behavioral and neurochemical development parameters in young adult male and female Wistar rats. Sixty-four male and female Wistar rats were distributed into four groups: Control (C) - without MD and exposed to the standard diet; Maternal Deprivation (MD) - animals submitted to MD (P1-P10) and exposed to the standard diet; Hypercaloric (HD) diet - without MD and exposed to the hypercaloric diet (palatable food / condensed milk); and Maternal Deprivation and Hypercaloric Diet (MDHD) - animals submitted to MD (P1-P10) and exposed to the hypercaloric diet (palatable food / condensed milk). The effects of MD on the initial reflex patterns in the pups were evaluated by the negative geotaxis and righting reflex tests, as well as their effects on the nociceptive response assessed by the Hot Plate (HP) and Tail-Flick tests (TFL). We also evaluated the anxiety-like behavior through the Elevated Plus-Maze (EPM) test and the locomotor activity by the Open Field Test (OF) before weaning (P21). From P21, the animals from the HD and MDHD groups were exposed to a hypercaloric / palatable diet (condensed milk) for three weeks and the nociceptive response, anxious-like behavior and locomotor activity were evaluated once again. We emphasize that the effect of gender in all parameters was analyzed. After the second set of behavioral tests, the animals

were killed (P44) and the cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus were removed for biochemical measurements. Levels of neuronal brain development factor (BDNF), neuronal growth factor 1 (NGF-1) and proinflammatory cytokines (IL6 and TNF- α) and anti-inflammatory cytokine (IL10) were measured. Our results demonstrate that the exposure to MD induces, in the short term, changes in the initial motor development, thermal nociceptive response (increase of the nociceptive threshold - PQ and TFL-females), increases locomotor activity of females due to the greater number of outer crossings and grooming time in males, which may be related to changes in dopaminergic system (OF test); increases time spent in open arms of deprived animals suggesting an anxiolytic effect of this intervention, increases the number of non-protected head dipping (NPHD) in males, behaviors related to exploratory activity and risk assessment (EPM test). The late effects of DM, evaluated between P42 and P43, were observed in the nociceptive response (decrease males' nociceptive thresholds in the TFL) and in the EPM test males presented a greater number of rearings, indicative of an increase in exploratory activity dependent on gender. When exposed to HD, males showed greater weight gain and Lee index. HD induced an increase in the relative adipose tissue weight, regardless of sex. Late effects of MD and gender on the BDNF levels were observed in the brain structures evaluated. Effect of HD exposure was observed only on the hypothalamic levels of NGF-1. Females presented higher levels of BDNF and IL-6 in hippocampus and hypothalamus, and TNF- α in the hypothalamus. At cortical levels of IL-10 there was interaction between gender and MD. In conclusion, these findings contribute to a better understanding of the possible effects of early exposure to a stressor and / or palatable food in childhood / adolescence, demonstrating different responses according to gender to the proposed interventions. In addition, gender differences *per se* were observed, suggesting the importance of including both genders in preclinical investigations in order to bring greater translationality to the studies.

Keywords: rodent, maternal separation, condensed milk, palatable food, behavior tests, interleukins, neurotrophins.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

PARTE I

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O número de crianças de 6 a 11 anos com sobrepeso e obesidade vem aumentando drasticamente, passando de 7% em 1980 para 18,8% em 2004 (Ogden et al. 2016). Acredita-se que o padrão alimentar obesogênico que caracteriza a alimentação conhecida como *Western Style Diet*, ou dieta ocidental altamente palatável e hipercalórica, contribua com as alarmantes taxas de sobrepeso e obesidade vigentes (Varlamov 2016). Sobrepeso e obesidade induzem graves problemas de saúde, elevando o risco do desenvolvimento de doenças como diabetes, cardiopatias, depressão, doenças neurodegenerativas, doenças musculoesqueléticas e alguns tipos de câncer (de Wit et al. 2010; Luppino et al. 2010; Keller et al. 2011; WHO, 2015).

Sabe-se que o controle alimentar pode ser influenciado pela exposição a um fator estressante, uma vez que a ativação do eixo HHA (hipotálamo-hipófise-adrenal) induz a liberação de glicocorticóides que alteram a sinalização do apetite (Ulrich-Lai et al. 2015). O descontrole alimentar e o consumo desenfreado de dieta obesogênica altamente palatável estão relacionados ao aumento de obesidade em diversos países. O aumento da prevalência de sobrepeso e de obesidade em crianças e adolescentes é ainda mais preocupante. Modelos animais que mimetizam o ganho de peso que ocorre em humanos vêm sendo amplamente utilizados nos últimos anos, com a finalidade de aperfeiçoar abordagens terapêuticas em quadros de compulsão por alimentos palatáveis (Corwin et al. 2011; Segni et al. 2014).

O estresse da vida diária aliado ao consumo excessivo de desses alimentos hipercalóricos, associados ao sedentarismo e pré-disposição genética, desencadeiam um balanço energético positivo onde o consumo supera o gasto (Kanoski e Davidson 2011). Ademais, o consumo de dieta palatável aumenta o prazer relacionado ao consumo alimentar, estimulando o sistema de recompensa e alterando vias de

sinalização do Sistema Nervoso Central (SNC). Esses eventos estão relacionados à perda do controle adequado do apetite (Blundell et al. 1995; Erlanson-Albertsson 2005; Bessesen 2011; Kenny 2011). Estudo experimental demonstrou que animais com comportamento do tipo ansioso buscam mais esse tipo de alimento a fim de reduzir sintomas relacionados à ansiedade (Machado et al. 2013).

Fatores estressantes no início da vida, como a deprivação materna (DM), podem gerar alterações comportamentais que são capazes de perdurar ao longo do tempo. A DM é entendida como uma fonte de estresse no período neonatal (Benetti et al. 2009) capaz de induzir alterações no processo de neuroplasticidade, estando relacionado a comportamentos do tipo depressivo, ansioso, compulsão alimentar e déficits em diferentes tarefas comportamentais cognitivas (Levine et al. 1988; Maciag et al. 2002, Aisa et al. 2009, Benetti et al. 2009).

O período neonatal, fase em que o modelo de DM é aplicado, compreende desde o nascimento da prole até o final da lactação, e nesse período ocorre maturação funcional e ganho de peso corporal dos filhotes. Nessa época, a progenitora é responsável pela sobrevivência da prole, sendo a primeira fonte de alimentação, limpeza e alento térmico, interferindo diretamente no desenvolvimento dos sistemas fisiológicos de modulação do comportamento nesses animais. Modificações nessa relação mãe-filhote podem influenciar o comportamento emocional e as respostas ao estresse na vida adulta (Huot et al. 2004). Um estresse neonatal, como a DM, ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) levando à liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) por neurônios do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo no sistema porta hipofisário. CRH liga-se aos seus receptores na hipófise e desencadeia a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na corrente sanguínea, que por sua vez estimula a síntese e liberação de glicocorticóides a partir da medula da

glândula adrenal (cortisol em humanos e corticosterona em roedores). O controle do eixo HHA ocorre por retroalimentação negativa sobre hipotálamo, hipófise e por ação de hormônios secretados no próprio eixo (Bear et al. 2017). Ao mesmo tempo, o estresse também desencadeia a ativação do sistema nervoso simpático com liberação das catecolaminas epinefrina e norepinefrina da medula adrenal (Chrousos 2009). Além disso, respostas neuroquímicas desencadeadas pelo estresse podem levar a alterações comportamentais, imunológicas, metabólicas, bem como doenças cardiovasculares e sintomas depressivos (Gobinath et al. 2014; Contoreggi 2015).

Como a DM é capaz de causar alterações no eixo HHA e acarretar em sintomas de depressão e ansiedade, testes como o labirinto em cruz elevado (*Plus-Maze-EPM*) vem sendo aplicado em estudos pré-clínicos a fim de avaliar o comportamento do tipo ansioso nos animais submetidos a esse modelo de estresse precoce (Cao et al. 2016; Wang et al. 2017). Essa ferramenta também é utilizada em estudos para avaliar o comportamento do tipo ansioso em animais expostos a dietas hipercalóricas, uma vez que alimentos palatáveis podem influenciar esse parâmetro (Kim et al. 2017). Além disso, o comportamento locomotor e exploratório de animais também é impactado pela exposição à DM neonatal ou pela oferta de alimento palatável (Jaimes-Hoy et al. 2016; Xu et al. 2018). Essas variáveis, em roedores, são comumente avaliadas pelo teste do campo aberto (CA) (Aya-Ramos et al. 2017; MacKay et al. 2017; Lockie et al. 2017).

Dentre as alterações neuroquímicas ocasionadas pelo modelo de DM em ratos e camundongos, podem ser citados diminuição da expressão de fatores neurotróficos derivados do encéfalo (BDNF) (Fumagalli et al. 2004; Lippmann et al. 2007) e alteração na expressão de receptores glutamatérgicos em hipocampo (Pickering et al. 2006) interferindo na neurogênese (Kikusui et al. 2009). Além disso, os níveis do fator de crescimento neural 1 (NGF-1) também parece estar alterado em animais submetidos

ao modelo de estresse neonatal, especialmente em hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral (Cirulli et al. 2000; Roceri et al. 2004; Cirulli et al. 2007). Outros importantes biomarcadores, como citocinas pró-inflamatórias, tem suas expressões alteradas em animais deprivados no período neonatal: o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) apresenta níveis aumentados no hipocampo e córtex pré-frontal (Pinheiro et al. 2015), assim como os níveis de interleucina 6 (IL-6) em córtex pré-frontal e hipocampo (Audet et al. 2010, 2011; Sukoff Rizzo et al. 2012).

Outro ponto a ser considerado, é de que a maioria dos estudos experimentais que avaliam a relação entre exposição ao estresse e parâmetros de obesidade são realizados em animais machos (Michopoulos 2016). Investigações utilizando-se fêmeas parecem ser de fundamental importância, a fim de avaliar se as respostas frente às intervenções variam de acordo com o gênero, promovendo maior translacionalidade aos estudos pré-clínicos. Assim sendo, o entendimento das alterações neuroquímicas e comportamentais ocasionadas pela DM e sua relação com a exposição a um alimento palatável durante a infância/adolescência, avaliando possíveis diferenças de gênero, auxiliarão a busca de abordagens terapêuticas mais específicas para o tratamento nessas situações.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estratégias para localizar e selecionar informações

Para realização desta revisão de literatura buscou-se apresentar os principais aspectos relacionados à deprivação materna e dieta hipercalórica, relacionando-os com os principais achados do nosso estudo. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: MEDLINE (PubMed), LILACS e SciELO. Somente estudos com animais e publicações nos últimos 15 anos foram selecionadas (2003 a 2018), sendo que livros e monografias também foram consultadas para esclarecimentos de assuntos de interesse.

Nos sites PubMed, LILACS e SciELO foram realizadas buscas utilizando-se as seguintes palavras-chave: *maternal deprivation*, *hypercaloric diet*, *nociception*, *NGF* e *IL-6*.

Utilizando-se o termo *maternal deprivation* foram encontrados 1507 artigos no PubMed, 6 no LILACS e 4 no SciELO. Já com o descritor *hypercaloric diet* foram encontrados 169 artigos no PubMed, 13 no LILACS e 2 no SciELO. Enquanto que para *nociception* foram encontrados 5619 artigos no PubMed, 98 no LILACS, 20 no SciELO. Quanto à pesquisa de artigos utilizando como descritores a neurotrofina *NGF* e a interleucina *IL-6*, foram encontrados 5058 e 38451 artigos no PubMed, 15 e 216 no LILACS, 3 e 30 no SciELO, respectivamente.

Refinando-se a busca por meio de cruzamentos entre as palavras-chave acima, foram encontrados um número reduzido de publicações, conforme demonstrado na **Figura 1**.

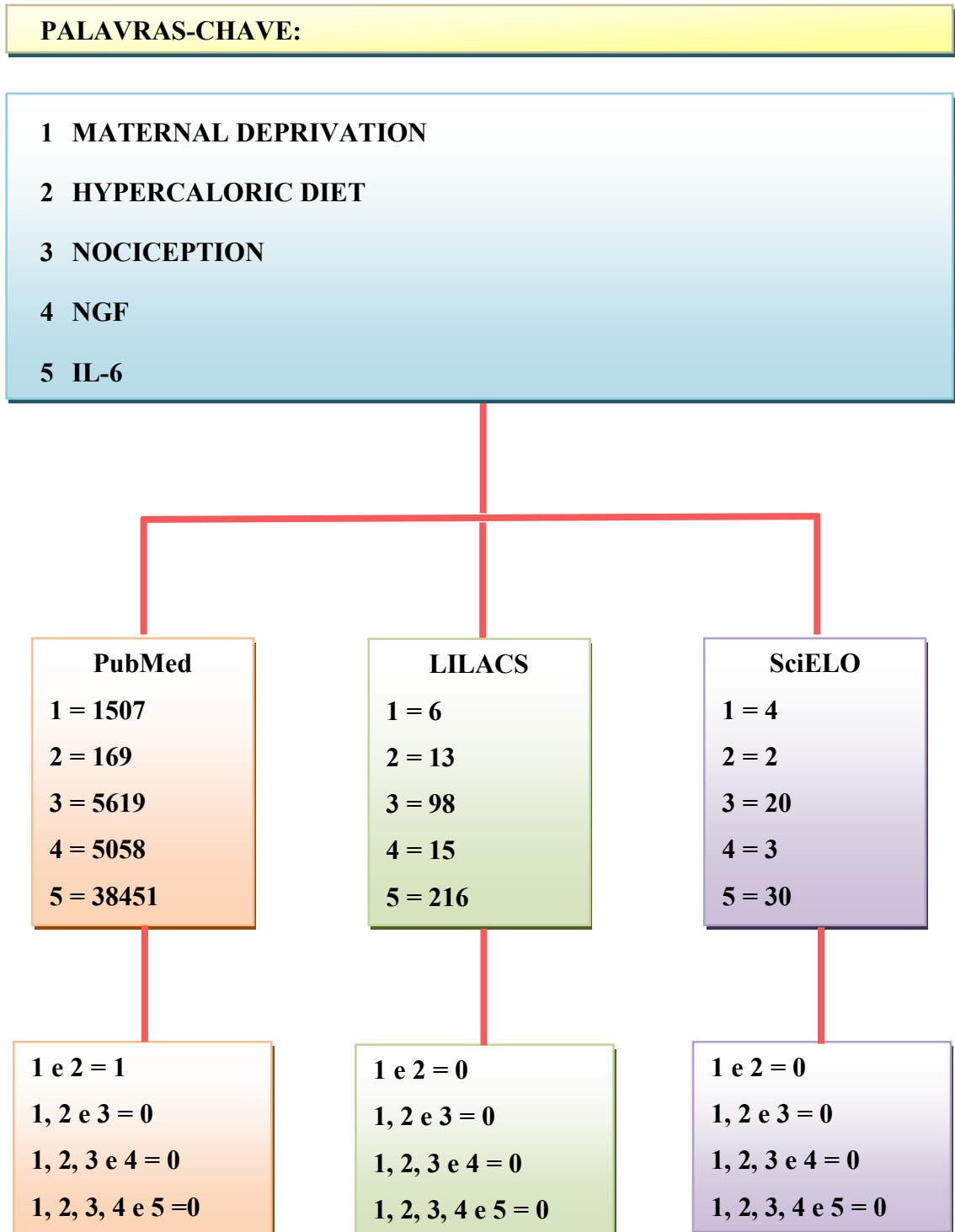


Figura 1. Fluxograma das pesquisas realizadas nas principais bases de dados.

2.2 Controle Alimentar

O controle alimentar é um comportamento que sofre influência do comportamento motivado, somos motivados a comer para manutenção das reservas energéticas do nosso organismo (Bear et al. 2017). Desta forma, a motivação é necessária para que um comportamento ocorra, porém não garante que o mesmo aconteça. A ingestão de alimento é estimulada quando neurônios do hipotálamo localizados na zona paraventricular detectam queda dos hormônios liberados por adipócitos. Envolvido na homeostase corporal, o hipotálamo além da manutenção do controle energético, regula o balanço de fluidos e a temperatura corporal, sendo que neurônios que estimulam o comportamento alimentar encontram-se no hipotálamo lateral (Bear et al. 2017).

Historicamente, acreditava-se que a “teoria periferalista” do comportamento alimentar fosse responsável pelo controle da fome. Essa teoria considerava que a fome seria resultado de sensações periféricas oriundas de contrações do estômago. Desta forma, a saciedade só ocorreria quando as contrações estomacais fossem cessadas, por meio da total distensão do órgão pela ingestão de alimentos (de Oliveira 2005).

Porém, surgiram evidências contrárias a essa teoria: animais com estômagos extirpados apresentavam consumo regular de alimentos e a injeção de insulina provocava aumento da ingestão de alimentos mesmo em animais vagotomizados. A partir desse momento, passou-se a acreditar que o controle da fome pudesse estar relacionado ao SNC, ficando conhecido como “teoria centralista”, baseada no papel do hipotálamo sobre o comportamento alimentar (de Oliveira 2005).

Portanto, a ingestão de alimentos é realizada por um sistema complexo, relacionando sinais periféricos (hormonais) e centrais (neuroquímicos) que atuam em conjunto a fim de detectar e integrar informações provenientes de estímulos internos e externos ao organismo

(Berthoud e Morrison 2008; Barrett et al. 2014).

Em 1940, A.W. Hetherington e S.W. Ranst, da Universidade Northwestern, descobriram que lesões no hipotálamo lateral (HL) de ratos causavam anorexia, enquanto que lesões no hipotálamo ventromedial (HVM), obesidade. Esse fato também é aplicado para humanos. Anorexia causada por lesão no hipotálamo lateral é conhecida como síndrome hipotalâmica lateral enquanto que o quadro de obesidade, gerado por lesões no hipotálamo ventromedial é conhecido como síndrome hipotalâmica ventromedial (**Figura 2**) (Bear et al. 2017).

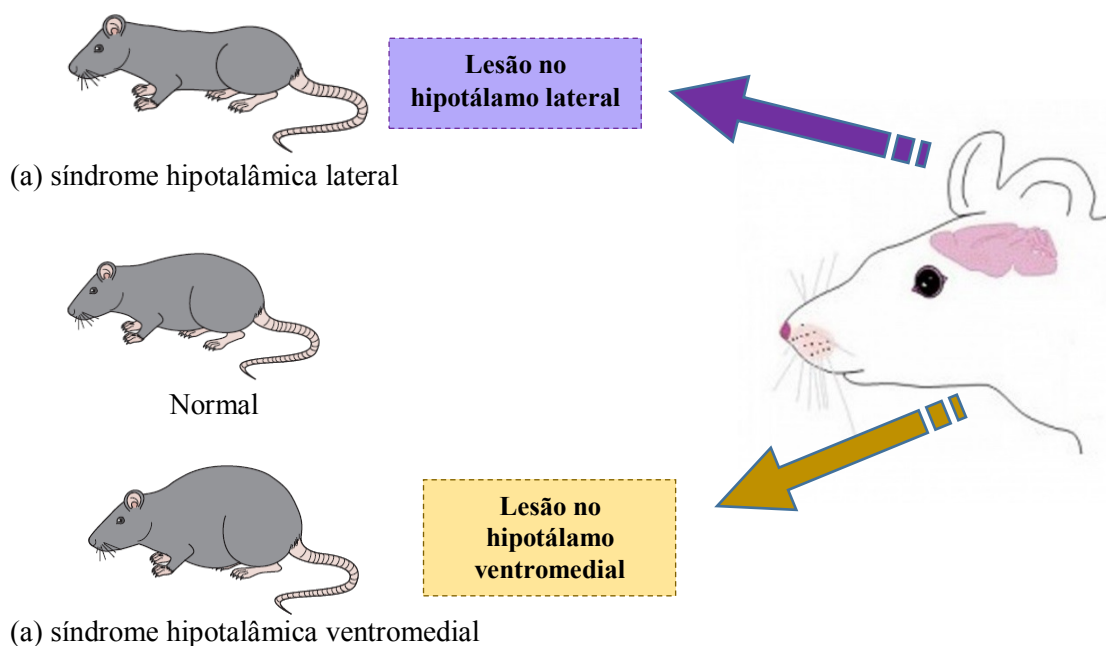


Figura 2. Comportamento alimentar e peso corporal alterados por lesões bilaterais do hipotálamo de ratos. (a) síndrome hipotalâmica lateral – caracterizada por anorexia- lesões no HL. (b) síndrome hipotalâmica vendromedial- caracterizada por obesidade- lesões no HVM. Fonte: (A autora, adaptado de Bear et al. 2017).

Dois grandes grupos de neurônios no núcleo arqueado do hipotálamo exercem importantes funções na regulação da ingesta alimentar que expressam: neuropeptídeos

orexígenos – que estimulam a ingestão alimentar – e neuropeptídeos anorexígenos - que reduzem a ingestão alimentar (Nelson e Cox 2006; Maior 2012). Neurônios orexígenos expressam o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado à Agouti (AgRP) - antagonista dos receptores de melanocortina. Enquanto que os neurônios anorexígenos expressam pró-opiomelanocortina (POMC) e o transcrito relacionado à cocaína e à amfetamina (CART) (Grill 2006).

NPY e AgRP estimulam a ingestão de alimentos por meio da ativação de receptores Y1/5 nos neurônios de segunda ordem. Ao passo que POMC e CART aumentam o gasto energético e a perda de peso por meio da produção do hormônio anorexígeno estimulante de α -melanócitos (α -MSH) e ativação de receptores de melanocortina 3 e 4 (MC3/MC4) em neurônios de segunda ordem (Bear et al. 2017).

A regulação periférica (hormonal) do comportamento alimentar envolve basicamente três principais sistemas: hormônios produzidos pelo tecido adiposo (leptina, adiponectina e resistina), pelo pâncreas (insulina e polipeptídeo pancreático-PP) e pelo trato gastrointestinal (peptídeo YY, grelina, peptídeo semelhante ao glucagon 1 – GLP-1, oxitomodulina e colecistocinica – CCK) (Dornelles 2010).

Dentre os hormônios gastrointestinais, destaca-se a grelina: peptídeo com ação orexígena, formado por 28 aminoácidos e ação mediada pelo aumento das vias NPY/AgRP e inibição dos neurônios POMC. Sua síntese ocorre principalmente no estômago, na mucosa oxíntica, apresentando picos de secreção antes da refeição, com queda significativa imediatamente após a ingestão alimentar (Maior 2012; Cavalcanti e Lins 2017). Além de estimular a ingestão de alimentos, a grelina é capaz de aumentar a motilidade gástrica e reduzir a secreção de insulina (Cavalcanti e Lins 2017). Outro importante peptídeo é a colecistoquinina (CCK): sintetizada no duodeno e jejuno, assim como no cérebro e no

sistema nervoso entérico (Cavalcanti e Lins 2017), sendo o principal hormônio responsável pela sensação de saciedade pós-prandial (Hojo et al. 2007). Já o peptídeo semelhante ao glucagon (GLP-1) além de agir como incretina, apresenta ação anorexígena e é expresso no cérebro, trato gastrointestinal e pâncreas. Seus níveis aumentam após a refeição e reduzem no estado de jejum. Possui efeito sobre a liberação de insulina e exerce efeitos tróficos nas células β pancreáticas (Alvarez-Leite et al. 2016).

Importantes hormônios sintetizados pelo tecido adiposo também estão ligados ao comportamento alimentar e o peso corporal, como a leptina. Esse hormônio exerce suas ações anorexígenas por meio da inibição de neurônios NPY/AgRP e ativação dos POMC/CART. Sua ação age principalmente sobre a massa de gordura corporal e aumento do gasto energético. Camundongos deficientes desse hormônio (ob/ob) ou de seus receptores (db/db) não apresentam adequada percepção do armazenamento de gordura resultando em quadros de hiperfagia, resistência insulínica e obesidade (Alvarez-Leite et al. 2016). Já dentre os hormônios sintetizados pelo pâncreas que influenciam o controle alimentar, destaca-se a insulina: assim como a leptina, estão relacionadas ao balanço energético sendo responsáveis pela regulação dos estoques de energia em longo prazo. A liberação da insulina está diretamente relacionada ao consumo alimentar (sendo rapidamente liberada após a refeição) e sua ação dá-se pela capacidade de ativar neurônios POMC no núcleo arqueado do hipotálamo (Alvarez-Leite et al. 2016).

No que tange sobre o comportamento hedônico do controle alimentar, o sistema de recompensa exerce um papel fundamental sobre a ingestão de alimentos. Alimentos palatáveis, ricos em açúcar e gordura, são capazes de modular sinais metabólicos de fome e saciedade, prolongando a ingestão, ativando o sistema de recompensa, aumentando a motivação para obtenção desses alimentos (Colantuoni et al. 2001; Sclafani e Ackroff 2003; Ribeiro e Santos 2013). Essa motivação, em alguns indivíduos, pode se sobrepor aos sinais

homeostáticos, promovendo o aumento de peso e obesidade (Zheng et al. 2009; Ribeiro e Santos 2013). O mecanismo hedônico do controle alimentar, diferentemente do mecanismo homeostático, ainda é pouco esclarecido (Ribeiro e Santos 2013).

No sistema de recompensa mesolímbico, mensageiros químicos (dopamina, serotonina, GABA, acetilcolina e encefalina) atuam em conjunto a fim de promover a liberação de dopamina no núcleo accumbens (NAc). Alimentos palatáveis são capazes de ativar esse circuito, caracterizando fenômenos relacionados à adição (Morton et al. 2006; Ribeiro e Santos 2013). As principais zonas cerebrais que fazem parte desse sistema são o NAc e a área tegmental ventral (VTA) (Kelley e Berridge 2002). Entretanto, outras áreas parecem estar envolvidas nos processos de recompensa: o estriado ventral (EV), a substância nigra (SN), o córtex orbito frontal (COF), o córtex cingulado anterior (CCA), o pallidum ventral (PV), a amígdala, o hipocampo e estruturas específicas do tronco cerebral (Haber e Knutson 2010; Ribeiro e Santos 2013).

A recompensa alimentar é composta basicamente por 3 principais elementos: o componente hedônico (*liking*), a motivação (*wanting*) e a aprendizagem (*learning*), que permite fazer associações e predições (Berridge 2009). O *liking* se manifesta no comportamento hedônico da ingestão alimentar e deriva da sinalização de sistemas cerebrais subcorticais. O *wanting* é um elemento motivacional ativado por estímulos de recompensa visuais e/ou olfativos, que induz a busca por alimentos, relacionado a comportamentos do tipo *craving*. O *wanting* está relacionado aos sistemas mesolímbicos cerebrais, especialmente os que envolvem a dopamina (Mela 2006). Porém, o comportamento de recompensa pode ocorrer na ausência de prazer, como ocorre em indivíduos com adição a drogas. Sabe-se que indivíduos obesos em situação de estresse psicológico apresentam um aumento do *wanting* e da ingestão de alimentos mesmo na ausência de fome (Lemmens et al. 2011). O estresse é capaz de induzir a ingestão de alimentos por meio do aumento do

wanting e da redução do *liking* após as refeições. Em situações de estresse, parâmetros de *liking* pós-prandiais foram significativamente menores em obesos do que em indivíduos normoponderais (Bellisle et al. 2012). Isso sugere que possa haver uma alteração no processo de recompensa nesses indivíduos, o que pode levar a uma procura excessiva pela recompensa e aumento dos parâmetros ponderais (Born et al. 2010).

A dopamina, principal neurotransmissor envolvido na recompensa alimentar, parece promover a motivação para a busca de alimento, ou seja, está relacionada ao *wanting* (Berridge 2009). Alimentos palatáveis são capazes de estimular a liberação desse neurotransmissor no núcleo estriado dorsal e, o nível dessa indução é diretamente proporcional ao prazer obtido por meio do consumo do alimento (Small et al. 2003). Em indivíduos obesos parece existir uma menor capacidade de sinalização da dopamina, seja por redução na disponibilidade de receptores D₂ (Wang et al. 2001) e/ou redução da ativação da dopamina no estriado em resposta ao estímulo gerado pelo alimento palatável (Stice et al. 2008). Nesses indivíduos, não há uma adequada resposta da recompensa por meio da ingestão (redução do *liking*) e um aumento na sensibilidade gerada pelos alimentos (aumento do *wanting*) (Ribeiro e Santos 2013).

Além da dopamina, o sistema opiodérgico também parece estar envolvido na regulação da ingestão alimentar (Bodnar 2004; Macedo et al. 2016). Estímulos de recompensa (naturais ou por drogas de adição) são capazes de estimular peptídeos opióides endógenos que atuam em receptores do tipo μ , k e δ , acarretando um aumento na percepção hedônica, ou seja, do *liking* (Barbano e Cador 2007). Alguns estudos têm demonstrado que antagonistas opiodérgicos reduziram seletivamente a ingestão de alimentos palatáveis, principalmente os hipercalóricos, ricos em gordura e açúcar (Yeomans e Gray 2002; Nathan et al. 2012). Destacamos ensaios clínicos que mostraram que os antagonistas de opióides, naloxona e a naltrexona, são capazes de reduzir a ingestão alimentar de obesos e de

indivíduos normoponderais (Trenchard and Silverstone 1983; Fantino et al. 1986; Bertino et al. 1991; Drewnowski et al. 1992). Por outro lado, morfina, um agonista opioide, é capaz de aumentar a frequência de disparo de neurônios dopaminérgicos mesolímbicos no VTA, confirmando a influência do sistema opioide sobre o sistema dopaminérgico (Matthews e German 1984; Sclafani e Ackroff 2003).

De forma geral, é possível concluir que a regulação do comportamento alimentar humano envolve um sistema complexo, havendo interação entre o SNC e periferia (por meio de hormônios). Além disso, fatores psicológicos e ambientais não podem ser deixados de lado, pois também exercem um papel fundamental sobre esse parâmetro.

2.3 Modelos de Dietas Hipercalóricas em Roedores

Nos últimos anos, dietas hipercalóricas ou hiperlipídicas vêm sendo utilizadas para indução da obesidade em roedores (Macedo et al. 2015; Damanaki et al. 2018). Esses modelos animais possuem semelhanças às respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos (Rosini et al. 2012). A ingestão de alimentos hipercalóricos em ratos também é capaz de induzir comorbidades associadas à obesidade, mimetizando o que ocorre em humanos (Dobrian et al. 2000; Petry et al. 2000, 2000; Nascimento et al. 2008).

A capacidade do alimento palatável em alterar os níveis de interleucinas pró-inflamatórias, como a interleucina 6, já foi descrita em estudos (Zeeni et al 2015; Collins et al. 2016; Vaidya et al. 2017). A leptina é uma adipocina secretada por adipócitos maduros, que é capaz de regular a produção de citocinas pró-inflamatórias (Paz-Filho et al. 2012). Esse hormônio regula o comportamento alimentar e o metabolismo energético, e suas concentrações circulantes se correlacionam diretamente com o conteúdo de gordura corporal (Zhang et al. 1994; Frederich et al. 1995).

Para aplicação do modelo de indução de obesidade por meio da dieta hipercalórica é

desejável que o número de animais por caixa não seja superior a quatro, e se a estrutura do biotério permitir, o aumento da temperatura ambiente e do ciclo escuro também podem facilitar a obtenção do resultado. Isso porque o aumento da temperatura ambiente diminui o gasto energético que o animal necessitaria para manter sua temperatura corporal, gerando um balanço energético positivo. Além disso, o aumento no ciclo escuro favorece a ingestão de alimentos, já que roedores são mais ativos durante esse ciclo (Rosini et al. 2012). A idade do animal no início do protocolo experimental é outro fator que pode influenciar no ganho de peso: animais jovens apresentam metabolismo que favorece o ganho de massa magra. Por este motivo, animais mais velhos (em torno de 100 dias de idade) são mais utilizados para aplicar o modelo de indução de obesidade utilizando dietas hipercalóricas (Tschöp e Heiman 2001; Rosini et al. 2012).

A composição da dieta varia de acordo com o estudo. Alguns autores utilizam a dieta de cafeteria, composta basicamente por *wafler*, bolachas recheadas, salsichas, salgadinhos, leite condensado e refrigerante (de Oliveira et al. 2014; Oliveira et al. 2015). Porém, há estudos que adaptam a dieta de cafeteria e utilizam outros alimentos, como: bacon, salame, manteiga, queijo, patê e batata frita (de Schepper et al. 1998; López et al. 2003). Dietas hipercalóricas citadas na literatura incluem a utilização de alimentos como: amendoim, chocolate, biscoito de milho ou amido, leite condensado, sacarose, batata frita, macarrão instantâneo, queijo ralado e *wafler* (Naderali et al. 2001; Burneiko et al. 2006; de Moraes et al. 2007, 2008; Nascimento et al. 2008; Zambon et al. 2009). Enquanto que em dietas hiperlipídicas são adicionadas maiores concentrações de gorduras, por meio da utilização de óleo de soja, amendoim ou banha de porco (Estadella et al. 2004; Guerra et al. 2007; da Silva et al. 2010).

De qualquer forma, independentemente dos alimentos que fazem parte da dieta, a composição da dieta hipercalórica ofertada aos animais deve apresentar quantidades de

calorias superiores à ração padrão “controle”. Há no mercado rações hipercalóricas padronizadas como a “WESTERN RD” fabricada pela empresa *Special Diets Services* (Saint Gratien/França), composta por 21,4 % de lipídeos, 17,5 % proteínas e 50 % carboidratos, totalizando 4,6 g/kcal. Essa dieta vem sendo utilizada em alguns estudos pré-clínicos (Auberval et al. 2014; Lozano et al. 2016).

O leite condensado, um dos alimentos utilizados nas dietas hipercalóricas, é composto por leite integral, açúcar e lactose, sendo composto 55% por carboidratos, 13% por lipídeos, 5% por proteínas e 0,1% por sódio. Vinte gramas (20g) de leite condensado equivalem a 3,3 kcal/g. Como sua composição é semelhante à dieta de cafeteria (que inclui vários alimentos) e apresenta valor energético cerca de 14% superior à ração padrão “controle” (**Tabela 1**), este produto parece ser uma alternativa de oferta de alimentação hipercalórica aos animais por meio de um único alimento.

Ração Padrão (Nuvilab CR-1)	Leite Condensado
4,5 % lipídios	13% lipídios
22% proteínas	5 % proteínas
55% carboidratos	55% carboidratos
Total: 2,9 kcal/g	Total: 3,3 kcal/g

Tabela 1. Comparação entre a composição nutricional da ração padrão Nuvilab e o leite condensado.

Estudos utilizando apenas o leite condensado como alimento palatável e hipercalórico vêm sendo realizados nos últimos anos (Hume et al. 2016, 2017; Marshall et al. 2017; Matzeu et al. 2017) e apresentam resultados promissores como alternativa à dieta de cafeteria, dado sua fácil manipulação e praticidade. Sendo assim, nesse estudo os animais foram expostos após o desmame à dieta hipercalórica composta somente por leite

condensado.

2.4 Parâmetros de Desenvolvimento Ponderais

A obesidade caracteriza-se por ser uma doença crônica, abrangendo fatores sociais, comportamentais, ambientais, culturais, psicológicos, metabólicos e genéticos. É definida pelo acúmulo de gordura corporal resultante do desequilíbrio energético prolongado, que pode ser causado pelo excesso de consumo de calorias e/ou inatividade física (WHO 2000; HHS 2000).

Fatores ambientais e de estilo de vida, como hábitos alimentares inadequados e sedentarismo, levam a um balanço energético positivo favorecendo o surgimento de sobrepeso e obesidade (HHS 2001; WHO 2015).

O excesso de peso corporal pode ser estimado por diferentes métodos, como pregas cutâneas e relação cintura-quadril. Entretanto, devido a simplicidade de execução, baixo custo e correlação com a gordura corporal, o índice de massa corporal (IMC) é amplamente utilizado e aceito para estudos epidemiológicos em humanos (**Figura 3**) (Anjos 1992; Andrade et al. 2003). Valores de IMC acima de 25,0 kg/m² indicam excesso de peso, valores de 25,0 kg/m² a 29,9 kg/m² correspondem a sobrepeso e valores de IMC ≥ 30,0 kg/m² caracterizam obesidade (NIH 1998). Porém essa metodologia apresenta limitações, já que esse indicador pode superestimar a gordura em indivíduos musculosos e subestimar gordura corporal de pessoas que tiveram redução da massa muscular.

$$\frac{\text{Peso (kg)}}{\text{Altura} \times \text{Altura (m)}}$$

Figura 3. Fórmula para cálculo do índice de massa corporal (IMC).

Em animais, especialmente em roedores, é possível estimar o IMC calculado em humanos por meio do índice de Lee. Esse parâmetro é calculado baseado na razão da raiz cúbica do peso corporal (g), sobre o comprimento nasoanal (cm) do animal, multiplicado por 100 para obtenção do cálculo em porcentagem (**Figura 4**) (Moura et al. 2008).

$$\frac{\sqrt[3]{\text{massa corporal (g)}}}{\text{Comprimento naso-anal (cm)}}$$

Figura 4. Fórmula para cálculo do índice de Lee.

Outro parâmetro ponderal que pode ser utilizado em modelos animais é a dissecação e pesagem do tecido adiposo (gordura retroperitoneal, mesentérica, subcutânea e perigonadal), relacionando com o peso corporal, obtemos o peso relativo de tecido adiposo. Esse indicador parece ser um parâmetro mais fidedigno para determinar a presença de obesidade.

2.5 Deprivação Materna em Roedores

Deprivação materna (DM) trata-se de um modelo animal de estresse precoce, que vem sendo utilizada a fim de investigar seus efeitos sobre parâmetros comportamentais, neuroendócrinos, neuroquímicos e emocionais. Animais submetidos à deprivação materna, seja por meio de um evento único ou repetitivo, apresentam alterações relacionadas a transtornos de humor, ansiedade, memória ou até mesmo motivação para adição de drogas (Millstein e Holmes 2007; Martini e Valverde 2012; Fuentes et al. 2014; Bian et al. 2015; Gracia-Rubio et al. 2016; Wearick-Silva et al. 2017). Além disso, nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que ratos submetidos a DM nos primeiros 10 dias de vida apresentam hipersensibilidade em testes térmicos nociceptivos, atraso em testes de desenvolvimento neuromotor (como na geotaxia negativa) e aumento nos níveis de NGF em córtex e tronco cerebral (de Oliveira et al. 2017).

O modelo de DM varia de acordo com o estudo: há trabalhos em que os animais são privados do cuidado materno por 3 a 6 horas/dia nos primeiros 10 dias de vida (MacQueen et al. 2003; Romeo et al. 2003; Venerosi et al. 2003; Parfitt et al. 2004; Benetti et al. 2007; Kikusui et al. 2009; Mello et al. 2009; de Oliveira et al. 2017) ou por apenas 10-15 minutos/dia (Cabib et al. 1993; D'Amato et al. 1998, 1999; Moles et al. 2004; Craft et al. 2006); além de protocolos onde os animais são submetidos a uma única separação de 24 horas do cuidado materno dentro das duas primeiras semanas de vida (Schmidt et al. 2002; Macrì and Laviola 2004; Schmidt et al. 2005; Martini e Valverde 2012).

Apesar das variações dos tempos em que os filhotes são privados do cuidado materno, todas as metodologias são aplicadas nas primeiras duas semanas pós-natal. Nesse período inicial da vida, os animais apresentam resposta adrenal ao estresse mínima ou inexistente, resultando em níveis baixos estáveis de glicocorticóides circulantes, conhecido como “período hiporresponsivo ao estresse” (Levine 2002). Sabe-se, porém, que a deprivação materna nessa fase é capaz de alterar o eixo HHA desses animais, alterando os níveis de glicocorticóides, causando alterações comportamentais e neuroquímicas ao longo da vida (Lee et al. 2001; Huot et al. 2004; Plotsky et al. 2005; Aisa et al. 2009; Amini-Khoei et al. 2015), incluindo aumento do comportamento do tipo ansioso (Renard et al. 2005, 2007).

A nocicepção também é influenciada pela deprivação materna (Iijima e Chaki 2005; Dickinson et al. 2009). Eventos estressantes no início da vida causam alterações sob a regulação do sistema endógeno opiórdérgico (Troisi et al. 2012). Estudos também demonstram que a DM é capaz de reduzir o limiar de dor dos animais (Bernardi et al. 1986; Kwok et al. 2014). Em contrapartida, estressores, como a DM, podem contribuir para o aumento do limiar nociceptivo, devido ao estabelecimento de um fenômeno conhecido por “analgesia induzida pelo estresse” (AIS) (Butler and Finn 2009). Esse fenômeno pode estar

relacionado a ativação da via nociceptiva inibitória descendente e pela inibição da transmissão ascendente da informação nociceptiva (Butler and Finn 2009). Além disto, ratos adultos privados do cuidado materno no início da vida demonstram alterações estruturais em nível central, devido ao aumento na apoptose neuronal e redução no número de neurônios hipocâmpais (Huot et al. 2004; Mirescu et al. 2004). A capacidade da DM em alterar a resposta nociceptiva pode ser decorrente do estresse no início da vida causar mudanças duradouras no desenvolvimento de sistemas somatossensoriais e de dor (Schwaller and Fitzgerald 2014). O sistema nervoso imaturo em humanos e roedores é altamente responsivo à estimulação tátil e nociva nesse período podendo causar alterações duradouras na nocicepção (Schwaller and Fitzgerald 2014).

Portanto, conforme o exposto, o modelo de DM em animais mimetiza uma exposição precoce a um evento estressante e permite a investigar alterações neuroquímicas e comportamentais acarretadas por esse estressor ao longo da vida do animal.

2.6 Avaliação do Comportamento Exploratório e do Tipo Ansioso

Um dos métodos de avaliação comportamental mais utilizado é o teste do campo aberto (CA), publicado por Hall and Ballachey (1932), sendo o primeiro teste a monitorar comportamentos do tipo ansioso, exploratório e emocional em ratos (Sestakova et al. 2013). Atualmente existe uma grande variabilidade nas metodologias empregadas nos estudos, variando desde o formato da arena de campo aberto (quadrado, retangular ou circular) (**Figura 5**), cor, iluminação e o modo de registro (Sestakova et al. 2013). Esse teste vem sendo empregado em muitos estudos para investigar o comportamento de roedores sob a influência de vários fatores (Sestakova et al. 2013) e animais de diferentes espécies (como ratos espontaneamente hipertensos (SHR), Wistar-Kyoto (WKY), Brown Noruega e Wistar Furth) e de gêneros distintos, podem apresentar comportamento locomotor e exploratório

diferenciado frente ao aparato (Ramos et al. 1997; Sestakova et al. 2013).

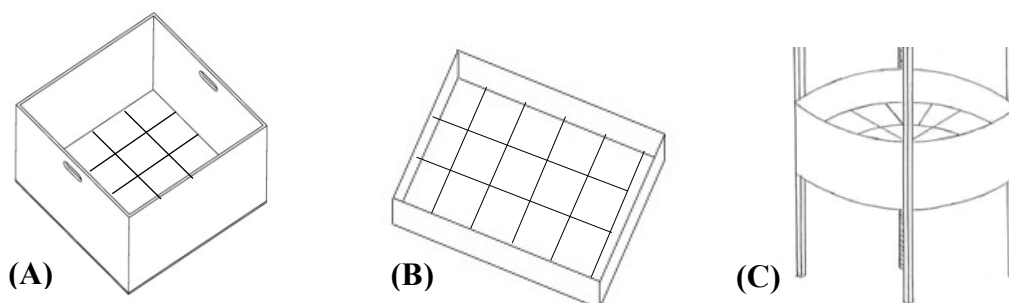


Figura 5. Desenho esquemático das arenas de Campo Aberto (CA). (A) arena quadrada; (B) arena retangular; (C) arena circular. (fonte: a autora)

No âmbito experimental, o teste do CA continua sendo empregado para a avaliação do comportamento exploratório de ratos expostos a eventos estressantes, incluindo à deprivação materna neonatal (Aya-Ramos et al. 2017; Xu et al. 2018). Assim como, esse instrumento é empregado em investigações que buscam avaliar a atividade locomotora e exploratória de animais expostos a alimentos palatáveis (MacKay et al. 2017; Lockie et al. 2017).

Uma importante ferramenta utilizada em investigações pré-clínicas validada para medir o comportamento do tipo ansioso é o teste do labirinto em cruz elevado (*Elevated Plus-Maze-EPM*) (Schmitt e Hiemke 1998). Esse aparato apresenta formato de cruz e elevado do chão, constituído por dois braços com paredes (fechados) e dois braços com plataformas abertas (braços abertos) (**Figura 6**). Como o aparato apresenta um conflito de motivação para explorar os braços abertos contra a motivação de permanecer seguro nos braços fechados, acredita-se que a proporção de tempo que um animal gasta em um *versus* o outro, seja capaz de indicar o nível de ansiedade do animal (Doremus-Fitzwater et al. 2009).

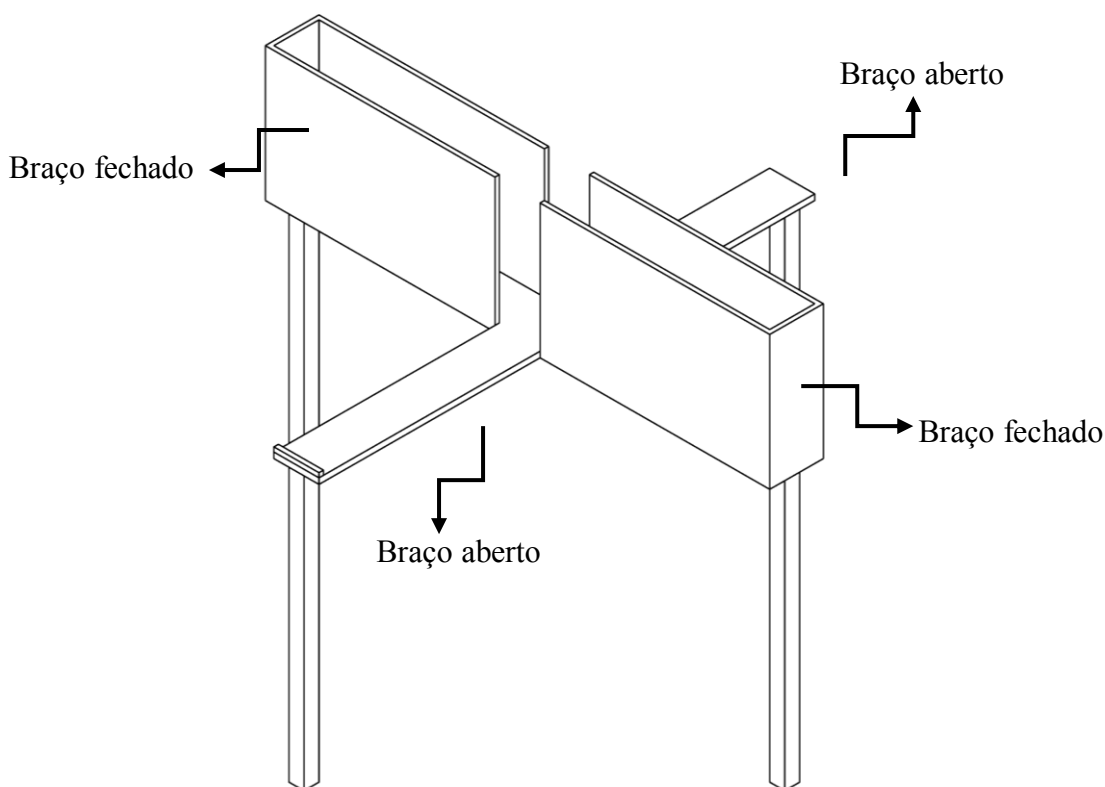


Figura 6. Desenho esquemático do aparato de *Elevated Plus-Maze* (EPM). (fonte: a autora)

O teste de EPM, hoje amplamente utilizado nos estudos em animais, foi aplicado primariamente para observação de efeitos ansiolíticos de fármacos (Handley and Mithani 1984; Pellow et al.1985). Porém seu emprego se estendeu para a compreensão das bases biológicas da emocionalidade, aprendizagem e memória emocional; além de modelos de ansiedade generalizada, fobia e estresse pós-traumático (Adamec et al., 1998; Bannerman et al., 2004; Carobreza e Bertogliob, 2005).

Os efeitos da deprivação materna em roedores sob o comportamento do tipo ansioso têm sido avaliados pelo teste de EPM (Cao et al. 2016; Wang et al. 2017), assim como os possíveis efeitos ansiolíticos da exposição a alimentos palatáveis (Rabasa et al. 2016; Kim et al. 2017). O aumento no tempo de permanência nos braços abertos em animais deprivados, que representa uma medida confiável de ansiedade, já foi demonstrado por Weiss et al.

2011, sugerindo um efeito ansiolítico da DM. Nesse sentido, outros estudos também demonstraram que a exposição a eventos estressantes no início da vida induziu efeitos ansiolíticos (Farkas et al. 2009; Xiong et al. 2014; Zhang et al. 2014).

Tento em vista a importância e emprego dos testes de CA e EPM, essas ferramentas foram utilizadas em nosso estudo a fim de avaliar os possíveis efeitos sob a atividade locomotora/exploratória e comportamento do tipo ansioso nos animais submetidos à deprivação materna neonatal e/ou expostos à dieta hipercalórica após o desmame.

2.7 Biomarcadores

Os biomarcadores são ferramentas para a confirmação de diagnóstico, identificação de gravidade e evolução de doenças, além da efetividade da intervenção proposta. Podem ser encontrados na periferia ou centralmente e suas dosagens, em grande parte, são de fácil e rápida execução (Mayeux 2004).

Dentre os biomarcadores, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), neurotrofina amplamente expressa em várias estruturas do SNC, estando presente em elevados níveis em hipocampo (Davies 1994), tem tido sua ação neuromoduladora avaliada em processos de aprendizado, memória, depressão e dependência química (Grimm et al. 2003; McGough et al. 2004; Filip et al. 2006). Essa neurotrofina possui ação em receptores de tirosina quinase B (Adachi et al. 2014) e exerce um importante papel sob a regulação da plasticidade sináptica, crescimento e sobrevivência neuronal (Huang e Reichardt 2001; Teixeira et al. 2010).

Tem sido descrito um aumento dos níveis BDNF nos dendritos apicais (CA1) em neurônios piramidais em cultura de cortes hipocámpais de ratos no período pós-natal (Tyler e Pozzo-Miller 2001, 2003). E, situações estressantes no início da vida, como a DM, é capaz de alterar a expressão de BDNF hipocámpal (Daskalakis et al. 2015). Além disto, repetidas

exposições a períodos de DM diminuem a expressão dessa neurotrofina em hipocampo de ratos adultos, demonstrando efeitos em longo prazo da DM (MacQueen et al. 2003; Aisa et al. 2009; Solas et al. 2010).

Outra relevante neurotrofina essencial para o desenvolvimento, sobrevivência e diferenciação dos neurônios é o fator de crescimento neural (NGF). Assim como o BDNF, níveis alterados dessa neurotrofina são encontrados em animais submetidos ao modelo de DM, especialmente no hipocampo, hipotálamo e córtex cerebral (Cirulli et al. 2000; Roceri et al. 2004; Cirulli et al. 2007). De modo geral, esses resultados indicam que, especialmente em protocolos longos de exposição a DM, modificações na relação mãe-filhote podem alterar a expressão de NGF em várias regiões do encéfalo, não sendo restrito somente à zona hipocampal (Cirulli et al. 2000).

Outros importantes biomarcadores, como as citocinas, são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis, produzidas por diferentes tipos de células do sistema imune por meio da ativação de proteinoquinas ativadas por mitógenos (Oliveira et al. 2011). Na maioria das vezes são formadas em cascata, isto é, uma citocina estimula suas células-alvo a produzir mais citocinas (Zhang e An 2007). Essas substâncias influenciam atividade, diferenciação, proliferação e sobrevivência de células imunológicas. Assim como, regulam a produção e a atividade de outras citocinas, podendo causar aumento (pró-inflamatórias) ou redução (antiinflamatórias) da resposta inflamatória (Oliveira et al. 2011).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e a interleucina 6 (IL-6) são exemplos de citocinas imunomodulatórias do tipo pró-inflamatória. O TNF α age diretamente no adipócito regulando acúmulo de gordura e interferindo diretamente em diversos processos dependentes de insulina, além de inibir a lipogênese e estimular a lipólise (Sethi e Hotamisligil 1999; Fonseca-Alaniz et al. 2006). A expressão e secreção dessa citocina estão

elevadas em animais e humanos obesos, correlacionada positivamente com aumento do volume de adipócitos (Fonseca-Alaniz et al. 2006). Já IL-6, assim como TNF α , é secretada por monócitos e adipócitos, e é capaz de promover a lipólise, independentemente da modulação de catecolaminas, glucagon e insulina. Embora esteja expressa em indivíduos normoponderais, seus níveis estão comumente mais elevados na obesidade, como ocorre com o TNF α (Fonseca-Alaniz et al. 2006).

A exposição à DM pode influenciar nas respostas do sistema imune (Loram et al. 2011; Painsipp et al. 2011). Fator estressante, como a DM neonatal, é capaz de elevar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , em hipocampo e córtex pré-frontal (Pinheiro et al. 2015). Além disso, outros estudos em modelos animais demonstraram que a exposição ao estresse psicossocial, como a derrota social, ocasionou aumento nos níveis plasmáticos de interleucinas pró-inflamatórias, como a IL-6, em córtex pré-frontal e hipocampo de ratos (Audet et al. 2010, 2011; Sukoff Rizzo et al. 2012).

Já dentre as citocinas com ação antiinflamatória, destaca-se a interleucina 10 (IL-10). Ela é capaz de inibir citocinas pró-inflamatórias e estimular a produção endógena de outras citocinas antiinflamatórias (Oliveira et al. 2011). Resultados dos efeitos da DM sobre essa interleucina são controversos: níveis elevados de IL-10 são encontrados no hipocampo de animais expostos ao modelo (Pinheiro et al. 2015), enquanto que Réus et al. (2017) demonstraram redução nos níveis de IL-10 no soro e em estruturas cerebrais na infância, adolescência e idade adulta (P20, P30, P40 e P60) de ratos que sofreram DM neonatal.

De modo geral, é possível verificar que fatores estressantes no início da vida, como a DM, é capaz de alterar a produção e liberação de citocinas envolvidas no sistema imune. Isso, por sua vez, pode contribuir para desregulação do eixo HHA e promover alterações no processo de plasticidade neural, incluindo redução do suporte neurotrófico e prejuízo da

neurogênese (Gracia-Rubio et al. 2016). A liberação dessas substâncias também está relacionada a quadros de sobrepeso e obesidade. Devido à sua importância, dosagens desses biomarcadores em diferentes estruturas cerebrais foram realizadas nesse trabalho, a fim de investigar os efeitos da deprivação materna neonatal e da exposição ao alimento palatável durante a infância/adolescência de ratos Wistar machos e fêmeas.

2.8 Diferenças entre Gêneros

A maioria dos estudos pré-clínicos utiliza apenas animais machos em suas investigações. Isso porque se acredita que os ciclos hormonais das fêmeas podem causar variabilidade e ser um viés nos resultados dos estudos (Rohden 2008). Por exemplo, no que diz respeito aos níveis de citocinas pró-inflamatórias, já foi demonstrado que os hormônios sexuais podem exercer um papel fundamental na sua síntese: as fases do ciclo ovariano podem modificar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que a produção de TNF- α aumenta durante a fase lútea (baixo estrogênio) e reduz com a fase folicular (alto estrogênio) (Bouman et al. 2005; Fish 2008).

Porém, a fim de trazer maior translacionalidade aos estudos pré-clínicos, nos últimos anos, pesquisas utilizando fêmeas vêm sendo incentivadas. De fato, estudos têm utilizado animais machos e fêmeas em suas investigações e comparando as diferenças nos resultados obtidos, quando existentes, entre os gêneros (Jaimes-Hoy et al. 2016; Mela et al. 2016; Aya-Ramos et al. 2017). Pesquisas utilizando-se o modelo de DM, por exemplo, comparando resultados obtidos em animais machos com fêmeas, observaram que animais machos que sofreram DM neonatal apresentaram aumento da glicose sanguínea e hiperatividade após serem expostos a soluções de sacarose e aspartame de P26 a P50 (Aya-Ramos et al. 2017). Outros estudos, utilizando DM em machos em fêmeas, também apenas encontraram diferenças nos desfechos investigados em animais machos (Derks et al. 2016; Lundberg et

al. 2017).

Em vista disso, esse estudo buscou avaliar além dos os efeitos da DM neonatal e da exposição à dieta hipercalórica (leite condensado) após o desmame de ratos Wistar, o efeito do gênero (sexo) sobre os parâmetros avaliados.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

3 JUSTIFICATIVA

Esse estudo busca avaliar o efeito da deprivação materna no período neonatal e/ou exposição à dieta hipercalórica após o desmame sobre parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos machos e fêmeas *Wistar* adultos jovens. Além disso, investigações com ratos machos e fêmeas, como o que foi desenvolvido nesse estudo, são escassos na literatura. Adicionalmente, espera-se contribuir com um melhor entendimento da relação da exposição à deprivação neonatal e à dieta hipercalórica na infância e alterações neuroquímicas e comportamentais no início da idade adulta, e demonstrar as diferentes respostas de acordo com gênero às intervenções propostas, trazendo maior translacionalidade para os estudos pré-clínicos.

4 HIPÓTESE

Ratos machos e fêmeas *Wistar*, adultos jovens, submetidos à deprivação materna neonatal e/ou exposição à dieta hipercalórica após desmame, desenvolvem alterações neuromotoras, ponderais, comportamentais e neuroquímicas no início da vida adulta, podendo essas alterações serem distintas entre machos e fêmeas.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

OBJETIVOS

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Essa dissertação teve como objetivo geral submeter ratos machos e fêmeas *Wistar* à deprivação materna no período neonatal e/ou exposição à dieta hipercalórica após o desmame e avaliar os efeitos destas intervenções sobre parâmetros de desenvolvimento neuromotor, comportamentais, ponderais e neuroquímicos em ratos adultos jovens.

5.2 Objetivos específicos

Verificar os efeitos da deprivação materna no período neonatal e/ou exposição à dieta hipercalórica após o desmame em ratos adultos jovens machos e fêmeas sobre:

- padrões de reflexos iniciais por meio dos testes de geotaxia negativa e endireitamento postural em P8 a P20;
- parâmetros ponderais por meio do índice de Lee e peso de tecido adiposo relativo em P44;
- a atividade nociceptiva por meio da medida da resposta ao estímulo térmico nocivo (placa quente e *Tail-Flick*) em P21 e P43;
- a atividade exploratória e locomotora por meio do teste do Campo Aberto (*Open Field*) em P20 e P42;
- o comportamento do tipo ansioso por meio do teste do labirinto em cruz elevado (*Elevated Plus-Maze*) em P20 e P42;
- os níveis dos marcadores neuroquímicos BDNF, NGF-1, citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) em córtex, hipocampo e hipotálamo em P44.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

PARTE II

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

ARTIGOS CIENTÍFICOS

7.1 ARTIGO I

“Maternal Deprivation Alters Neuromotor Reflex, Anxiety-Like Behavior and Nociception in a Gender Dependent Manner in Rats”

Periódico: Revista Behavioural Brain Research

Situação: Submetido

**MATERNAL DEPRIVATION ALTERS NEUROMOTOR REFLEX,
ANXIETY-LIKE BEHAVIOR AND NOCICEPTION
IN A GENDER DEPENDENT MANNER IN RATS**

Roberta Ströher^{1,3}, Carla de Oliveira^{3,4}, Bettega da Costa Lopes^{3,5}, Lisiane Santos da Silva^{3,4},
Gabriela Gregory Regner^{1,3}, Helouise Richardt Medeiros^{3,4}, Isabel Cristina de Macedo^{3,6},
Wolnei Caumo⁴, Iraci LS Torres^{1,2,3,4,5*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

²Departamento de Farmacologia - Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

³Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-clínicas - Departamento de Farmacologia - ICBS - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

⁶Universidade Federal do Pampa. São Gabriel, RS, Brasil.

***CORRESPONDENCE ADDRESS:**

Iraci Lucena da Silva Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.
Rua Sarmento Leite, 500 sala 237.
90050-170 - Porto Alegre, RS, Brasil.
Phone: 55 (51) 3308 3183.
Email: iltorres@hcpa.edu.br

ABSTRACT

Maternal deprivation (MD) is a potent stressor during development and it can trigger long-lasting neurobiological alterations. We aimed to investigate early and long-term effects of MD and gender on neuromotor reflexes (righting reflex and negative geotaxis tests), behavior (open field and elevated plus-maze tests) and thermal nociceptive responses (hot plate and tail-flick tests). Animals submitted to MD showed a delayed reflex response at P8 in the negative geotaxis test. Open field test at P20 showed effect of gender in outer crossings and grooming, and interaction between gender x MD in latency. Elevated plus-maze test at P20, effect of MD was found in open and closed arms and effect of gender in protected head-dipping and non-protected head-dipping. At P42, effect of gender was found in latency and interaction between gender x MD in rearing. Effect of MD was found at P21 in hot plate test, where deprived animals showed an analgesic behavior. At the same age, deprived females also presented higher thermal thresholds in tail-flick test. When applied at P43, deprived male rats presented lower thermal thresholds, characterizing hyperalgesia. Maternal deprivation altered thermal thresholds according to the time after exposure to this stressor, short time induced analgesia while long time hyperalgesia (in a gender specific-manner). Future investigations evaluating the role of HPA axis and sexual hormones (estrogen, for exemple) over animals submitted to MD should be carried out in order to elucidate the mechanisms of this intervention and perform translational studies.

Keywords: analgesia; development; female; male; maternal separation; rodent.

1 INTRODUCTION

Environmental alterations during the neonatal period seem to play a fundamental role in the establishment of neurobiological factors controlling behavior and stress responsiveness (Marco et al. 2009). In relation of postnatal stressor events, it is well known that postnatal maternal deprivation is one of the most potent stressors during development, and it can trigger long-lasting neurobiological effects (Fuentes et al. 2014; Gracia-Rubio et al. 2016; de Oliveira et al. 2017). Studies have documented that the appearance of effects by maternal deprivation is highly age-dependent (Lehmann et al. 2002; Loi et al. 2014). However, there are scarce data regarding possible sex-dependent effects of an adverse neonatal episode such as maternal deprivation.

Maternal stress during pregnancy, like stressors after birth, can affect the correct development of the offspring (Relier 2001; Weinstock 2008; Charil et al.2010).Among postnatal stressors in rats, early maternal deprivation has been studied for years, and it is used to investigate the effects of stress on offspring's behavior and physiology (Aguggia et al. 2013). Commonly, offspring exposed to alterations on mother–pup interaction shows long-lasting modifications on behavior and developmental parameters (Pryce and Feldon 2003). It is important to note that long-lasting functional and structural modifications induced by postnatal stress (Kaufman et al. 2000) occur in several levels of developmental, such as growth (Kuhn and Schanberg 1998), regulatory systems maturation (Ladd et al. 2000), and learning process (McEwen 2001).

In this way, postnatal maternal deprivation is considered as an early life stressor and has been shown to have lasting effects as nociceptive response, since rats' nociceptive system matures during the first three postnatal weeks (Bernardi et al. 1986; Kwok et al. 2014; Amini-Khoei et al. 2015). It is well documented that animals or

humans submitted to stressors exhibit higher pain thresholds (Butler and Finn 2009; al'Absi et al. 2013). The establishment of this phenomenon known as stress-induced analgesia (SIA) may be by the activation of the descending inhibitory pain pathway and also inhibiting the ascending transmission of nociceptive information (Butler and Finn 2009).

Stressors at neonatal period also may affect animals' locomotor activity and anxiety-like behavior (Kikusui and Mori 2009). Studies using rodents showed an anxiogenic effect of maternal deprivation (Huot et al. 2001; Romeo et al. 2003; Rentesi et al. 2010; Li et al. 2013), while others found the opposite effect (Farkas et al. 2009; Xiong et al. 2014; Zhang et al. 2014). In humans, adults who experienced childhood parental loss exhibit sensitized response to stress and increased risk of depression and anxiety (Harris et al. 1986; Agid et al. 1999; Tyrka et al. 2008).

In addition, the majority of animal studies evaluate the relation of stressors only in male rats (Kikusui and Mori 2009). Besides that, investigations of differences in the neuromotor reflexes, behavior and nociceptive responses between males and females rats subjected to maternal deprivation in early life have never been approached. In this way, we aimed to investigate early and long-term effects of maternal deprivation on neuromotor reflexes, nociceptive and behavior responses, considering in all assessments the possible effect of gender.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

A total of 64 Wistar pup rats (32 males / 32 females) were utilized in this study. They were kept in polypropylene cages (49 × 34 × 16 cm), with the floor covered in sawdust, with their mothers, maintained on a standard 12h dark/light cycle, in a

temperature-controlled environment (22 ± 2 °C), and had access to water and food, *ad libitum*. At birth, pups were standardized according to Silveira et al. (2010; 2011), with minor modifications, containing 8 pups per dam (4 males and 4 females). Importantly, assessing the development of offspring during lactation is the current procedure of adjusting litter in the first days of birth, in order to homogenize nutritional conditions for all pups (Tanaka 2004). All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (GPPG/HCPA protocol N° 160558), and conducted in compliance with Brazilian laws (Brazil 2008; MCTI 2013a; MCTI 2013b). As also, complied with the National Centre for the Replacement Refinement & Reduction of Animals in Research (NC3Rs) and National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023 revised 1978). The animals' husbandry followed Law No. 11794 (Brazil), which regulates the scientific use of animals. Vigorous attempts were made to minimize animal suffering, and decrease external sources of pain and discomfort, as well as to use the minimum number of animals required to produce reliable scientific data.

2.2 Maternal Deprivation

From post-natal day 1 (P1), litters were deprived of their mother for 3h daily for the first 10 days of life (Benetti et al. 2009). Deprivation consisted in removing the mother from the home cage. Four animals per litter were submitted to the maternal deprivation protocol. Pups were maintained in the original home cage, and grouped in a nest in the presence of maternal odor; they were transferred to a different room where the temperature was maintained at 30–32 °C to compensate for the mother's body heat (Renard et al. 2005). Non-deprived rats remained undisturbed in the home cage with their mothers. Deprivation was carried out between 09:00 a.m. and 12:00 p.m. The first bedding was changed only on P11 both the groups (non-deprived and deprived rats).

2.3 Experimental design

Animals were divided into 2 groups: control group (C), in which pups did not receive any intervention (n= 16 males / 16 females); and maternal deprivation group (MD), in which pups were subjected to maternal deprivation (n= 16 males / 16 females) (Figure 1 – Panel A). Neurobehavioral testing was performed in a blinded manner, and tests were always performed at the same time, each day (14:00 h). Righting reflex (P8 to P10), negative geotaxis (P8, P10, P14, P16, P18 and P20) were the tests chosen to evaluate postural parameters as an index of neuromotor reflexes. At P20, right before the weaning, the rats were exposed to the open field apparatus to evaluate locomotor and exploratory activity, and anxiety-like behavior was evaluated in a plus-maze. At P21, animals' nociceptive responses were evaluated by hot plate and tail-flick tests. To evaluate maternal deprivation long effects, open field and plus-maze tests were performed at P42 and hot plate and tail-flick tests at P43. (Figure 1 – Panel B).

INSERT FIGURE 1-PANELS A AND B

2.4 Neuromotor reflexes

2.4.1 Righting reflex

The righting reflex test was applied to evaluate pups' neurological reflexes. It was performed from P8 to P10. Pups were placed in a supine position, and the latency time to turn over their longitudinal axis to restore a normal prone position was measured. This was considered fully achieved when the pups turned 180° around their longitudinal axis, and their four paws were in contact with the plane surface within the

observed 120-s timeframe (Karalis et al. 2011; de Oliveira et al. 2017).

2.4.2 Negative geotaxis

The negative geotaxis test evaluated pups' vestibular function and proprioception. It was carried out at P8, P10, P14, P16, P18 and P20. Pups were placed on a 35-cm-long inclined platform (45° slope), facing downwards. The latency time to turn around 180° to face upwards, and climb up the board with their forepaws reaching the upper edge of the board was measured. The results of the test were considered negative if the pups did not succeed this task in 120s (Horvath et al. 2013; de Oliveira et al. 2017).

2.5. Exploratory behavior and general activity measurements

2.5.1 Open Field Test (OFT)

The OFT was used to evaluate the locomotor activity and anxious behavior state of the rats at P20 and P42. The open field apparatus test was a varnished wood cage (60 cm x 40 cm x 50 cm) with a glass front wall. The floor was covered with linoleum and divided by dark lines into 12 squares of 13 x 13 cm each. Rats were gently placed one at a time in the left back corner and allowed to explore the apparatus for 5 min (Bianchin et al. 1993; Carlini et al. 2002). The following behaviors were evaluated: latency time (in seconds) to leave the first quadrant (Britton and Britton 1981; Lister 1990), number of outer and inner crossings (Roesler et al. 1999), number of rearing behaviors (Silveira et al. 2005) and grooming (time in seconds) (Spruijt et al. 1992). After each evaluation, the apparatus was cleaned with 70% alcohol to remove any animal scent.

2.6 Anxiety-like behavior assessments

2.6.1 Elevated Plus-Maze Test (EPM)

The EPM was used to evaluate anxiety-like behavioral state at P20 and P42. The apparatus was elevated to a height 50 cm above floor level, with two open arms and two closed arms (50 cm x 40 cm x 10 cm), which extended from a common central platform (10 cm x 10 cm). Animals were placed one at a time in the central area of the EPM, facing one of the closed arms, allowed to explore surroundings for 5 minutes. The following behavioral measures were evaluated: number of protected and non-protected head-dipping movements (PHD and NPHD, respectively), time spent in open and closed arms (in seconds), time of grooming (in seconds) and number of rearings. Then, as in OFT, the apparatus was cleaned with 70% alcohol to remove any animal scent.

2.7 Nociceptives responses

2.7.1 Hot Plate Test (HP)

HP was performed at P21 and P43. This test is used as an indicator of the supraspinal pain process (Ossipov et al. 1995) and thermal hyperalgesia evaluation. Twenty-four hours before the test, animals were habituated to the apparatus for 5 min, avoiding the analgesia induced by novelty (Netto et al. 1987). The licking or jumping responses are considered to be the result of supraspinal sensory integration (Caggiula et al. 1995; Rubinstein et al. 1996). The temperature of the plate was 55 ± 0.1 °C. Animals were placed in glass funnels on the heated surface, and the time (s) between placement of the rat and the first response (foot licking, jumping, or rapid removing of paws) was recorded as the latency of nociceptive response. A cutoff time of 20 seconds was used to avoid tissue damage (Woolfe and Macdonald 1944).

2.7.2 Tail-Flick Test (TFL)

Rats were tested for evaluated the nociceptive response using the TFL at P21

and P43. Each animal was placed on the apparatus and its tail was laid across a nichrome wire coil that was then heated using an electric current. The equipment was calibrated to obtain three consecutive baseline tail-flick latencies between 3s and 5s. If at any time the animal failed to flick its tail before the temperature reached 75°C, the tail was removed from the coil to prevent damage to the skin (a cut-off time of 10s was used to avoid tissue damage). The groove system for the tail and the adjustment of response sensitivity ensure optimum repeatability and reliability of results. Three tail-flick latency baselines were taken at 3 min intervals. The animals were exposed to the tail-flick apparatus to acclimate to the procedure 24h prior to the test session because the novelty of the apparatus can itself induce antinociception. This test was chosen because it has been related to supra-spinal activation (Castilho et al. 2002).

2.8 Statistical analysis

Neuromotor reflexes tests were analyzed using repeated measures ANOVA. To highlight negative geotaxis test result at P8, two-way ANOVA was performed. Open field and elevated plus-maze tests were evaluated using multivariate analysis (MANOVA). The nociceptive behavioral tests were evaluated using two way ANOVA. To confirm effect of maternal deprivation inside the gender, one-way ANOVA/SNK was performed. Results were considered statistically significant if $P \leq 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The SPSS 20.0 program was used for all statistical analysis and for the confirmation of outliers animals, which were excluded from the study.

3 RESULTS

3.1 Neuromotor Reflexes

3.1.1 Righting Reflex

At P8, P9 and P10 pups were subjected to righting reflex tests. Only effect of age was found (repeated measure ANOVA, $F_{(2,60)}=102.53$; $P<0.05$). There were not effects of maternal deprivation or gender in this test, only animals' improvement overtime along of the evaluations, showing the developmental (growth) effect (Figure 1).

INSERT FIGURE 2 – PANEL A

3.1.2 Negative Geotaxis

At P8, P10, P14, P16, P18 and P20 pups were subjected to negative geotaxis tests. Effect of age was presented, showing the developmental (growth) effect, as also interaction between age x maternal deprivation (repeated measure ANOVA, $F_{(5,60)}=116.35$; $F_{(5,60)}=3.64$, respectively, $P<0.05$) (Figure 2). Maternal deprived animals showed a delayed reflex response at the first day of the experiment (P8), which can be better seen in the highlighted image at Figure 2-Panel B (two-way ANOVA, $F_{(1,60)}=5.05$, $P<0.05$).

INSERT FIGURE 2 – PANEL B

3.2 Exploratory behavior and general activity measurements

3.2.1 Open Field Test (OFT)

In the OFT at P20, the analysis of data showed effect of gender in outer crossings and grooming (MANOVA, $F_{(1,60)}=13.39$; $F_{(1,60)}=6.138$, respectively, $P<0.05$).

Interaction between gender x maternal deprivation was found in latency (MANOVA, $F_{(1,60)}= 4.93$, $P<0.05$). (Table 1 – Panel A). There were not effects of maternal deprivation or gender in the OFT at P42 (MANOVA, $P>0.05$). (Table 1-Panel B).

INSERT TABLE 1 – PANELS A AND B

3.3 Anxiety-like behavior assessments

3.3.1 Elevated Plus-Maze (EPM) Test

In the EPM test at P20, the effect of maternal deprivation was found in open and closed arms (MANOVA, $F_{(1,60)}= 4.10$; $F_{(1,60)}= 4.05$, respectively, $P<0.05$). Effect of gender was presented in PHD and NPHD (MANOVA, $F_{(1,60)}= 3.93$; $F_{(1,60)}= 6.75$, respectively, $P<0.05$) (Table 2 – Panel A). At P42, effect of gender was found in the latency (MANOVA, $F_{(1,28)}=6.01$, $P<0.05$), and there was interaction between gender x maternal deprivation in rearing (MANOVA, $F_{(1,28)}= 4.40$, $P<0.05$) (Table 2 – Panel B).

INSERT TABLE 2 – PANELS A AND B

3.4 Nociceptives responses

3.4.1 Hot Plate Test (HP)

In HP test at P21 was found a maternal deprivation effect (two-way ANOVA, $F_{(1,60)}=10.25$, $P<0.05$). Maternal deprived animals showed higher thermal thresholds comparing to control group (one-way ANOVA, $F_{(1,30)}= 6.65$ (males); $F_{(1,30)}= 3.97$ (females), $P\leq 0.05$) (Figure 4-Panel A). There were not effects of gender or maternal

deprivation in this test at P43 (two-way ANOVA, $P > 0.05$) (Figure 3- Panel B).

INSERT FIGURE 3 –PANELS A AND B

3.4.2 Tail-flick test (TFL)

At P21 animals were subjected to TFL and the effect of maternal deprivation was found (two-way ANOVA, $F_{(1,22)} = 10.25$, $P < 0.05$). Maternal deprived female rats presented higher thermal thresholds (one-way ANOVA, $F_{(1,12)} = 11.79$, $P < 0.05$) (Figure 3-Panel C). At P43, there was effect of maternal deprivation (two-way ANOVA, $F_{(1,28)} = 11.25$, $P < 0.05$). Maternal deprived male rats showed lower thermal latency thresholds (one-way ANOVA, $F_{(1,14)} = 10.17$, $P < 0.05$) (Figure 3- Panel D).

INSERT FIGURE 3 - PANELS C AND D

4 DISCUSSION

This study showed the maternal deprivation effect in the neuromotor reflexes tests only at the first day of negative geotaxis performance, indexed by a delayed response. The negative geotaxis reflex is necessary for rodents' to be able to adapt to the environment (Golan and Huleihel 2006), and it is related to vestibular and proprioceptive functions (Motz and Alberts 2005). On the other hand, the righting reflex test is mediated beyond motor neurons, vestibular pathways, spinal inter neurons and proprioceptive afferents (Bignall 1974; Bose et al. 1998). As observed through the negative geotaxis assessment in this study, and suggested by our group previously

results (de Oliveira et al. 2017), maternal deprivation may trigger a developmental delay, affecting negatively rats' brain development.

In exploratory behavior assessment at P20, effect of gender was presented in outer crossings and grooming. Female rats presented an increase in locomotor activity, indexed by higher number of outer crossings; whereas male rats spent higher time in grooming behavior, reflecting possible emotional alterations mediated by dopaminergic mechanisms (Chesher and Jackson 1980; Magaji et al. 2017). Higher intensity of exploration in females may be important from the evolutionary perspective, as potential mothers, they should get more familiarized with the unknown environment than males, as to secure a quiet course of pregnancy, delivery and care of offspring (Dubovicky et al. 1999). Interaction between gender x maternal deprivation was found in latency. Deprived females presented higher latency time to leave the first quadrant, observing the opposite for males. Other studies also noticed divergent responses between genders to early-life stress exposure (Jaworska et al. 2018; Aya-Ramos et al. 2017). Despite there are other ways to evaluate anxiety, too long latency time to leave the first quadrant, as observed in deprived females, can suggest anxiety-like behavior (Andersen and Tufik 2015). We did not observe effects of maternal deprivation or gender at P42. In this way, we suggest that gender *per se* can increase exploratory behavior to a novel environment in females, and increase grooming behavior in males at P20. Maternal deprivation suggested anxiety-like behavior in gender-specific manner, increasing time latency in females and reducing in males. These alterations provoked by gender and maternal deprivation did not persist until P42.

Concerning about anxiety-like behavior evaluation at P20, maternal deprived animals presented more anxiolytic-like behaviors. This result was indexed by more time spent in open arms at EMP test, and consequently, less time in closed arms. Our result

corroborates previous study that showed that deprived male animals presented increase in time spent in the open arms compared to no-deprived (Weiss et al. 2011). In fact, anxiolytic effect induced by stressors early life exposure has been reported in others studies (Farkas et al. 2009; Xiong et al. 2014; Zhang et al. 2014). In addition, at this same age, effect of gender was presented in PHD and NPHD, showing that male animals had lower numbers of PHD and higher NPHD movements, which can be related to exploratory behavior, risk assessment and anxiety-like behaviors (Sorregotti et al. 2018). When animals were submitted to EPM test at P42, female rats showed lower latency time to start exploring the apparatus. Also, in this same age, there was interaction between gender x maternal deprivation in rearing behavior. It was observed an increase the number of rearing in deprived males and opposite effect in females. Rearing is related to exploratory behavior (Pellow et al. 1985), therefore, maternal deprivation increased males' exploratory activity and reduced this behavior in females, suggesting that this intervention altered animals' exploratory behavior in a gender-dependent manner.

In relation to nociceptive response, there was effect of maternal deprivation in HP test only at P21. The maternal deprived animals presented higher thermal thresholds, demonstrating an analgesic effect induced by this intervention. This same response was found in TFL at P21, but only for female rats. The TFL evaluates phasic pain, a short-duration nociceptive thermal stimulus related to nociceptive threshold, and it is applied in a minimal surface. It involves the stimulation of A δ fibers (Le Bars 2001), which are known to be present at birth (P0). On the other hand, HP test involves tonic pain, a long-duration stimulus triggering a nociceptive response mainly involving C-fibers (Le Bars 2001). These fibers are still undergoing maturation during the first three weeks of life (Fitzgerald 2005). In this period, there is an increase in the number

of C-fibers connecting to the spinal cord and a gradual decrease in the number of A δ fibers. Therefore, in the first three weeks of life, both fiber populations take up the same space in the spinal cord (Fitzgerald 2005). TFL involves reflex descending supraspinal inhibitory control that travels through the dorsolateral funiculus (Necker and Hellon 1978). This control plays a significant modulatory role, which is accentuated by the stimuli of the heat intensity, and by visual and auditory cues provided during the test (King et al. 1997). In addition, the TFL latency can be altered according to the tail and room temperature (Berge et al. 1988). All of our experiments were performed in a temperature-controlled environment ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), with high coil temperatures (up to 75°C) and avoiding any visual or auditory cues, hence making our observations reliable. It is important highlight that descending inhibitory modulation becomes apparent between the 15th (Guy and Abbott 1992; Weber et al. 1977) and the 21st postnatal days (Van Praag and Frenk 1991) due to the delay in receptors maturation in the dorsal horn, and the time-dependent myelination of A δ fibers (involved with thermal sensitivity) (Fitzgerald 1991). So, in according with growing of rats the receptors reach to maturity and A δ fibers, become myelinated, it promotes faster conduction velocities and nociceptive response. Although conduction speed of this type of fibers increases with the increased age due to myelination (Fitzgerald 1991), such increment in the conduction velocities is not necessarily correlated with the withdrawal behavior latency assessed in the hot plate test. In neonates and young rats there is a lack of keratin in paws skin as well as high penetration of nerve fiber in the epidermis (Fitzgerald 1966), leaving neuronal terminals and non-neuronal cells more exposed to the plate thermal insult. Thus, HP test evaluates supraspinally-integrated responses, represented by the behavior of paw licking and jumping, while the TFL test is more related to spinal reflex (Le Bars et al. 2001). In this way, these results suggest that the maternal deprivation

may alter supraspinally and spinal pain pathways, principally after a short-time exposure to the stressor (at P21).

The maternal deprivation ability to alter nociceptive response may be for the reason that pain and injury in early life can cause lasting changes to developing somatosensory and pain systems. The immature nervous system in both humans and rodents is highly responsive to tactile and noxious stimulation at this period (Schwaller and Fitzgerald 2014). The dorsal horn of the spinal cord in the newborn rat is characterized by large cutaneous mechanoreceptive fields, a predominance of A-fibre synaptic inputs, and diffuse primary afferent A-fibre projections, all of which are gradually reduced and refined over the first postnatal weeks (Beggs et al. 2002). The C-fiber-evoked activity matures after the first postnatal week, and from P10, repetitive C-fiber stimulation produces a classical “*wind-up*” (Fitzgerald and Beggs 2001). *Wind up* refers to the progressive increase in the magnitude of C-fiber evoked responses of dorsal horn neurons produced by repetitive activation of C-fibers (Li et al. 1999). Also, stressors may contribute to the SIA development, by the activation of the descending inhibitory pain pathway and inhibiting the ascending transmission of nociceptive information (Butler and Finn 2009). In this way, we propose that maternal deprivation was able to reduce the wind-up classical scenario produced by repetitive activation of C-fibers and to supply SIA establishment, altering animals’ nociception at P21 promoting an analgesic episode. So far, this is the first study showing analgesic effect in this early-stress animal model.

The TFL test at P43 showed that maternal deprivation caused the opposite effect found at P21 reducing male animals’ thermal thresholds. This hyperalgesic effect of maternal deprivation was found in male rats, as already reported to some studies (Bernardi et al. 1986; Kwok et al. 2014; Yasuda et al. 2016). Early-life stressful events

can result in dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which regulates the stress response (Heim et al. 2001). Maternal deprivation can lead to lifelong HPA axis dysfunction, resulting in increased corticosterone serum levels, and its increase has been related to decrease in the nociceptive threshold (Kim et al. 2008; Marais et al. 2008; Esquivel et al. 2009). Even though corticosterone levels were not measured in our study, we can suggest that male rats hyperalgesia presented at P43 may be related to the HPA axis dysfunction, due to the already known long-term effects of maternal deprivation over this axis.

5 CONCLUSION

Maternal deprivation, an early life stressor, may trigger a developmental delay, affecting brain maturing. In a short time (P21), this intervention surprisingly promoted thermal analgesia, while following a long time after MD exposure (P43), it promoted hyperalgesia in male rats, possibly due to the HPA axis dysfunction. It also altered animals' exploratory behavior in a gender-dependent manner. In this manner, we presume that future investigations evaluating the role of HPA axis and sexual hormones (estrogen, for example) over animals submitted to maternal deprivation could elucidate the mechanisms of this early-life stress animal model. Besides that, we suggest that is important to include male and females in researches to be able to perform translational studies.

Acknowledgements

This research was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Dr. ILS Torres; GG Regner); Brazilian Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES (R Ströher); CAPES/PNPD (de Oliveira, C); Graduate

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG (ILS Torres – Grant 160558).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- al'Absi M, Nakajima M, Grabowski J. Stress response dysregulation and stress-induced analgesia in nicotine dependent men and women. *Biol Psychol.* 2013 Apr;93(1):1–8.
- Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B. Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Mol. Psychiatry*, 4 (1999), pp. 163-172
- Aguggia JP, Suárez MM, Rivarola MA. Early maternal separation: Neurobehavioral consequences in mother rats. *Behav Brain Res.* 2013 Jul 1;248:25–31.
- Amini-Khoei H, Amiri S, Shirzadian A, Haj-Mirzaian A, Alijanpour S, Rahimi-Balaei M, et al. Experiencing neonatal maternal separation increased the seizure threshold in adult male mice: Involvement of the opioid system. *Epilepsy Behav EB.* 2015 Nov;52(Pt A):37–41.
- Andersen ML, Tufik S. *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research.* Springer. 2015. doi:10.1007/978-3-319-11578-8.
- Aya-Ramos L, Contreras-Vargas C, Rico JL, Dueñas Z. Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food Funct.* 2017 Jul 19;8(7):2592–600.
- Beggs S, Torsney C, Drew LJ, Fitzgerald M. The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-dependent process. *Eur. J. Neurosci* 2002; 16: 1249–1258.
- Benetti F, Mello PB, Bonini JS, Monteiro S, Cammarota M, Izquierdo I. Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci.* 2009 Feb;27(1):59–64.
- Berge OG, Garcia-Cabrera I, Hole K . Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci Lett.* 1988, 86:284-288.
- Bernardi M, Genedani S, Tagliavini S, Bertolini A. Effects on long-term sensitivity to pain and morphine of stress induced in the newborn rat by pain or manipulation. *Physiol Behav.* 1986;37(5):827–31.
- Bianchin M, Walz R, Ruschel AC, Zanatta MS, Da Silva RC, e Silva MB, et al. Memory expression is blocked by the infusion of CNQX into the hippocampus and/or the amygdala up to 20 days after training. *Behav Neural Biol.* 1993 Mar 1;59(2):83–6.
- Bignall KE. Ontogeny of levels of neural organization: the righting reflex as a model. *Exp Neurol.* 1974 Mar;42(3):566–73.
- Bose P, Fielding R, Ameis KM, Vacca-Galloway LL. A novel behavioral method to detect motoneuron disease in Wobbler mice aged three to seven days old. *Brain Res.* 1998 Dec 7;813(2):334–42.
- Brazil, 2008. Brazil. Lei 11794- Procedimentos para o uso científico de animais. 2008. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm.
- Britton DR, Britton KT. A sensitive open field measure of anxiolytic drug activity. *Pharmacol*

Biochem Behav. 1981 Oct 1;15(4):577–82.

Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. Prog Neurobiol. 2009 Jul;88(3):184–202.

Caggiula R, Epstein LH, Perkins KA, Saylor S. Different methods of assessing nicotine-induced antinociception may engage different neural mechanisms. Psychopharmacology. 1995; 122(3): 301–306.

Carlini VP, Monzón ME, Varas MM, Cragolini AB, Schiöth HB, Scimonelli TN, et al. Ghrelin increases anxiety-like behavior and memory retention in rats. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Dec 20;299(5):739–43.

Castilho V, Macedo C, Brandão M. Role of benzodiazepine and serotonergic mechanisms in conditioned freezing and antinociception using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray as unconditioned stimulus in rats. Psychopharmacology (Berl). 2002 Dec 1;165(1):77–85.

Charil A, Laplante DP, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. Brain Res Rev. 2010 Oct 5;65(1):56–79.

Chesher GB, Jackson DM. Post-swim grooming in mice inhibited by dopamine receptor antagonists and by cannabinoids. Pharmacol Biochem Behav. 1980, 13(3):479–481.

de Oliveira C, Scarabelot VL, Vercelino R, Silveira NP, Adachi LNS, Regner GG, et al. Morphine exposure and maternal deprivation during the early postnatal period alter neuromotor development and nerve growth factor levels. Int J Dev Neurosci. 2017 Dec;63:8–15.

Dubovicky M, Skultetyova I and Jezova D. Neonatal stress alters habituation of exploratory behavior in adult male but not female rats. Pharmacol Biochem Behav. 1999;64: 681–686.

Esquivel BB, Levin G, Rivarola MA, Suarez MM. 2009. Maternal separation and lesion of adtn alters anxiety and adrenal activity in male rats. Int J Neurosci. 119(9):1319–1336.

Farkas J, Reglodi D, Gaszner B, Szogyi D, Horvath G, Lubics A, et al. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. Brain Res Bull. 2009 May 29;79(3):208–14.

Fuentes, S, Daviu, N, Gagliano, H, Garrido, P, Zelena, D, Monasterio, N, Armario, A, Nadal, R. Sex-dependent effects of an early life treatment in rats that increases maternal care: vulnerability or resilience? Front. Behav. Neurosci. 2014, 8, 56.

Fitzgerald M. Development of pain mechanisms. Br Med Bull. 1991 Jul;47(3):667-75.

Fitzgerald M. The development of nociceptive circuits. Nat Rev Neurosci. 2005; 6:507–520.

Fitzgerald MJT. Perinatal changes in epidermal innervation in rat and mouse. J Comp Neurol. 1966, 126:37-41.

Fitzgerald M, Beggs S. The neurobiology of pain: developmental aspects. Neuroscientist. 2001 Jun;7(3):246-57.

Gracia-Rubio, I, Moscoso-Castro, M, Pozo, OJ, Marcos, J, Nadal, R, Valverde, O. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2016, 65, 104–117.

Golan H, Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. Dev Sci. 2006 Jul;9(4):338–49.

- Guy ER, Abbott FV. The behavioral response to formalin in preweanling rats. *Pain*. 1992, 51:81–90.
- Harris T, Brown GW, Bifulco A. Loss of parent in childhood and adult psychiatric disorder: the role of lack of adequate parental care. *Psychol. Med.*, 16 (1986), pp. 641–659.
- Heim C, Newport DJ, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse. *Am J Psychiatr.* 2001;158:575–581.
- Horvath G, Reglodi D, Vadasz G, Farkas J, Kiss P. Exposure to Enriched Environment Decreases Neurobehavioral Deficits Induced by Neonatal Glutamate Toxicity. *Int J Mol Sci.* 2013 Sep 16;14(9):19054–66.
- Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl)*. 2001 Dec;158(4):366–73.
- Jaworska N, Dwyer SM, Rusak B. Repeated neonatal separation results in different neurochemical and behavioral changes in adult male and female Mongolian gerbils. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008 Feb 1;88(4):533–41.
- Karalis F, Soubasi V, Georgiou T, Nakas CT, Simeonidou C, Guiba-Tziampiri O, et al. Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain. *Brain Res.* 2011 Nov 24;1425:98–110.
- Kaufman J, Plotsky PM, Nemeroff CB, Charney DS. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. *Biol Psychiatry* 2000;48:778/90.
- Kim YS, Lee MY, Choi CS, Sohn YW, Park BR, Choi MG, Nah YH, Choi SC. The effect of chronic variable stress on bowel habit and adrenal function in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23(12):1840–1846.
- King TE, Joynes RL, Grau JW. Tail-flick test: II. The role of supraspinal systems and avoidance learning. *Behav Neurosci.* 1997, 111:754–767.
- Kikusui T, Mori Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. *J Neuroendocrinol.* 2009 Mar;21(4):427–31.
- Kuhn CM, Schanberg SM. Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *Int J Dev Neurosci* 1998;16:261/70.
- Kwok CHT, Devonshire IM, Bennett AJ, Hathway GJ. Postnatal maturation of endogenous opioid systems within the periaqueductal grey and spinal dorsal horn of the rat. *Pain.* 2014 Jan;155(1):168–78.
- Ladd CO, Huot RL, Thirivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Prog Brain Res* 2000;122:81/103.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001, 53:597–652.
- Lehmann J, Russig H, Feldon J, Pryce CR. Effect of a single maternal separation at different pup ages on the corticosterone stress response in adult and aged rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2002; 73: 141±145.

- Li J, Simone DA, Larson AA. Wind up leads to characteristics of central sensitization. *Pain*. 1999 Jan;79(1):75-82.
- Li M, Xue X, Shao S, Shao F, Wang W. Cognitive, emotional and neurochemical effects of repeated maternal separation in adolescent rats. *Brain Res*. 2013 Jun 26;1518:82-90. doi: 10.1016/j.brainres.2013.04.026.
- Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther*. 1990 Jan 1;46(3):321-40.
- Loi M, Koricka S, Lucassen PJ, Joëls M. Age- and sex-dependent effects of early life stress on hippocampal neurogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; 5: 1±11.
- Magaji MG, Iniaghe LO, Abolarin M, Abdullahi OI, Magaji RA. Neurobehavioural evaluation of resveratrol in murine models of anxiety and schizophrenia. *Metab Brain Dis*. 2017 Apr;32(2):437-442. doi: 10.1007/s11011-016-9927-6.
- Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM. Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res*. 2008; 61(1):106-112.
- Marco EM, Adriani W, Llorente R, Laviola G, Viveros MP. Detrimental psycho-physiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009 Apr;33(4):498-507.
- McEwen BS. Stress, sex, hippocampal plasticity: relevance to psychiatric disorders. *Clin Neurosci Res* 2001;1:19/34.
- MCTI, 2013a. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, CONCEA, (2013a). Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. Portaria n. 465, de 23 de Maio de 2013. http://www.mct.gov.br/upd_blob/0226/226494.pdf, Brasília-DF, Brasil, p. 50.
- MCTI, 2013b. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, CONCEA, (2013b). Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. Portaria n. 596, de 25 de Junho de 2013. <http://www.mct.gov.br/updblob/0226/226746.pdf>, Brasília-DF, Brasil, p. 54.
- Motz BA, Alberts JR. The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicol Teratol*. 2005 Jul 1;27(4):529-33.
- Necker R, Hellon RF. Noxious thermal input from the rat tail: modulation by descending inhibitory influences. *Pain*. 1978, 4:231-242.
- Netto CA, Siegfried B, Izquierdo I. Analgesia induced by exposure to a novel environment in rats: effect of concurrent and post-training stressful stimulation. *Behav. Neural Biol.*, 48 (1987), pp. 304-30.
- Ossipov MH, Kovelowski CJ, Nichols ML, Hruby, VJ, Porreca F. Characterization of supraspinal antinociceptive actions of opioid delta agonists in the rat. *Pain*, 62 (1995), pp. 287-293.
- Pellow, P. Chopin, S. E. File and M. Briley, Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 1985, 14, 149.
- Pryce CR, Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats:

- manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003 Jan 1;27(1):57–71.
- Relier JP. Influence of Maternal Stress on Fetal Behavior and Brain Development. *Biol Neonate.* 2001;79(3-4):168-71
- Renard GM, Suárez MM, Levin GM, Rivarola MA. Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *Physiol Behav.* 2005 Jun 30;85(3):363–9.
- Rentesi G, Antoniou K, Marselos M, Fotopoulos A, Alboycharali J, Konstandi M. Long-term consequences of early maternal deprivation in serotonergic activity and HPA function in adult rat. *Neurosci Lett.* 2010 Aug 9;480(1):7–11.
- Roesler R, Walz R, Quevedo J, de-Paris F, Zanata SM, Graner E, et al. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrPC. *Mol Brain Res.* 1999 Aug 25;71(2):349–53.
- Romeo RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav.* 2003 May 1;43(5):561–7.
- Rubinstein M, Mogil JS, Japón M, Chan EC, Allen RG, Low MJ. Absence of opioid stress-induced analgesia in mice lacking beta-endorphin by site-directed mutagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1966; 93(9): 3995–4000.
- Schwaller F and Fitzgerald M. The consequences of pain in early life: injury-induced plasticity in developing pain pathways. *Eur J Neurosci* 2014; 39: 344-355.
- Silveira PP, Portella AK, Clemente Z, Gamaro GD, Dalmaz C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. *Int J Dev Neurosci.* 2005 Feb 1;23(1):93–9.
- Silveira PP, Portella AK, Assis SACN, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, Peres W, Costa G, Scorza C, Quillfeldt JA, Lucion AB, Dalmaz C. Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. *Int J Dev Neurosci.* 2010 Feb;28(1):111-8. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.08.018.
- Silveira PP, Portella AK, Benetti C da S, Zugno AI, Scherer EB, Mattos CB, Wyse AT, Lucion AB, Dalmaz C, 2011. Association between Na⁺, K⁺-ATPase activity and the vulnerability/resilience to mood disorders induced by early life experience. *Neurochem Res.* 2011 Nov;36(11):2075-82. doi: 10.1007/s11064-011-0531-1.
- Sorregotti T, Cipriano AC, Cruz FC, Mascarenhas DC, Rodgers RJ, Nunes-de-Souza RL. Amygdaloid involvement in the defensive behavior of mice exposed to the open elevated plus-maze. *Behav Brain Res.* 2018 Feb 15;338:159-165. doi: 10.1016/j.bbr.2017.10.022.
- Spruijt BM, van Hooff JA, Gispen WH. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol Rev.* 1992 Jul;72(3):825–52.
- Tanaka T. The relationships between litter size, offspring weight and behavioral development in laboratory mice. *Mamm Study.* 2004 Tokio 29, 147–153.
- Tyrka AR, Wier L, Price LH, Ross N, Anderson GM, Wilkinson CW, Carpenter LL. Childhood parental loss and adult hypothalamic–pituitary–adrenal function. *Biol. Psychiatry*, 2008 63;1147-1154.

- Van Praag H, Frenk H. Evidence for opiate tolerance in newborn rats. *Dev Brain Res.* 1991, 60:99-102.
- Weber RK, Buda AJ, Levene DL. General anesthesia in Eisenmenger's syndrome. *Can Med Assoc J.* 1977 Dec 17;117(12):1413-4.
- Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev.* 2008 Aug 1;32(6):1073–86.
- Weiss IC, Franklin TB, Vizi S, Mansuy IM. Inheritable Effect of Unpredictable Maternal Separation on Behavioral Responses in Mice. *Front Behav Neurosci* [Internet]. 2011 Feb 4;5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3034937/>
- Woolfe G, Macdonald AD. The Evaluation of the Analgesic Action of Pethidine Hydrochloride (demerol). *J Pharmacol Exp Ther.* 1944 Mar 1;80(3):300–7.
- Xiong G-J, Yang Y, Wang L-P, Xu L, Mao R-R. Maternal separation exaggerates spontaneous recovery of extinguished contextual fear in adult female rats. *Behav Brain Res.* 2014 Aug 1;269:75–80.
- Yasuda M, Shinoda M, Honda K, Fujita M, Kawata A, Nagashima H, Watanabe M, Shoji N, Takahashi O, Kimoto S, Iwata K. Maternal Separation Induces Orofacial Mechanical Allodynia in Adulthood. *Journal of Dental Research* 2016, Vol. 95(10) 1191–1197. DOI: 10.1177/0022034516661159.
- Zhang X, Wang B, Jin J, An S, Zeng Q, Duan Y, et al. Early deprivation reduced anxiety and enhanced memory in adult male rats. *Brain Res Bull.* 2014 Sep 1;108:44–50.

LEGENDS

Figure 1 – Experimental design illustration.

PANEL A - Study groups divisions.

PANEL B - Study timeline.

MD=maternal deprivation. HP=Hot plate test. TFL=Tail-flick test. OF=Open Field test. EMP=Elevated plus-maze test.

Figure 2 - Neuromotor reflexes results.

PANEL A - Righting reflex tests at P8, P9 and P10. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of age (repeated measure ANOVA, $F_{(2,60)}=102.530$; $P < 0.05$). $n= 16$ animals/group.

C= control group. MD= maternal deprivation group.

PANEL B - Negative Geotaxis tests at P8, P10, P14, P16, P18 and P20. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of age and interaction between age x maternal deprivation (repeated measure ANOVA, $F_{(5,60)}=116.351$; $F_{(5,60)}=3.641$, respectively $P < 0.05$). $n= 16$ animals/group.

C= control group. MD= maternal deprivation group.

Highlighted image: Maternal deprivation effect at P8 (two way ANOVA, $F_{(3,60)}=5.055$, $P<0.05$).

Figure 3–Nociceptives responses results.

PANEL A - Hot plate test at P21. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of maternal deprivation (two way ANOVA, $F_{(1,60)}=10.252$, $P<0.05$). Effect of maternal deprivation in males and females (one-way ANOVA, $F_{(1,30)}= 6.653$ (males); $F_{(1,30)}= 3.976$ (females), $P\leq 0.05$). $n= 16$ animals/group.

C= control group. MD= maternal deprivation group.

*Statistically significant difference of $P\leq 0.05$, effect of maternal deprivation.

PANEL B - Hot plate test at P43. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). No effects of maternal deprivation or gender were found (two way ANOVA, $P>0.05$). $n= 8$ animals/group.

C= control group. MD= maternal deprivation group.

PANEL C - Tail-flick test at P21. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of maternal deprivation (two way ANOVA, $F_{(1,22)}= 10.255$, $P<0.05$). Maternal deprived female rats presented higher nociceptive's thresholds (one-

way ANOVA, $F_{(1,12)} = 11.799$ $P < 0.05$). $n = 5-6$ animals/group.

C= control group. MD= maternal deprivation group

*Statistically significant difference of $P < 0.05$, effect of maternal deprivation.

PANEL D - Tail-flick test at P43. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of maternal deprivation (two way ANOVA, $F_{(1,28)} = 11.259$, $P < 0.05$). Maternal deprived male rats presented lower nociceptive's thresholds (one-way ANOVA, $F_{(1,14)} = 10.174$, $P < 0.05$). $n = 8$ animals/group.

C= control group. MD= maternal deprivation group.

LEGENDS

Table 1- Exploratory behavior and general activity results.

PANEL A - Open Field Test at P20. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of gender in outer crossings and grooming (MANOVA, $F_{(1,60)}=13.396$; $F_{(1,60)}=6.138$, respectively, $P<0.05$). Interaction between maternal deprivation and gender in latency (MANOVA, $F_{(1,60)}= 4.932$, $P<0.05$). $n=16$ animals/group.

MD= maternal deprivation group.

^aStatistically significant difference of $P < 0.05$, effect of gender in grooming.

^bStatistically significant difference of $P < 0.05$, effect of gender in outer crossings.

PANEL B - Open Field Test at P42. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). No effect of maternal deprivation or gender were found (MANOVA, $P>0.05$). $n= 8$ animals/group. MD= maternal deprivation group.

Table 2 - Anxiety-like behavior results. PANEL A -Elevated Plus-Maze Test at

P20. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of deprivation in open and closed arms (MANOVA, $F_{(1,60)}= 4.109$; $F_{(1,60)}= 4.050$, respectively, $P<0.05$). Effect of gender in PHD and NPHD (MANOVA, $F_{(1,60)}= 3.937$; $F_{(1,60)}=6.757$, respectively, $P<0.05$). $n= 16$ animals/group.

MD= maternal deprivation group. PHD=Protected head-dipping movements. NPD=Non-protected head-dipping movements.

^aStatistically significant difference of $P<0.05$, effect of maternal deprivation in open arms.

^bStatistically significant difference of $P<0.05$, effect of maternal deprivation in closed arms.

^cStatistically significant difference of $P<0.05$, effect of gender in PHD.

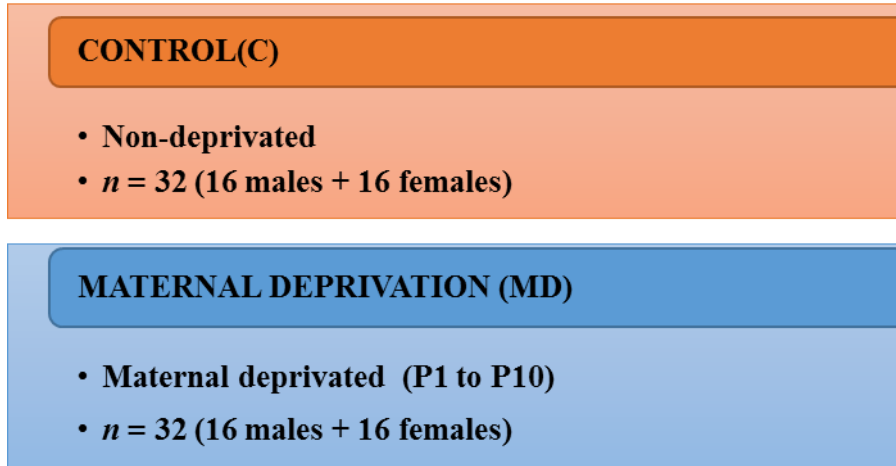
^dStatistically significant difference of $P<0.05$, effect of gender in NPHD.

PANEL B - Elevated Plus-Maze Test at P42. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of gender in latency (MANOVA, $F_{(1,28)}= 6.016$, $P<0.05$). Interaction between gender x maternal deprivation in rearing (MANOVA, $F_{(1,28)}=4.403$, $P<0.05$). $n= 8$ animals/group. MD= maternal deprivation group.

^aStatistically significant difference of $P<0.05$, effect of gender in latency.

FIGURE 1

PANEL A



PANEL B

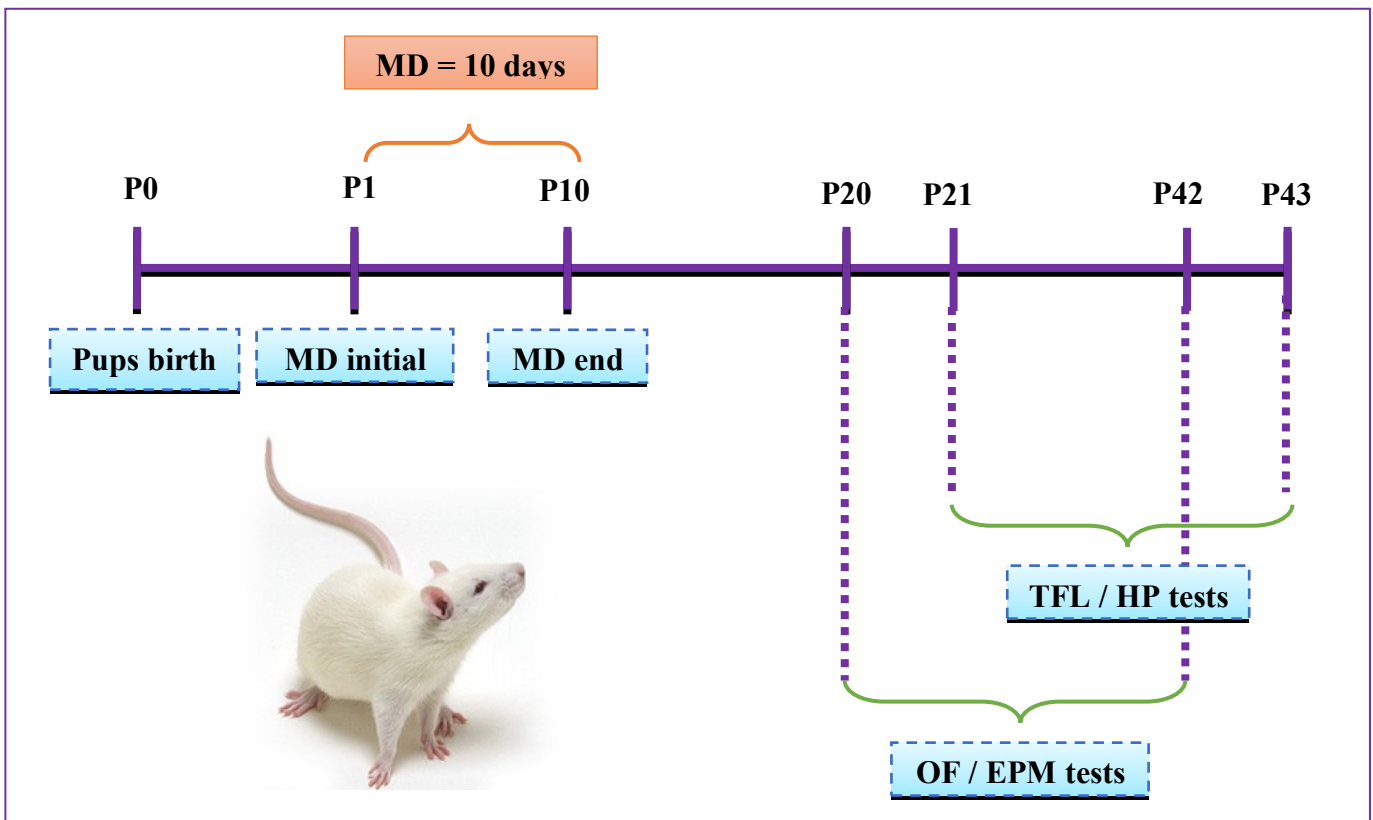


FIGURE 2

PANEL A

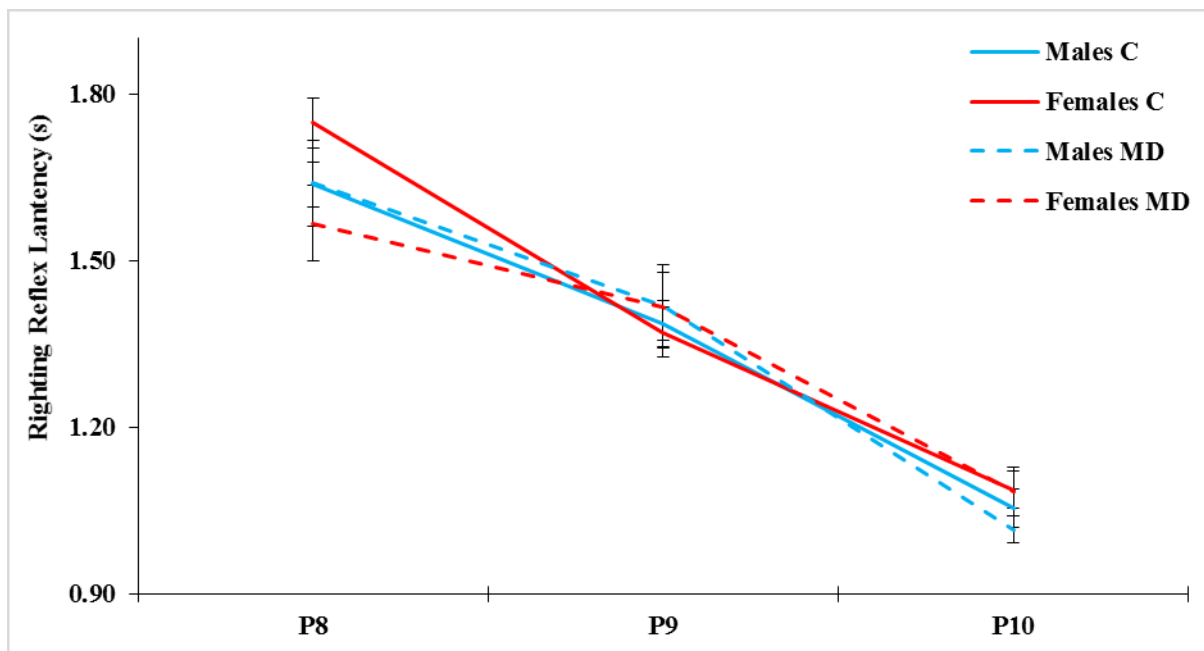


FIGURE 2

PANEL B

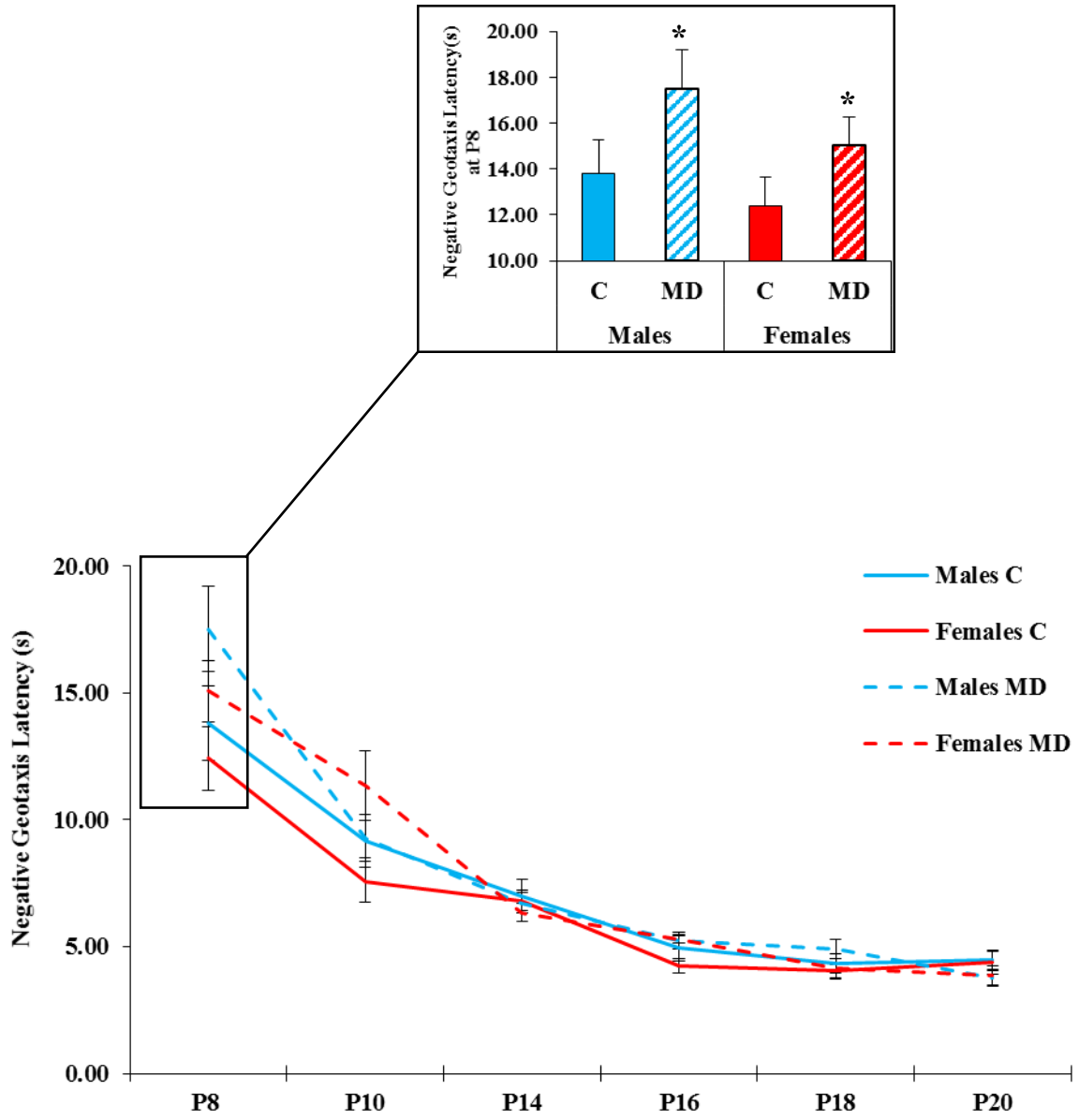
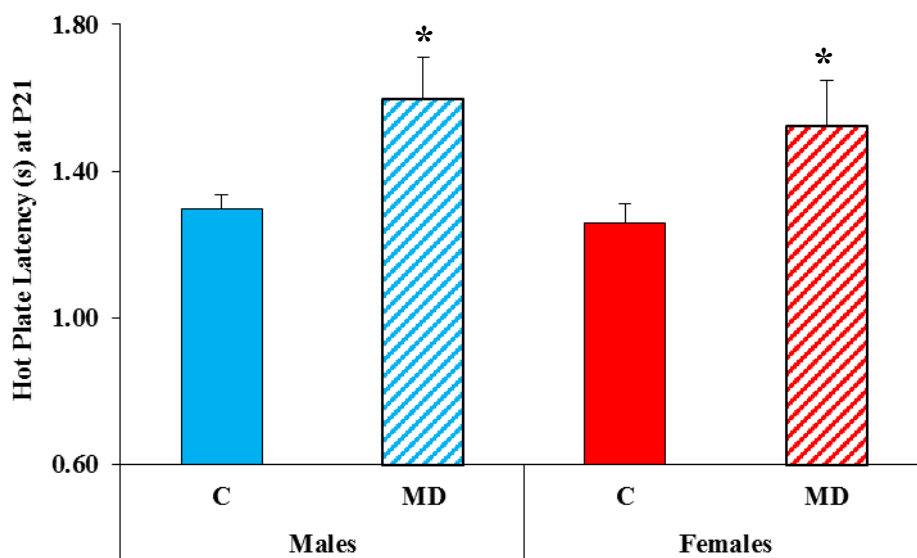


FIGURE 3

PANEL A



PANEL B

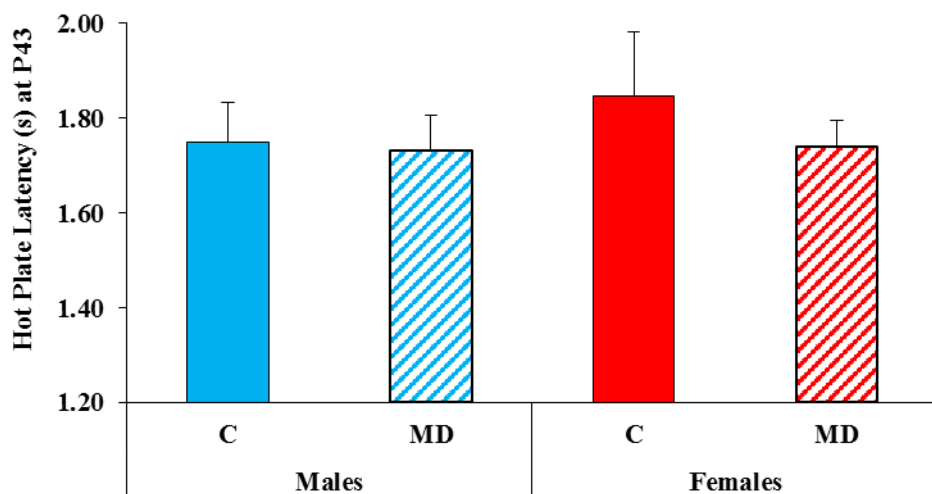
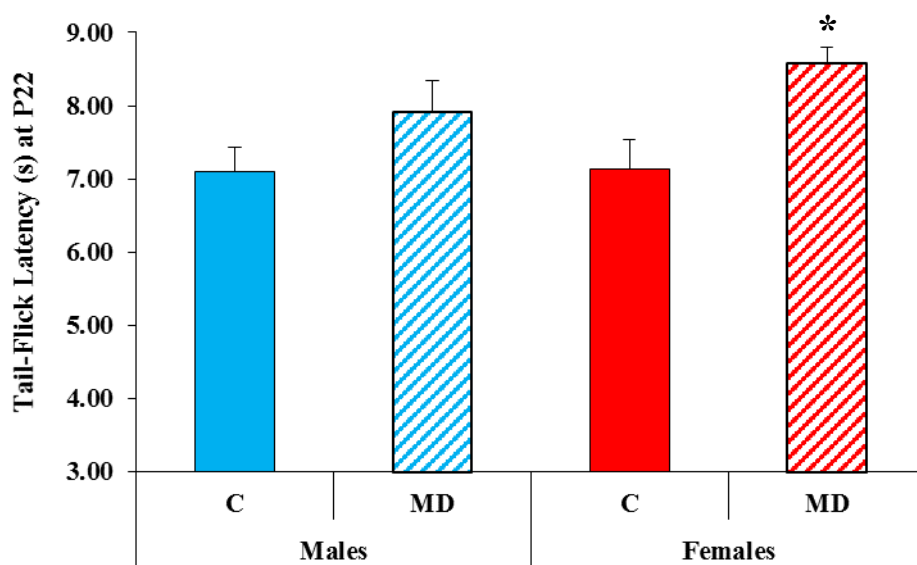


FIGURE 3

PANEL C



PANEL D

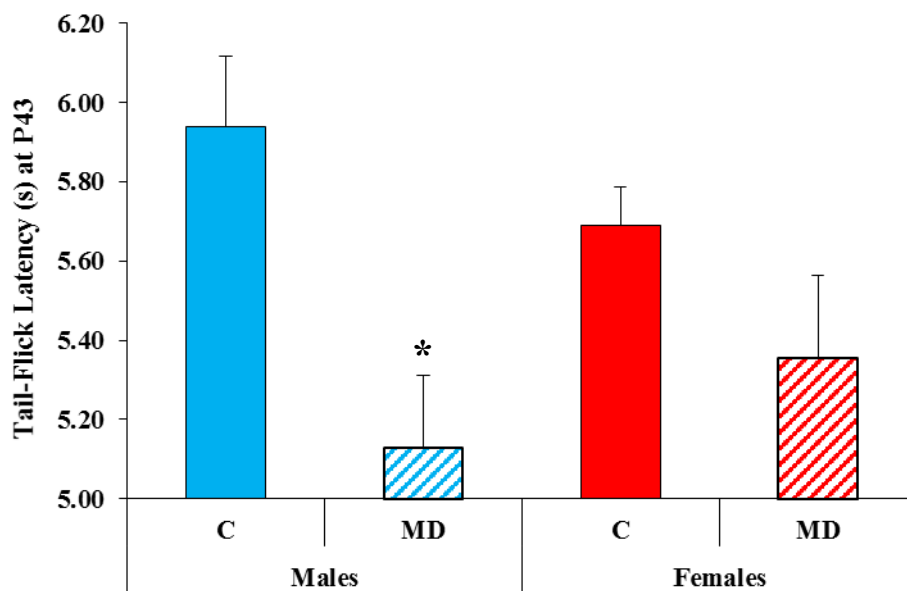


TABLE 1

PANEL A

Open Field at P20																
Gender		Latency Time			Rearing			Grooming			Inner Crossings		Outer Crossings			
Males	Control	9.06	±	1.17	20.19	±	2.12	13.49 ^a	±	1.84	3.38	±	1.03	47.93 ^b	±	4.80
	MD	5.05	±	0.43	20.75	±	2.23	11.69 ^a	±	1.73	3.06	±	0.82	46.25 ^b	±	2.93
Females	Control	6.92	±	1.26	23.69	±	2.50	9.00	±	0.84	2.44	±	0.48	65.56	±	3.66
	MD	7.78	±	1.29	20.88	±	1.34	9.15	±	0.99	3.00	±	0.56	58.13	±	4.46

PANEL B

Open Field at P42																
Gender		Latency Time			Rearing			Grooming			Inner Crossings		Outer Crossings			
Males	Control	5.87	±	0.86	45.13	±	5.46	2.01	±	0.73	7.13	±	2.02	91.25	±	13.95
	MD	4.83	±	1.24	43.88	±	4.53	1.65	±	0.85	5.75	±	1.05	88.88	±	8.14
Females	Control	4.99	±	0.56	37.75	±	2.52	2.95	±	1.36	8.38	±	1.86	84.50	±	3.31
	MD	3.76	±	0.76	40.25	±	3.65	2.17	±	0.83	7.00	±	0.73	92.13	±	8.09

TABLE 2

PANEL A

Elevated Plus-Maze at P20								
Gender		Latency Time	Rearing	Grooming	Open Arms	Closed Arms	PHD	NPHD
Male	Control	3.20 ± 0.36	19.69 ± 3.19	18.42 ± 2.46	7.76 ± 2.13	273.32 ± 6.65	0.19 ^c ± 0.10	1.13 ^d ± 0.36
	MD	2.67 ± 0.22	19.19 ± 1.00	21.54 ± 3.70	12.52 ^a ± 4.17	264.77 ^b ± 9.29	0.31 ^c ± 0.15	1.50 ^d ± 0.54
Female	Control	2.98 ± 0.37	23.81 ± 2.44	14.96 ± 1.31	1.71 ± 0.98	290.04 ± 2.58	0.44 ± 0.16	0.25 ± 0.14
	MD	3.13 ± 0.39	22.75 ± 2.68	19.68 ± 3.03	8.67 ^a ± 3.25	266.59 ^b ± 10.75	0.75 ± 0.25	0.56 ± 0.20

PANEL B

Elevated Plus-Maze at P42								
Gender		Latency Time	Rearing	Grooming	Open Arms	Closed Arms	PHD	NPHD
Male	Control	3.33 ^a ± 0.73	28.13 ± 1.03	0.38 ± 0.26	50.07 ± 20.52	222.36 ± 20.79	4.75 ± 1.01	1.88 ± 0.58
	MD	4.34 ^a ± 1.44	32.63 ± 1.74	2.46 ± 0.99	17.35 ± 6.85	264.79 ± 10.89	5.25 ± 1.22	2.13 ± 0.97
Female	Control	1.86 ± 0.37	30.38 ± 2.72	3.04 ± 1.78	18.15 ± 5.67	242.29 ± 22.09	3.13 ± 0.88	2.00 ± 0.68
	MD	1.71 ± 0.22	27.63 ± 0.68	2.37 ± 1.11	24.27 ± 11.56	255.66 ± 13.16	4.13 ± 1.25	1.75 ± 0.82

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

7.2 ARTIGO II

*Gender and Maternal Deprivation Affect Rats' Neurotrophins
and Neuroinflammatory Levels More Than Palatable Food*

Periódico: Revista Developmental Neurobiology

Situação: Submetido

**GENDER AND MATERNAL DEPRIVATION
AFFECT RATS' NEUROTROPHINS AND NEUROINFLAMMATORY LEVELS
MORE THAN PALATABLE FOOD**

Roberta Ströher^{1,2,6}, Carla de Oliveira^{2,3,6}, Isabel Cristina de Macedo^{2,4},
Andressa de Souza^{2,5,6}, Jéferson Ferraz Goularte², Bettega da Costa Lopes^{2,6},
Gabriela Gregory Regner^{1,2,6}, Lisiane Santos da Silva^{2,3,6},
Helouise Richardt Medeiros^{2,3,6}, Wolnei Caumo³, Iraci LS Torres^{1,2,3,6*}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica –Instituto de Ciências Básicas da Saúde- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

²Laboratório de Farmacologia da Dor e Neuromodulação: Investigações Pré-clínicas– Departamento de Farmacologia – ICBS – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴Universidade Federal do Pampa. São Gabriel, RS, Brazil.

⁵Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento Humano, Centro Universitário Unilasalle, Canoas, RS, Brazil.

⁶Unidade de Experimentação Animal e Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Acknowledgements

This research was supported by the following Brazilian funding agencies: National Council for Scientific and Technological Development – CNPq (Dr. ILS Torres, Dr. Wolnei Caumo); Brazilian Committee for the Development of Higher Education Personnel – CAPES (R Ströher); Graduate Research Group of Hospital de Clínicas de Porto Alegre - GPPG (ILS Torres – Grant 16-0558).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

***CORRESPONDENCE ADDRESS:**

Iraci LS Torres

Departamento de Farmacologia - ICBS, UFRGS.
Rua Sarmiento Leite, 500 sala 305.
90050-170 - Porto Alegre, RS, Brasil.
Phone: 55 (51) 3308 3183.
Email: iltorres@hcpa.edu.br

ABSTRACT

Maternal deprivation (MD) exposure in pup rodents are used to simulate human-infant early life stress, which leads in neural, hormonal and behavioral alterations, also reported in humans. Palatable food (PF) can reduce stress response, and individuals have used it as self-stress relief. This study evaluated the association of an early-life stressor and PF consumption over neuroplasticity (BDNF/NGF levels) and neuroinflammatory parameters (TNF- α , IL-6, IL-10 levels) in males and females rats submitted to MD in early life (P1-P10), and PF exposure after weaning for three weeks. Condensed milk consumption and weight parameters (weight gain, Lee Index and relative adipose tissue weight) were evaluated, observing gender different responses. PF exposure increased relative adipose tissue weight, but was not able to modify animals' weight. MD reduced hypothalamic BDNF and NGF levels, as also hippocampal TNF- α levels in male and female rats. PF only reduced hypothalamic NGF levels in both genders. Analyzing interactions found in neuroinflammatory markers, MD reduced cortical IL-10 levels whereas PF increased IL-6 levels in male rats, showing that these animals are more susceptible to the interventions applied. There were gender differences in the Lee index, BDNF, TNF- α and IL-6 levels. Female rats showed higher BDNF and IL-6 levels at hippocampus and hypothalamus, as also hypothalamic TNF- α levels. Sex hormones may have an important role for the differences found between genders in our study. There were more noticeable effects of MD than PF in the assessments applied. Investigations evaluating the role of hormones, especially estrogen, in animals submitted to MD and/or PF should be conducted in order to perform translational studies.

Key-words: BDNF, Condensed milk, IL-6, IL-10, Maternal separation, NGF, TNF.

1 INTRODUCTION

Prolonged periods of maternal deprivation (MD) exposure in pup rodents are used to simulate human-infant early life stress, which leads in neural, hormonal and behavioral alterations, also reported in humans (Kikusui and Mori 2009; Macri et al. 2011; Berman et al. 2014). Previous study of our research group showed that repeated treatment with morphine and exposure to early maternal deprivation triggered a developmental delay, negatively affecting brain development, and led to the increased risk of the occurrence of behavioral alterations (de Oliveira et al. 2017). The prolonged MD protocols result in propensity for higher ethanol consumption in adult male offspring (Nylander and Roman 2013). In addition, the exposure to this stressor during the first 2 weeks of life has been demonstrated to be able to develop depression-like and anxiety-like behaviors, as also hyperphagia throughout life in rats (Jahng 2011).

Rats that experienced neonatal maternal deprivation and had prolonged access to high palatable food during adolescence and youth had partly improvement of anxiety-related, but not depressive symptoms, possibly due to the improved function of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (Lee et al. 2014). Palatable food is able to disrupt appetite regulation, induce pleasure and activate the reward system (de Macedo et al. 2016). Condensed milk has been applied in animal studies as a palatable solution to evaluate reward pathways (Hume et al. 2016; Marshall et al. 2017; Martin-Fardon and Weiss 2017). Palatable food can also reduce stress responses (phenomenon known as “comfort eating”), and individuals have used it as self-stress relief (Dallman et al. 2003; Schellekens et al. 2013). Thus, may be interesting to evaluate the effect of the exposition to a comfort food in animals submitted to this early-life stress model.

Chronic stressful events, including early-life stress exposure, can also promote

ongoing intake of palatable foods (Machado et al. 2013). Kim et al. (2015) also verified that palatable food access during adolescence in animals submitted to an early-life stressor improved anxiety/depression-like behaviors and increased BDNF levels in the nucleus accumbens. Neurotrophins such brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and the nerve growth factor (NGF) are among the most prominent factors required in brain development and plasticity; since, they are involved in synaptic and morphological plasticity with maximal levels at times of neuronal growth, differentiation and synaptogenesis (de Thoenen 2005). Early-life stressors, as maternal deprivation, can alter these cerebral neurotrophins expressions, in different brain regions (Roceri et al. 2004; Cirulli et al. 2007; Wang et al. 2015, de Oliveira et al. 2017).

Cytokines are polypeptides or extracellular glycoproteins produced by different cells from immune system, and they are able to influence the activity, differentiation, proliferation and survival of these cells (de Oliveira et al. 2011). They regulate the production and activity of other cytokines, both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines (de Oliveira et al. 2011). Animals submitted to maternal deprivation exhibit alterations through some of these neuroinflammatory markers, including increased levels of pro-inflammatory cytokines in brain structures and serum, as interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF α) (Pinheiro et al. 2015; Réus et al. 2017). Palatable food, as hypercaloric diets, can also alter neuroinflammatory parameters (Hansen et al. 1998), and the relationship between obesity and inflammation has received extensive support across pre-clinical and clinical studies (see Kanneganti and Dixit 2012, for review).

Gender-specific responses to an intervention, as palatable food exposure or early-life stressors, have been investigated in the pre-clinical studies offering greater translationality to human's scenario (Krolowet al. 2010; Marshall et al. 2017; Cabbia et

al. 2018). Considering this, the present study evaluated the association of an early-life stressor and palatable food consumption over neuroplasticity (BDNF/NGF levels) and neuroinflammatory parameters (TNF- α , IL-6, IL-10 levels) in males and females rats submitted to MD in early life (P1-P10), and palatable food exposure after weaning (P21) for three weeks. Also, condensed milk consumption and weight parameters (as weight gain, Lee Index and relative adipose tissue weight) were evaluated.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals

A total of 64 Wistar pups (32 males / 32 females) were utilized in this study. They were kept in polypropylene cages (49 × 34 × 16 cm), with the floor covered in sawdust, with their mothers, maintained on a standard 12h dark/light cycle, in a temperature-controlled environment (22 ± 2 °C), and had access to water and food, *ad libitum*. At birth, pups were standardized according to de Oliveira et al. (2017), with minor modifications, containing 8 pups per dam (4 males and 4 females). Importantly, assessing the development of offspring during lactation is the current procedure of adjusting litter in the first days of birth, in order to homogenize nutritional conditions for all pups (Tanaka 2004). All experiments and procedures were approved by the Institutional Committee for Animal Care and Use (GPPG/HCPA protocol No. 160558). The animals' husbandry followed Law No. 11794 (Brazil), which regulates the scientific use of animals. Vigorous attempts were made to minimize animal suffering, and decrease external sources of pain and discomfort, as well as to use the minimum number of animals required to produce reliable scientific data.

2.2 Maternal Deprivation (MD)

From postnatal day 1 (P1), litters were deprived of their mother for 3h daily for the first 10 days of life (Benetti et al. 2009). Deprivation consisted in removing the mother from the home cage. Four animals per litter were used in each experimental group. Pups were maintained in the original home cage, and grouped in a nest in the presence of maternal odor; they were transferred to a different room where the temperature was maintained at 30–32 °C to compensate for the mother's body heat (Renard et al. 2005). Non-deprived rats remained undisturbed in the home cage with their mothers. Deprivation was carried out between 09:00 a.m. and 12:00 p.m. The first bedding was changed only on P11 both the groups (non-deprived and deprived rats).

2.3 Palatable Food (PF) Exposure

After weaning (P21), rats were separated by sex into cages (4 animals/cage) and animals from palatable food (PF) groups received 25g of condensed milk/rat per day, resetting daily, until P44. All animals, including groups from PF, received water and food (standard chow) *ad libitum*.

2.4 Experimental design

Firstly, animals were divided into 2 groups: control group (C), in which pups did not receive any intervention (n= 16 males / 16 females); and maternal deprived group (MD), in which pups were subjected to maternal deprivation (n= 16 males / 16 females). After weaning (P21) animals were subdivided in two more groups: one was exposed to standard chow and the other group received palatable food (condensed milk) until P44, totaling four study groups (Figure 1). All manipulations were performed in at the same time (9 a.m.). Condensed milk consumption and animals' weight were measured weekly during the palatable food exposure. After euthanasia (P44), adipose tissues were collected and cerebral structures removed for biochemical analyses (Figure 2).

INSERT FIGURE 1

INSERT FIGURE 2

2.5 Palatable Food (condensed milk) estimated consumption

The standard diet and the experimental diet were replaced daily by fresh ingredients. Rats fed with palatable food also had free access to standard chow and water. The amount of palatable food consumed in each cage was evaluated by weighing each day the condensed milk remaining in the feeders on a digital scale, and by calculating the consumption per cage (grams of condensed milk intake/box). This parameter is only illustrative, since we followed this variable only at the end of the experiment, and there were not enough data to perform statistical analysis.

2.6. Weight parameters

2.6.1 Body weight and Lee Index

Animals were weighed (g) weekly using a semi-analytical scale, in order to follow animals' body weight during condensed milk exposition. At the end of the experiment, it was measured the naso-anal length (cm), always by the same experimenter, to perform Lee Index estimation, using the follow index:

$$\frac{\sqrt[3]{\text{body mass}} \text{ (g)}}{\text{nose-to-anus length (cm)}}$$

Data were expressed as grams per centimeter (g/cm).

2.6.2 Relative adipose tissue weight

The retroperitoneal, mesenteric, perirenal and perigonadal adipose tissues were dissected manually and weighed together using a semi-analytical balance. Data were expressed as grams of tissue per 100 grams of body weight (g /100g body weight).

2.7 Cerebral structures collection

Rats were killed by decapitation at P44 having cerebral cortex, hippocampus and hypothalamus removed and stored in independent slots (without buffer solution), frozen at -80°C until analysis.

2.8 Biochemical assays

Cerebral structures were homogenized with Cocktail (Sigma[®] #P8340) in the proportion of 1:100 in phosphate buffered saline (PBS), at pH 7.2. The homogenate was centrifuged for 5 min at 10.000 rpm. The resultant supernatant was applied in all biochemical assays performed in this study. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Nerve growth factor (NGF), Tumor necrosis factor alpha (TNF α), Interleukin 6 (IL6) and Interleukin 10 (IL10) levels were carried out by sandwich ELISA using monoclonal antibodies specific for each measurement (R&D Systems, Minneapolis, United States). Procedures were performed in accordance with the manufacturer's protocol. Optical density was measured using an ELISA reader at the wavelength of 450 nm. All data were expressed in pg/mg of protein. Total protein was measured by Bradford's method

using bovine serum albumin as standard.

2.9 Statistical analysis

Body weight results were analyzed by repeated measure ANOVA. For Lee index and relative adipose tissue weight, univariate analysis were performed. For biochemical assays, multivariate analysis of variance (MANOVA) was performed. Results were considered statistically significant if $P < 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). The SPSS 20.0 program was used for the statistical analysis and for the outliers verification, which were excluded from the study.

3 RESULTS

3.1 Palatable Food (condensed milk) estimated consumption

The estimated consumption of condensed milk by the groups, which were exposed to this intervention, shows that maternal deprivation did not influence its consumption, but it seems that male animals (deprived and non-deprived) consumed more condensed milk than females (Figure 3).

INSERT FIGURE 3

3.2 Weight parameters

3.2.1 Body weight and Lee Index

Body weight follow-up showed effect of age (growth) and gender (repeated measure ANOVA, $F_{(1,56)} = 7405.00$; $F_{(1,56)} = 76.89$, respectively, $P < 0.05$); male animals

(deprived and non-deprived) gained more weight when exposed to the palatable food (Figure 4).

INSERT FIGURE 4

After three weeks of palatable food exposure, there was interaction between gender and palatable food and gender effect in the Lee Index at P43 (univariate analysis, $F_{(1,56)}=103.00$; $F_{(1,56)}= 3.69$, respectively, $P>0.05$) (Figure 5).

INSERT FIGURE 5

3.2.2 Relative adipose tissue weight

In terms of adipose tissue relative weight, there were effects of gender and palatable food (univariate analysis, $F_{(1,48)}=10.42$; $F_{(1,48)}= 107.80$, respectively, $P<0.05$). Also, there was an interaction between palatable food x gender (univariate analysis, $F_{(1,48)}=5.92$, $P<0.05$). Animals exposed to the palatable food (males and females) showed higher relative adipose tissue weight (one-way ANOVA, $F_{(1,22)}= 42.42$ (males); $F_{(1,30)}=80.09$ (females), $P<0.05$) (Figure 6).

INSERT FIGURE 6

3.3 Biochemical analyses

3.3.1 Neurotrophins

In relation to BDNF levels, effect of gender was found in hippocampus (MANOVA, $F_{(1,48)} = 8.30$, $P < 0.05$) and hypothalamus (MANOVA, $F_{(1,48)} = 9.38$; $P < 0.05$); in both brain structures, females presented higher BDNF levels. Maternal deprivation effect was also presented at hypothalamus, reducing the BDNF levels at this structure (MANOVA, $F_{(1,48)} = 4.09$; $P < 0.05$). No effects of gender, maternal deprivation or palatable food were found in BDNF levels at cerebral cortex (MANOVA, $P > 0.05$) (Table 1).

Concerning to NGF levels, there was interaction between maternal deprivation and gender in the cerebral cortex NGF levels (MANOVA, $F_{(1,48)} = 4.15$; $P < 0.05$). At hippocampus, there was interaction between maternal deprivation x palatable food x gender (MANOVA, $F_{(1,48)} = 5.74$, $P < 0.05$). At hypothalamus, deprived animals showed lower NGF levels (MANOVA, $F_{(1,48)} = 11.00$, $P < 0.05$), as the same result for animals from palatable food (MANOVA, $F_{(1,48)} = 4.49$, $P < 0.05$). Moreover, there was interaction between maternal deprivation and palatable food (MANOVA, $F_{(1,48)} = 5.58$, $P < 0.05$) (Table 1).

INSERT TABLE 1

3.3.2 Inflammatory cytokines

Among TNF α levels, interaction of maternal deprivation x palatable food was found at cerebral cortex (MANOVA, $F_{(1,48)} = 12.65$, $P < 0.05$). At hippocampus, deprived

animals showed lower levels of this cytokine (MANOVA, $F_{(1,48)}= 10.82$, $P<0.05$). At hypothalamus was only observed effect of gender (MANOVA, $F_{(1,48)}= 35.30$, $P<0.05$), the females presented higher TNF α levels in this structure (Table 2).

In IL6 levels, interaction between maternal deprivation x gender (MANOVA, $F_{(1,48)}= 8.00$, $P<0.05$), maternal deprivation x palatable food (MANOVA, $F_{(1,48)}= 5.45$, $P<0.05$) and maternal deprivation x palatable food x gender (MANOVA, $F_{(1,48)}= 11.04$, $P<0.05$) were found at cerebral cortex. Effect of gender was found in IL6 levels at hippocampus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 8.40$, $P<0.05$) and hypothalamus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 5.77$, $P<0.05$), showing that females presented higher levels of this interleukin in these both structures (Table 2).

Referring to IL10 levels, only interaction between maternal deprivation x gender was found at cerebral cortex (MANOVA, $F_{(1,48)}= 4.95$, $P<0.05$). There was not effect of maternal deprivation, palatable food or gender at hippocampus or hypothalamus in the IL10 levels (MANOVA, $P>0.05$ for all) (Table 2).

INSERT TABLE 2

4 DISCUSSION

This study showed that the neonatal rats MD did not influence condensed milk consumption. Besides that, the consumption showed difference according to the gender, as reported in other studies (Arganini et al. 2012; Manippa et al. 2017). Over body weight follow-up, our results showed effect of age and gender, where male animals (deprived and non-deprived) gained more weight when exposed to the palatable food. In

fact, male animals consumed more condensed milk, which may have affected their weight gain. Male animals presented higher Lee Index, demonstrating the gender effect in this parameter. Typically, adult male rats are larger than female rats, due to a difference in the growth rate from puberty onward (Slob et al. 1975). Also, it was observed that the effect of palatable food exposure was influenced according to the gender: the Lee index was higher for females, whereas it was decreased for male rats. Despite Lee index has been used as an obesity parameter, its limitations in correlation with the percentage of fat mass has been reported; it is possible that the length is a relatively weak predictor of fat free mass in animals of a similar age and nutritional history (Stephens 1980).

Considering Lee Index limitations, animals' relative adipose tissue weight was evaluated. In this analysis, rats exposed to the palatable food (males and females) showed higher relative adipose tissue weight. Although body weight gain of the animals exposed to the condensed milk did not differ from animals subjected to standard chow. The higher presence of relative adipose tissue weight in animals from palatable food group shows the effect this intervention. Another point that should be considered to explain the non-weight gain during the palatable food exposure is the age of the animals. The animals' age at the beginning of the experiment may have influenced the weight gain, since young animals have metabolism that favors lean body mass (Tschöp and Heiman 2001). The condensed milk exposure in our study was conducted from day 21 (P21) until P44, considered a time where rats exhibit adolescent-typical neurobehavioral characteristics, and the peak of growth spurt occurs at 4-5 weeks of age, which may have contributed for our result (Spear and Brake 1983; Spear 2000).

In addition, MD did not alter weight parameters in our study. But, it is well established that the duration, type and severity of stress may change the animal's

responses to diets (Maniam and Morris, 2012). Severe stressors usually decrease food intake when animals are exposed to either standard or hypercaloric diet (Pucilowski et al., 1993). For example, chronic stress increases the activity of corticotrophin-releasing hormone (CRH), causing anorexic effects (Pasquali, 2012), and reduces the orexigenic peptide (NPY) expression in the hypothalamus (Heinrichs et al., 1993). Early-life stressful events, as MD, can alter HPA axis, which regulates the stress response (Heim et al. 2001), interfering in the food intake and, consequently, in animals' weight.

In relation to BDNF levels, female rats presented higher levels of this neurotrophin at hippocampus and hypothalamus. These results corroborate data from Bakos et al. (2009) which showed similar gender-specific alterations. Estrogen modulates BDNF expressions through different mechanisms (Chan and Ye 2017), which may have contributed for the increased levels observed in females. Also, MD reduced BDNF levels at hypothalamus. In this way, we can suggest that this early-life stressor can induce long-term responses, including the activation of the HPA axis (Levine et al. 1991; Smith et al. 1997; Schmidt et al. 2006). Since glucocorticoids can interfere at hypothalamic BDNF mRNA expression (Jeanneteau et al. 2012), it is possible that stress response induced by the MD is contributing for the reduction in hypothalamic BDNF levels observed in this study. It is important to highlight that BDNF is a neurotrophin that plays a critical role in numerous neuronal activities and its' lower concentrations has been implicated in various neurological disorders, as Alzheimer's and Parkinson's disease (Chan and Ye 2017).

The interactions found in cortical and hippocampal NGF levels showed a gender-specific response to the interventions proposed. These results corroborate another study where divergent behaviors of male and female rats were found in animals submitted to early-life stress (Jaworska et al. 2008). Male rats seem to be more

susceptible to maternal care modifications, due the mother licks and grooms male pups more than females (Champagne 2012). At hypothalamus, MD and PF decreased NGF levels in the male and female rats. The capacity of stressful events, as maternal deprivation, reducing NGF levels has been showed (Réus et al. 2011; Dimatelis et al. 2014; Zugno et al. 2015). It is important to note that this neurotrophin is essential to promote neuronal survival, differentiation, and function, including during development (Cirulli et al. 2000). In controversy, some studies show the opposite: MD or PF increasing NGF levels (Cirulli et al. 1998, 2000; Leffa et al. 2013). Our research group already observed that animals exposed to morphine and MD during early postnatal period presented increased levels of this neurotrophin in brainstem and cerebral cortex in rats at 21 days old (de Oliveira et al. 2017).

Concerning about TNF- α levels, interaction showed that MD and PF isolated were able to increase this pro-inflammatory cytokine cortical levels, but when the interventions were associated, it had a reduction. Pinheiro et al. (2015) also found increased TNF- α levels at hippocampus and prefrontal cortex in adult rats submitted to MD during the neonatal period. In addition, Réus et al. (2017) also showed TNF- α levels increased in hippocampus and pre-frontal cortex in deprived rats at P20, P30 and P40. On the other hand, at hippocampus we observed that deprived animals presented lower TNF- α levels. In fact, previous studies demonstrated the impact of glucocorticoids in suppressing production of the pro-inflammatory cytokines, including TNF- α (Waage and Bakke 1988; Zuckerman et al. 1989). MD can activate HPA axis altering glucocorticoids production, which may have contributed for the decreased hippocampal levels of this interleukin found in our study. At hypothalamus female rats presented higher TNF- α levels. Sex hormones may have an important role in differences found in this pro-inflammatory cytokine. Ovarian cycle phases can modify pro-

inflammatory cytokines levels: TNF- α production is increased during the luteal phase (low estrogen) compared with the follicular phase (high estrogen) (Bouman et al. 2005; Fish 2008). Inflammation process is regarded as a constant component of obesity and it contributes to the development of many chronic conditions, as type 2 diabetes and liver disease (Gregor and Hotamisligil 2011; Osborn and Olefsky 2012). Particularly, TNF- α has already been associated to insulin resistance (Tzanavari et al. 2010). This interleukin can also impact food behavior: Brebner et al. (2000) observed that palatable food consumption (chocolate milk) was reduced by dose-dependently and synergistically systemic interleukin 1 β and TNF- α administration.

Observing the interactions found in IL-6 cortical levels, palatable food was able to increase this pro-inflammatory cytokine in males and decrease in females. When MD was associated with condensed milk, only males' cortical IL-6 levels decreased. At hippocampus and hypothalamus, female rats presented higher levels of this interleukin. Other studies showed differences in IL-6 levels between women and men (Fernandez-Real et al. 2001; Huang et al. 2012). Sex hormones, especially estrogen and progesterone, may influence not only TNF- α , but also IL-6 levels (Angstwurm et al. 1997; Konecna et al. 2000; Bouman et al. 2005). The capacity of palatable food in alter IL-6 levels was already described (Zeeni et al 2015; Collins et al. 2016; Vaidya et al. 2017). It is important to consider that leptin is an adipokine secreted by mature adipocytes, which regulates the production of pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-6 (Paz-Filho et al. 2012). This hormone regulates feeding behavior and energy metabolism, and its circulating concentrations correlate directly with body fat content (Zhang et al. 1994; Frederich et al. 1995). Although leptin levels were not evaluated in our study, literature shows that diets high in fat and carbohydrate are able to increase circulating glucose, insulin, and leptin levels (Surwit et al. 1988, 1995,

1997). Therefore, we can suggest that the modifications in IL-6 levels presented in animals submitted to the palatable food in our study may involve leptin modulation.

In relation to IL-10 levels at cerebral cortex, MD reduces this interleukin levels only in male rats. Dimatelis et al. (2012) verified that neonatal stress promotes down-regulation of IL-10 expression. In addition, Wang et al. (2017) found decreased IL-10 levels at ventral hippocampus in male adult offspring mice. IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine, preventing death of glial cells, increasing cerebellar neuron survival, and modulating the HPA axis avoiding depressive behaviors (Roque et al. 2009). Previous studies showed that this interleukin has role in diabetes, and *in vivo* administration of IL-10 prevented the development of lipid-induced insulin resistance (Kim et al. 2004), and muscle-specific transgenic overexpression of IL-10 increased whole-body insulin sensitivity (Hong et al. 2009).

Due to the possible contribution of hormones, as corticosterone and estrogen, over the results based on what has already been stated in the literature, we believe that their not assessment may be of the limitations of our study. As well, the fact that we did not evaluated the effect of MD and of early palatable food exposure at older ages, as 60 days or more (considered adult rats, with slower metabolism).

5 CONCLUSION

Our findings showed that palatable food exposure from P21 to P44 increases relative adipose tissue weight, but is not able to modify animals' weight. Gender effect was observed in Lee index, as also in neuroinflammatory cytokines levels (hypothalamic TNF- α , hippocampal and hypothalamic IL-6 levels) and neurotrophins levels (hippocampal and hypothalamic BDNF). We can state that there were more noticeable effects of MD than PF in all assessments evaluated, demonstrating that this

early-life stress animal model is able to impact long-lasting modifications. In addition, in order to clarify the effects of gender found in our study, investigations evaluating the role of hormones, especially estrogen, in animals submitted to MD and/or PF should be conducted.

REFERENCES

- Angstwurm MW, Gärtner R, Ziegler-Heitbrock HW. Cyclic plasma IL-6 levels during normal menstrual cycle. *Cytokine*. 1997 May;9(5):370-4. doi: 10.1006/cyto.1996.0178.
- Arganini C, Saba A, Comitato R, Virgili F, Turrini A. Gender Differences in Food Choice and Dietary Intake in Modern Western Societies. *Public Health – Social and Behavioral Health*. 2012 83-103. Doi: DOI: 10.5772/37886.
- Bakos J, Hlavacova N, Rajman M, Ondicova K, Koros C, Kitraki E, Steinbusch HW, Jezova D. Enriched environment influences hormonal status and hippocampal brain derived neurotrophic factor in a sex dependent manner. *Neuroscience*. 2009;164(2):788–797.
- Benetti F, Mello PB, Bonini JS, Monteiro S, Cammarota M, Izquierdo I. Early postnatal maternal deprivation in rats induces memory deficits in adult life that can be reversed by donepezil and galantamine. *Int J Dev Neurosci*. 2009 Feb;27(1):59–64.
- Berman AK, Lott RB, Donaldson ST. Periodic maternal deprivation may modulate offspring anxiety-like behavior through mechanisms involving neuroplasticity in the amygdala. *Brain Res Bull*. 2014 Feb;101:7-11. doi: 10.1016/j.brainresbull.2013.12.005.
- Bouman A, Heineman MJ, Faas MM. Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*. 2005 Jul-Aug;11(4):411-23. Epub 2005 Apr 7.
- Brebner K, Hayley S, Zacharko R, Merali Z, Anisman H. Synergistic effects of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha: central monoamine, corticosterone, and behavioral variations. *Neuropsychopharmacology*. 2000 Jun;22(6):566-80.
- Cabbia R, Consoli A, Suchecki D. Association of 24 h maternal deprivation with a saline injection in the neonatal period alters adult stress response and brain monoamines in a sex-dependent fashion. *Stress*. 2018 Apr 1:1-14. doi: 10.1080/10253890.2018.1456525.
- Champagne FA. Interplay between social experiences and the genome: epigenetic consequences for behavior. *Adv. Genet.* (2012) 77:33–57. doi: 10.1016/B978-0-12-387687-4.00002-7.
- Chan CB, Ye K. Sex differences in brain-derived neurotrophic factor signaling and functions. *J Neurosci Res*. 2017 Jan 2;95(1-2):328-335. doi: 10.1002/jnr.23863.
- Cirulli F, Alleva E, Antonelli A, Aloe L. NGF expression in the developing rat brain: effects of maternal separation. *Brain Res. Dev. Brain Res*. 2000 123 (2), 129–134.
- Cirulli F, Capone F, Bonsignore LT, Aloe L, Alleva E. Early behavioural enrichment in the form of handling renders mouse pups unresponsive to anxiolytic drugs and increases NGF levels in the hippocampus. 2007; *Behav. Brain Res*. 178, 208–215.
- Cirulli F, Micera A, Alleva E, Aloe L. Early maternal separation increases NGF expression in the developing rat hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1998 59 (4), 853–858.
- Collins KH, Paul HA, Hart DA, Reimer RA, Smith IC, Rios JL, Seerattan RA, Herzog W1. A High-Fat High-Sucrose Diet Rapidly Alters Muscle Integrity, Inflammation and Gut Microbiota in Male Rats. *Sci Rep*. 2016 Nov 17;6:37278. doi: 10.1038/srep37278.
- Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, Bell ME, Bhatnagar S, Laugero KD, Manalo S. Chronic stress and obesity: a new view of comfort food. *Proc. Natl.*

Acad. Sci. U.S.A. 2003, 100, 11696–11701 10.1073/pnas.1934666100.

de Macedo IC, Freitas JC, Torres ILS. The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2016, Article ID 7238679. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7238679>.

de Oliveira C, Scarabelot VL, Vercelino R, Silveira NP, Adachi LNS, Regner GG, et al. Morphine exposure and maternal deprivation during the early postnatal period alter neuromotor development and nerve growth factor levels. *Int J Dev Neurosci*. 2017 Dec;63:8–15.

de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011 Apr;61(2):260–5.

de Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science*. 1995 Oct 27;270(5236):593-8.

Dimatelis JJ, Pillay NS, Mutyaba AK, Russell VA, Daniels WM, Stein DJ. Early maternal separation leads to down-regulation of cytokine gene expression. *Metab Brain Dis*. 2012 Sep;27(3):393-7. doi: 10.1007/s11011-012-9304-z.

Dimatelis JJ, Russell VA, Stein DJ, Daniels WM. Methamphetamine reversed maternal separation-induced decrease in nerve growth factor in the ventral hippocampus. *Metab Brain Dis*. 2014 Jun;29(2):433-9. doi: 10.1007/s11011-014-9481-z.

Fernandez-Real JM, Vayreda M, Richart C, Gutierrez C, Broch M, Vendrell J, Ricart W. Circulating interleukin 6 levels, blood pressure, and insulin sensitivity in apparently healthy men and women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Mar;86(3):1154-9.

Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):737-44. doi: 10.1038/nri2394.

Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995; 1: 1311— 1314 .

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:415-45. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101322.

Hansen MK, Taishi P, Chen Z, Krueger JM. Cafeteria feeding induces interleukin-1beta mRNA expression in rat liver and brain. *Am J Physiol*. 1998 Jun;274(6 Pt 2):R1734-9.

Heim C, Newport DJ, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse, *Am. J. Psychiatr*. 2001 Apr;158(4):575-81. doi: 10.1176/appi.ajp.158.4.575.

Heinrichs SC, Menzaghi F, Pich EM, Hauger RL, Koob GF. Corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus modulates feeding induced by neuropeptide Y. *Brain Res*. 1993 May 14;611(1):18-24.

Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, Friedline RH, Kurt-Jones E, Finberg R, Fischer MA, Granger EL, Norbury CC, Hauschka SD, Philbrick WM, Lee CG, Elias JA, Kim JK. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*. 2009 Nov;58(11):2525-35. doi: 10.2337/db08-1261.

Huang WN, Tso TK, Kuo YC, Tsay GJ. Distinct impacts of syndesmophyte formation on male and female patients with ankylosing spondylitis. *Int J Rheum Dis*. 2012 Apr; 15(2):163-8.

- Hume C, Jachs B, Menzies J. Homeostatic responses to palatable food consumption in satiated rats. *Obesity* (Silver Spring). 2016 Oct; 24(10): 2126–2132.
- Jahng JW. An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *HormBehav*. 2011;59:213–220.
- Jaworska N, Dwyer SM, Rusak B. Repeated neonatal separation results in different neurochemical and behavioral changes in adult male and female Mongolian gerbils, *Pharmacol. Biochem. Behav.* (2008) Feb 1;88(4):533–41. doi: 10.1016/j.pbb.2007.10.012.
- Jeanneteau F.D, Lambert W.M, Ismaili N, Bath K.G, Lee F.S, Garabedian M.J, Chao M.V. BDNF and glucocorticoids regulate corticotrophin-releasing hormone (CRH) homeostasis in the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109 (2012), pp. 1305-1310.
- Kanneganti TD, Dixit VD. Immunological complications of obesity. *Nat Immunol*. 2012;13:707–712. doi: 10.1038/ni.2343.
- Kikusui T, Mori Y. Behavioural and neurochemical consequences of early weaning in rodents. *J Neuroendocrinol*. 2009;21:427–431.
- Kim HJ, Higashimori T, Park SY, Choi H, Dong J, Kim YJ, Noh HL, Cho YR, Cline G, Kim YB, Kim JK. Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo. *Diabetes*. 2004 Apr;53(4):1060-7.
- Kim JY, Lee JH, Kim D, Kim SM, Koo J, Jahng JW. Beneficial Effects of Highly Palatable Food on the Behavioral and Neural Adversities induced by Early Life Stress Experience in Female Rats. *Int J Biol Sci*. 2015 Aug 1;11(10):1150-9. doi: 10.7150/ijbs.12044.
- Konecna L, Yan MS, Miller LE, Scholmerich J, Falk W, Straub RH. Modulation of IL-6 production during the menstrual cycle in vivo and in vitro. *Brain Behav Immun* 2000 14, 49–61.
- Krolow R, Noschang CG, Arcego D, Andreazza AC, Peres W, Gonçalves CA, Dalmaz C. Consumption of a palatable diet by chronically stressed rats prevents effects on anxiety-like behavior but increases oxidative stress in a sex-specific manner. *Appetite*. 2010 Aug;55(1):108-16. doi: 10.1016/j.appet.2010.03.013.
- Lee JH, Kim JY, Jahng JW. Highly Palatable Food during Adolescence Improves Anxiety-Like Behaviors and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction in Rats that Experienced Neonatal Maternal Separation. *EndocrinolMetab* (Seoul). 2014 Jun;29(2):169-78. doi: 10.3803/EnM. 2014.29.2.169.
- Leffa DD, Valvassori SS, Varela RB, Lopes-Borges J, Daumann F, Longaretti LM, Dajori AL, Quevedo J, Andrade VM. Effects of palatable cafeteria diet on cognitive and noncognitive behaviors and brain neurotrophins' levels in mice. *Metab Brain Dis*. 2015 Aug;30(4):1073-82. doi: 10.1007/s11011-015-9682-0.
- Levine S, Huchton D.M, Wiener S.G, Rosenfeld P. Time course of the effect of maternal deprivation on the hypothalamic—pituitary—adrenal axis in the infant rat. *Dev. Psychobiol.*, 24 (1991), pp. 547-548.
- Machado TD, DalleMolle R, Laureano DP, Portella AK, Werlang IC, BenettiCda S, Noschang C, SilveiraPP. Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for "comfort foods" in adult female rats. *Stress*. 2013 Sep;16(5):549-56. doi: 10.3109/10253890.2013.816841.

- Macri S, Zoratto F, Laviola G. Early-stress regulates resilience, vulnerability and experimental validity in laboratory rodents through mother-offspring hormonal transfer. *Neuroscience Biobehav Rev.* 2011;35:1534–1543.
- Maniam J, Morris MJ. The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology.* 2012 Jul;63(1):97-110. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.017.
- Manippa V, Padulo C, van der Laan LN, Brancucci A. Gender Differences in Food Choice: Effects of Superior Temporal Sulcus Stimulation. *Front Hum Neurosci.* 2017; 11: 597. doi: 10.3389/fnhum.2017.00597.
- Marshall AT, Liu AT, Murphy NP, Maidment NT, Ostlund SB. Sex-specific enhancement of palatability-driven feeding in adolescent rats. *PLoSOne.* 2017 Jul 14;12(7):e0180907. doi: 10.1371/journal.pone.0180907.
- Martin-Fardon R, Weiss F. Perseveration of craving: effects of stimuli conditioned to drugs of abuse versus conventional reinforcers differing in demand. *Addict Biol.* 2017 Jul;22(4):923-932. doi: 10.1111/adb.12374.
- Nylander I, Roman E. Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? *Psychopharmacology (Berl).* 2013 Oct;229(4):555-69. doi: 10.1007/s00213-013-3217-3.
- Osborn O, Olefsky JM. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. *Nat Med.* 2012 Mar 6;18(3):363-74. doi: 10.1038/nm.2627.
- Pasquali R. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex hormones in chronic stress and obesity: pathophysiological and clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Aug;1264:20-35. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06569.x.
- Paz-Filho, G., Mastronardi, C., Franco, C. B., Wang, K. B., Wong, M.-L., & Licinio, J. Leptin: Molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia.* 2012 56(9), 597–607. doi: 10.1590/S0004-27302012000900001.
- Pinheiro RMC, de Lima MNM, Portal BCD, Busato SB, Falavigna L, Ferreira RDP, et al. Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. *J Neural Transm Vienna Austria.* 2015 May;122(5):709–19.
- Pucilowski O, Overstreet DH, Rezvani AH, Janowsky DS. Chronic mild stress-induced anhedonia: greater effect in a genetic rat model of depression. *PhysiolBehav.* 1993 Dec;54(6):1215-20.
- Renard GM, Suárez MM, Levin GM, Rivarola MA. Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *PhysiolBehav.* 2005 Jun 30;85(3):363–9.
- Réus GZ, Fernandes GC, de Moura AB, Silva RH, Darabas AC, de Souza TG, Abelaira HM, Carneiro C, Wendhausen D, Michels M, Pescador B, Dal-Pizzol F, Macêdo DS, Quevedo J. Early life experience contributes to the developmental programming of depressive-like behaviour, neuroinflammation and oxidative stress. *J Psychiatr Res.* 2017 Dec;95:196-207. doi: 10.1016/j.jpsychires.2017.08.020.
- Réus GZ, Stringari RB, Ribeiro F, Cipriano AL, Panizzutti BS, Stertz L, Lersch C, Kapczinski F, Quevedo J. Maternal deprivation induces depressive-like behaviour and alters neurotrophin

- levels in the rat brain. *Neurochem Res* 2011 36(3):460–466. doi:10.1007/s11064-010-0364-3.
- Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva, MA. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. 2004; *Biol. Psychiatry* 55,708–714.
- Roque S, Correia-Neves M, Mesquita AR, Palha JA, Sousa N. Interleukin-10: A Key Cytokine in Depression? *Cardiovasc Psychiatry Neurol.* 2009;2009:187894. doi: 10.1155/2009/187894.
- Schellekens H, Dinan TG, Cryan JF. Taking two totango: a role for ghrelin receptor heterodimerization in stress and reward. *Frontiers in Neuroscience* 2013, vol. 7, article 148.
- Schmidt M.V, Levine S, Alam S, Harbich D, Sterlemann V, Ganea K, de Kloet E.R, Holsboer F, Muller M.B. Metabolic signals modulate hypothalamic—pituitary—adrenal axis activation during maternal separation of the neonatal mouse. *J. Neuroendocrinol.*, 18 (2006), pp. 865-874.
- Slob AK, Van der Werff Ten Bosch JJ. Sex differences in body growth in the rat. *Physiol. Behav.* 1975 Mar;14(3):353-61. doi: 10.1016/0031-9384(75)90044-X.
- Smith M.A, Kim S.Y, van Oers H.J, Levine S. Maternal deprivation and stress induce immediate early genes in the infant rat brain. *Endocrinology*, 138 (1997), pp. 4622-4628.
- Spear LP, Brake SC. Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol.* 1983 Mar;16(2):83-109. doi:10.1002/dev.420160203.
- Spear LP. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav Rev.* 2000 Jun;24(4):417-63.
- Stephens DN. Does the Lee obesity index measure general obesity? *Physiol. Behav.* 1980 Aug;25(2):313-5.
- Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, Kuhn CM, Rebuffé-Scrive M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6i and A/J mice. *Metabolism* 1995; 44: 645—651.
- Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane D, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet induced type II diabetes in C57BL/6 mice. *Diabetes* 1988; 37: 1163—1167 8.
- Surwit RS, Petro AE, Parekh P, Collins S. Low plasma leptin in response to dietary fat in diabetes- and obesity-prone mice. *Diabetes* 1997; 46: 1516—1520.
- Tanaka T. The relationships between litter size, offspring weight and behavioral development in laboratory mice. *Mamm Study* 2004 Tokio 29, 147–153.
- Tschöp M, Heiman ML. Rodent obesity models: an overview. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc.* 2001;109(6):307–19.
- Tzanavari T, Giannogonas P, Karalis KP. TNF-alpha and obesity. *Curr Dir Autoimmun.* 2010;11:145-56. doi: 10.1159/000289203.
- Vaidya HB, Gangadaran S, Cheema SK. A high fat-high sucrose diet enriched in blue mussels protects against systemic inflammation, metabolic dysregulation and weight gain in C57BL/6 mice. *Food Res Int.* 2017 Oct;100(Pt 2):78-85. doi: 10.1016/j.foodres.2017.08.033.
- Waage A, Bakke O. Glucocorticoids suppress the production of tumour necrosis factor by lipopolysaccharide-stimulated human monocytes. *Immunology.* 1988 Feb;63(2):299-302.
- Wang Q, Dong X, Wang Y, Liu M, Sun A, Li N, Lin Y, Geng Z, Jin Y, Li X. Adolescent

escitalopram prevents the effects of maternal separation on depression and anxiety-like behaviours and regulates the levels of inflammatory cytokines in adult male mice. *Int J Dev Neurosci*. 2017 Nov;62:37-45. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.07.007.

Wang Q, Shao F, Wang W. Maternal separation produces alterations of forebrain brain-derived neurotrophic factor expression in differently aged rats. *Front Mol Neurosci*. 2015 Sep 1;8:49. doi: 10.3389/fnmol.2015.00049.

Zeeni N, Dagher-Hamalian C, Dimassi H, Faour WH. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflamm Res*. 2015 Jul;64(7):501-12. doi: 10.1007/s00011-015-0831-z.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-432.

Zuckerman SH, Shellhaas J, Butler LD. Differential regulation of lipopolysaccharide-induced interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis: effects of endogenous and exogenous glucocorticoids and the role of the pituitary-adrenal axis. *Eur J Immunol*. 1989 Feb;19(2):301-5.

Zugno AI, Pacheco FD, Budni J, de Oliveira MB, Canever L, Heylmann AS, Wessler PG, da Rosa Silveira F, Mastella GA, Gonçalves CL, Freitas KV, de Castro AA, Streck EL, Quevedo J. Maternal deprivation disrupts mitochondrial energy homeostasis in the brain of rats subjected to ketamine-induced schizophrenia. *Metab Brain Dis*. 2015 Aug;30(4):1043-53. doi: 10.1007/s11011-015-9671-3.

LEGENDS

Figure 1. Study groups divisions.

Figure 2. Study timeline.

MD=maternal deprivation. PF=palatable food.

Figure 3. Palatable food (condensed milk) estimated consumption.

PF=palatable food. MD+PF= maternal deprivation and palatable food.

Figure 4. Body weight results. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). There was effect of gender (three-way ANOVA, $P < 0.05$). $n = 8$ animals/group.

C= Control. MD= maternal deprivation. PF=palatable food. MD+PF = maternal deprivation and palatable food.

*There was effect of gender on body weight ($P < 0.05$).

Figure 5. Lee Index at P43. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of gender (three-way ANOVA, $P < 0.05$). $n = 8$ animals/group.

C= Control. MD= maternal deprivation. PF= palatable food. MD+PF = maternal deprivation and palatable food.

*There was effect of gender on Lee Index ($P < 0.05$).

Figure 6. Relative adipose tissue weight. Data expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Effect of gender and PF (Univariate analysis, $P < 0.05$ for both), there was interaction between PF \times gender (Univariate analysis, $p < 0.05$). $n = 6-8$ animals/group.

C= Control. MD= maternal deprivation. PF= palatable food. MD+PF = maternal deprivation and palatable food.

*There was effect of palatable food on relative adipose tissue weight ($P < 0.05$).

#There was effect of gender on relative adipose tissue weight ($P < 0.05$).

LEGENDS

Table 1. Neurotrophins levels results. Data presented as the mean \pm standard error of the mean ($n= 6-8$ animals/group).

BDNF levels: Effect of gender at hippocampus and hypothalamus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 8.305$; $F_{(1,48)}= 9.386$, respectively, $P<0.05$). Effect of MD at hypothalamus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 4.098$; $P<0.05$). There are not effects of gender, MD or PF in BDNF levels at cerebral cortex (MANOVA, $P>0.05$ for all).

^aThere was effect of gender at hippocampus ($P<0.05$).

^bThere was effect of gender at hypothalamus ($P<0.05$).

^cThere was effect of MD at hypothalamus ($P<0.05$).

NGF levels: There was an interaction between MD x gender at cerebral cortex (MANOVA, $F_{(1,48)}= 4.158$; $P<0.05$). There was an interaction between MD x PF x gender at hippocampus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 5.748$, $P<0.05$). There was effect of MD (MANOVA, $F_{(1,48)}= 11.001$, $P<0.05$), PF (MANOVA, $F_{(1,48)}= 4.498$, $P<0.05$) and an interaction between MD x PF at hypothalamus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 5.589$, $P<0.05$).

^dThere was effect of MD at hypothalamus ($P<0.05$).

^eThere was effect of palatable food at hypothalamus ($P<0.05$).

C= Control. MD= maternal deprivation. PF= palatable food. MD+PF = maternal deprivation and palatable food.

Table 2. Inflammatory cytokines levels results. Data presented as the mean \pm standard error of the mean ($n= 6-8$ animals/group).

TNF α levels: There was an interaction between MD x PF at cerebral cortex (MANOVA, $F_{(1,48)}= 12.651$, $P<0.05$); effect of MD at hippocampus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 10.823$, $P<0.05$) and effect of gender at hypothalamus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 35.306$, $P<0.05$).

^aThere was effect of MD at hippocampus ($P<0.05$).

^bThere was effect of gender at hypothalamus ($P<0.05$).

IL-6 levels: There was an interaction between MD x gender (MANOVA, $F_{(1,48)}= 8.007$, $P<0.05$), MD x PF (MANOVA, $F_{(1,48)}= 5.451$, $P<0.05$) and MD x PF x gender (MANOVA, $F_{(1,48)}= 11.049$, $P<0.05$) at cerebral cortex; there was effect of gender at hippocampus (MANOVA, $F_{(1,48)}= 8.405$, $P<0.05$) and at hypothalamus (MANOVA,

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

$F_{(1,48)} = 5.770, P < 0.05$).

^cThere was effect of gender at hippocampus ($P < 0.05$).

^dThere was effect of gender at hypothalamus ($P < 0.05$).

IL-10 levels: There was an interaction between MD x gender (MANOVA, $F_{(1,48)} = 4.954, P < 0.05$).

C= Control. MD= maternal deprivation. PF= palatable food. MD+PF = maternal deprivation and palatable food.

FIGURE 1

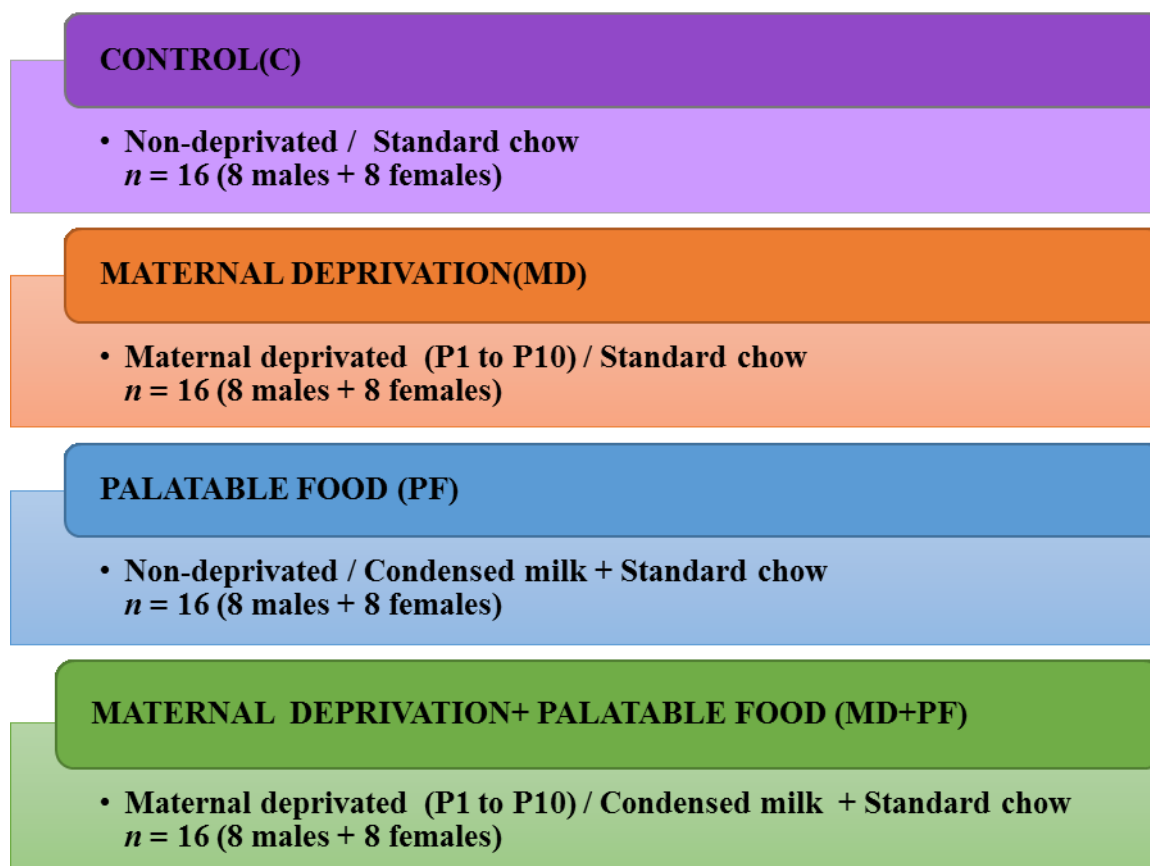


FIGURE 2

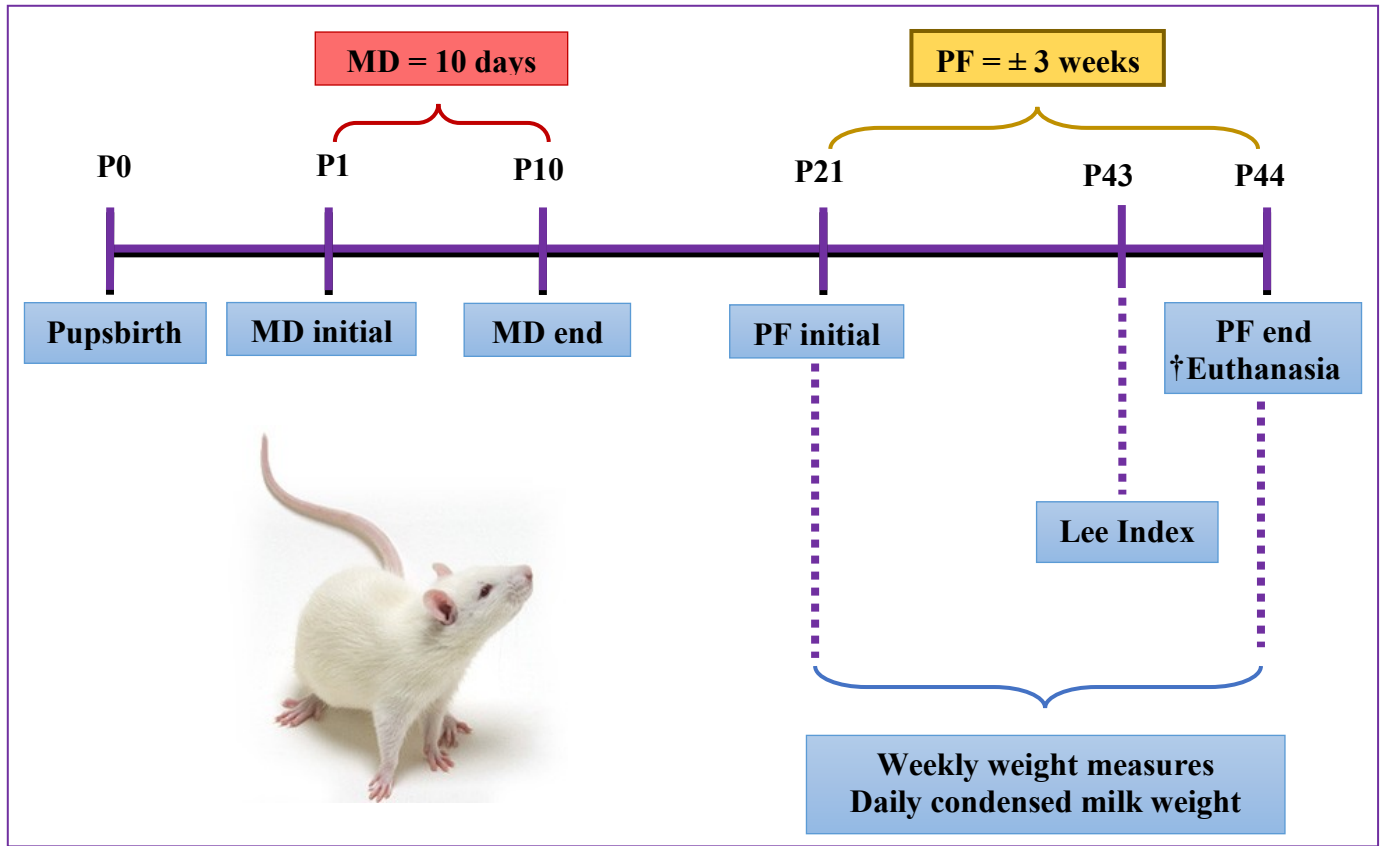


FIGURE 3

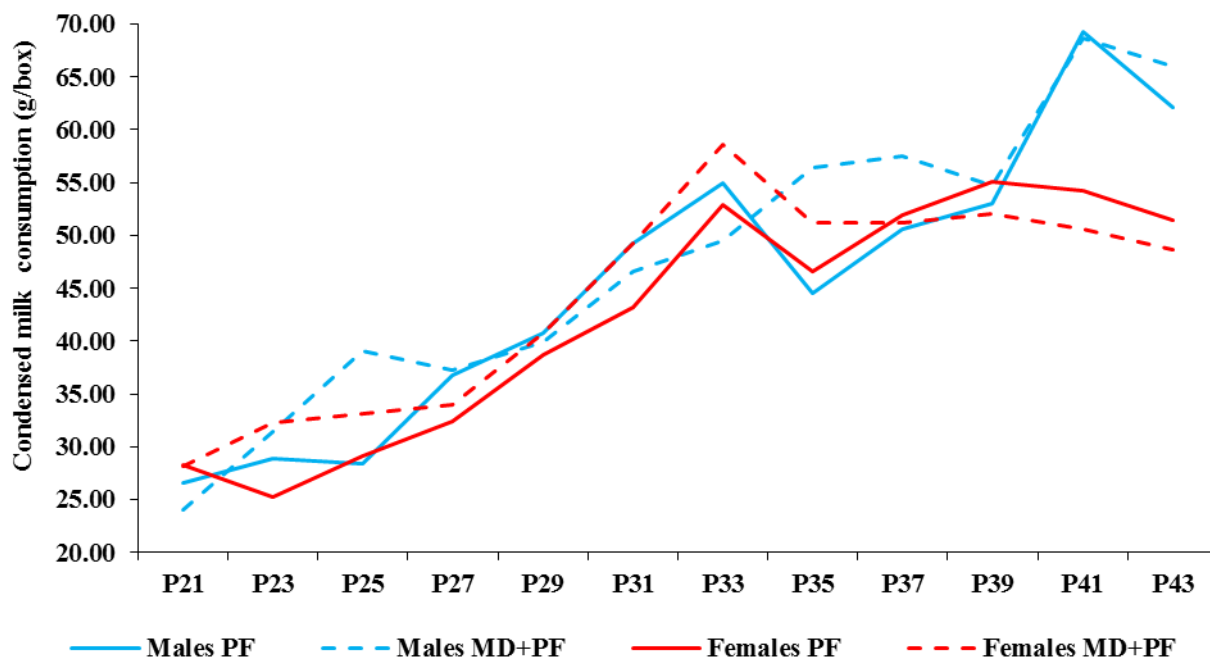


FIGURE 4

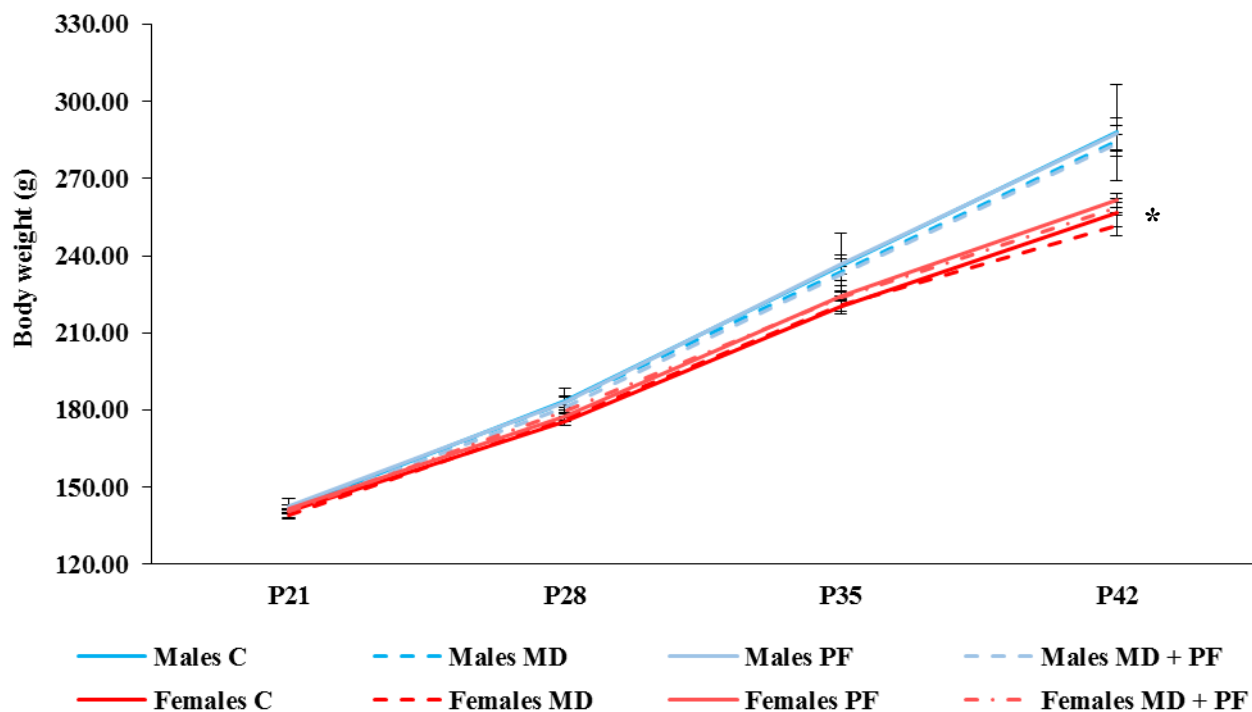


FIGURE 5

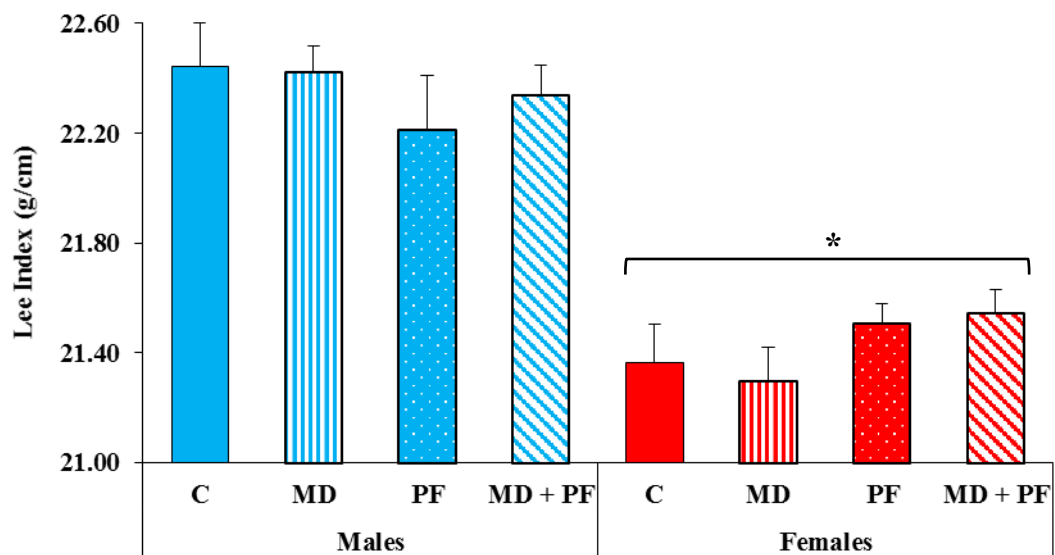


FIGURE 6

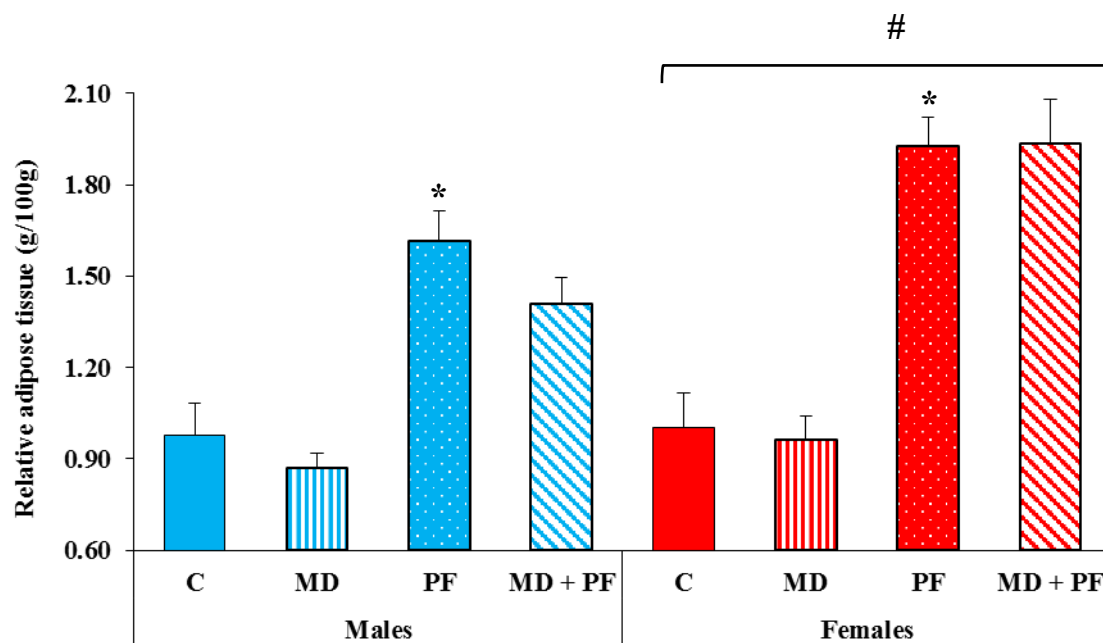


TABLE 1

			BDNF Levels (mg/pg protein)	NGF Levels (mg/pg protein)
Cerebral Cortex	Males	C	2.66 ± 0.20	3.36 ± 0.37
		MD	2.96 ± 0.15	3.16 ± 0.25
		PF	3.44 ± 0.17	3.23 ± 0.26
		MD+PF	2.91 ± 0.10	2.64 ± 0.22
	Females	C	2.71 ± 0.17	2.81 ± 0.27
		MD	3.06 ± 0.20	3.08 ± 0.32
		PF	2.92 ± 0.26	2.98 ± 0.16
		MD+PF	3.04 ± 0.19	3.38 ± 0.10
Hippocampus	Males	C	10.04 ^a ± 0.89	7.25 ± 0.10
		MD	10.40 ^a ± 1.62	5.91 ± 0.37
		PF	8.67 ^a ± 0.79	6.47 ± 0.61
		MD+PF	9.03 ^a ± 0.50	7.68 ± 0.12
	Females	C	12.38 ± 1.24	7.27 ± 0.68
		MD	12.35 ± 1.81	7.96 ± 0.86
		PF	11.21 ± 1.07	7.70 ± 0.45
		MD+PF	12.30 ± 0.90	6.81 ± 0.71
Hypothalamus	Males	C	32.82 ^b ± 4.42	25.38 ± 3.47
		MD	27.30 ^{b,c} ± 2.85	13.65 ^d ± 0.41
		PF	28.18 ^b ± 3.13	14.83 ^e ± 1.54
		MD+PF	23.69 ^b ± 4.94	13.32 ± 0.91
	Females	C	43.34 ± 1.37	20.65 ± 1.96
		MD	^c 33.76 ± 3.06	16.45 ^d ± 1.60
		PF	34.90 ± 3.71	18.62 ^e ± 2.22
		MD+PF	32.80 ± 5.11	17.46 ± 1.88

TABLE 2

			TNF α Levels (mg/pg protein)		IL-6 Levels (mg/pg protein)		IL-10 Levels (mg/pg protein)	
Cerebral Cortex	Males	C	5.72	± 0.45	10.13	± 0.99	10.03	± 0.41
		MD	8.38	± 0.92	14.22	± 2.21	7.78	± 0.42
		PF	8.37	± 0.59	15.10	± 2.23	9.78	± 1.15
		MD+PF	6.36	± 0.43	7.66	± 0.62	6.61	± 1.26
	Females	C	6.68	± 0.85	12.82	± 1.28	9.19	± 1.86
		MD	8.04	± 0.85	15.91	± 1.05	9.23	± 0.48
		PF	7.34	± 0.16	10.04	± 0.87	9.07	± 1.07
		MD+PF	6.78	± 0.46	15.14	± 1.63	10.66	± 0.89
Hippocampus	Males	C	19.33	± 2.48	18.39 ^c	± 1.28	12.22	± 1.47
		MD	13.80 ^a	± 1.25	17.80 ^c	± 1.94	14.14	± 2.77
		PF	18.24	± 1.59	18.67 ^c	± 0.08	10.43	± 1.41
		MD+PF	15.32	± 0.70	19.99 ^c	± 2.70	12.26	± 1.61
	Females	C	20.08	± 1.96	21.23	± 1.00	12.67	± 1.50
		MD	17.66 ^a	± 1.25	24.01	± 2.55	14.22	± 2.07
		PF	19.57	± 1.28	21.48	± 1.33	14.95	± 1.44
		MD+PF	14.81	± 1.94	23.90	± 2.38	13.60	± 0.64
Hypothalamus	Males	C	130.59 ^b	± 7.39	106.39 ^d	± 14.82	86.17	± 22.77
		MD	142.65 ^b	± 10.12	65.11 ^d	± 6.15	62.73	± 7.73
		PF	130.16 ^b	± 2.97	80.13 ^d	± 11.89	60.05	± 9.42
		MD+PF	126.14 ^b	± 16.59	81.93 ^d	± 11.18	80.51	± 18.12
	Females	C	191.06	± 17.06	108.46	± 6.50	76.68	± 10.32
		MD	177.88	± 15.33	105.02	± 9.38	75.56	± 12.55
		PF	169.94	± 6.10	91.08	± 2.93	62.07	± 8.61
		MD+PF	198.98	± 10.17	90.29	± 7.67	62.83	± 1.44

PARTE III

DISCUSSÃO GERAL

7 DISCUSSÃO GERAL

Os resultados dessa dissertação demonstram o efeito da deprivação materna (DM) sobre o teste da geotaxia negativa apenas no primeiro dia de avaliação (P8), onde os animais submetidos à intervenção apresentaram atraso no reflexo neuromotor. O reflexo da geotaxia negativa, em roedores, é necessário para adaptação ao ambiente (Golan e Huleihel 2006) e está relacionado a funções vestibulares e proprioceptivas (Motz e Alberts 2005). O teste de reflexo do endireitamento, também utilizado para avaliar o reflexo neuromotor dos filhotes, está relacionado a funções dos neurônios neuromotores, vias vestibulares, interneurônios da coluna vertebral e aferências proprioceptivas (Bignall 1974; Bose et al. 1998). Como foi observado em nosso estudo por meio do teste de geotaxia negativa corroborando estudo prévio do grupo (de Oliveira et al. 2017), a DM é acarretou um atraso no desenvolvimento dos filhotes, afetando negativamente o desenvolvimento cerebral nesses animais.

No teste de avaliação do comportamento locomotor e exploratório em P20, fêmeas apresentaram maior atividade locomotora demonstrado pelo maior número de cruzamentos externos. Maior intensidade de exploração em fêmeas pode ser importante do ponto de vista evolutivo, uma vez que por serem mães em potencial devem apresentar maior capacidade adaptativa ao ambiente desconhecido do que os machos. Dessa forma, a fêmea é capaz de assegurar um curso tranquilo de prenhez, parto e zelo à ninhada (Dubovicky et al. 1999). Por outro lado, os machos apresentaram maior tempo em comportamento de *grooming* (auto-limpeza), refletindo possíveis alterações emocionais mediadas por mecanismos dopaminérgicos (Chester e Jackson 1980; Magaji et al. 2017). Esse comportamento inato está envolvido na manutenção da higiene, termorregulação, comunicação social e motivação (Spruijt et al. 1988; Kalueff et al. 2016), apresentando uma organização sequencial padronizada com características de progressão cefalocaudal (Spruijt et al. 1984). Pode ser modulado por circuitos límbicos, incluindo a amígdala e o hipotálamo (Kalueff et al. 2016) e, é mediado pelo sistema dopaminérgico nigrostriatal e tegmental-ventral, relacionando

eventos estressantes com o comportamento de recompensa (Spruijt et al. 1986). Existe uma relação direta entre a redução do *grooming* com a diminuição da liberação de dopamina na amígdala (Homberg et al. 2002). A avaliação desse comportamento em roedores é potencialmente útil para a neurociência translacional, uma vez que o aumento desse tipo de comportamento pode estar relacionado a transtornos psiquiátricos (Kalueff et al. 2016). Fêmeas deprivadas apresentaram maior tempo de latência de saída do primeiro quadrante, efeito oposto foi observado em machos. Outros estudos também observaram respostas divergentes entre os gêneros à exposição ao estresse precoce (Jaworska et al. 2018; Aya-Ramos et al. 2017). Apesar de existirem outras maneiras de avaliar o comportamento do tipo ansioso (como o EPM), o maior tempo de latência para deixar o primeiro quadrante como observado nas fêmeas deprivadas no teste do campo aberto, pode ser um indicativo de ansiedade (Andersen e Tufik 2015). Quando nova avaliação foi realizada em P42 para verificar o efeito da DM em longo prazo, não foram encontrados efeitos da DM ou do gênero. Assim sendo, nossos resultados sugerem que o gênero é capaz de modificar a atividade locomotora e exploratória dos animais em P20 e a DM em curto prazo, pode estar relacionada a comportamento do tipo ansioso gênero-dependente.

Quanto à avaliação do comportamento tipo ansioso em P20, por meio do teste EPM, animais deprivados apresentaram aumento no tempo de permanência nos braços abertos. Na medida em que os animais são mais ativos e exploram o labirinto, eles podem ser mais propensos a exploração das áreas desprotegidas do aparato (braços abertos) (Doremus-Fitzwater et al. 2009). O aumento no tempo de permanência nos braços abertos em animais deprivados observado nesse estudo, que representa uma medida confiável de ansiedade, corrobora Weiss et al. 2011, sugerindo um efeito ansiolítico da DM (Doremus-Fitzwater et al. 2009). Previos estudos demonstraram que a exposição a eventos estressantes no início da vida induziu efeitos ansiolíticos (Farkas et al. 2009; Xiong et al. 2014; Zhang et al. 2014). Também observamos que machos apresentaram redução no número de *protected head dipping* (PHD) e aumento no número de *non-protected head dipping* (NPHD). Esses

parâmetros podem ser utilizados para avaliação de risco e atividade exploratória de animais submetidos ao EPM (Rodgers e Cole 1993; Sestakova et al. 2013). O NPHD (movimento de mergulho com a cabeça na borda de um dos braços abertos), especificamente, pode servir como um parâmetro inverso de avaliação de comportamento do tipo ansioso, um aumento de NPHD indica redução do nível de ansiedade (Rodgers e Dalvi 1997; Sestakova et al. 2013). Desta forma, podemos concluir que machos apresentaram redução no comportamento do tipo ansioso. Em nova avaliação do EPM para avaliar os efeitos em longo prazo da DM (P42), fêmeas apresentaram menor latência para iniciar a exploração do aparato. Sugere-se que quanto maior for esse tempo de latência, maior o nível de ansiedade do animal (Braun et al. 2011). Portanto, referindo-se a esse parâmetro, fêmeas demonstraram menor comportamento do tipo ansioso. Além disso, machos deprivados apresentaram aumento no número de *rearings*, e o efeito oposto foi encontrado em fêmeas deprivadas. Esse parâmetro está relacionado ao comportamento do tipo exploratório (Rodgers et al. 1997), desta forma, podemos sugerir que a DM foi capaz de aumentar o comportamento do tipo exploratório nos machos e reduzir em fêmeas. Em síntese, nossos resultados referentes à avaliação do comportamento do tipo ansioso, demonstram que a DM em curto prazo é capaz de induzir efeitos ansiolíticos, e em longo prazo, ocasionar efeito gênero-dependente, aumentando o comportamento exploratório de machos e reduzindo os das fêmeas. Além disso, é importante salientar que foi observada diferença entre os gêneros na latência em P42.

Em relação às avaliações nociceptivas, quando os animais foram submetidos ao teste da placa quente (PQ) em P21, a DM causou um aumento do limiar térmico. Esse mesmo efeito analgésico, induzido pela DM, foi verificado somente em fêmeas no teste do tail-flick (TFL). É importante salientar que o teste do TFL avalia dor fásica, estímulos térmicos nociceptivos de curta duração relacionado ao limiar nociceptivo, sendo aplicado em uma superfície mínima. Envolve a estimulação de fibras A δ (Le Bars et al. 2001) presentes ao nascimento. Por outro lado, o teste da PQ envolve dor tônica, estímulos de longa duração que desencadeiam uma resposta nociceptiva

envolvendo principalmente fibras C (Le Bars et al. 2001). Essas fibras ainda estão em fase de maturação durante as primeiras três semanas de vida (Fitzgerald 2005). Nesse período, há um aumento no número de fibras C conectadas à medula espinhal e uma diminuição gradual no número de fibras A δ . Portanto, nas primeiras três semanas de vida, ambas as populações de fibras ocupam o mesmo espaço na medula espinhal (Fitzgerald, 2005). TFL envolve controle inibitório supra-espinhal descendente, reflexo que percorre através do funículo dorsolateral (Necker e Hellon 1978). Esse controle desempenha um papel modulatório significativo, que é acentuado pelos estímulos da intensidade de calor e pelas dicas visuais e auditivas fornecidas durante o teste (King et al. 1997). Além disso, a latência do TFL pode ser alterada de acordo com as características da cauda e da temperatura ambiente (Berge et al.1988). Todos os nossos experimentos foram realizados em um ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 ° C), com altas temperaturas da bobina (até 75 ° C), evitando-se qualquer sinal visual ou auditivo, tornando nossas observações confiáveis. É importante destacar que a modulação inibitória descendente se torna aparente entre o 15º (Guy and Abbott 1992; Weber et al. 1977) e o 21º dia pós-natal (vaan Praag e Frenk 1991) devido ao atraso na maturação dos receptores no corno dorsal; e a mielinização dependente de tempo das fibras A δ (envolvidas com a sensibilidade térmica) (Fitzgerald et al. 1991). Assim, de acordo com o crescimento de ratos, os receptores atingem a maturidade e as fibras A δ tornam-se mielinizadas, promovendo velocidades de condução mais rápidas da resposta nociceptiva. Embora a velocidade de condução desse tipo de fibras aumente com o passar da idade devido à mielinização (Fitzgerald et al. 1991), tal incremento nas velocidades de condução não está necessariamente correlacionado com a latência do comportamento de retirada da pata avaliada no teste da placa quente. Em neonatos e ratos jovens há falta de queratina na pele das patas, bem como alta penetração da fibra nervosa na epiderme (Fitzgerald 1966), deixando terminais neuronais e células não neuronais mais expostas ao insulto térmico da placa. Além disso, o teste PQ avalia respostas supraespinhais integradas, representadas pelo comportamento de lambar, pular ou sapatear, enquanto o teste TFL está mais relacionado ao reflexo da coluna vertebral (Le bars 2001). Dessa forma, nossos resultados

sugerem que a DM pode alterar as vias de dor supraespinal e espinhal, principalmente após curto tempo de exposição ao estressor. Até o momento, o efeito analgésico em curto prazo induzido pela DM encontrado nessa dissertação, é o primeiro a ser observado nesse modelo animal de estresse neonatal.

A capacidade da DM em alterar a resposta nociceptiva pode ser decorrente do estresse no início da vida causar mudanças duradouras no desenvolvimento de sistemas somatossensoriais e de dor (Schwaller and Fitzgerald 2014). O sistema nervoso imaturo em humanos e roedores é altamente responsivo à estimulação tátil e nociva nesse período (Schwaller and Fitzgerald 2014). O corno dorsal da medula espinhal no rato recém-nascido é caracterizado por grandes campos mecanorreceptivos cutâneos, com predominância de *inputs* de fibras-A sinápticas e projeções difusas de fibras-A aferentes primárias, todas as quais são gradualmente reduzidas e refinadas ao longo das primeiras semanas pós-natais (Beggs et al. 2002). A atividade evocada por fibra C amadurece após a primeira semana pós-natal e, a partir de P10, a estimulação repetitiva de fibras C produz o clássico “*wind up*” (Fitzgerald and Beggs 2001). *Wind up* refere-se ao aumento progressivo na magnitude das respostas nos neurônios do corno dorsal mediada por glutamato através de receptores do tipo NMDA (Li et al. 1999). Além disso, estressores podem contribuir para o aumento do limiar nociceptivo, devido ao estabelecimento de um fenômeno conhecido por “analgesia induzida pelo estresse” (AIS) (Butler and Finn 2009). Esse fenômeno pode estar relacionado a ativação da via nociceptiva inibitória descendente e pela inibição da transmissão ascendente da informação nociceptiva (Butler and Finn 2009). Desta forma, podemos sugerir que a DM em curto prazo seja capaz de reduzir o clássico cenário de *Wind up* produzido pela ativação repetitiva das fibras C, devido ao estresse neonatal, e favorecer o estabelecimento da AIS, alterando a nocicepção dos animais promovendo um episódio analgésico.

Já em relação aos efeitos em longo prazo causados pela DM sob a nocicepção, no teste TFL realizado em P43, verificou-se que a intervenção foi capaz de reduzir o limiar térmico dos machos,

efeito contrário do encontrado em P21 no teste da PQ. Na verdade, o efeito hiperalgésico da DM já foi demonstrado em alguns estudos (Bernardi et al. 1986; Kwok et al. 2014; Yasuda et al. 2016). Eventos estressantes precoces podem resultar na desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), responsável pela resposta ao estresse (Heim et al. 2011). DM pode levar à disfunção desse eixo ao longo da vida, resultando em aumento dos níveis séricos de corticosterona relacionado à diminuição do limiar nociceptivo (Kim et al. 2008, Marais et al. 2008; Esquivel et al. 2009). Embora os níveis de corticosterona não tenham sido medidos nessa dissertação, podemos sugerir que a hiperalgesia de ratos machos apresentada na P43 pode estar relacionada à disfunção do eixo HHA, devido aos conhecidos efeitos da DM sobre esse eixo já descritos na literatura (van Oers et al. 1999; Penke et al. 2001; Daskalakis et al. 2014). Portanto, nossos resultados demonstram que, em curto prazo, a DM aumenta os limiares térmicos nociceptivos dos animais, enquanto que em longo prazo, reduz os limiares em machos. Concluindo, deprivação materna induziu um aumento no limiar nociceptivo independente do gênero no teste da placa quente. No entanto, no TFL esse efeito, foi dependente do gênero. Esse estudo foi o primeiro a demonstrar analgesia induzida por esse modelo animal de estresse neonatal. Sugerimos, que o estresse induzido pela deprivação materna seja decorrente da ativação do eixo HHA induzindo a clássica analgesia induzida pelo estresse. Desta forma, a resposta de neonatos difere de animais adultos expostos a modelos de estresse repetido que apresentam hiperalgesia.

Em relação às análises bioquímicas do nosso estudo realizadas em P44, DM reduziu os níveis hipotalâmicos de BDNF e NGF, assim como o nível hipocampal de TNF- α dos animais privados. A exposição ao alimento palatável (leite condensado) por 3 semanas reduziu os níveis hipotalâmicos de NGF. Interações entre DM x gênero em níveis corticais de NGF demonstraram que a DM reduziu os níveis dessa neurotrofina nos machos privados e aumentou em fêmeas. Em relação aos níveis hipocampais, interações demonstraram que a DM e o alimento palatável isolados reduziu os níveis de NGF nos machos, ocorrendo o oposto nas fêmeas. Quando essas duas

intervenções foram associadas, houve um pequeno aumento nos níveis dessa neurotrofina em machos e uma redução em fêmeas. Observando-se a interação encontrada entre DM x alimento palatável em níveis corticais de TNF- α . O grupo exposto a associação das duas intervenções apresentou uma redução nos níveis desta citocina pro-inflamatória, comparado aos grupos que foram expostos as intervenções isoladamente. Em relação as interações encontradas nos níveis corticais de IL-6, a exposição ao alimento palatável induziu um aumento em machos e uma redução em fêmeas. A associação da DM ao alimento palatável reduziu os níveis corticais de IL-6 somente em machos. Considerando os resultados obtidos nessa dissertação em relação aos marcadores inflamatórios, é possível sugerir que ratos machos são mais susceptíveis a DM ou exposição a alimento palatável, uma vez que a DM reduziu os níveis corticais de IL-10 e o alimento palatável aumentou os níveis de IL-6 nesses animais. Adicionalmente, há efeito do gênero tanto nos parâmetros inflamatórios como nas neurotrofinas. As fêmeas apresentaram aumento nos níveis hipotalâmicos de TNF- α , nos níveis hipocâmpais e hipotalâmicos de IL-6 e BDNF.

Detalhando-se os resultados demonstrados acima, foi possível observar interação entre DM x gênero nos níveis de NGF em córtex cerebral. Fêmeas deprivadas apresentaram aumento nos níveis desta neurotrofina, enquanto o oposto foi encontrado em machos. Similar diferença entre os gêneros foi encontrada em hipocampo; houve interação entre DM x alimento palatável x gênero. Observando isoladamente, DM e o alimento palatável reduziram os níveis hipocâmpais de NGF em machos, e aumentaram em fêmeas. Quando as duas intervenções foram associadas, é possível inferir que enquanto os machos apresentam um aumento estatisticamente não-significativo as fêmeas não apresentaram esse efeito nos níveis hipocâmpais desta neurotrofina. A DM e PF foram capazes de reduzir os níveis hipotalâmicos de NGF em ambos os sexos. É importante destacar que essa neurotrofina é essencial para promover a sobrevivência, diferenciação e funcionamento neuronal, inclusive durante o desenvolvimento. Nossos resultados corroboram um estudo que demonstrou respostas divergentes entre machos e fêmeas submetidos ao estresse precoce (Jaworska

et al. 2008), indicando que ratos machos parecem ser mais suscetíveis a modificações no cuidado materno. Na verdade, acredita-se que animais machos sejam mais sensíveis às modificações na relação mãe-filhote, uma vez que foi observado que a mãe disponibiliza maior atenção aos filhotes machos (como comportamentos do tipo *licking* e *grooming*) do que as fêmeas (Champagne et al. 2012; Auger e Auger 2013). Além disso, eventos estressantes, como a DM tem sido relacionado com a redução dos níveis de NGF (Réus et al. 2011; Dimatelis et al. 2014; Zugno et al. 2015). Notavelmente, baixos níveis de neurofinas em pacientes esquizofrênicos parecem ser devido ao estresse psicológico crônico. Em contraste, alguns estudos demonstram que DM é capaz de aumentar os níveis de NGF (Cirulli et al., 1998, 2000), incluindo uma investigação do nosso grupo de pesquisa onde a exposição a estresse neonatal e a exposição precoce à morfina aumentaram os níveis de NGF em córtex e tronco cerebral em animais com 21 dias de idade (Oliveira et al. 2017).

No que diz respeito ao BDNF, as fêmeas apresentaram níveis hipocâmpais e hipotalâmicos mais altos desta neurotrofina. Esses resultados corroboram estudo de Bakos et al. (2009), que também observou diferenças gênero-específicas. O estrogênio modula as expressões de BDNF por meio de diferentes mecanismos (Chan e Ye 2017), o que pode ter contribuído para o aumento dos níveis observados nas fêmeas. Além disso, DM reduziu os níveis de BDNF no hipotálamo de machos e fêmeas. Esse modelo de estresse neonatal pode induzir respostas de longo prazo decorrentes da ativação repetida do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) (Levine et al. 1991; Smith et al. 1997; Schmidt et al. 2006). Uma vez que glicocorticoides interferem na expressão do mRNA hipotalâmico de BDNF (Jeanneteau et al., 2012), a resposta ao estresse induzida pela DM pode contribuir para a redução dos níveis de BDNF em hipotálamo observados nessa dissertação. É importante ressaltar que o BDNF é uma neurotrofina que desempenha um papel crítico em inúmeras atividades neuronais e suas concentrações reduzidas têm sido implicadas em vários transtornos neurológicos (Chan e Ye, 2017).

No que se refere aos níveis de TNF- α , o grupo exposto a associação de DM e alimento palatável apresentou uma redução nos níveis corticais dessa citocina pró-inflamatória, comparando aos grupos expostos a cada intervenção isoladamente. Foi também observada uma redução nos níveis desta citocina em hipocampo. Fêmeas apresentaram níveis hipotalâmicos de TNF- α mais altos que machos. Hormônios sexuais podem exercer um papel importante nas diferenças dos níveis de interleucinas encontrados em nosso estudo. As fases do ciclo ovariano podem modificar os níveis de citocinas pró-inflamatórias: a produção de TNF- α aumenta durante a fase lútea (baixo estrogênio) em comparação com a fase folicular (alto estrogênio) (Bouman et al. 2005; Fish 2008).

Quanto aos níveis de IL-6, a exposição ao alimento palatável induziu um aumento nos níveis de IL-6 em machos e uma diminuição em fêmeas. Quando a DM foi associada ao alimento palatável, apenas os níveis corticais de IL-6 de machos foram reduzidos. No hipocampo e no hipotálamo, fêmeas apresentam níveis mais elevados desta interleucina. Outros estudos mostraram diferenças nos níveis de IL-6 entre mulheres e homens (Fernandez-Real et al. 2001; Huang et al. 2012). A capacidade do alimento palatável em alterar os níveis de IL-6 já foi descrita (Zeeni et al. 2015; Collins et al. 2016; Vaidya et al. 2017). É importante considerar que leptina é uma adipocina secretada por adipócitos maduros, que regula a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (Paz-Filho et al. 2012). Esse hormônio regula o comportamento alimentar e o metabolismo energético, e suas concentrações circulantes se correlacionam diretamente com o conteúdo de gordura corporal (Zhang et al. 1994; Frederich et al. 1995). Embora os níveis de leptina não tenham sido avaliados em nosso estudo, a literatura mostra que dietas ricas em gordura e carboidrato são capazes de aumentar níveis circulantes de glicose, insulina e leptina (Surwit et al. 1988, 1995, 1997). Recentemente, Toniazzo et al. (2018) verificaram que os efeitos da dieta rica em gordura foram mais pronunciadas nos machos, incluindo a sinalização da leptina. Portanto, podemos sugerir que as modificações nos níveis de IL-6 apresentados em animais submetidos ao alimento palatável em nosso estudo podem envolver contribuições da leptina.

No que diz respeito aos níveis de IL-10, DM reduziu os níveis corticais desta interleucina apenas nos machos. Dimatelis et al. (2012) verificaram que o estresse neonatal promove regulação negativa da expressão de IL-10. Além disso, Wang et al. (2017) encontraram diminuição dos níveis de IL-10 no hipocampo ventral em camundongos machos adultos. IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória, prevenindo a morte das células gliais, aumentando a sobrevivência dos neurônios cerebelares e modulando o eixo HHA evitando comportamentos depressivos (Roque et al. 2009).

Nossos resultados em relação ao consumo estimado de leite condensado pelos grupos que foram expostos a essa intervenção, demonstraram que não foram alterados pela DM. No entanto foi observada uma diferença dependente de gênero, corroborando outros estudos, onde a escolha alimentar também foi afetada pelo gênero (Arganini et al. 2012; Manipa et al. 2017). O ganho de peso dos animais durante as 3 semanas de exposição ao leite condensado, demonstrou haver efeito da idade (crescimento) e do gênero. Animais machos (deprivados ou não) ganharam mais peso quando expostos ao alimento palatável comparando-se às fêmeas. O efeito da idade também foi observado: o aumento de peso foi proporcional ao desenvolvimento (crescimento) dos animais.

Em relação à avaliação do índice de Lee, efeito do gênero também foi observado, onde machos apresentaram índices mais elevados. Tipicamente, ratos machos adultos são maiores que fêmeas, devido a uma diferença persistente na taxa de crescimento a partir da puberdade (Slob et al. 1975). Além disso, a exposição ao alimento palatável impactou diferentemente de acordo com o gênero: esse índice de Lee foi menor nas fêmeas em relação aos machos. Apesar do índice de Lee ser utilizado como parâmetro de avaliação de obesidade, suas limitações na correlação com o percentual de massa gorda foram relatadas, uma vez que o comprimento é um preditor relativamente fraco de massa livre de gordura em animais (Stephens 1980).

Considerando que o índice de Lee apresenta limitações, o peso relativo de tecido adiposo foi também avaliado nos animais. Nesta análise, ratos expostos ao alimento palatável (machos e fêmeas) apresentaram maior peso relativo de tecido adiposo. Embora o ganho de peso corporal dos

animais expostos ao leite condensado não tenha diferido dos animais submetidos à ração padrão, a maior presença de peso relativo de tecido adiposo nos animais do grupo que recebeu leite condensado mostra o efeito dessa intervenção. Um ponto importante que pode ter dificultado o ganho de peso dos animais do nosso estudo é a idade, uma vez que ratos jovens possuem metabolismo acelerado favorecendo o emagrecimento e ganho de massa magra (Tschöp e Heiman 2001). No período de exposição ao leite condensado (P21 a P44), os ratos exibem neuro-comportamentos típicos de adolescentes, com o pico de crescimento entre 4-5 semanas de idade (Spear and Brake 1983; Spear 2000), influenciando o peso dos animais. Desta forma, uma limitação do nosso estudo pode ser o fato de não termos avaliado, em animais adultos, o efeito da DM e da exposição precoce a alimento palatável.

Em nosso estudo, a DM não alterou os parâmetros de peso avaliados. Porém, já está bem estabelecido que a duração, o tipo e a severidade do estresse podem alterar as respostas do animal às dietas (Maniam e Morris 2012). Estressores severos geralmente diminuem a ingestão de alimentos quando os animais são expostos à dieta padrão ou hipercalórica (Pucilowski et al. 1993). O estresse crônico pode aumentar a atividade do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), causando efeitos anoréxicos (Pasquali 2012) e reduzir a expressão do peptídeo orexigênico (NPY) no hipotálamo (Heinrichs et al. 1993). Eventos estressantes precoces, como a DM, podem alterar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que regula a resposta ao estresse (Heim et al. 2001), interferindo na ingestão de alimentos e consequentemente, no peso dos animais.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Nosso estudo demonstrou que a DM pode desencadear um atraso no desenvolvimento neuromotor dos filhotes submetidos à essa intervenção. Efeitos de curto prazo da DM (P20/P21) foram observados, onde essa intervenção provocou um aumento do comportamento exploratório e efeito ansiolítico nos animais deprivados. Também, surpreendentemente, promoveu analgesia térmica, efeito nunca publicado antes para este modelo animal de estresse precoce. Em relação aos efeitos tardios da DM (P42/P43) sobre o comportamento do tipo ansioso, machos e fêmeas responderam diferentemente à intervenção. Assim como, a DM promoveu hiperalgesia em ratos machos, possivelmente devido à disfunção do eixo HHA. A exposição ao leite condensado de P21 a P44 aumentou o peso relativo de tecido adiposo, mas não foi capaz de modificar o peso dos animais durante o experimento. Os efeitos tardios (P44) da DM encontrados nas análises bioquímicas do nosso estudo foram mais evidentes do que os efeitos da exposição ao leite condensado.

Devido aos resultados encontrados nessa dissertação, parece ser relevante a condução de novos grupos experimentais para complementariedade e conclusão dos achados. A inclusão de fêmeas ovariectomizadas, assim como suplementadas com antagonistas de estrogênio, podem elucidar os possíveis efeitos dos hormônios sexuais envolvidos nos desfechos encontrados. Do mesmo modo, a dosagem sérica de corticosterona associada a expressão de receptores de glicocorticoide no SNC, especialmente no hipocampo, um dos principais responsáveis pelo feedback negativo do eixo HHA, podem auxiliar na compreensão da relação desse eixo com eventos estressantes precoces, como a deprivação materna. Desta forma, espera-se que os resultados possam servir de instrumento translacional e contribuir para um maior entendimento dos possíveis efeitos da exposição precoce a um estressor e/ou ao alimento palatável na infância/adolescência.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

REFERÊNCIAS

9 REFERÊNCIAS

- Adachi N, Numakawa T, Richards M, Nakajima S, Kunugi H. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases. *World J Biol Chem.* 2014 Nov 26;5(4):409–28.
- Adamec, R., Kent, P., Anisman, H., Shallow, T., Merali, Z., 1998. Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals—implications for understanding and treating affective disorder following traumatic stress in humans. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 301–318.
- Aisa B, Elizalde N, Tordera R, Lasheras B, Del Río J, Ramírez MJ. Effects of neonatal stress on markers of synaptic plasticity in the hippocampus: implications for spatial memory. *Hippocampus.* 2009 Dec;19(12):1222–31.
- Alvarez-Leite JI, Soares FLP, Teixeira LG. Sistema digestório: integração básico-clínica. Editora Blucher; 2016.
- Amini-Khoei H, Amiri S, Shirzadian A, Haj-Mirzaian A, Alijanpour S, Rahimi-Balaei M, et al. Experiencing neonatal maternal separation increased the seizure threshold in adult male mice: Involvement of the opioid system. *Epilepsy Behav EB.* 2015 Nov;52(Pt A):37–41.
- Andrade RG, Pereira RA, Sichieri R. Consumo alimentar de adolescentes com e sem sobrepeso do Município do Rio de Janeiro. *Cad Saúde Pública.* 2003 Oct;19(5):1485–95.
- Anjos LA. Índice de massa corporal (massa corporal.estatura-2) como indicador do estado nutricional de adultos: revisão da literatura. *Rev Saúde Pública.* 1992 Dec;26(6):431–6.
- Auberval N, Dal S, Bietiger W, Pinget M, Jeandidier N, Maillard-Pedracini E, et al. Metabolic and oxidative stress markers in Wistar rats after 2 months on a high-fat diet. *Diabetol Metab Syndr* 2014; 6: 130. doi: 10.1186/1758-5996-6-130.
- Audet MC, Jacobson-Pick S, Wann BP, Anisman H. Social defeat promotes specific cytokine variations within the prefrontal cortex upon subsequent aggressive or endotoxin challenges. *Brain Brain Behav Immun.* 2011 Aug;25(6):1197-205. doi: 10.1016/j.bbi.2011.03.010.
- Audet MC, Mangano EN, Anisman H. Behavior and Pro-Inflammatory Cytokine Variations Among Submissive and Dominant Mice Engaged in Aggressive Encounters: Moderation by Corticosterone Reactivity. *Front Behav Neurosci.* 2010 Aug 23;4. pii: 156. doi: 10.3389/fnbeh.2010.00156.
- Auger CJ, Auger AP. Permanent and plastic epigenesis in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol.* 2013 Aug;34(3):190–7.
- Aya-Ramos L, Contreras-Vargas C, Rico JL, Dueñas Z. Early maternal separation induces preference for sucrose and aspartame associated with increased blood glucose and hyperactivity. *Food Funct.* 2017 Jul 19;8(7):2592–600. doi: 10.1039/c7fo00408g.
- Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H., Feldon, J., 2004. Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 273–283.
- Barbano MF, Cador M. Opioids for hedonic experience and dopamine to get ready for it. *Psychopharmacology (Berl).* 2007 Apr;191(3):497–506.
- Barbara Monteiro de Oliveira. Os transtornos alimentares sob a perspectiva analítico-comportamental. Brasília; 2005.
- Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. *Fisiologia Médica de Ganong - 24ed.* AMGH Editora;

2014.

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed Editora; 2017.

Beggs S, Torsney C, Drew LJ, Fitzgerald M. The postnatal reorganization of primary afferent input and dorsal horn cell receptive fields in the rat spinal cord is an activity-dependent process. *Eur. J. Neurosci* 2002; 16: 1249–1258.

Bellisle F, Drewnowski A, Anderson GH, Westerterp-Plantenga M, Martin CK. Sweetness, satiation, and satiety. *J Nutr.* 2012 Jun;142(6):1149S–54S.

Benetti F, Andrade de Araujo P, Sanvitto GL, Lucion AB. Effects of neonatal novelty exposure on sexual behavior, fear, and stress-response in adult rats. *Dev Psychobiol.* 2007 Apr;49(3):258–64.

Berge OG, Garcia-Cabrera I, Hole K. Response latencies in the tail-flick test depend on tail skin temperature. *Neurosci Lett.* 1988, 86:284-288.

Bernardi M, Genedani S, Tagliavini S, Bertolini A. Effects on long-term sensitivity to pain and morphine of stress induced in the newborn rat by pain or manipulation. *Physiol Behav.* 1986;37(5):827–31.

Berridge KC. “Liking” and “wanting” food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiol Behav.* 2009 Jul 14;97(5):537–50.

Berthoud H-R, Morrison C. The Brain, Appetite, and Obesity. *Annu Rev Psychol.* 2008;59(1):55–92.

Bertino M, Beauchamp GK, Engelman K. Naltrexone, an opioid blocker, alters taste perception and nutrient intake in humans. *Am J Physiol.* 1991 Jul;261(1 Pt 2):R59-63.

Bessesen DH. Regulation of body weight: what is the regulated parameter? *Physiol Behav.* 2011 Sep 26;104(4):599-607.

Bian Y, Yang L, Wang Z, Wang Q, Zeng L, Xu G. Repeated Three-Hour Maternal Separation Induces Depression-Like Behavior and Affects the Expression of Hippocampal Plasticity-Related Proteins in C57BL/6N Mice. *Neural Plast.* 2015;2015:627837.

Bignall KE. Ontogeny of levels of neural organization: the righting reflex as a model. *Exp Neurol.* 1974 Mar;42(3):566–73.

Blundell JE, Lawton CL, Halford JC. Serotonin, eating behavior, and fat intake. *Obes Res.* 1995 Nov;3 Suppl 4:471S-476S.

Bodnar RJ. Endogenous opioids and feeding behavior: a 30-year historical perspective. *Peptides.* 2004 Apr;25(4):697–725.

Born J, G. T. Lemmens S, Martens M, Formisano E, Goebel R, S. Westerterp-Plantenga M. Brain representation of liking and wanting as a function of hunger and satiety. *Appetite.* 2010 Jun 1;54:635–635.

Bose P, Fielding R, Ameis KM, Vacca-Galloway LL. A novel behavioral method to detect motoneuron disease in Wobbler mice aged three to seven days old. *Brain Res.* 1998 Dec 7;813(2):334–42.

Braun AA, Skelton MR, Vorhees CV, Williams MT. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011 Jan;97(3):406-15. doi: 10.1016/j.pbb.2010.09.013.

Burneiko RCM, Diniz YS, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GMX, Faine LA, et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2006 Jul;44(7):1167–72.

- Butler RK, Finn DP. Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol*. 2009 Jul;88(3):184–202.
- Cabib S, Puglisi-Allegra S, D’Amato FR. Effects of postnatal stress on dopamine mesolimbic system responses to aversive experiences in adult life. *Brain Res*. 1993 Feb 26;604(1–2):232–9.
- Cao B, Wang J, Zhang X, Yang X, Poon DC, Jelfs B, Chan RH, Wu JC, Li Y. Impairment of decision making and disruption of synchrony between basolateral amygdala and anterior cingulate cortex in the maternally separated rat. *Neurobiol Learn Mem*. 2016 Dec;136:74-85. doi: 10.1016/j.nlm.2016.09.015.
- Carobreza AP, Bertogliob LJ. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: The elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci Biobehav Rev*. 2005;29(8):1193-205.
- Cavalcanti N, Lins DC. Diabetes na prática Clínica. E-book 2.0. [Internet]. Vol. Módulo 1. Capítulo 5. O papel dos hormônios intestinais no controle glicêmico. Sociedade Brasileira de Diabetes; 2017 [cited 2017 Oct 31]. Available from: <http://www.diabetes.org.br/ebook/component/k2/item/35-o-papel-dos-hormonios-intestinais-no-controle-glicemico>.
- Champagne FA. Interplay between social experiences and the genome: epigenetic consequences for behavior. *Adv Genet*. 2012;77:33–57. doi: 10.1016/B978-0-12-387687-4.00002-7.
- Chesher GB, Jackson DM. Post-swim grooming in mice inhibited by dopamine receptor antagonists and by cannabinoids. *Pharmacol Biochem Behav*. 1980, 13(3):479–481.
- Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Jul;5(7):374-81. doi: 10.1038/nrendo.2009.106.
- Cinti S. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 Jul;73(1):9–15.
- Cirulli F, Alleva E, Antonelli A, Aloe L. NGF expression in the developing rat brain: effects of maternal separation. *Dev Brain Res*. 2000 Oct 28;123(2):129–34.
- Cirulli F, Capone F, Bonsignore LT, Aloe L, Alleva E. Early behavioural enrichment in the form of handling renders mouse pups unresponsive to anxiolytic drugs and increases NGF levels in the hippocampus. *Behav Brain Res*. 2007 Mar 28;178(2):208–15.
- Colantuoni C, Schwenker J, McCarthy J, Rada P, Ladenheim B, Cadet JL, et al. Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. *Neuroreport*. 2001 Nov 16;12(16):3549–52.
- Contoreggi C. Corticotropin releasing hormone and imaging, rethinking the stress axis. *Nucl Med Biol*. 2015 Apr;42(4):323-39. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2014.11.008.
- Corwin RL, Avena NM, Boggiano MM. Feeding and reward: perspectives from three rat models of binge eating. *Physiol Behav*. 2011;104(1):87-97. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.04.041. Epub 2011 May 1.
- Craft TKS, Zhang N, Glasper ER, Hurn PD, DeVries AC. Neonatal factors influence adult stroke outcome. *Psychoneuroendocrinology*. 2006 Jun 1;31(5):601–13.
- D’Amato FR, Cabib S, Ventura R, Orsini C. Long-term effects of postnatal manipulation on emotionality are prevented by maternal anxiolytic treatment in mice. *Dev Psychobiol*. 1998 Apr;32(3):225–34.
- D’Amato FR, Mazzacane E, Capone F, Pavone F. Effects of postnatal manipulation on nociception and morphine sensitivity in adult mice. *Dev Brain Res*. 1999 Oct 20;117(1):15–20.
- da Silva ASR, Pauli JR, Ropelle ER, Oliveira AG, Cintra DE, De Souza CT, et al. Exercise intensity, inflammatory signaling, and insulin resistance in obese rats. *Med Sci Sports Exerc*. 2010 Dec;42(12):2180–8.
- Damanaki A, Nokhbehsaim M, Hiththetiya K, Memmert S, Gao J, Nguyen KA, Götz W, Jäger A, Wahl G, Deschner J. Characterization of a diet-induced obesity rat model for periodontal research. *Clin Oral Investig*. 2018 Jun 16. doi: 10.1007/s00784-018-2514-y.

Daskalakis NP, Enthoven L, Schoonheere E, de Kloet ER, Oitzl MS. Immediate Effects of Maternal Deprivation on the (Re)Activity of the HPA-Axis Differ in CD1 and C57Bl/6J Mouse Pups. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014 Nov 5;5:190. doi: 10.3389/fendo.2014.00190. eCollection 2014.

Daskalakis NP, De Kloet ER, Yehuda R, Malaspina D, Kranz TM. Early Life Stress Effects on Glucocorticoid-BDNF Interplay in the Hippocampus. *Front Mol Neurosci*. 2015;8:68.

de Moraes C, Camargo EA, Antunes E, de Nucci G, Zanesco A. Reactivity of mesenteric and aortic rings from trained rats fed with high caloric diet. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 Jul;147(3):788–92.

de Moraes C, Davel APC, Rossoni LV, Antunes E, Zanesco A. Exercise training improves relaxation response and SOD-1 expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. *BMC Physiol*. 2008 May 29;8:12.

de Oliveira C, Scarabelot VL, de Souza A, de Oliveira CM, Medeiros LF, de Macedo IC, et al. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides*. 2014 Jan;51:46–53.

de Oliveira C, de Oliveira CM, de Macedo IC, Quevedo AS, Filho PRM, Silva FR da, et al. Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats. *Stress Amst Neth*. 2015;18(5):514–23.

de Oliveira C, Scarabelot VL, Vercelino R, Silveira NP, Adachi LNS, Regner GG, et al. Morphine exposure and maternal deprivation during the early postnatal period alter neuromotor development and nerve growth factor levels. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci*. 2017 Dec;63:8–15.

de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Cytokines and pain. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011 Apr;61(2):260–5.

de Schepper JA, Smitz JP, Zhou XL, Louis O, Velkeniers BE, Vanhaelst L. Cafeteria diet-induced obesity is associated with a low spontaneous growth hormone secretion and normal plasma insulin-like growth factor-I concentrations. *Growth Horm IGF Res Off J Growth Horm Res Soc Int IGF Res Soc*. 1998 Oct;8(5):397–401.

de Wit L, Luppino F, van Straten A, Penninx B, Zitman F, Cuijpers P. Depression and obesity: a meta-analysis of community-based studies. *Psychiatry Res*. 2010 Jul 30;178(2):230-5. doi: 10.1016/j.psychres.2009.04.015.

Derks NAV, Krugers HJ, Hoogenraad CC, Joëls M, Sarabdjitsingh RA. Effects of Early Life Stress on Synaptic Plasticity in the Developing Hippocampus of Male and Female Rats. *PloS One*. 2016;11(10):e0164551.

Dickinson AL, Leach MC, Flecknell PA. Influence of early neonatal experience on nociceptive responses and analgesic effects in rats. *Lab Anim*. 2009 Jan;43(1):11–6.

Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2000 Apr;35(4):1009–15.

Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP. Effects of pretest manipulation on elevated plus-maze behavior in adolescent and adult male and female Sprague-Dawley rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2009 May;92(3):413-23. doi: 10.1016/j.pbb.2009.01.006.

Dornelles CTL. Comparação de grelina, leptina, insulina e glicose entre crianças e adolescentes cirróticos e

hígidos. Porto Alegre. PPG em Saúde da Criança e do Adolescente. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.

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

Erlanson-Albertsson C. How palatable food disrupts appetite regulation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005 Aug;97(2):61-73.

Esquivel BB, Levin G, Rivarola MA, Suarez MM. 2009. Maternal separation and lesion of adtn alters anxiety and adrenal activity in male rats. *Int J Neurosci.* 119(9):1319–1336.

Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutr Burbank Los Angel Cty Calif.* 2004 Feb;20(2):218–24.

Fantino M, Hosotte J, Apfelbaum M. An opioid antagonist, naltrexone, reduces preference for sucrose in humans. *Am J Physiol.* 1986 Jul;251(1 Pt 2):R91-96.

Farkas J, Reglodi D, Gaszner B, Szogyi D, Horvath G, Lubics A, et al. Effects of maternal separation on the neurobehavioral development of newborn Wistar rats. *Brain Res Bull.* 2009 May 29;79(3):208–14. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.12.011.

Filip M, Faron-Górecka A, Kuśmider M, Gołda A, Frankowska M, Dziedzicka-Wasylewska M. Alterations in BDNF and trkB mRNAs following acute or sensitizing cocaine treatments and withdrawal. *Brain Res.* 2006 Feb 3;1071(1):218–25.

Fitzgerald M. The development of nociceptive circuits. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6:507–520. doi: 10.1038/nrn1701.

Fitzgerald M. Development of pain mechanisms. *Br Med Bull.* 1991 Jul;47(3):667-75.

Fitzgerald MJT. Perinatal changes in epidermal innervation in rat and mouse. *J Comp Neurol.* 1966, 126:37-41.

Fitzgerald M, Beggs S. The neurobiology of pain: developmental aspects. *Neuroscientist.* 2001 Jun;7(3):246-57.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MIC, Lima FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol.* 2006 Apr;50(2):216–29.

Fuentes S, Daviu N, Gagliano H, Garrido P, Zelena D, Monasterio N, et al. Sex-dependent effects of an early life treatment in rats that increases maternal care: vulnerability or resilience? *Front Behav Neurosci.* 2014 Feb 25;8:56. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00056.

Fumagalli E, Black J, Vogelsong I, Ilic M. Quality of service provision in electric Power distribution systems though reliability insurance. *IEEE transactions on Power systems* 2004 19 (3), 1286-1293.

Gobinath AR, Mahmoud R, Galea LA. Influence of sex and stress exposure across the lifespan on endophenotypes of depression: focus on behavior, glucocorticoids, and hippocampus. *Front Neurosci.* 2014 8, p. 420.

Golan H, Huleihel M. The effect of prenatal hypoxia on brain development: short- and long-term consequences demonstrated in rodent models. *Dev Sci.* 2006 Jul;9(4):338–49.

Gracia-Rubio I, Moscoso-Castro M, Pozo OJ, Marcos J, Nadal R, Valverde O. Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2016 Feb 4;65:104–17.

- Grill HJ. Distributed Neural Control of Energy Balance: Contributions from Hindbrain and Hypothalamus. *Obesity*. 2006 Aug 1;14(S8):216S–221S.
- Grimm JW, Lu L, Hayashi T, Hope BT, Su T-P, Shaham Y. Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003 Feb 1;23(3):742–7.
- Guerra RLF, Prado WL, Cheik NC, Viana FP, Botero JP, Vendramini RC, et al. Effects of 2 or 5 consecutive exercise days on adipocyte area and lipid parameters in Wistar rats. *Lipids Health Dis*. 2007 Jul 2;6:16.
- Guy ER, Abbott FV. The behavioral response to formalin in preweanling rats. *Pain*. 1992, 51:81–90.
- Haber SN, Knutson B. The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2010 Jan;35(1):4–26.
- Hall CS, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field: a contribution to methods in comparative psychology. *University of California Publications in Psychology* 1932 6: 1–12
- Handley, SL., Mithani, S. 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol*. 327, 1–5.
- Heim C, Newport DJ, Bonsall R, Miller AH, Nemeroff CB. Altered pituitary-adrenal axis responses to provocative challenge tests in adult survivors of childhood abuse. *Am J Psychiatr*. 2001;158:575–581. doi: 10.1176/appi.ajp.158.4.575.
- HHS. The U.S. Department of Health and Human Services. The Surgeon General's Call To Action To Prevent and Decrease Overweight and Obesity. 2001. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44206/>
- Hojo VES, Melo JM, Nobre LN. Alterações hormonais após cirurgia bariátrica. *Rev Bras Nutr Clin*. 2007;22(1):77–82.
- Homberg JR, van den Akker M, Raasø HS, Wardeh G, Binnekade R, Schoffelmeer AN, de Vries TJ. Enhanced motivation to self-administer cocaine is predicted by self-grooming behaviour and relates to dopamine release in the rat medial prefrontal cortex and amygdala. *Eur J Neurosci*. 2002 May;15(9):1542–50.
- Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:677–736.
- Hume C, Jachs B, Menzies J. Homeostatic responses to palatable food consumption in satiated rats. *Obes Silver Spring Md*. 2016 Oct;24(10):2126–32.
- Hume C, Sabatier N, Menzies J. High-Sugar, but Not High-Fat, Food Activates Supraoptic Nucleus Neurons in the Male Rat. *Endocrinology*. 2017 Jul 1;158(7):2200–11.
- Huot RL, Gonzalez ME, Ladd CO, Thrivikraman KV, Plotsky PM. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary-adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*. 2004 Feb;29(2):279–89.
- Iijima M, Chaki S. Separation-induced ultrasonic vocalization in rat pups: further pharmacological characterization. *Pharmacol Biochem Behav*. 2005 Dec;82(4):652–7.
- Jaimés-Hoy L, Gutiérrez-Mariscal M, Vargas Y, Pérez-Maldonado A, Romero F, Sánchez-Jaramillo E, Charli JL, Joseph-Bravo P. Neonatal Maternal Separation Alters, in a Sex-Specific Manner, the Expression of TRH, of TRH-Degrading Ectoenzyme in the Rat Hypothalamus, and the Response of the Thyroid Axis to Starvation. *Endocrinology*. 2016 Aug;157(8):3253-65. doi: 10.1210/en.2016-1239.

- Jaworska N, Dwyer SM, Rusak B. Repeated neonatal separation results in different neurochemical and behavioral changes in adult male and female Mongolian gerbils. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008 Feb 1;88(4):533–41. doi: 10.1016/j.pbb.2007.10.012.
- Kalueff AV, Stewart AM, Song C, Berridge KC, Graybiel AM, Fentress JC. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2016 Jan;17(1):45-59. doi: 10.1038/nrn.2015.8.
- Kanoski SE, Davidson TL. Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav.* 2011 Apr 18;103(1):59-68. doi: 10.1016/j.physbeh.2010.12.003.
- Keller L, Xu M, Wang HX, Winblad B, Fratiglioni L, Graff C. The obesity related gene, FTO, interacts with APOE, and is associated with Alzheimer's disease risk: a prospective cohort study. *J Alzheimers Dis.* 2011;23(3):461-9. doi: 10.3233/JAD-2010-101068.
- Kelley AE, Berridge KC. The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2002 May 1;22(9):3306–11.
- Kenny PJ. Reward mechanisms in obesity: new insights and future directions. *Neuron.* 2011 Feb 24;69(4):664-79. doi: 10.1016/j.neuron.2011.02.016.
- Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology.* 2009 Jun;34(5):762–72.
- Kim JY, Kim D, Park K, Lee JH, Jahng JW. Highly palatable food access during adolescence increased anxiety-/depression-like behaviors in male, but not in female, rats. *Nutr Neurosci.* 2017 Apr 11:1-9. doi: 10.1080/1028415X.2017.1313583.
- Kim YS, Lee MY, Choi CS, Sohn YW, Park BR, Choi MG, Nah YH, Choi SC. The effect of chronic variable stress on bowel habit and adrenal function in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23(12):1840–1846. doi: 10.1111/j.1440-1746.2008.05524.x.
- King TE, Joynes RL, Grau JW. Tail-flick test: II. The role of supraspinal systems and avoidance learning. *Behav Neurosci.* 1997, 111:754-767.
- Kwok CHT, Devonshire IM, Bennett AJ, Hathway GJ. Postnatal maturation of endogenous opioid systems within the periaqueductal grey and spinal dorsal horn of the rat. *Pain.* 2014 Jan;155(1):168–78.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 2001, 53:597-652.
- Lee HJ, Kim JW, Yim SV, Kim MJ, Kim SA, Kim YJ, et al. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Mol Psychiatry.* 2001 Nov;6(6):610, 725–8.
- Lemmens SG, Rutters F, Born JM, Westterp-Plantenga MS. Stress augments food “wanting” and energy intake in visceral overweight subjects in the absence of hunger. *Physiol Behav.* 2011 May 3;103(2):157–63.
- Li J, Simone DA, Larson AA. Wind up leads to characteristics of central sensitization. *Pain.* 1999 Jan;79(1):75-82.
- Lippmann M, Bress A, Nemeroff CB, Plotsky PM, Monteggia LM. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur J Neurosci.* 2007 May;25(10):3091-8.
- Lockie SH, McAuley CV, Rawlinson S, Guiney N, Andrews ZB. Food Seeking in a Risky Environment: A Method for Evaluating Risk and Reward Value in Food Seeking and Consumption in Mice. *Front Neurosci.* 2017 Jan 30;11:24. doi: 10.3389/fnins.2017.00024.
- Levine S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal

behavior. *Neurotox Res.* 2002 Sep;4(5–6):557–64.

López IP, Marti A, Milagro FI, Zulet Md M de los A, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA, et al. DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res.* 2003 Feb;11(2):188–94.

Loram LC, Taylor FR, Strand KA, Frank MG, Sholar P, Harrison JA, et al. Prior exposure to glucocorticoids potentiates lipopolysaccharide induced mechanical allodynia and spinal neuroinflammation. *Brain Behav Immun.* 2011 Oct;25(7):1408–15.

Lozano I, Van der Werf R, Bietiger W, Seyfritz E, Peronet C, Pinget M, et al. High-fructose and high-fat diet-induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications. *Nutr Metab [Internet]*. 2016 Feb 25;13. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4766713/>

Lundberg S, Martinsson M, Nylander I, Roman E. Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. *Horm Behav.* 2017 Jan;87:137–44.

Luppino FS, de Wit LM, Bouvy PF, Stijnen T, Cuijpers P, Penninx BW, Zitman FG. Overweight, obesity, and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry.* 2010 Mar;67(3):220-9. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.2.

Macedo IC, de Freitas JS, da Silva Torres IL. The Influence of Palatable Diets in Reward System Activation: A Mini Review. *Adv Pharmacol Sci [Internet]*. 2016;2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4818794/>

Machado TD, DalleMolle R, Laureano DP, Portella AK, Werlang IC, BenettiCda S, Noschang C, Silveira PP. Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for "comfort foods" in adult female rats. *Stress.* 2013 Sep;16(5):549-56. doi: 10.3109/10253890.2013.816841.

Maciag CM, Dent G, Gilligan P, He L, Dowling K, Ko T, Levine S, Smith MA. Effects of a non-peptide CRF antagonist (DMP696) on the behavioral and endocrine sequelae of maternal separation. *Neuropsychopharmacology.* 2002 May;26(5):574-82.

Macedo IC, Rozisky JR, Oliveira C, Oliveira CM, Laste G, Nonose Y, Santos VS, Marques PR, Ribeiro MF, Caumo W, Torres ILS. Chronic stress associated with hypercaloric diet changes the hippocampal BDNF levels in male Wistar rats. *Neuropeptides.* 2015 Jun;51:75-81. doi: 10.1016/j.npep.2015.01.002.

MacKay JC, Kent P, James JS, Cayer C, Merali Z. Ability of palatable food consumption to buffer against the short- and long-term behavioral consequences of social defeat exposure during juvenility in rats. *Physiol Behav.* 2017 Aug 1;177:113-121. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.04.002.

MacQueen GM, Ramakrishnan K, Ratnasingan R, Chen B, Young LT. Desipramine treatment reduces the long-term behavioural and neurochemical sequelae of early-life maternal separation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003 Dec;6(4):391–6.

Macri S, Laviola G. Single episode of maternal deprivation and adult depressive profile in mice: interaction with cannabinoid exposure during adolescence. *Behav Brain Res.* 2004 Sep 23;154(1):231–8.

Magaji MG, Iniahe LO, Abolarin M, Abdullahi OI, Magaji RA. Neurobehavioural evaluation of resveratrol in murine models of anxiety and schizophrenia. *Metab Brain Dis.* 2017 Apr;32(2):437-442. doi: 10.1007/s11011-016-9927-6.

Maior AS. Regulação hormonal na ingestão alimentar: um breve relato. *Medicina (Ribeirão Preto).* 2012;45(3):303–9.

Marais L, van Rensburg SJ, van Zyl JM, Stein DJ, Daniels WM. Maternal separation of rat pups increases

- the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neurosci Res.* 2008; 61(1):106–112. doi: 10.1016/j.neures.2008.01.011.
- Marshall AT, Liu AT, Murphy NP, Maidment NT, Ostlund SB. Sex-specific enhancement of palatability-driven feeding in adolescent rats. *PloS One.* 2017;12(7):e0180907.
- Martini M, Valverde O. A single episode of maternal deprivation impairs the motivation for cocaine in adolescent mice. *Psychopharmacology (Berl).* 2012 Jan;219(1):149–58.
- Matthews RT, German DC. Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. *Neuroscience.* 1984 Mar;11(3):617–25.
- Matzeu A, Cauvi G, Kerr TM, Weiss F, Martin-Fardon R. The paraventricular nucleus of the thalamus is differentially recruited by stimuli conditioned to the availability of cocaine versus palatable food. *Addict Biol.* 2017 Jan;22(1):70–7.
- McGough NNH, He D-Y, Logrip ML, Jeanblanc J, Phamluong K, Luong K, et al. RACK1 and brain-derived neurotrophic factor: a homeostatic pathway that regulates alcohol addiction. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2004 Nov 17;24(46):10542–52.
- Mela DJ. Eating for pleasure or just wanting to eat? Reconsidering sensory hedonic responses as a driver of obesity. *Appetite.* 2006 Jul;47(1):10–7.
- Mela V, Piscitelli F, Berzal AL, Chowen J, Silvestri C, Viveros MP, et al. Sex-dependent effects of neonatal maternal deprivation on endocannabinoid levels in the adipose tissue: influence of diet. *J Physiol Biochem.* 2016 Aug;73(3):349–57.
- Mayeux R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *Neuro Rx.* 2004 Apr; 1(2): 182–188. doi: 10.1602/neurorx.1.2.182.
- Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Physical exercise can reverse the deficit in fear memory induced by maternal deprivation. *Neurobiol Learn Mem.* 2009 Oct;92(3):364–9.
- Michopoulos V. Stress-induced alterations in estradiol sensitivity increase risk for obesity in women. *Physiol Behav* 2016 1; 166: 56–64. doi:10.1016/j.physbeh.2016.05.016.
- Millstein RA, Holmes A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci Biobehav Rev.* 2007 Jan 1;31(1):3–17.
- Mirescu C, Peters JD, Gould E. Early life experience alters response of adult neurogenesis to stress. *Nat Neurosci.* 2004 Aug;7(8):841–6.
- Moles A, Rizzi R, D'Amato FR. Postnatal stress in mice: does “stressing” the mother have the same effect as “stressing” the pups? *Dev Psychobiol.* 2004 May;44(4):230–7.
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature.* 2006 Sep 21;443(7109):289–95.
- Motz BA, Alberts JR. The validity and utility of geotaxis in young rodents. *Neurotoxicol Teratol.* 2005 Jul 1;27(4):529–33. doi: 10.1016/j.ntt.2005.06.005.
- Moura RF de, Cambri LT, Junior Q, De AC, Nascimento CMC, Arantes LM, et al. Aerobic capacity of rats fed with fructose rich diet. *Rev Bras Med Esporte.* 2008 Oct;14(5):422–6.
- Naderali EK, Brown MJ, Pickavance LC, Wilding JP, Doyle PJ, Williams G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2001 Nov;101(5):499–506.

- Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, et al. A Hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Amp Metabol.* 2008 Aug;52(6):968–74.
- Nathan PJ, O’Neill BV, Bush MA, Koch A, Tao WX, Maltby K, et al. Opioid receptor modulation of hedonic taste preference and food intake: a single-dose safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic investigation with GSK1521498, a novel μ -opioid receptor inverse agonist. *J Clin Pharmacol.* 2012 Apr;52(4):464–74.
- Necker R, Hellon RF. Noxious thermal input from the rat tail: modulation by descending inhibitory influences. *Pain.* 1978, 4:231-242.
- Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Princípios de Bioquímica.* 4ª Ed. Sarvier Editora; 2006.
- NIH. National Institutes Of Health. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults. National Heart, Lung, and Blood Institute; 1998.
- Ogden CL, Carroll MD, Lawman HG, Fryar CD, Kruszon-Moran D, Kit BK, Flegal KM. Trends in Obesity Prevalence Among Children and Adolescents in the United States, 1988-1994 Through 2013-2014. *JAMA.* 2016 Jun 7;315(21):2292-9. doi: 10.1001/jama.2016.6361.
- Painsipp E, Köfer MJ, Sinner F, Holzer P. Prolonged Depression-Like Behavior Caused by Immune Challenge: Influence of Mouse Strain and Social Environment. *PLOS ONE.* 2011 Jun 6;6(6):e20719.
- Parfitt DB, Levin JK, Saltstein KP, Klayman AS, Greer LM, Helmreich DL. Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57BL/6 mice. *Brain Res.* 2004 Jul 30;1016(1):111–8.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Penke Z, Felszeghy K, Fernette B, Sage D, Nyakas C, Burette A. Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-related behaviour in the rat. *Eur J Neurosci.* 2001 Aug;14(4):747-55.
- Petry CJ, Ozanne SE, Wang CL, Hales CN. Effects of early protein restriction and adult obesity on rat pancreatic hormone content and glucose tolerance. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Metab.* 2000 Jun;32(6):233–9.
- Pickering G, Loriot MA, Libert F, Eschalier A, Beaune P, Dubray C, Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin Pharmacol Ther.* 2006 Apr;79(4):371-8.
- Pinheiro RMC, de Lima MNM, Portal BCD, Busato SB, Falavigna L, Ferreira RDP, et al. Long-lasting recognition memory impairment and alterations in brain levels of cytokines and BDNF induced by maternal deprivation: effects of valproic acid and topiramate. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 2015 May;122(5):709–19.
- Plotsky PM, Thiruvikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol.* 2005 Dec;30(12):2192–204.
- Rabasa C, Winsa-Jörnulf J, Vogel H, Babaei CS, Askevik K, Dickson SL. Behavioral consequences of exposure to a high fat diet during the post-weaning period in rats. *Horm Behav.* 2016 Sep;85:56-66. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.07.008.
- Ramos A, Berton O, Mormede P and Chaouloff F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. *Behav Brain Res* 1997 85: 57–69

- Renard GM, Suárez MM, Levin GM, Rivarola MA. Sex differences in rats: effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. *Physiol Behav.* 2005 Jun 30;85(3):363–9.
- Renard GM, Rivarola MA, Suárez MM. Sexual dimorphism in rats: effects of early maternal separation and variable chronic stress on pituitary-adrenal axis and behavior. *Int J Dev Neurosci Off J Int Soc Dev Neurosci.* 2007 Oct;25(6):373–9.
- Ribeiro G, Santos O. Recompensa alimentar: mecanismos envolvidos e implicações para a obesidade. *Rev Port Endocrinol Diabetes E Metab.* 2013 Jul 1;8(2):82–8.
- Roceri M, Cirulli F, Pessina C, Peretto P, Racagni G, Riva MA. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol Psychiatry.* 2004 Apr 1;55(7):708–14.
- Rodgers RJ, Dalvi A. (1997). Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 801–810.
- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz J Med Biol Res.* 1997 Mar;30(3):289-304.
- Rohden F. O império dos hormônios e a construção da diferença entre os sexos. *História, Ciências, Saúde – Manguinhos*, Rio de Janeiro, v.15, supl., p.133-152, jun. 2008).
- Romeo RD, Mueller A, Sisti HM, Ogawa S, McEwen BS, Brake WG. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. *Horm Behav.* 2003 May 1;43(5):561–7.
- Rosini TC, Silva ASR da, Moraes C de. Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Médica Bras.* 2012 Jun;58(3):383–7.
- Schmidt MV, Schmidt M, Oitzl MS, Levine S, de Kloet ER. The HPA system during the postnatal development of CD1 mice and the effects of maternal deprivation. *Brain Res Dev Brain Res.* 2002 Nov 15;139(1):39–49.
- Schmidt MV, Schmidt M, Levine S, Oitzl MS, van der Mark M, Müller MB, et al. Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during the stress hyporesponsive period of the mouse. *Endocrinology.* 2005 Mar;146(3):1458–64.
- Schmitt U, Hiemke, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 59(4):807–811, 1998.
- Schwaller F, Fitzgerald M. The consequences of pain in early life: injury-induced plasticity in developing pain pathways. *Eur J Neurosci* 2014; 39: 344-355.
- Sclafani A, Ackroff K. Reinforcement value of sucrose measured by progressive ratio operant licking in the rat. *Physiol Behav.* 2003 Sep 1;79(4):663–70.
- Segni, MD; Patrono, E; Patella, L; Puglisi-Allegra, S et al.(2014). Animal Models of Compulsive Eating Behavior. *Nutrients*.6, p. 4591-4609).
- Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol.* 2013 Sep;6(3):126-35. doi: 10.2478/intox-2013-0020.
- Sethi JK, Hotamisligil GS. The role of TNF alpha in adipocyte metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Feb;10(1):19–29.
- Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates

- with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *NeuroImage*. 2003 Aug;19(4):1709–15.
- Solas M, Aisa B, Mugueta MC, Del Río J, Tordera RM, Ramírez MJ. Interactions between age, stress and insulin on cognition: implications for Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. 2010 Jul;35(8):1664–73.
- Spruijt BM, Gispen WH. Behavioral sequences as an easily quantifiable parameter in experimental studies. *Physiol Behav*. 1984 May;32(5):707-10.
- Spruijt BM, Cools AR, Ellenbroek BA, Gispen WH. Dopaminergic modulation of ACTH-induced grooming. *Eur J Pharmacol*. 1986 Jan 29;120(3):249-56.
- Spruijt BM, Welbergen P, Brakkee J, Gispen WH. An ethological analysis of excessive grooming in young and aged rats. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;525:89-100.
- Stice E, Spoor S, Bohon C, Small DM. Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science*. 2008 Oct 17;322(5900):449–52.
- Sukoff Rizzo SJ, Neal SJ, Hughes ZA, Beyna M, Rosenzweig-Lipson S, Moss SJ, et al. Evidence for sustained elevation of IL-6 in the CNS as a key contributor of depressive-like phenotypes. *Transl Psychiatry*. 2012 Dec 4;2:e199.
- Teixeira AL, Barbosa IG, Diniz BS, Kummer A. Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function. *Biomark Med*. 2010 Dec;4(6):871–87.
- Toniazzo AP, M Arcego D, Lazzaretti C, Lampert C, N Weis 4, Proto-Siqueira R, Krolow R, Dalmaz C. Sex-specific effects of prepubertal stress and high-fat diet on leptin signaling in rats. *Nutrition*. 2018 Jun;50:18-25. doi: 10.1016/j.nut.2017.10.018.
- Trenchard E, Silverstone T. Naloxone reduces the food intake of normal human volunteers. *Appetite*. 1983 Mar;4(1):43–50.
- Troisi A, Frazzetto G, Carola V, Di Lorenzo G, Coviello M, Siracusano A, et al. Variation in the μ -opioid receptor gene (OPRM1) moderates the influence of early maternal care on fearful attachment. *Soc Cogn Affect Neurosci*. 2012 Jun;7(5):542–7.
- Tschöp M, Heiman ML. Rodent obesity models: an overview. *Exp Clin Endocrinol Diabetes Off J Ger Soc Endocrinol Ger Diabetes Assoc*. 2001;109(6):307–19.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller LD. BDNF enhances quantal neurotransmitter release and increases the number of docked vesicles at the active zones of hippocampal excitatory synapses. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2001 Jun 15;21(12):4249–58.
- Tyler WJ, Pozzo-Miller L. Miniature synaptic transmission and BDNF modulate dendritic spine growth and form in rat CA1 neurones. *J Physiol*. 2003 Dec 1;553(Pt 2):497–509.
- Ulrich-Lai YM, Fulton S, Wilson M, Petrovich G, Rinaman L. Stress Exposure, Food Intake, and Emotional State. *Stress*. 2015; 18(4): 381–399. doi: 10.3109/10253890.2015.1062981.
- van Oers HJ, de Kloet ER, Levine S. Persistent effects of maternal deprivation on HPA regulation can be reversed by feeding and stroking, but not by dexamethasone. *J Neuroendocrinol*. 1999 Aug;11(8):581-8.
- Van Praag H, Frenk H. Evidence for opiate tolerance in newborn rats. *Dev Brain Res*. 1991, 60:99-102.
- Varlamov O. Western-style diet, sex steroids and metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2017 May;1863(5):1147-1155. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.05.025. Epub 2016 Jun 3.
- Venerosi A, Cirulli F, Capone F, Alleva E. Prolonged perinatal AZT administration and early maternal separation: effects on social and emotional behaviour of periadolescent mice. *Pharmacol Biochem Behav*.

2003 Feb;74(3):671–81.

Xiong G-J, Yang Y, Wang L-P, Xu L, Mao R-R. Maternal separation exaggerates spontaneous recovery of extinguished contextual fear in adult female rats. *Behav Brain Res*. 2014 Aug 1;269:75–80. doi: 10.1016/j.bbr.2014.04.015.

Xu H, Ye Y, Hao Y, Shi F, Yan Z, Yuan G, Yang Y, Fei Z, He X. Sex differences in associations between maternal deprivation and alterations in hippocampal calcium-binding proteins and cognitive functions in rats. *Behav Brain Funct*. 2018 May 15;14(1):10. doi: 10.1186/s12993-018-0142-y.

Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, et al. Brain dopamine and obesity. *Lancet Lond Engl*. 2001 Feb 3;357(9253):354–7.

Wang Q, Dong X, Wang Y, Liu M, Sun A, Li N, Lin Y, Geng Z, Jin Y, Li X. Adolescent escitalopram prevents the effects of maternal separation on depression- and anxiety-like behaviours and regulates the levels of inflammatory cytokines in adult male mice. *Int J Dev Neurosci*. 2017 Nov;62:37-45. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2017.07.007.

Wearick-Silva LE, Marshall P, Viola TW, Centeno-Silva A, de Azeredo LA, Orso R, et al. Running during adolescence rescues a maternal separation-induced memory impairment in female mice: Potential role of differential exon-specific BDNF expression. *Dev Psychobiol*. 2017;59(2):268–74.

Weber RK, Buda AJ, Levene DL. General anesthesia in Eisenmenger's syndrome. *Can Med Assoc J*. 1977 Dec 17;117(12):1413-4.

Weiss IC, Franklin TB, Vizi S, Mansuy IM. Inheritable Effect of Unpredictable Maternal Separation on Behavioral Responses in Mice. *Front Behav Neurosci*. 2011 Feb 4;5. doi: 10.3389/fnbeh.2011.00003.

WHO. World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. 2000.

WHO. World Health Organization. Obesity and overweight. 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>

Yasuda M, Shinoda M, Honda K, Fujita M, Kawata A, Nagashima H, Watanabe M, Shoji N, Takahashi O, Kimoto S, Iwata K. Maternal Separation Induces Orofacial Mechanical Allodynia in Adulthood. *Journal of Dental Research* 2016, Vol. 95(10) 1191–1197. doi: 10.1177/0022034516661159.

Yeomans MR, Gray RW. Opioid peptides and the control of human ingestive behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002 Oct;26(6):713–28.

Zambon L, Duarte FO, Freitas LF de, Scarmagnani FRR, Dâmaso A, Duarte ACG de O, et al. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Rev Nutr*. 2009 Oct;22(5):707–15.

Zhang JM, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27–37.

Zhang X, Wang B, Jin J, An S, Zeng Q, Duan Y, et al. Early deprivation reduced anxiety and enhanced memory in adult male rats. *Brain Res Bull*. 2014 Sep 1;108:44–50. doi: 10.1016/j.brainresbull.2014.08.005.

Zheng H, Lenard NR, Shin AC, Berthoud H-R. Appetite control and energy balance regulation in the modern world: reward-driven brain overrides repletion signals. *Int J Obes* 2005. 2009 Jun;33 Suppl 2:S8-13.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

10 APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



GRUPO DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

Projeto: 160558 **Data de Aprovação do Projeto:** 06/12/2016

Título: EFEITO DA EXPOSIÇÃO À SEPARAÇÃO MATERNA E/OU DIETA HIPERCALÓRICA NA INDUÇÃO DE OBESIDADE E PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS EM NEONATOS WISTAR **Data de Término:** 10/01/2018

Pesquisador Responsável: IRACI LUCENA DA SILVA TORRES

Equipe de pesquisa:	ISABEL CRISTINA DE MACEDO	ISABEL CRISTINA DE MACEDO	ISABEL CRISTINA DE MACEDO	ROBERTA STRÖHER	ROBERTA STRÖHER	
Submissão	Documento	Espécie/Linhagem	Sexo/Idade	Qtd.	Data Reunião	Situação
26/10/2016	APROVAÇÃO	RATO - WISTAR	M/Neonato	36	06/12/2016	APROVADO
26/10/2016	APROVAÇÃO	RATO - WISTAR	F/Neonato	36	06/12/2016	APROVADO
26/10/2016	APROVAÇÃO	RATO - WISTAR	F/Progenitora	9	06/12/2016	APROVADO

Total de Animais: 81
Michael

Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.

Efeito da exposição à deprivação materna e/ou dieta hipercalórica em parâmetros de desenvolvimento neuromotor, ponderais, comportamentais e neuroquímicos em ratos

PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O MESTRADO

11 PRODUÇÃO ACADÊMICA DURANTE O MESTRADO

11.1 Artigos Publicados

- **STROHER, R**; MACEDO, I.C; OLIVEIRA, C; SCARABELOT, V.L; RIZZO, T.L; GOULART, J.F; CAUMO, W; KLEIN, A.B; SANVITTO, G.L; TORRES, I.L.S. Cafeteria diet increases liquid intake and serum creatinine levels in rats. *Clinical and biomedical research*, 2017.
- SILVA, E.F; LASTE, G; TORRES, R.L; HIDALGO, M.P.L; **STROHER, R**; TORRES, I.L.S. Consumo de álcool e tabaco: fator de risco para doença cardiovascular em população idosa do sul do Brasil. *Saúde e Desenvolvimento Humano*, v. 5, p. 23-33, 2017.
- TORRES, I.L.S; **STROHER, R**; SCARABELOT, V.L; MEDEIROS, L.F; ROZISKY, J.R; VIEIRA, L.C; STENZEL, B; DALLEGRAVE, E; FERREIRA, M.B.C; DANTAS, G. The involvement of opioidergic and gabaergic systems at the short- and long-lasting effect of early surgical procedure in rats' nociceptive response. *International Journal of Development Research*, v. 07, p. 15230-35, 2017.
- OLIVEIRA, C.M; OLIVEIRA, C; SCARABELOT, V.L; **STROHER, R**; MACEDO, I.C; LOPES, B.C; CAUMO, W; TORRES, I. L. S. Hypercaloric diet and chronic stress desynchronizes the temporal pattern of rats' insulin release. *Biological Rhythm Research*, 2017. doi: 10.1080/09291016.2017.1395528.

11.2 Resumos Publicados em Anais de Congresso

- **STROHER, R**; OLIVEIRA, C; SCARABELOT, V.L; LOPES, B.C; ZANCANARO, M; MACEDO, I.C; TORRES, I.L.S. The effects of hypercaloric diet ingestion and/or postnatal maternal deprivation on thermal tests response in young adult rats. In: 37ª Semana Científica do HCPA-Crise e resiliência, 2017, Porto Alegre.

- ZANCANARO, M; SCARABELOT, V.L; MACEDO, I.C; ADACHI, L.N.S; **STROHER, R**; LOPES, B.C; OLIVEIRA, C; CAUMO, W; TORRES, I.L.S. Estimulação transcraniana por corrente contínua (etcc) induz analgesia preemptiva em modelo animal cirúrgico. In: 37ª Semana Científica do HCPA-Crise e resiliência, 2017, Porto Alegre.
- ZANCANARO, M; SCARABELOT, V.L; AGUIAR, R.P; MACEDO, I.C; ADACHI, L.N.S; **STROHER, R**; LOPES, B.C; OLIVEIRA, C; SOUZA, A.H; MARCHESAN, S; CAUMO, W; TORRES, I.L.S. Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) preemptiva altera níveis de atividade mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAGase) em um modelo cirúrgico experimental. In: IX Simpósio Internacional em Neuromodulação- Promovendo a Troca de Conhecimento em Medicina e Saúde Pública, 2017.
- ZANCANARO, M; SCARABELOT, V.L; MACEDO, I. C; ADACHI, L.N.S; **STROHER, R**; LOPES, B.C; OLIVEIRA, C; CAUMO, W; TORRES, I. L.S. Analgesia preemptiva induzida pela Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC) em modelo animal de dor pós-operatória. In: IX Simpósio Internacional em Neuromodulação- Promovendo a Troca de Conhecimento em Medicina e Saúde Pública, 2017.
- **STROHER, R.**; MACEDO, I.C; CALLETI, G; BELLAVER, B; SILVA, J; LOPES, B.C; ZANCANARO, M; SANTOS, A.Q; GOMES, R; TORRES, I.L.S. Efeito antinoceptivo e antioxidante do aminoácido taurina em ratos diabéticos por streptozotocina. In: V Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2016, Porto Alegre.
- AGUIAR, R.P; MACEDO, I.C; SCARABELOT, V.L; BELLAVER, B; **STROHER, R**; ZANCANARO, M; LOPES, B.C; SANTOS, A.Q; TORRES, I.L.S. Alteração de parâmetros de estresse oxidativo e de citocinas inflamatórias em ratos obesos. In: V Simpósio Internacional de Estresse Oxidativo e Doenças Cardiovasculares, 2016, Porto Alegre.