

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

DANIELA ORTOLANI

**EFEITOS DE DIETA PALATÁVEL SOBRE A RESPOSTA DE
ESTRESSE EM RATOS**

Este exame	definição final
da tese de	definição candidato (a)
<u>Daniela Ortolani</u>	
<u>R. C.</u>	
e aprovada	por

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Regina Célia Spadari
Co-orientadora: Prof. Dra. Liana Lins Melo

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Or88e

Ortolani, Daniela

Efeitos de dieta palatável sobre a resposta de estresse em ratos / Daniela Ortolani. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadores: Regina Célia Spadari-Bratfisch, Liana Lins Melo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Dieta palatável. 2. Ansiedade. 3. Corticosterona. 4. Leptina. 5. Stress (Fisiologia). I. Spadari-Bratfisch, Regina Célia. II. Melo, Liana Lins. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Effects of palatable diet on stress response in rats.

Palavras-chave em inglês: Palatable diet; Anxiety; Corticosterone; Leptin; Stress (Physiology).

Área de concentração: Fisiologia.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Regina Célia Spadari, Claudia Maria de Penha Oller do Nascimento, Miguel Arcanjo Areas.

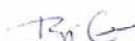
Data da defesa: 24/08/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.


Campinas, 24 de agosto de 2010

BANCA EXAMINADORA

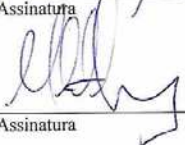
Profa. Dra. Regina Célia Spadari (Orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Cláudia Maria da Penha Oller do Nascimento


Assinatura

Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Assinatura

Profa. Dra. Gláucia Monteiro de Castro

Assinatura

Dedico e agradeço

Aos meus queridos pais, José e Terezinha, pelo exemplo, pelo caráter, pelo amor, pela educação, por tudo que me deram e por tudo que tenho, pois sem eles nada seria possível.

Ao meu irmão Márcio, pela sua orientação, pelo seu amor, e por estar sempre pronto em me ajudar.

Ao Carlos Eduardo, meu amado, meu amigo, meu parceiro, pela sua paciência extrema, pelo apoio incondicional e pela sua presença, que torna meus dias muito melhores.

Agradecimentos especiais

Inicialmente agradeço a DEUS pela sua bondade em me conceder as oportunidades recebidas até hoje e pelas mesmas fazerem de mim uma pessoa privilegiada.

Agradeço às minhas orientadoras,

Profa. Dra. Regina, que me deu a oportunidade de ser sua aluna mesmo ainda quando pouco me conhecia, por todo conhecimento transmitido e pela sabedoria de ensinar não só fisiologia, mas sobre todas as demais ciências que a compõem. Pela ajuda nos momentos de dúvidas e por ser uma verdadeira mestre;

Profa. Dra. Liana, minha maior incentivadora, que me fez não desistir das coisas em que acreditava, contribuindo científica e humanamente para minha formação e que muito mais do que uma co-orientadora, tornou-se uma grande amiga.

Agradeço também

A CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro nesses 2 anos.

Agradecimentos

Aos professores do Departamento de Anatomia, Biologia Celular, Fisiologia e Biofísica da Universidade Estadual de Campinas, que colaboraram para a minha formação.

À Profa. Dra. Lila Missae Oyama, pela orientação, pelo auxílio técnico, por abrir as portas do Departamento de Fisiologia, Disciplina de Nutrição da Universidade Federal de São Paulo e me acolher em seu grupo, de maneira única e especial.

À Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari, pela amizade, pela colaboração e disponibilidade.

Ao Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas, pela orientação e incentivo durante o Programa de Estágio Docente (PED).

Às amigas Débora, Márcia e Viviane, pessoas com as quais aprendi muito e foram fundamentais para a construção deste trabalho.

Aos queridos amigos e funcionários do Laboratório de Neuropsicofarmacologia da Universidade São Francisco, pela sincera amizade, por todo o apoio e pela boa vontade em trabalhar comigo.

Aos amigos do Laboratório de Estudos do Estresse (LABEEST) da Universidade Estadual de Campinas, que me acolheram, me ouviram, me ajudaram e sempre me tratam como parte de seu grupo.

A todos os amigos que, mesmo não sendo citados, participaram direta ou indiretamente na concretização deste trabalho.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	10
Lista de figuras.....	12
Lista de tabelas.....	13
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1.0 – Introdução.....	16
1.1 – Estresse.....	17
1.2 – Resposta de estresse.....	18
1.3 – Estresse e ansiedade.....	24
1.4 – Regulação do comportamento alimentar.....	27
1.5 – Sistemas neurais envolvidos na regulação do comportamento alimentar.....	28
1.6 – Regulação do apetite.....	31
1.7 – Regulação periférica do comportamento alimentar.....	32
1.8 – O eixo HPA e o comportamento alimentar.....	34
2.0 – Hipóteses gerais de estudo.....	36
3.0 – Objetivos.....	37
4.0 – Artigo.....	38
5.0 – Conclusões.....	69
6.0 – Referências.....	70
7.0 – Anexos.....	99

Lista de abreviaturas

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

AGRP – proteína relacionada ao gene cutia

ARC – núcleo arqueado

AVP – arginina-vasopressina

BDNF – fator neurotrófico derivado do encéfalo

CART – peptídeo relacionado à cocaína e à anfetamina

CCK – colecistocinina

CRH – hormônio liberador de corticotrofina

GABA – ácido gama-aminobutírico

GC - glicocorticóide

GLP-1 – peptídeo-1 semelhante ao glucagon

GR – receptor de glicocorticóide

HPA – eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

IRS – substrato do receptor de insulina

LCE – labirinto em cruz elevado

MCH – hormônio concentrador de melanina

MR – receptor de mineralocorticóide

NPV – núcleo paraventricular

NPY – neuropeptídeo Y

NSQ – núcleo supraquiasmático

NTS – núcleo do trato solitário

PET scan – tomografia por emissão de pósitrons

POMC – pro-opiomelanocortina

SNA – sistema nervoso autônomo

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso parassimpático

SNS – sistema nervoso simpático

SOCS-3 – supressor da sinalização de citocinas-3

TRH – hormônio tireotrófico

VTA – área tegmental ventral

Lista de figuras

Figure 1 – Body weight (g) of control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet (n=20/group); and rats with option between commercial and palatable diet (n=15/group). Body weight was evaluated before and after 3 days of experimental protocol.....62

Figure 2 – Percentage of entries in the open and closed arms of the elevated plus maze of control (n=20) and foot-shock stressed rats (n=18) fed with commercial diet; control (n=12) and stressed rats (n=11) with option between commercial and palatable diet.....63

Figure 3 – Serum corticosterone concentration (ng/ml) of control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet or rats with option between commercial and palatable diet. The number of experiments was 6 for each group.....64

Lista de tabelas

Table 1 – Daily food (g) and caloric intake (KJ) of control rats and rats submitted to inescapable, unsignaled foot-shock stress fed with commercial diet or with option between commercial and palatable diet.....65

Table 2 – Behaviors evaluated in the open arms of the elevated plus maze of control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet or with option between commercial and palatable diet.....66

Table 3 – Open field behaviors of control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet or rats with option between commercial and palatable diet.....67

Table 4 – Serum levels of glucose (mg/dl), triacylglycerol (mg/dl), insulin (ng/ml) and leptin (ng/ml) in control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet, or with option between commercial and palatable diet.....68

Resumo

Tem sido proposto que o acesso a alimentos palatáveis atenua a resposta de estresse. O objetivo deste estudo foi examinar o efeito de uma dieta palatável sobre parâmetros comportamentais e hormonais de ratos submetidos a estresse por choque nas patas. Ratos controles e estressados preferiram dieta palatável à comercial e a diminuição da ingestão alimentar induzida pelo estresse foi abolida em ratos com acesso a dieta palatável. Como consequência das diferenças de ingestão alimentar entre os grupos, ratos estressados e alimentados com dieta comercial consumiram quantidade inferior de calorias quando comparados com os controles, enquanto que ratos com acesso a dieta palatável ingeriram quantidade maior de calorias, não sendo alterado pelo estresse. Apesar dessas diferenças o peso corporal não se alterou. Ratos submetidos ao estresse aumentaram o número de entradas e o tempo de permanência no braço aberto do labirinto em cruz elevado (LCE), e também o número de imersões de cabeça. O número de estiramentos e de avaliações de risco foi diminuído pelo estresse por choque nas patas. A dieta palatável também diminuiu o número de avaliações de risco. Os animais submetidos ao estresse e com acesso ao alimento palatável apresentaram maior latência para o primeiro cruzamento e permaneceram mais tempo no centro do campo aberto. O número de levantamentos avaliado no campo aberto aumentou com a ingestão de dieta palatável, e o número de cruzamentos, auto-limpezas e bolos fecais não foi alterado pelo estresse nem pela composição da dieta. O aumento da concentração sérica de corticosterona induzido pelo estresse foi atenuado pela ingestão de dieta palatável. O estresse aumentou as concentrações de glicose e de insulina, e diminuiu as concentrações de triacilgliceróis. O consumo de dieta palatável aumentou a concentração de glicose, de leptina e de triacilgliceróis. Esses resultados mostram que o estresse reduz a ingestão alimentar e que esta redução é prevenida pelo acesso a dieta palatável. Este protocolo de estresse induziu à diminuição da ansiedade, com atenuação da concentração de corticosterona pelo alimento palatável. A combinação de dieta palatável e estresse afeta parâmetros metabólicos que podem levar à resistência a insulina. O efeito anorexigênico do estresse aconteceu independente da concentração de leptina, portanto outros fatores devem estar envolvidos com o controle do comportamento alimentar, como por exemplo, CRF e outros peptídeos, devendo ser estudados neste modelo experimental.

Abstract

It has been proposed that the access to palatable foods attenuates the stress response. The aim of this study was to examine the effect of a palatable diet on behavioral and hormonal parameters of rats submitted to footshock stress. Both control and stressed rats preferred the palatable than commercial diet and the stress-induced decrease in food intake was abolished in rats with access to palatable diet. As a consequence of the differences in food intake between the groups, rats submitted to stress and fed with commercial diet consumed a lower amount of calories than control rats, whereas rats with access to palatable diet ingested a higher amount of calories that was not altered by stress. Despite these differences, the body weight not altered. Rats submitted to stress increased the number of entries and the time spent in the open arms in the elevated plus maze (EPM), and also the number of head dipping. The number of stretched-attend posture and the risk assessment were decreased by footshock stress. The palatable diet also decrease the number of risk assessment. The rats submitted to stress with access to palatable diet showed a higher latency to the first crossing, and spent more time in the centre in the open field. The number of rearing increased with palatable diet intake, and the number of crossing, grooming and fecal bolus were not altered by stress neither diet composition. The stress-induced increase in serum corticosterone concentration was attenuated by palatable diet. The stress increased the serum glucose and insulin concentrations, and decreased the triacylglycerols concentrations. The access to palatable diet increased the glucose, leptin and triacylglycerols concentrations. These results showed that the stress reduces the intake food and that this reduction is prevented by access to palatable diet. This protocol of stress induced less anxiety-like behaviors with attenuation of corticosterone concentration induced by palatable diet. It is concluded that stress associated with palatable diet intake affect metabolic parameters that may lead to insulin resistance. Moreover, footshock stress had an anorexigenic effect that was independent of leptin, therefore other factors involved with the control of feeding behavior, such as CRF or other peptides, must be investigated in this experimental model.

1.0 - Introdução

A resposta de estresse é conhecida por promover alterações metabólicas e comportamentais essenciais para a manutenção da homeostase e da sobrevivência (CHROUSOS & GOLD, 1992; TSIGOS & CHROUSOS, 2002). A exposição a agentes estressores induz a liberação de glicocorticóides, os quais atuam juntamente com as catecolaminas liberadas pelo sistema nervoso simpático (SNS) e pela medula da adrenal alterando a atividade metabólica, cardiovascular, imunológica e neural (McEWEN, 2007). As respostas metabólicas incluem aumento da concentração plasmática de glicose, devido à estimulação, no fígado, da gliconeogênese e glicogenólise, assim como, inibição da recaptação periférica de glicose em alguns tecidos; mobilização de aminoácidos de tecidos extra-hepáticos; estimulação da lipólise no tecido adiposo e aumento da taxa metabólica (YAMADA *et al.*, 1993; APPLE *et al.*, 1995). Respostas de estresse inadequadas ou exposição repetida a agentes estressores representam uma ameaça à saúde.

Dentre as disfunções orgânicas e comportamentais causadas pelo estresse repetido, podemos incluir alterações no comportamento alimentar (OLIVER *et al.*, 2000; ZELLNER *et al.*, 2006). Em situações de estresse, o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e os glicocorticóides são liberados como resultado da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (DALLMAN *et al.*, 2005; ADAM & EPEL, 2007). Também são ativados o sistema nervoso autônomo (SNA) (TORRES & NOWSON, 2007; BERTHOUD & MORRISON, 2008) e sistemas neurais envolvidos na cognição, recompensa e aspectos emocionais do comportamento alimentar (TORRES & NOWSON, 2007). Assim sendo, estes e outros hormônios influenciam a ingestão alimentar não apenas no que diz respeito à quantidade, mas também à qualidade do alimento ingerido (ELY *et al.*, 1997; LA FLEUR, 2006; ADAM & EPEL, 2007).

A exposição repetida a agentes estressores modifica especialmente aqueles padrões alimentares relacionados com a ingestão de alimentos ricos em açúcar ou gordura (ELY *et al.*, 1997), o que levou Dallman *et al.* (2005) a hipotetizarem que estes reduzem a resposta de estresse e sugerirem que estes fossem denominados “comfort foods”, ou seja, “alimentos palatáveis”, “alimentos que confortam”.

Esta hipótese encontra paralelo em estudos feitos em humanos, nos quais estresse estimula a ingestão de calorias saborosas (EPEL *et al.*, 2001; GIBSON, 2006) e esta estimula a secreção

de dopamina no núcleo acumbens, em quantidade proporcional à resposta de cortisol (OSWALD *et al.*, 2005; WAND *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que os glicocorticóides induzem saliência por calorias prazerosas (PECINA, 2003). Se comprovada, tal hipótese poderia auxiliar na compreensão dos mecanismos que levam à obesidade causada pela ingestão excessiva de alimentos palatáveis, observada em períodos de estresse. E, considerando que o estresse é prevalente na sociedade ocidental atual assim como a obesidade, este pode ser considerado um tópico de grande relevância do ponto de vista da saúde da população.

1.1- Estresse

Os seres vivos estão constantemente em contato com situações que lhes exigem adaptações física e/ou psicológica. Exemplos disso são as alterações climáticas, que exigem um reequilíbrio térmico do organismo, alterações no estado nutricional, que levam o organismo a mobilizar-se para armazenar ou liberar energia, ou também, para seres que vivem em comunidade, alterações sociais, que levam o indivíduo à necessidade de reestruturar-se para se integrar melhor à sociedade. Tais alterações, por gerarem distúrbios no complexo equilíbrio orgânico conhecido como “homeostase”, levam à ativação de forças adaptativas, que são cruciais para a sobrevivência do organismo e responsáveis por sua resistência às alterações do meio ambiente. Segundo Chrousos & Gould (1995), organismos unicelulares adaptam-se com mudanças apropriadas em sua bioquímica; organismos multicelulares adaptam-se através de complexas mudanças neurais, metabólicas e celulares; e organismos sociais, cuja sobrevivência depende da cooperação da comunidade, desenvolvem ligações sociais com esta comunidade, cuja manutenção é essencial para a homeostase. Contudo, não são apenas eventos desagradáveis que desencadeiam respostas adaptativas: sentimentos de exultação e excitação, por exemplo, provocam no organismo a mesma série de reações, o que é denominado por alguns autores como “bom estresse” (McEWEN, 2000).

Há muito tempo os cientistas estudam os efeitos de um ambiente adverso na fisiologia e na saúde. Já em 1911, Cannon & La Paz propuseram o papel da glândula adrenal no controle das funções orgânicas em situações adversas. Em 1914, novamente Cannon, em um estudo clássico, baseou-se em teorias propostas por McDougall (1908) e explicou que “a emoção do medo e a

emoção da raiva são, na vida selvagem, provavelmente, seguidas por atividades de fugir ou lutar” (CANNON, 1914).

Esse conceito foi um dos marcos para a definição de estresse, anos mais tarde. Em 1936, Hans Selye afirmou que quando repentinamente confrontado com situações críticas, o organismo apresenta uma “reação de alarme”, descrita como o impacto inicial causado pelo agente agressor. Após um período de submissão contínua ao agressor, entram em ação mecanismos de adaptação tendo como objetivo a homeostase. Esta constitui a fase de resistência orgânica. A fase de exaustão, esgotamento ou fadiga, seria resultado de um longo e intenso esforço durante o qual o organismo tentou alcançar a homeostase e a adaptação (SELYE, 1936; VAN DE KAR *et al.*, 1991; HUETHER *et al.*, 1999; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003; McEWEN, 2005). A síndrome como um todo foi chamada por Selye de “Síndrome da Adaptação Geral”, que também enfatizou seu caráter inespecífico (SELYE, H., 1936).

Porém, sabe-se atualmente que a quantidade necessária de atividade fisiológica para restabelecer ou manter a homeostasia diferem; e as diferenças dependem das condições em que cada organismo se encontra. Recentemente, alguns autores propuseram uma alteração na teoria de Selye, questionando também a constância do meio interno, na qual esta teoria se baseia. Propuseram que o conceito de homeostase pode ser aplicado a alguns parâmetros fundamentais apenas, tais como pH, temperatura corporal, glicemia e pCO₂. No entanto, para que estes parâmetros sejam mantidos constantes, outros devem variar. Denominaram “alostasia” esta nova condição em que a estabilidade é obtida por meio de mudanças (STERLING & EYER, 1988; McEWEN, 1998). O conjunto das alterações impostas aos organismos a cada instante comporia a “carga alostática” que este suporta. Quando esta supera a capacidade de adaptação do organismo, este enfrenta “sobrecarga alostática”. É quando podem surgir as doenças relacionadas ao estresse (McEWEN, 2007). Esses conceitos propostos recentemente ampliam a teoria homeostática inicial e podem ajudar a compreender as conseqüências do estresse agudo ou crônico sobre os organismos.

1.2 - Resposta de estresse

O termo “estresse” é usado de várias formas e com muitos significados. Como descrito acima, este conceito foi introduzido por Hans Selye como uma adaptação de um conceito

existente na Física, segundo o qual, estresse refere-se ao estado de tensão que determinado material suporta antes de se partir. A definição de estresse, do ponto de vista biológico, então se deu como uma sequência de reações às agressões que ameaçam a integridade física e psicológica e, portanto, o estado de equilíbrio do organismo. Diante dos novos conceitos, descritos acima, o estresse pode ser redefinido como a reação que é desencadeada quando as expectativas, geneticamente programadas, estabelecidas pelo aprendizado prévio ou deduzidas pelas circunstâncias, não correspondem às percepções reais ou antecipadas dos ambientes externo e interno. Esta diferença entre o que é esperado, ou programado, e o que é observado, ou sentido, desencadeia respostas compensatórias que constituem a reação de estresse ou carga alostática (McEWEN, 2000; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003).

A resposta de estresse é resultado da interação entre as características do indivíduo e as demandas do meio, ou seja, as discrepâncias entre o meio externo e interno e a percepção do indivíduo quanto à sua capacidade de resposta. Esta resposta ao estressor compreende aspectos cognitivos, comportamentais e viscerais, visando propiciar uma melhor percepção da situação e de suas demandas, assim como um processamento mais rápido da informação disponível, possibilitando busca de soluções, selecionando comportamentos adequados e preparando o organismo para agir de maneira rápida e eficiente (McEWEN, 2000). A sobreposição destes três níveis (cognitivo, comportamental e visceral) é eficaz até certo limite, o qual, uma vez ultrapassado poderá desencadear um efeito desorganizador (VAN DE KAR & BLAIR, 1999; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003).

A resposta a estressores agudos inclui processos fisiológicos que redirecionam a utilização de energia entre os vários órgãos, mobilizando reservas e preparando o organismo para uma exposição estressante adicional, imprevisível. O aumento do suprimento energético aos órgãos-alvo (fundamentais para o enfrentamento ou a fuga, como coração, cérebro e músculos) é feito principalmente pela liberação de catecolaminas e glicocorticóides que, em geral, ativam a gliconeogênese e glicogenólise hepáticas, inibem a captação de glicose por tecidos periféricos e aumentam a proteólise e a lipólise. Outras adaptações fisiológicas incluem aumento do tônus cardiovascular e frequência respiratória, assim como inibição das funções vegetativas como comportamento alimentar, digestão, crescimento, reprodução e imunidade (SAPOLSKY *et al.*, 2000).

A ativação da resposta de estresse também inicia uma série de alterações comportamentais como aumento do estado de alerta e euforia, melhora temporária da cognição e memória para o evento estressor, assim como analgesia (CHROUSOS & GOLD, 1992). Essas respostas comportamentais e fisiológicas são afetadas pela ativação de sistemas efetores primários como o SNS (liberando noradrenalina), sistema adrenomedular (liberando adrenalina e noradrenalina), eixo HPA (liberando CRH, ACTH e glicocorticóides), sistema nervoso parassimpático (SNP, liberando acetilcolina) e sistema renina-angiotensina.

Vários outros sistemas contribuem para o restabelecimento da homeostase, como o eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (em resposta ao frio e calor), eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (reduzindo temporariamente a função reprodutiva), liberação ou inibição do hormônio do crescimento e alterações na função imunológica. Todos estes sistemas agem diretamente, alterando a liberação ou os efeitos biológicos de muitos mediadores da resposta aguda de estresse (ex: neurotransmissores, hormônios, citocinas, etc.), ou indiretamente, alterando os níveis das variáveis monitoradas (ex.: pressão sanguínea, temperatura corporal, etc.), com subseqüentes ajustes reflexos determinados pela homeostase (McEWEN, 2000). Apesar de todos esses eixos desempenharem papéis importantes na resposta de estresse por sua ação individual ou integrada, o eixo HPA e o sistema neurovegetativo são os mais estudados.

Todo o sistema nervoso central (SNC) está direta ou indiretamente envolvido na manutenção da homeostase e participa na organização geral da resposta de estresse. Diversas estruturas do prosencéfalo, incluindo córtex pré-frontal, hipocampo, amígdala e septo, juntamente com fibras nervosas condutoras dos estímulos sensoriais, projetam eferências mono e polissinápticas que convergem para o núcleo paraventricular (NPV). Este componente central da resposta de estresse está localizado no hipotálamo, e inclui principalmente neurônios liberadores de CRH e de arginina-vasopressina (AVP). Núcleos do tronco encefálico, como o locus ceruleus e outros grupos celulares catecolaminérgicos do bulbo e da ponte que constituem o “sistema simpático central” também participam desta resposta (CHROUSOS, 1992; TSIGOS & CHROUSOS, 1994; JOËLS & BARAM, 2009). Estes constituem os componentes centrais do “sistema de estresse”, como foi proposto por Charmandari *et al.* (2005).

A resposta de estresse é ativada por estímulos como dor (PALKOVITS *et al.*, 1999), recrutamento de sistemas de defesa inatos (FIGUEIREDO *et al.*, 2003) ou associações ligadas aos estímulos sensoriais, como o medo condicionado (VAN DE KAR *et al.*, 1991). Além disso,

distúrbios internos da homeostase sinalizados por meio dos sistemas cardiovascular, respiratório e das vísceras são capazes de acionar tais mecanismos. Esses distúrbios parecem ser sinalizados ao NPV através de neurônios do tronco encefálico, localizados na região do núcleo do tracto solitário (NTS) (SWANSON & SAWCHENKO, 1983). Grande parte desses neurônios utiliza noradrenalina e adrenalina como neurotransmissores (CUNNINGHAM *et al.*, 1990; CUNNINGHAM & SAWCKENKO, 1988). Esses estímulos atingem a região medial parvocelular do NPV. Este, por sua vez, estimula o SNS que ativa a medula das glândulas adrenais, levando à liberação de catecolaminas endógenas (adrenalina e noradrenalina), o que dispara a resposta imediata inicial de estresse ou reação de alarme (URSIN & OLFF, 1993).

O NPV também possui neurônios que sintetizam e secretam CRH, liberando este hormônio nos vasos da circulação porta-hipofisária, que têm acesso à porção anterior da glândula hipófise. A ligação do CRH nos receptores nos corticotropos da adenohipófise induz a liberação de ACTH na circulação sistêmica. O principal alvo do ACTH é o córtex da glândula adrenal, onde este hormônio exerce efeito trófico, além de estimular a síntese e secreção de glicocorticóides na zona fasciculada. Os glicocorticóides são os efetores periféricos do eixo HPA e promovem alterações fisiológicas através da ligação em receptores intracelulares distribuídos em praticamente todos os tecidos (MUNCK *et al.*, 1984; BAMBERGER *et al.*, 1996).

Os glicocorticóides, cortisol em humanos e corticosterona em roedores, são a principal subclasse de hormônios esteróides que regulam processos metabólicos, cardiovasculares, imunológicos e comportamentais (SAPOLSKY *et al.*, 2000; CHARMANDARI *et al.*, 2005). Os glicocorticóides exercem seus efeitos por meio da ligação e ativação de dois tipos de receptores intracelulares, o receptor de mineralocorticóide (MR), primeiramente descrito por McEWEN *et al.* (1992), de alta afinidade; e o receptor de glicocorticóide (GR), de baixa afinidade. Os MR possuem alta afinidade pela corticosterona e também pela aldosterona; os GR possuem baixa afinidade por glicocorticóides endógenos e alta afinidade por glicocorticóides sintéticos, como a dexametasona (REU & DE KLOET, 1986; SUTANO & DE KLOET, 1987). A ativação do GR, que ocorre em altas concentrações circulantes de glicocorticóides, estimula ou inibe a transcrição gênica, e exerce efeito *feedback* negativo no hipotálamo e na adenohipófise, interrompendo a resposta de estresse; enquanto que os MR regulam a atividade basal do eixo HPA.

No estado inativo, o GR é parte de um complexo multiprotéico consistindo de várias moléculas de proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*; BAMBERGER *et al.*, 1996;

GIGUERE *et al.*, 1996). A ligação do glicocorticóide (GC) com GR desloca as proteínas de choque térmico e permite a formação de homodímeros de complexos GC-GR que se deslocam para o núcleo da célula, onde interagem com elementos responsivos aos glicocorticóides específicos no DNA, de modo a alterar a transcrição de determinados genes (PRATT, 1990). O receptor ativado também inibe, por meio de interações proteína-proteína, outros fatores de transcrição como o c-jun/c-fos e NF-kB, que são reguladores positivos da transcrição de vários genes envolvidos na ativação e crescimento de células do sistema imunológico e outros tipos celulares (SHEINMAN *et al.*, 1995). Além disso, os glicocorticóides alteram o potencial elétrico de neurônios.

Na maioria dos vertebrados há um ritmo circadiano pronunciado da secreção de glicocorticóides, com picos relacionados ao início da fase ativa do ciclo diurno (KELLER-WOOD & DALLMAN, 1984). O ritmo circadiano de glicocorticóide é dependente do núcleo supraquiasmático (NSQ), uma vez que lesões desta estrutura levam a concentrações plasmáticas aproximadamente constantes e intermediárias entre o pico e o nadir circadianos (MOORE & EICHLER, 1972; CASCIO *et al.*, 1987).

A regulação da atividade secretória do eixo HPA é feita, em grande parte, por retroalimentação negativa dos glicocorticóides sobre componentes do SNC, aumentando ou diminuindo sua atividade de acordo com as necessidades fisiológicas (MARTÍ *et al.*, 1999). Várias estruturas cerebrais estão envolvidas nos processos de retroalimentação, dentre as quais se destacam o hipotálamo, a amígdala, o córtex cerebral pré-frontal e o hipocampo (CAMPEAU *et al.*, 1998), sendo esta última estrutura uma das mais fortemente relacionadas à regulação do eixo, devido a sua alta concentração de receptores glicocorticóides.

A corticosterona é o marcador mais utilizado para caracterizar situação de estresse em roedores. Mas, na literatura há evidências de que outros marcadores de estresse também podem ser utilizados (MARTÍ & ARMÁRIO, 1998). Em ratos submetidos a estresse agudo, hormônios derivados da pro-opiomelanocortina (POMC; ex. ACTH), e a prolactina parecem refletir a intensidade do estresse experimentado por modelos animais (EUKER *et al.*, 1975; ARMÁRIO *et al.*, 1986; MARTÍ & ARMÁRIO, 1998; REIS *et al.*, 1998; MÁRQUEZ *et al.*, 2006). As concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina também podem ser consideradas como marcadores de estresse (NATELSON *et al.*, 1987; DE BOER *et al.*, 1990). O aumento da concentração sérica de cálcio foi usado como marcador de estresse em camundongos submetidos

a estresse físico (choque nas patas) e estresse emocional (animais que presenciavam a sessão de choque de outro animal) (SUTOO & AKIYAMA, 2002), e em humanos, após a exposição ao frio (LENNQUIST, 1975).

Marcadores metabólicos também foram utilizados para avaliar a resposta de estresse em roedores. Verago *et al.* (2001) submetem ratos a três sessões de choque nas patas e dosaram, além das concentrações sanguíneas de corticosterona, as de glicose, triglicerídeos e glicerol. A corticosterona aumentou significativamente após cada sessão de estresse; mas as concentrações de triglicerídeos aumentaram somente após a primeira sessão; e as de glicose aumentaram apenas após a segunda e a terceira sessão, enquanto as concentrações de glicerol não foram alteradas. O aumento da concentração sérica de colesterol também já foi usado como indicador do estresse crônico por imobilização em ratos (JAIN *et al.*, 2000).

Assim, fica claro que o aumento na concentração plasmática dos hormônios relacionados ao estresse inicia alterações metabólicas que produzem mobilização de substratos energéticos a partir de tecidos de armazenamento, como o fígado e o tecido adiposo branco. O aumento da mobilização metabólica resulta em disponibilização de carboidratos e lipídios para a atividade celular, as quais contribuem para a manutenção da homeostasia em situações de estresse, por meio de ajustes de outros sistemas como, por exemplo, o cardiovascular, o respiratório, o nervoso e o muscular (SELYE, H., 1936; CARRASCO & VAN DE KAR, 2003).

Alguns autores propuseram que a concentração sanguínea de glicose pode ser usada como marcador confiável de estresse em ratos (ARMÁRIO *et al.*, 1990; REIS *et al.*, 1998; MÁRQUEZ *et al.*, 2004).

O pâncreas endócrino, a medula adrenal e o fígado participam da regulação da glicemia, que também sofre influência de sinais nervosos de origem central e periférica (NIJIMA, 1989). Estes possibilitam elevação rápida, intensa e preventiva da glicemia em situações de emergência ou de demanda energética elevada (exercício físico e exposição aguda ao frio) e também durante alterações metabólicas que acompanham diferentes comportamentos (TIMO-IARIA, 1990; BRITO, 1996; SHIMAZU *et al.*, 1966; ZAIA *et al.*, 1997).

A lipólise também pode ser um importante marcador para as respostas individuais a diferentes formas de estresse. A este respeito, o tecido adiposo branco tem se revelado como um local de metabolismo ativo capaz de sintetizar e armazenar triglicerídeos, liberar ácidos graxos livres e glicerol para o sangue, em situações de demanda energética como jejum, exercício físico

ou exposição aguda ao frio (MIGLIORINI *et al.*, 1997; BAMSHAD *et al.*, 1998; BALTHAZAR *et al.*, 2007).

1.3 - Estresse e ansiedade

Acredita-se que o estresse, a ansiedade e a depressão são processos inter-relacionados. O estresse está implicado na etiologia tanto da ansiedade quanto da depressão ou é consequência delas. Modelos animais de ansiedade e de depressão são baseados na exposição de animais a estressores de várias intensidades, para avaliar respostas comportamentais e/ou viscerais (ANISMAN & ZACHARKO, 1982; PEETERS & BROEKKAMP, 1994; BREMNER, 1999; GORWOOD, 1999).

O estresse, a ansiedade e a depressão têm efeitos similares no eixo HPA e no sistema funcional das catecolaminas (HOLSBOER, 1999), o que sugere que há considerável sobreposição fisiológica entre os três sistemas. O CRH liberado pelo hipotálamo também modula vários comportamentos, incluindo aqueles relacionados à função motora, ingestão de alimentos, reprodução e ansiedade (DUNN & BERRIDGE, 1990; DE SOUZA, 1995; BRANDÃO *et al.*, 2003). Alguns autores sugeriram que o CRH teria ação ansiogênica e que disfunções no sistema CRH estariam relacionadas a uma variedade de distúrbios psiquiátricos induzidos por estresse, tais como ansiedade, depressão e distúrbios alimentares (TREIT, 1985; HOLSBOER *et al.*, 1992; SKUTELLA *et al.*, 1998; STECKLER & HOLSBOER, 1999).

Inúmeras pesquisas mostram que as raízes biológicas da ansiedade encontram-se nas reações de defesa que os animais exibem em situações de perigo (GRAEFF, 1983; SANDFORD *et al.*, 2000). A ansiedade é descrita como um estado emocional de grande valor adaptativo que é experimentado de maneira subjetiva como sendo desagradável, tendo como características o medo, a apreensão, o temor e sentimentos correlatos. Sua expressão envolve alterações comportamentais, psicofisiológicas e cognitivas (GRAEFF, 1983; 1994). Ao contrário do medo, que se manifesta em situações em que o perigo é iminente, a ansiedade se manifesta em situações onde o perigo é apenas potencial e incerto (GRAEFF, 1983; RODGERS *et al.*, 1997; LANG, *et al.*, 2000).

As manifestações psicológicas e fisiológicas da ansiedade têm sido extensamente estudadas, mas os mecanismos biológicos envolvidos na sua regulação não são completamente

conhecidos. Estudos animais sugerem que reações análogas ao medo humano são mediadas e integradas por substratos neuroanatômicos localizados no sistema límbico, como amígdala, septo, hipocampo e substância cinzenta periaquedutal (GRAEFF, 1994; SANDERS & SHEKHAR, 1995; AGUIAR & BRANDÃO, 1996; DE SOUZA *et al.*, 1998; SANDFORD *et al.*, 2000).

Muitos neurotransmissores parecem estar envolvidos na gênese e modulação da ansiedade, entre eles a noradrenalina, a serotonina, a dopamina, o ácido gama-aminobutírico (GABA), a glicina, os aminoácidos excitatórios, o CRH, a corticosterona e a colecistocinina (CCK), além de outros neuropeptídeos (BEHAN *et al.*, 1996 a, b; SOUTHWICH *et al.*, 1999; MILLAN, 2003). Atualmente, existem várias evidências de que os neuropeptídeos desempenham um papel importante na modulação do estado de ansiedade (STROHLE *et al.*, 1997; RIBEIRO, 1998; GAVIOLI, *et al.*, 1999; RUPNIAK *et al.*, 2000).

Vários testes são usados para avaliar a ansiedade em roedores. Estes visam aspectos particulares da ansiedade ou do comportamento emocional com o objetivo de compreender estes fenômenos em humanos, assim como avaliar o potencial terapêutico de fármacos (DE BOER & KOOLHAAS, 2003). Dentre estes testes, encontramos o labirinto em cruz elevado (Figura 1). Este consiste de dois braços abertos opostos ($50 \times 10 \times 1$ cm) e dois fechados ($50 \times 10 \times 1$ cm), também opostos, em forma de cruz. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (10×10 cm). O aparato está elevado a uma altura de 45 cm do chão.

O LCE foi validado farmacológica, fisiológica e comportamentalmente como modelo de ansiedade por Pellow *et al.* (1985), quando demonstraram que a exposição aos braços abertos do labirinto produzia comportamentos relacionados à ansiedade. O LCE gera conflito no animal entre a exploração de um novo ambiente e a esquiva de áreas abertas, que podem levar tanto ao impulso de exploração e ao medo, ou seja, conflito entre aproximação e esquiva. Além disso, baseia-se na exploração natural do animal, sem a utilização de estímulos dolorosos. Embora os sintomas de ansiedade em humanos surjam frequentemente após exposição a situações estressantes, alguns estudos demonstraram que a exposição a agentes estressores aumenta comportamentos associados com ansiedade ou depressão (BUWALDA *et al.*, 2005).



Figura 1 – Fotografia do labirinto em cruz elevado

Outro aparato freqüentemente utilizado para avaliar comportamentos em roedores é o campo aberto (Figura 2), um dos procedimentos mais populares na psicologia animal. Diversas versões estão disponíveis, diferindo na forma (circular, quadrado ou retangular), iluminação, presença de objetos dentro da arena, como plataformas, colunas, túneis (ver BELZUNG, 1999). A ansiedade no campo aberto é provocada por dois fatores: separação do animal do seu grupo social e fobia do ambiente aberto e relativamente grande quando comparado com seu ambiente natural. Na maioria das situações, os roedores preferem espontaneamente permanecer na periferia do campo aberto do que na parte central. Situações ou fármacos que causam aumento no tempo de permanência na parte central, assim como, a diminuição da latência para entrar na parte central podem ser interpretadas como tendo efeito ansiolítico. O campo aberto é também utilizado para avaliar atividade locomotora (PRUT & BELZUNG, 2003).



Figura 2 – Fotografia do campo aberto

1.4 - Regulação do comportamento alimentar

Tão essencial à sobrevivência e à manutenção da homeostase, a alimentação é finamente controlada por meio de uma complexa e intrincada rede de mecanismos. Como exemplo ilustrativo da importância do comportamento alimentar, sabe-se que ratos mesmo com o tronco encefálico isolado das áreas superiores do encéfalo continuam a regular a ingestão alimentar e a demonstrar respostas afetivas aos alimentos palatáveis (GRILL & KAPLAN, 2001, 2002).

Basicamente, o comportamento alimentar pode ser dividido em diferentes fases para melhor compreensão de seus mecanismos: na fase de iniciação, o “valor” de um objetivo alimentar disponível ou o estado interno, de alguma maneira, atraem a atenção do indivíduo para a alimentação. Esta fase pode ser disparada pela visão ou pelo olfato do alimento, sem necessariamente haver um estado interno adjuvante. Uma vez que a atenção seletiva é alcançada e a motivação para a ingestão alimentar é grande, inicia-se a fase de procura. Este comportamento requer planejamento, aprendizado e memória e, portanto, depende essencialmente de processos corticais cognitivos. A fase de consumo começa quando o alimento está finalmente presente e é ingerido. Também é caracterizada pela degustação dos alimentos ingeridos e de seus nutrientes a

nível cefálico e gastrointestinal, assim como pela formação de associações entre os vários atributos sensoriais do alimento. Na sequência, tomam parte da ação os mecanismos de saciedade, por fim levando ao término da refeição, que inclui o fim do consumo, mas também a sensação das conseqüências da absorção e pós-absorção, assim como o armazenamento dessas sensações em forma de memória associativa para posterior comparação (BERTHOUD, 2002).

Os sistemas de aferências de informação para o cérebro em relação ao alimento incluem estímulos externos, como as aferências visuais, olfativas, auditivas e táteis, e estímulos internos, que se subdividem em pré-gástricos (principalmente sabor), gástricos (distensão) e pós-gástricos (ou pré-absortivos). Há ainda estímulos pós-absortivos, que se dividem em mecanismos de transporte de nutrientes e a liberação de hormônios locais como a CCK, agindo através da circulação sanguínea ou de nervos sensoriais viscerais; nutrientes, metabólitos e hormônios agindo em sensores do sistema porta-hepático. São eles, a glicose, os aminoácidos, produtos intermediários de processamento metabólico (ATP, por ex.), e mensageiros locais ou hormônios agindo no fígado ou diretamente no cérebro (BERTHOUD, 2002).

1.5 - Sistemas neurais envolvidos na regulação do comportamento alimentar

O hipotálamo é uma estrutura chave na regulação do comportamento alimentar. Em mamíferos, esta estrutura consiste de mais de 40 áreas e núcleos histologicamente distintos, e muitos deles ainda podem ser subdivididos em subnúcleos. Além de controlar a alimentação, o hipotálamo está envolvido em outros processos como a ingestão hídrica, comportamentos defensivos e agressivos, comportamento sexual, regulação da temperatura corporal e defesa imunitária. No que tange ao comportamento alimentar, vários de seus núcleos recebem aferências e enviam eferências a diversas partes do encéfalo e medula espinal, porém os núcleos mais intensamente envolvidos nesse controle são o núcleo arqueado (ARC), o hipotálamo lateral e ventromedial e o NPV.

O núcleo ARC é uma região que recebe aferências de outros núcleos como o NPV e área pré-óptica medial, assim como do hipotálamo lateral (GUAN *et al.*, 2001; HORVATH *et al.*, 1999). Aferências extra-hipotalâmicas incluem o córtex (DEFALCO *et al.*, 2001), a amígdala, o núcleo próprio da estria terminal e núcleos do tronco encefálico como o núcleo parabraquial e o NTS (RICARDO & KOH, 1978; LI *et al.*, 1999). Seus neurônios são anatomicamente

posicionados próximos a capilares fenestrados na base do hipotálamo, o que os coloca em contato com importantes hormônios como a leptina (GLAUM *et al.*, 1996), o hormônio do crescimento (KAMEGAI *et al.*, 1996), esteróides sexuais (TONG *et al.*, 1990), insulina (MUROYA *et al.*, 1999) e grelina (WANG *et al.*, 2002), para os quais possuem receptores (BENOIT *et al.*, 2000; CONE *et al.*, 2001). Esse núcleo envia sinais a outros núcleos do hipotálamo e para sítios extra-hipotalâmicos como núcleos talâmicos mediais, núcleo próprio da estria terminal, núcleos da rafe, substância cinzenta periaquedutal e núcleo parabraquial lateral. Dois subtipos de neurônios foram identificados no ARC, ambos contendo neurotransmissor inibitório GABA (HORVATH *et al.*, 1997; HENTGES *et al.*, 2004). Uma das populações neuronais expressa a POMC e o peptídeo relacionado à cocaína e à anfetamina (CART), e quando ativada leva à diminuição do apetite e aumento do gasto energético (CONE, 2005). Em contraste, a outra população de células, contendo neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada ao gene cutia (AGRP), leva a uma resposta orexigênica e menor gasto energético (CLARK *et al.*, 1984). Tanto os neurônios contendo POMC quanto os neurônios contendo NPY expressam receptores para leptina e grelina (RIEDGER *et al.*, 2003). A leptina aumenta a atividade dos neurônios POMC e inibe neurônios NPY (BASKIN *et al.*, 1999), enquanto a grelina age fazendo o oposto (TRAEBERT *et al.*, 2002).

O hipotálamo lateral, por sua vez, recebe aferências de várias áreas corticais e límbicas como a amígdala, o hipocampo e o núcleo accumbens, assim como dos núcleos paraventricular e ARC (especialmente de neurônios contendo NPY na área perifornical). Os neurônios do hipotálamo lateral projetam eferências para todo o córtex, hipocampo, amígdala, gânglios da base, tálamo, ponte e medula espinal, assim como para os outros núcleos do próprio hipotálamo. Nesse núcleo encontram-se duas populações de neurônios que contêm tanto orexina, peptídeo envolvido no estado de vigília, na atenção e no comportamento alimentar (CHEN *et al.*, 1999), como o hormônio concentrador de melanina (MCH), outro potente estimulante da ingestão alimentar (BITTENCOURT *et al.*, 1992).

No núcleo ventromedial do hipotálamo ocorre alta expressão de receptores para leptina e este núcleo é descrito como responsável pela mediação das ações da leptina na homeostase (MERCER *et al.*, 1996). As eferências do núcleo ventromedial, em sua maioria, são excitatórias, aumentando a atividade das células POMC; sua atividade diminui durante o jejum (STERNSON *et al.*, 2005). Infusões de NPY nesse núcleo aumentam o consumo alimentar, e o jejum aumenta as concentrações de NPY nessa região (BOUALI *et al.*, 1995). Nesse núcleo também ocorre

expressão acentuada do Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo (BDNF). Este é apontado como inibidor do apetite e regulador do balanço energético, e é controlado pela leptina (RIOS *et al.*, 2001; NAKAGAWA *et al.*, 2002, 2003).

O NPV do hipotálamo recebe aferências de outros núcleos hipotalâmicos como a área pré-óptica medial, órgão subfornicial e núcleos ARC, dorsomedial e lateral. Além disso, aferências do tronco encefálico como o NTS, principalmente noradrenérgicas (SAWCHENKO & SWANSON, 1982), locus ceruleus e núcleo da rafe, principalmente serotoninérgicas (SAWCHENKO *et al.*, 1983), assim como do núcleo próprio da estria terminal e amígdala também atingem o NPV (SAWCHENKO & SWANSON, 1983). As eferências endócrinas mais conhecidas desse núcleo são provenientes dos neurônios magnocelulares e dirigem-se para a hipófise posterior, secretando ocitocina e AVP, assim como eferências dos neurônios parvocelulares secretando CRH e hormônio tireotrófico (TRH). Eferências não-endócrinas incluem a maioria dos outros núcleos hipotalâmicos e núcleos autonômicos pré-ganglionares do mesencéfalo, prosencéfalo e medula espinal, assim como neurônios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos que inervam o pâncreas (JANSEN *et al.*, 1997) e estruturas diencefálicas e telencefálicas como o tálamo e a amígdala.

Outras estruturas são também importantes na regulação do comportamento alimentar. Por exemplo, o córtex sensório-visceral dissemina importantes informações nutricionais da cavidade oral e do trato gastrointestinal para áreas corticais envolvidas na geração de representações e associações polimodais, tanto diretamente como através da amígdala, para processamento emocional ou através do estriado ventral para aspectos motivacionais. O córtex olfatório primário tem propriedades semelhantes em relação ao olfato, com a possibilidade de estocagem de memórias através da formação hipocampal. O hipocampo, por sua vez, além de envolvido no aprendizado e memória dos aspectos relacionados ao comportamento alimentar como a qualquer outro comportamento, também parece ter um papel específico na alimentação (CLIFTON *et al.*, 1998). A amígdala é a única região cerebral além do córtex gustatório e do hipotálamo lateral a receber aferências gustatórias diretas do NTS e do núcleo parabraquial, mas também recebe informações provenientes de áreas corticais, hipotalâmicas, hipocámpais e do estriado ventral, sendo responsiva a uma variedade de peptídeos e neurotransmissores envolvidos no comportamento alimentar como os opióides (GIRAUDO *et al.*, 1998) e a enterostatina (LIN & YORK, 1997).

Estruturas do tronco encefálico também integram as grandes vias de aferências víscero-sensoriais e eferências motoras, sendo que suas áreas mais estudadas em relação ao comportamento alimentar são o NTS, área postrema e núcleo parabraquial. O NTS e a área postrema detectam hormônios e outros fatores circulantes, além de receberem aferências dos receptores víscero-sensoriais e gustatórios via neurônios aferentes primários vagais, glossofaríngeos, faciais e trigeminais, possuindo uma população significativa de neurônios que expressam POMC e são responsivos à urocortina (GRILL *et al.*, 2000). O núcleo parabraquial localiza-se na ponte e integra várias modalidades sensoriais, como gustação (SPECTOR, 1995), sensações viscerais químicas, mecânicas (BAIRD *et al.*, 2001) e álgicas (GAURIAU & BERNARD, 2002), através de projeções recíprocas a várias áreas do tronco encefálico, prosencéfalo e diencéfalo, servindo como interface entre o controle reflexo medular e a regulação integrativa dos sistemas neurovegetativos.

1.6 - Regulação do apetite

Mesmo na ausência de fome, o prazer e a sensação de recompensa associados ao alimento podem estimular o consumo. Acredita-se que o núcleo accumbens está relacionado a comportamentos direcionados e ao aprendizado instrumental apetitivo (CORBIT *et al.*, 2001; BALDWIN *et al.*, 2002). O desejo ou a saliência do alimento nesse tipo de tarefa é determinado pelo seu valor hedônico e pelo estado nutricional, assim como pela interação dos dois fatores (BERRIDGE, 1991). Além disso, evidências recentes sugerem que a atividade dos neurônios dopaminérgicos da área tegmental ventral (VTA) que projetam para o núcleo accumbens pode ser modulada por sinalizadores do estado energético como a leptina, a insulina e a grelina (ABIZAID *et al.*, 2006; JERLHAG *et al.*, 2006), revelando a potencial importância desse sistema na regulação da ingestão alimentar.

De acordo com Berridge & Robinson (1998), a saliência (“querer”) e a sensação hedônica (“gostar”) relacionadas ao alimento representam processos distintos no circuito da motivação e da recompensa. Segundo essa hipótese, os neurônios dopaminérgicos da VTA projetando-se para o núcleo accumbens determinam seletivamente o nível de saliência do alimento, enquanto a sensação hedônica ligada ao alimento palatável está associada com sistemas opióides e GABA/benzodiazepínicos difusos distribuídos nos núcleos gustatórios do tronco encefálico, no

estriado ventral e, provavelmente, em outras áreas como a amígdala, o córtex límbico e o hipotálamo. De fato, antagonistas opióides injetados no núcleo accumbens reduzem o consumo de alimentos doces, mas não de substâncias menos palatáveis (ZHANG *et al.*, 2003). No entanto, interessantes estudos em humanos utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET scan) mostram que o consumo alimentar associa-se à liberação de dopamina no estriado dorsal, e que a quantidade liberada do neurotransmissor se correlaciona com o grau de prazer associado à alimentação (SMALL *et al.*, 2003), sugerindo que a regulação dos mecanismos hedônicos pode ser mais complexa.

Outros sistemas podem ser também capazes de modular tanto circuitos homeostáticos quando hedônicos no controle do comportamento alimentar. A serotonina, por exemplo, pode influenciar diretamente a rota da melanocortina no ARC. O sistema noradrenérgico, por sua vez, inibe o apetite através de seus receptores α_1 - e β_2 -adrenérgicos, enquanto a ativação de receptores do tipo α_2 -adrenérgico estimula o apetite.

1.7 - Regulação periférica do comportamento alimentar

O controle periférico do comportamento alimentar é exercido principalmente por hormônios produzidos no tecido adiposo (como a leptina, a adiponectina e a resistina), hormônios pancreáticos (como a insulina e o polipeptídeo pancreático) e hormônios produzidos no trato gastrointestinal (como o peptídeo YY, a grelina, o peptídeo-1 semelhante ao glucagon-GLP-1, a oxintomodulina, a bombesina e a CCK). Neste trabalho, nossa atenção focalizou-se em dois destes hormônios: a leptina e a insulina.

A leptina é um hormônio peptídico que influencia a homeostase energética, as funções endócrinas e imunológicas. É o produto do gene *ob* expresso predominantemente em adipócitos (ZHANG *et al.*, 1994), mas também em menores concentrações no epitélio gástrico (BADO *et al.*, 1998) e na placenta (MASUZAKI *et al.*, 1997). As concentrações circulantes de leptina refletem tanto estoques energéticos como alterações agudas do balanço energético. Sua ação é anorexígena. O jejum reduz as concentrações circulantes (FREDERICH *et al.*, 1995; MAFFEI *et al.*, 1995), o que é revertido pela alimentação ou administração de insulina. Sua sinalização ocorre através de receptores da família dos receptores para citocinas, com domínio transmembrana único, (TARTAGLIA *et al.*, 1995), podendo ser classificados como receptores do

tipo longo, curto ou solúvel (TARTAGLIA, 1997). A forma longa (conhecida como Ob-Rb) está envolvida nos efeitos da leptina sobre o comportamento alimentar, agindo através da ativação da via JAK-STAT e induzindo a expressão do peptídeo supressor da sinalização de citocinas-3 (SOCS-3) no hipotálamo. O aumento da expressão de SOCS-3 inibe a leptina (regulando a concentração do hormônio e a expressão de receptores), sendo um dos mecanismos propostos como responsáveis pela resistência às ações da leptina que acontece, por exemplo, na obesidade. Por sua vez, a forma curta do receptor *ob* parece estar envolvida no transporte da leptina através da barreira hemato-encefálica (EL HASCHIMI *et al.*, 2000), enquanto a forma solúvel liga-se ao hormônio circulante modulando sua disponibilidade e atividade biológica (GE *et al.*, 2002).

A insulina é um hormônio pancreático que, como a leptina, correlaciona-se com o balanço energético em longo prazo (BAGDADE *et al.*, 1967). No entanto, ao contrário do hormônio produzido no tecido adiposo, suas concentrações plasmáticas flutuam drasticamente conforme as refeições, aumentando de forma rápida após a alimentação (POLONSKY *et al.*, 1988). A insulina e seus agentes miméticos atuam como um sinal anorexigênico no SNC, diminuindo o consumo alimentar e o peso corporal quando administrados centralmente (AIR *et al.*, 2002). Sua passagem pela barreira hemato-encefálica se dá por um processo saturável mediado por receptores (BAURA *et al.*, 1993) e, como a produção central de insulina é ínfima (WOODS *et al.*, 2003), concentrações periféricas devem ter ações similares à administração central. Sua sinalização ocorre por meio de receptores de membrana, compostos de duas subunidades extracelulares α que se ligam ao hormônio e duas subunidades intracelulares β , com atividade tirosina-cinase intrínseca que, quando ativada, inicia uma cascata de reações intracelulares de fosforilação, que regulam interações protéicas e a atividade de enzimas. Os substratos mais importantes do receptor de insulina (IRS) são IRS-1 e IRS-2 que, quando fosforilados, ligam-se e ativam cinases celulares, iniciando rotas de sinalização divergentes envolvidas na mediação da ação celular da insulina (BASKIN *et al.*, 1994). A insulina é um hormônio de caráter anabólico que age em vários tecidos periféricos, incluindo músculo, fígado e tecido adiposo. Seus efeitos metabólicos imediatos incluem: aumento da captação de glicose, principalmente em tecido muscular e adiposo, aumento da síntese de proteínas, ácidos graxos e glicogênio, bem como da produção hepática de glicose, da lipólise e proteólise, entre outros (SALTIEL & KAHN, 2001). Além destes efeitos, a insulina é capaz de atuar no hipotálamo, interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome-saciedade.

1.8 - O eixo HPA e o comportamento alimentar

O estado emocional afeta o comportamento alimentar, e diferentes alimentos influenciam as respostas de estresse, numa complexa via dupla de regulação e tênue equilíbrio (GIBSON *et al.*, 2006). Estudos em humanos demonstram que as experiências emocionais podem levar a um aumento de ingestão de alimento, em especial alimentos doces e ricos em calorias (OLIVER *et al.*, 2000). Períodos de maior sobrecarga de trabalho associam-se a maior consumo de calorias e gorduras, principalmente em pessoas que usualmente fazem dietas hipocalóricas (WARDLE *et al.*, 2000). A variação individual da intensidade da resposta de estresse se correlaciona com o grau de influência do estresse no comportamento alimentar (EPEL *et al.*, 2001). Em modelos animais, vários pesquisadores demonstram que a exposição crônica a agentes estressores pode alterar o consumo de alimento e o peso corporal. Por exemplo, animais submetidos ao estresse por choque inescapável diminuem a ingestão de alimento e o peso corporal (KREBS *et al.*, 1996; FARIAS-SILVA *et al.*, 2002). O estresse crônico repetido por contenção aumenta a ingestão de alimento doce (ELY *et al.*, 1997) sem alterar o consumo de ração padrão, e a administração de um fármaco ansiolítico reverte esse efeito. A influência do estresse no comportamento alimentar, intensificando ou atenuando o apetite ou ainda aumentando o consumo de macronutrientes ou sabores específicos varia conforme a intensidade e a duração do agente estressor (MARTI *et al.*, 1994).

Como vimos nas seções anteriores, a resposta de estresse inclui a liberação de CRH do hipotálamo. Este peptídeo tem sua ação mediada por receptores CRH-R1 e CRH-R2, e sua ligação, principalmente neste último, tem efeito inibitório sobre o comportamento alimentar (KOOB & HEINRICHS, 1999). Os glicocorticóides têm efeito permissivo sobre o consumo alimentar. Este efeito pode ser constatado pela hiperfagia e obesidade, associadas à síndrome de Cushing; e pela anorexia observada em portadores da doença de Addison. Agindo no SNC, modulam a ingestão de alimento, provavelmente através da ativação do NPY (Dallman *et al.*, 1993). A remoção dos glicocorticóides por adrenalectomia reduz o consumo alimentar em 10-20% e diminui o ganho de peso, assim como inibe a obesidade induzida pelo NPY (DALLMAN *et al.*, 2004). Esses efeitos da adrenalectomia são revertidos pela administração de glicocorticóides (FREEDMAN *et al.*, 1985). Como existe uma sobreposição importante em neurônios alvo de glicocorticóides, insulina e leptina, sugere-se que estes hormônios atuem de modo coordenado na regulação do apetite e no gasto energético.

É intrigante, porém, que a dieta também possa influenciar a resposta de estresse. Por exemplo, após uma noite de jejum, uma sobrecarga de carboidratos (mas não de proteínas ou gordura) aumenta a secreção de cortisol induzida por estresse (GONZALEZ-BONO *et al.*, 2002). Por outro lado, após 10 dias de consumo de uma dieta rica em carboidratos, diminuem as concentrações basais de cortisol em relação a indivíduos recebendo dieta rica em proteínas (ANDERSON *et al.*, 1987). Em ratos, a ingestão de uma solução de glicose por vários dias inibe a produção central de CRH (DALLMAN *et al.*, 2003). Dietas ricas em gordura aumentam a secreção de glicocorticóides basal e induzida por estresse (TANNENBAUM *et al.*, 1997), e reduzem a resposta do sistema simpático (STRACK *et al.*, 1995). Por sua vez, o jejum aumenta a secreção de ACTH e corticosterona, reduzindo a retroalimentação negativa do eixo HPA (DALLMAN *et al.*, 2003). Em decorrência destes efeitos, alguns autores propuseram que os glicocorticóides e a insulina estimulam o consumo de alimentos altamente calóricos (“comfort foods”) que, por sua vez, protegeriam o eixo HPA da disfunção associada ao estresse e, conseqüentemente, da depressão e da ansiedade (DALLMAN *et al.*, 2003).

2.0 - Hipóteses gerais de estudo

O grupo de pesquisa liderado pela professora Regina Célia Spadari estuda os efeitos do estresse por choques nas patas sobre a reatividade cardíaca e parâmetros metabólicos e endócrinos de ratos. Estes pesquisadores demonstraram que neste modelo de estresse ocorre: alteração de sensibilidade do tecido cardíaco às catecolaminas dependente da presença de altas concentrações de corticosterona (SPADARI *et al.*, 1988; SPADARI & DE MORAES, 1988; SPADARI-BRATFISCH *et al.*, 1999; SOUZA, 2001; SANTOS & SPADARI-BRATFISCH, 2001; SANTOS, 2002; SANTOS *et al.*, 2002; 2003; MOURA, 2002), do gênero e, em fêmeas, das fases do ciclo estral (RODRIGUES *et al.*, 1995; MARCONDES *et al.*, 1996; VANDERLEI *et al.*, 1996). Os autores também demonstraram que ocorre elevação da concentração sérica de corticosterona após estresse, em ratos e em ratas sacrificadas em diestro, que não são acompanhadas de alteração na expressão dos receptores de glicocorticóides no tecido cardíaco (SANTOS & SPADARI-BRATFISCH, 2001; SANTOS, 2002).

Farias-Silva *et al.* (1999) demonstraram que as alterações de sensibilidade da resposta adrenérgica causadas por estresse ocorrem também em adipócitos epididimais isolados de ratos submetidos ao mesmo protocolo de estresse e que estes ratos desenvolvem um quadro de resistência à insulina (FARIAS-SILVA *et al.*, 2004).

A demonstração de que tais alterações de sensibilidade observadas *in vitro* poderiam também ser observadas *in vivo* foi feita por Verago *et al.* (2001). Em outro estudo, Sampaio-Barros *et al.* (2003), utilizando ratos submetidos a estresse por natação, demonstraram que a intensidade e a duração do agente estressor podem modular a utilização dos substratos energéticos.

Levando em consideração o fato que animais submetidos a estresse por choque nas patas apresentam uma clássica alteração na atividade do eixo HPA associada a alterações metabólicas e redução da ingestão alimentar, e que o acesso a alimentos que confortam pode reduzir os efeitos do estresse, as hipóteses que norteiam este trabalho são: (1) o acesso a alimento palatável poderá alterar a redução de ingestão de alimento induzida pelo estresse por choque nas patas; (2) as respostas comportamentais e locomotora, induzidas por estresse por choque nas patas serão alteradas pelo acesso a alimentos palatáveis; e (3) ocorrerá alteração na preferência alimentar e consumo de alimentos palatáveis.

3.0 - Objetivos

Gerais

Estudar os efeitos do consumo de alimento palatável sobre as respostas comportamentais e hormonais de estresse em ratos.

Específicos

- a)- Verificar se o estresse por choque nas patas promove alteração dos comportamentos alimentar e locomotor, e da ansiedade em ratos;
- b)- investigar a preferência por alimento palatável durante o estresse por choque nas patas e a influência deste tipo de alimento na resposta de estresse; e
- c)- analisar se o estresse por choque nas patas e o tipo de alimento ingerido alteram as concentrações séricas de corticosterona, insulina, leptina, glicose e triacilglicerol.

4.0 – Artigo

Effects of palatable diet on anxiety-like behaviors and stress response in rats

Em processo de finalização para ser submetido na revista *Physiology and Behavior*.

Effects of palatable diet on anxiety-like behaviors and stress response in rats

Ortolani, D.^{1,2}, Oyama, L. M.³, Melo, L. L.¹ and ¹Regina Célia Spadari-Bratfisch

¹Department of Biosciences, Federal University of São Paulo, Santos, SP, Brazil.

²Department of Anatomy, Cell Biology, Physiology and Biophysics, Institute of Biology, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

³ Department of Physiology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Corresponding author:

Regina Célia Spadari-Bratfisch

Departamento de Biociências, UNIFESP

Avenida D. Ana Costa, 95

CEP: 11060-001

Santos, SP, Brazil

Phone: 55 13 3221 8058

Email: regina.spadari@unifesp.br

Abstract

It has been proposed that the access to palatable food attenuates the stress response. This work investigates the effect of a palatable diet on behavioral and hormonal parameters of rats submitted to foot-shock stress. Adult Wistar male rats, with or without access to palatable food, were or were not submitted to foot-shock stress. The anxiety levels of stressed and control rats were evaluated in the elevated plus maze (EPM) and open field; the plasma levels of insulin, leptin, corticosterone, glucose and triacylglycerol were determined. Rats preferred the palatable than the commercial diet, and the stress-induced decrease in food intake was abolished in stressed rats with access to palatable diet. Stress increased head dipping, number of entries, and the time spent in the EPM open arms; and decreased stretched-attend posture and risk assessment. The palatable diet decreased risk assessment in non-stressed rats. Stress associated to palatable diet induced higher latency to the first crossing and time spent in the open field center; the other parameters were not altered. The stress-induced increase in serum corticosterone concentration was attenuated by palatable diet. After stress serum glucose and insulin increased, leptin was not altered and triacylglycerol concentrations decreased. Those stress effects were not altered by palatable food. Non-stressed rats ingesting palatable diet increased glucose, leptin and triglyceride concentrations. It is concluded that foot-shock stress had an anorexigenic effect that was abolished by palatable diet and that is independent of leptin. The stress induced anxiolytic-like effect was potentiated by the ingestion of palatable food. However, eating those foods result in metabolic alterations that may be risk factors for obesity or insulin resistance.

Keywords: foot-shock stress, palatable diet, behavior, corticosterone, leptin, insulin

INTRODUCTION

The stress response is known to lead to behavioral and metabolic changes, as an effort to maintain body homeostasis and increase chances of survival (TSIGOS & CHROUSOS, 2002). The glucocorticoids and catecholamines, released during the stress reaction, alter the activity of most of the organic systems, as well as metabolism (FACHIN *et al.*, 2008). Metabolic responses to stress include increased plasma glucose, due to stimulation of glyconeogenesis and glycogenolysis in the liver, as well as inhibition of glucose uptake in the insulin dependent tissues, mobilization of amino acids from extra hepatic tissues, stimulation of lipolysis in adipose tissue and increased metabolic rate (APPEL *et al.*, 1995). All these processes enhance the available energy what supports the stress reaction and allows survival. However, both inadequate control of the stress response or repeated exposure to stress might represent a severe threat to the health and well being.

Besides metabolic alterations, behavioral responses are also associated to the stress reaction such as depressed mood or anhedonia (KENDLER *et al.*, 1999) and anxiety-related responses (MULLER *et al.*, 2003). It is interesting to note that comorbidity between anxiety and depression is a remarkable issue in human (American Psychiatric Association, 1994) and both are related to corticotrophin-releasing hormone (CRH) and to the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) (DE KLOET, 2003; MULLER *et al.*, 2003). However in animals the effects of stress on anxiety-related behaviour are contradictory. While some authors have reported enhanced anxiety-related behaviour after foot-shock stress (KAVUSHANSKY *et al.*, 2009), others have found no effects (MACLEAN & DATTA, 2007) or even decreased anxiety-related behavior after chronic mild stress (D'AQUILA *et al.*, 1994; ROSSLER *et al.*, 2000; WILLNER, 2005; SCHWEIZER *et al.*, 2009;). In the present work we investigate the effect of foot-shock stress on anxiety behaviour and plasmatic biochemical parameters.

Stress also affects feeding behavior. Studies using animal models have suggested that stress may both increase and decrease food ingestion (COTTONE *et al.*, 2009). Several factors related to the stress response may be involved in these effects, and they include the activation of the autonomic nervous system (BERTHOUD & MORRISON, 2008), as well as the HPA axis that releases CRH, adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and glucocorticoids (GCs) (ADAM & EPEL, 2007). Leptin, a hormone that affect feeding behavior, is released by adipose tissue under sympathetic stimulation (BARANOWSKA *et al.*, 2008). Moreover, during stress, some areas in the nervous system that are involved in the cognition, rewarding, and emotional aspects of the eating behavior are activated (TORRES & NOWSON, 2007).

It has been proposed that when animals are allowed to have access to food rich in sugar and lard during exposure to stress, eating these foods has a role in ameliorating stress and possibly stress-related behaviors (DALLMAN *et al.*, 2005; FACHIN *et al.*, 2008; MANIAM & MORRIS, 2009; WARNE, 2009). Indeed, in contrast to acute, inhibitory feedback provided by transient increases in GCs, chronic elevations of GCs are directly excitatory in the brain, increasing stimulus salience for both appetitive and aversive events. (DALLMAN *et al.*, 2005).

We have demonstrated that rats exposed to foot-shock stress reduced food intake, presented high serum levels of glucose and insulin and are resistant to insulin in the glucose tolerance test (FARIAS-SILVA *et al.*, 1999). They also exhibited high serum corticosterone levels immediately after each foot-shock session that returned to basal levels 24 h after that (FARIAS-SILVA *et al.*, 2002). The mechanism through which food intake has been reduced after foot-shock stress has not been clarified.

The aim of this study was to verify whether the stress induced food intake reduction was associated to some locomotor impairment or to anxiety-like behaviors and whether the access to palatable food would alter the hormonal and behavioral responses to foot-shock stress.

MATERIAL AND METHOD

Animals

Eighty-six adult male Wistar rats weighing 250 to 300 g at the beginning of the experiments were used. The animals were housed in groups of 5-6 in home cages made of Plexiglas (41×34×16 cm) with the floor covered with sawdust in a temperature-controlled room (22±2 °C), on a 12 h light/dark cycle, with lights on at 7:00 a.m. Standard laboratory chow (Labina, Purina®, Evialis Group, Brazil) and tap water were available *ad libitum*. During the experiments, the animals were cared for in accordance with the principles for the use of animals in research and education, as laid down in the Statement of Principles adopted by the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) board. The experimental protocols were also approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation (certificate number 1409-1).

Experimental Protocols

At the beginning of the experiment and throughout it, the rats were individually placed in metabolic cages made of acrylic (20 cm in diameter × 14 cm in high) with the floor made of stainless-steel rods and adapted for contain two feeders. Some of the rats designed to determination of basal corticosterone serum levels were kept in standard cages.

The rats were distributed in two groups: control, non-stressed rats, and rats submitted to inescapable foot-shock as described below. These groups were further subdivided according to the diet offered to the rats: only commercial chow or both commercial and palatable diet, that were available three days before and throughout the experimental procedure.

Immediately after the third stress or control session, some animals were submitted to the behavioral tests. Other groups of rats were euthanized by decapitation within 30s after the end of

the last foot-shock or control session. Blood was collected into plastic vials and centrifuged for 20 min, 4000 rpm. Aliquots of serum were removed and stored at -80°C until assayed for triacylglycerol, corticosterone and leptin. The serum levels of glucose and insulin were assayed in rats sacrificed after an overnight 12 h fasting.

Palatable Diet

The palatable diet, also called cafeteria diet, consisted of a mixture of powdered commercial chow for rodents (Labina, Purina®, Evialis Group, Brazil), peanuts (Hikari®, São Paulo, Brazil), milk chocolate (Chocolates Garoto®, Brazil) and sweet biscuit (Tostines®, Nestlé, Brazil) in the proportion of 3:2:2:1. This diet achieved 20% protein, 20% fat, 48% carbohydrate, and 4% fiber. The caloric densities of this diet and of the commercial diet were determined with an adiabatic calorimeter (C400, IKA® Works, São Paulo, Brazil) and were 21.40 KJ/g (35% of calories as fat) and 17.03 KJ/g, respectively (ESTADELLA *et al.*, 2004). The amount of food consumed by each animal was evaluated by weighing the food remaining at the feeders on a digital scale, every 24 hours.

Stress Procedure

Rats were randomly assigned for the inescapable foot-shock stress group (ST) or the control group (CO). As previously described (FARIAS-SILVA *et al.*, 1999), the animals were placed in a Plexiglas chamber (26×21×26 cm) provided with a grid floor made of stainless-steel rods (0.3 cm in diameter and spaced 1.0 cm apart). During the 30 min sessions, which occurred between 7:30 a.m. and 11:00 a.m., the foot-shocks were delivered by a constant current source controlled by a microprocessor-based instrument constructed at the Biomedical Engineering

Center, State University of Campinas. The current intensity was 1.0 mA, duration 1.0 s with pulses delivered at random intervals of 5-25 s (mean interval of 15 s). The rats were returned to the metabolic cages at the end of the first and the second foot-shock sessions. After the third session rats were evaluated in the behavioral tests or sacrificed for blood collection. The rats in the CO group were also placed in the foot-shock cage for the same period of time, but received no foot-shock.

Behavioral Analysis

Elevated Plus-Maze Test (EPM)

After the third period in the foot-shock cage, the animals were evaluated in the EPM, under a 60 lux light, as previously described (MELO *et al.*, 1995; PELLOW *et al.*, 1985). Animals were placed individually on the center of the maze, on the junction between open and closed arms, facing one of the closed arms. A recorder camera was installed in order to allow the registration of the animal's behavior during 5 min and allowed later analysis by more than one researcher. The rat was considered to have entered one arm of the maze when all four paws were within that arm. Conventional parameters of anxiety-like behavior were monitored, i.e., the number of entries into the closed arms, entries into the open arms and the total time spent in each arm. The ratio between time spent in the open (or the closed) arms and time spent in the open plus the closed arms was calculated and multiplied by 100, to yield the percentage of time spent in open (or closed) arms. In addition, the number of the following ethological categories were measured: head dipping (dipping of the head below the level of the maze floor), risk-assessment (exiting an enclosed arm with the forepaws and head only, and investigating the surroundings; often but not necessarily accompanied by body stretching), stretched-attend postures (when the animal stretches to its full length with the forepaws, keeping the hind paws in the same place and

turns back to the anterior position), rearing (rising on the hind limbs), grooming (licking, scratching, and washing of the head and body), and fecal bolus produced. These categories were defined according to previous studies (RODGERS & COLE, 1993; CRUZ *et al.*, 1994; ANSELONI & BRANDÃO, 1997). After removal of each animal, the maze was cleaned with a 10% ethanol solution.

Open Field Test

Immediately after the EPM test each animal was evaluated in the open field, under a 60 lux light. The apparatus consists of a cylinder constructed of acrylic, with 72 cm in diameter and 60 cm high, its base being divided into 12 equal areas (rectangles measuring 13.3 by 15.0 cm). A recorder camera was installed in order to allow the registration of the animal's behavior for later analysis by more than one researcher. Rats were placed individually in the open field for 5 min and the following parameters were analyzed: latency to first crossing, time spent in the periphery and center of the apparatus, number of crossings (times that the animal enters with the four paws into another square), number of rearings, number of grooming, and number of fecal bolus (WALSH & CUMMINS, 1976; CAPAZ *et al.*, 1981). After each trial, the apparatus was cleaned with a 10% ethanol solution.

Biochemical Parameters

Serum corticosterone concentrations were determined by enzyme immunoassay (ELISA) using a commercial kit (Assay Designs, Inc., Ann Arbor, USA). Insulin and leptin were measured using ELISA kits (Linco Research, Inc., Missouri, USA). Serum glucose and triacylglycerol were evaluated with commercial kits from Labtest Diagnostic S.A. (Minas Gerais, Brazil).

Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm standard error of means. The data were compared by Student's *t* test and Two-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls's test. The differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

RESULTS

Food Intake

Food intake was strongly influenced by stress and the diet composition ($F_{[3,69]} = 240$; $p=0.0001$). The rats submitted to foot-shock stress reduced the intake of commercial diet as compared to control rats ($p=0.035$, Student's *t* test). Rats that could choose between commercial and palatable diet showed a clear preference for the palatable diet. This preference was not altered by stress. Moreover, the reduction of food intake induced by stress was not observed when the animals had access to the palatable diet (Table 1). Despite these differences in the food and caloric intake there was no significant difference in the rats' body weight between the groups ($F_{[3,69]}=1.2$; $p=0.30$, Figure 1).

Behavioral Analysis

The percentage of entries ($F_{[1,60]}=5.97$; $p=0.017$) and the time spent in the open arms of the EPM ($F_{[1,60]}=4.59$; $p=0.036$) were higher in rats submitted to foot-shock stress whereas the percentage of entries and the time spent in the closed arms were not altered by stress or the diet composition (Figure 2). The number of head dipping was higher ($F_{[1,60]}=5.55$; $p=0.021$), whereas the number of stretched-attend posture ($F_{[1,60]}=8.08$; $p=0.006$) and of risk assessment was lower ($F_{[1,60]}=7.94$; $p=0.006$) after foot-shock stress (Table 2). Non-stressed rats with access to

palatable diet also displayed a lower number of risk assessment ($F_{[1,60]}=2.25$; $p=0.000$). None of the rats exhibited rearing or grooming behaviors in the open arms of the EPM (Table 2).

None of the parameters evaluated in the open field were significantly altered in rats fed with commercial chow and submitted to foot-shock stress or in non-stressed rats fed with palatable diet (Table 3). However, the interaction between stress and palatable diet caused an increase in the latency to the first crossing ($F_{[1,60]}=4.79$; $p=0.032$), and in the time spent in the centre of the open field ($F_{[1,60]}=7.76$; $p=0.007$), with a correspondent decrease in the time spent in the periphery ($F_{[1,60]}=6.17$; $p=0.015$). The number of crossing, rearing, grooming and fecal bolus was not altered by stress or diet (Table 3).

Hormonal and metabolic parameters

Foot-shock stress induced an increase in the serum corticosterone concentration of rats fed with commercial diet ($F_{[1,22]}=14.0$; $p=0.0001$). The access to palatable diet did not alter serum corticosterone concentration in control rats. However, in those rats with access to palatable diet, the stress-induced increase in serum corticosterone concentration was attenuated (Figure 3). In order to evaluate if the metabolic cage could represent an additional stressor for the rats, serum corticosterone was determined in rats were kept in standard cages. There were no significant differences in the serum corticosterone concentration between non-stressed rats kept in standard cages fed only with commercial (65.5 ± 23.2) or with commercial and palatable diet (170.7 ± 35.6 ng/ml) and those seen in rats living in metabolic cages (118.30 ± 21.76 ; 100.00 ± 90.11 ; respectively).

The serum insulin concentrations were higher in stressed than control rats ($F_{[1,23]}=14.27$; $p=0.001$). On the other hand, serum leptin concentration was not affected by stress, but the consumption of palatable diet increased it ($F_{[1,23]}=68.93$; $p=0.000$; Table 4).

Serum glucose concentration was higher in rats submitted to foot-shock stress as compared to control rats fed with commercial chow ($F_{[1,23]}=25.31$, $p=0.001$) or with palatable diet ($F_{[1,23]}=15.47$, $p=0.005$; Table 4). On the other hand, serum triacylglycerol concentration decreased in rats submitted to stress ($F_{[1,23]}=14.97$; $p=0.000$) and the access to palatable diet increased it ($F_{[1,23]}=9.65$; $p=0.005$; Table 4).

DISCUSSION

Data presented here have shown that rats submitted to foot-shock stress fed with commercial chow decreased food intake as compared to control rats, as previously reported in this experimental model (FARIAS-SILVA *et al.*, 1999; 2002) as well as other stress protocols (MARTÍ *et al.*, 1994; VALLÈS *et al.*, 2000), with this effect being modulated by intensity, duration, frequency or time of the day that the stressor is applied. Present data also have shown that the access to palatable diet cancelled this effect of stress on feeding behavior and attenuated the stress-induced increase in serum corticosterone levels.

Several factors related to the stress response may be involved in these effects of foot-shock stress on feeding behavior. They include the autonomic nervous system activation (BERTHOUD & MORRISON, 2008), the release of hormones, such as CRH, ACTH, glucocorticoids (ADAM & EPEL, 2007) and leptin (BARANOWSKA *et al.*, 2008), and the activation of neural systems involved in the cognitive, rewarding, and emotional aspects of ingestive behavior (TORRES & NOWSON, 2007). However, the anorexigenic effect of foot-shock stress was independent of leptin and it was not due to anxiety since the behavioral analysis of foot-shock stressed rats indicated lower rather than higher levels of anxiety.

Moreover, the anorexigenic effect of foot-shock stress was not observed in rats that have access to palatable food. It has been previously reported that rats submitted to stress showed

higher preference for sweet food than non-stressed rats (KANT & BAUMAN, 1993; YOUNG, 2000; FACHIN *et al.*, 2008) and that the intake of palatable food would reduce the stress response (PECORARO *et al.*, 2004). Indeed, rats were submitted to restraint stress during 3 hours a day in a period of 5 days increased the intake of calorically dense lard and sucrose (DALLMAN *et al.*, 2003; LA FLEUR *et al.*, 2004; PECORARO *et al.*, 2004; LIANG *et al.*, 2008). However, rats exposed to chronic restraint stress during 1h daily, 5 days per week for 40 days, did not present any difference in the consumption of palatable food as compared to non-stressed rats (KROLOW *et al.*, 2010).

In the present study, both stressed and control rats showed clear preference for palatable food, which has not been altered by stress. Moreover, data presented here have shown that foot-shock stressed rats did not decrease the intake of palatable diet, which indicates that they did not develop anhedonia, a symptom observed in rats exposed to chronic unpredictable mild stress (MOREAU *et al.*, 1994; WILLNER 2005) and in patients with chronic stress and depression (FORBES *et al.*, 2010). These differences are in line with the proposal that the stressor type and duration may affect the food intake in different ways (KANT & BAUMAN, 1993) and also with the hypothesis that the intake of palatable food reduces the stress response (DALLMAN *et al.*, 2003) because the stress-induced increase in serum corticosterone levels was attenuated in rats with access to palatable food.

Both elevated plus maze and open field tests have been largely used to assess neurobehavioral profiles of experimental animals under the influence of anxiogenic/anxiolytic agents (PRUT & BELZUNG, 2003; CAROBREZ & BERTOGLIO, 2005; TEEGARDEN & BALE, 2007). The number of entries and the time spent in the open arms of the EPM are considered to reflect the animal fear from entering the open arms and it is associated to the animals' anxiety level. Therefore, in the present study, an increased number of entries and of the

time spent in the EPM open arms suggest that the foot-shock stressed rats present a level of anxiety which is lower than those of control rats.

The animals also performed higher number of head dipping behavior, and lower number of stretched-attend posture and risk assessment. These behavioral categories are associated with exploratory activity (RODGERS *et al.*, 1997) and, the last two behaviors are considered as strategies used by the animal to evaluate the environment in potentially dangerous situations (BLANCHARD *et al.*, 1993). The stretched-attend posture has been interpreted in terms of “cautious exploration”, the function of which is to optimize the most adaptive behavioral strategy (RODGERS *et al.*, 1999). Hence, a lower number of stretched-attend and risk assessment postures, as observed in stressed rats, reinforces the hypothesis that those rats present a lower level of anxiety and are less cautious exploring the new environment. The reduced number of behaviors related to anxiety observed in foot-shock stressed rats was not modified by the access to palatable food. An anxiolytic-like profile in the EPM test has been previously reported in rats exposed to chronic mild unpredictable stress (D’AQUILA *et al.*, 1994; ROSSLER *et al.*, 2000; SCHWEIZER *et al.*, 2009) but not for foot-shock stressed rats. However, some authors have reported enhanced anxiety-related behavior after foot-shock (KAVUSHANSKY *et al.*, 2009), whereas others have found no effects (MACLEAN & DATTA, 2007). These conflicting results could probably be due to different levels of plasmatic corticosterone. VAF AEI *et al.* (2008) showed that peripheral administration of glucocorticoids induces biphasic effects on anxiety related behaviors: anxiolytic effects in lower doses and anxiogenic effects in higher doses. As discussed above the stressed animals in the present study showed higher corticosterone levels than control groups, but probably these levels are only sufficient to induce an anxiolytic effect.

The parameters evaluated in the open field were not altered in foot-shock stressed rats, which indicate that the rats’ locomotor activity has not been impaired by the foot shocks. On the

other hand, the interaction of stress and palatable diet increased the latency to the first crossing, as well as the time spent in the centre of the open field. This behavioral profile indicates a reduced anxiety level (PRUT & BELZUNG, 2003).

In contrast to data presented here, an anxiogenic effect of chronic restraint stress (KROLOW *et al.*, 2010) and of foot-shock stress has been reported in a modified dark and light test, measured between 2 and 10 weeks post-stress (BRUIJNZEEL *et al.*, 2001). A reduced locomotor activity in the open field has been demonstrated in foot-shock stressed rats (PALERMO-NETO *et al.*, 2003), but this test was performed before the EPM test, whereas in the present study, rats were evaluated in the open field immediately after the EPM test.

Not only behavioral parameters and serum glucocorticoids levels were altered by foot-shock stress that also leads to a widespread metabolic response. High levels of insulin and glucose were previously reported after each one of the foot-shock sessions (VERAGO *et al.*, 2001) and those were associated with insulin resistance, as demonstrated in vivo by the oral glucose tolerance test (oGTT) and by the reduced adipocytes response to insulin (FARIAS-SILVA *et al.*, 2004), although the release of insulin by pancreatic islets isolated from foot-shock stressed rats was similar to that of control rats (FARIAS-SILVA *et al.*, 2004). In contrast to serum glucocorticoids, glucose and insulin, triacylglycerol concentration was lower in the serum of rats submitted to foot-shock stress. Verago *et al.* (2001) analyzed triacylglycerol concentrations in the serum of conscious rats after each one of the three sessions of foot-shock stress. The authors reported that triacylglycerol increased only after the first session and was lower than those seen in control rats after the third session of foot-shock stress. The access to palatable food increased the serum levels of glucose and triacylglycerol but the serum insulin concentration was not significantly altered in control rats. Palatable food intake did not alter the metabolic effect of stress.

Leptin, which is secreted by the adipocytes, has many effects on the organism, most of them related to energy homeostasis, by signaling of energy stores and inhibiting food intake (ANUBHUTI & ARORA, 2008). Leptin also acts on specific receptors in taste cells thus suppressing the behavioral responses to sweet substances (SHIGEMURA *et al.*, 2004). In the present study, although the serum leptin concentration was higher in rats with access to palatable diet, the food intake was not reduced. Moreover, the effect of stress was cancelled.

It is concluded that foot-shock stress has an anorexigenic effect that is abolished by palatable diet and that is independent of leptin. The stress induced anxiolytic-like effect was potentiated by the ingestion of palatable food. However, eating those foods result in metabolic alterations that may be risk factors for obesity or insulin resistance.

DECLARATION OF INTEREST

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

ACKNOWLEDGEMENTS: the authors acknowledge the financial support from “Coordenadoria de Apoio a Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Fundação para o Amparo da Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Fabio Montesano for the statistic analysis and Linda Gentry El’Dash for the linguistic revision.

FOOTNOTE: this work is part of the Master's degree thesis of Daniela Ortolani.

REFERENCES

American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-IV). Washington, DC.

Adam TC, Epel SE. 2007. Stress, eating and the reward system. *Physiology and Behavior*; 91: 449–458.

Anseloni VCZ, Brandão ML. 1997. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology*; 8: 533–540.

Anubhuti and Arora S. 2008. Leptina and its metabolic interactions – an update. *Diabetes, Obesity and Metabolism*; 10: 973-993.

Appel JK, Dikeman ME, Minton JE, McMurphy RM, Fedde MR, Leith DE, Unruh JA. 1995. Effects of restraint and isolation stress and epidural blockade on endocrine and blood metabolite status, muscle glycogen metabolism, and incidence of dark-cutting longissimus muscle of sheep. *Journal of Animal Science*; 73(8): 2295-2307.

Baranowska B, Baranowska-Bik A, Bik W, Martynska L. 2008. The role of leptin and orexins in the dysfunction of hypothalamo-pituitary-gonadal regulation and in the mechanism of hyperactivity in patients with anorexia nervosa. *Neuroendocrinology Letters*; 29(1): 37-40.

Berthoud HR, Morrison C. 2008. The brain, appetite, and obesity. *Annual Review of Psychology*; 59: 55–92.

Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC. 1993. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*;58(1-2): 155-165.

Bruijnzeel AW, Stam R, Wiegant VM. 2001. Effect of a benzodiazepine receptor agonist and corticotropin-releasing hormone receptor antagonists on long term foot-shock-induced increase in defensive withdrawal behavior. *Psychopharmacology* 158: 132–139.

Capaz FR, Vanconcellos LE, De Moraes S, Neto JP. 1981. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. *Arch Int Pharmacodyn Ther*; 251(2): 228-236.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 1193–1205.

Cottone P, Sabino V, Steardo L, Zorrilla EP. 2009. Consummatory, anxiety-related and metabolic adaptations in female rats with alternating access to preferred food. *Psychoneuroendocrinology*; 34(1): 38-49.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry Behavior*; 49(1): 171-176.

Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. 2003. Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 100: 11696–11701.

Dallman MF, Pecoraro N, La Fleur SE. 2005. Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity. *Brain, Behavior and Immunity*; 19: 275–280.

D'Aquila PS, Brain P, Willner P. 1994. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology and Behavior*; 56(5): 861-867.

De Kloet ER. 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*; 37:51 –68.

Estadella D, Oyama LM; Dâmaso AR, Ribeiro, EB; Do Nascimento, CO. 2004. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats *Nutrition*; 20:218–224.

Fachin A, Silva RK, Noschang CG, Pettenuzzo L, Bertinetti L, Billodre MN, Peres W, Busnello F, Dalmaz C. 2008. Stress effects on rats chronically receiving a highly palatable diet are sex-specific. *Appetite* 51: 592–598.

Farias-Silva E, Grassi-Kassisse DM, Wolf-Nunes V, Spadari Bratfisch RC. 1999. Stress-induced alteration in the lipolytic response to β -adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *Journal of Lipid Research*; 40(9): 1719-1727.

Farias-Silva E, Sampaio-Barros, MM, Amaral MEC, Carneiro EM, Boschero AC, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. 2002. Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot shock stress. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 80(8): 783-789.

Farias-Silva E, Santos IN, Amaral MEC, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. *Annals of the New York Academy Science*; 1018: 328-332, 2004.

Forbes C, Blanchard JJ, Bennett M, Horan WP, Kring A, Gur R. 2010. Initial development and preliminary validation of a new negative symptom measure: The Clinical Assessment Interview for Negative Symptoms (CAINS). *Schizophrenia Research*.

Kant GJ, Bauman R. 1993. Effect of chronic stress and time of day on preference for sucrose. *Physiology and Behavior*; 54: 499–502.

Kavushansky A, Ben-Shachar D, Richter-Levin G, Klein E. 2009. Physical stress differs from psychosocial stress in the pattern and time-course of behavioral responses, serum corticosterone and expression of plasticity-related genes in the rat. *Stress*; 12(5):412-25.

Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. 1999. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156: 837–841.

Krolow RCG, Noschang D, Arcego AC, Andreazza W, Peres CA, Gonçalves C, Dalmaz MF. 2010. 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*; 55(1):108-16.

La Fleur SE, Akana SF, Manalo SL, Dallman MF. 2004. Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology*; 145: 2174-2185.

Liang S, Byers DM, Irwin LN. 2008. Sex and diet affect the behavioral response of rats to chronic mild stressors. *Physiology and Behavior*; 93: 27-36.

Maclean RR, Datta S. 2007. The relationship between anxiety and sleep-wake behavior after stressor exposure in the rat. *Brain Res*; 20;1164:72-80.

Maniam J, Morris MJ. 2009. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment *Psychoneuroendocrinology*; 1-12.

Martí J, Armário A. 1994. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology and Behavior*; 55: 747-753.

- Melo, L.L.; Brandão, M.L. 1995. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the inferior colliculus in aversive states induced by exposure of rats to the elevated plus-maze test. *Behavioural Pharmacology*; 6 (4) 413-417.
- Moreau JL, Bourson A, Jenck f, Martin JR, Mortas P. 1994. Curative Effects of the Atypical Antidepressant Mianserin in the Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia Model of Depression. *Journal of Psychiatric Neuroscience*; 19(1).
- Müller MB, Zimmermann S, Sillaber I, Hagemeyer TP, Deussing JM, Timpl P, Kormann MS, Droste SK, Kühn R, Reul JM, Holsboer F, Wurst W. 2003. Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci*; 6:1100– 1107.
- Palermo-Neto J, de Oliveira Massoco C, Robespierre de Souza W. 2003. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun*; 17(1):43-54.
- Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*; 145(8): 3754-3762.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience and Methods*; 14(3):149-167.
- Prut L, Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*; 463: 3–33.

Rodgers RJ, Cole JC. 1993. An ethological analysis of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology*; 4: 573–580.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. 1997. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 30(3): 289-304.

Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. 1999. Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology and Behavior*; 68: 47–53.

Rossler AS, Joubert C, Chapouthier G. 2000. Chronic mild stress alleviates anxious behaviour in female mice in two situations. *Behav Processes*; 49:163–165.

Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I. 2009. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, ‘anomalous anxiolysis’ and activity. *PLoS One*; 4:e4326.

Shigemura N, Ohta R, Kusakabe Y, Miura H, Hino A, Koyano K, Nakashima K, Ninomiya Y. 2004. Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology*; 145(2): 839-847.

Teegarden SL, Bale TL. 2007. Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse. *Biological Psychiatry*; 61(9): 1021-1029.

Torres SJ, Nowson CA. 2007. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*; 23: 887–894.

Tsigos C, Chrousos GP. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*; 53: 865-871.

Vallès A, Martí O, García A, Armário A. 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 279: R1138-1144.

Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Taherian AA 2008. Peripheral injection of dexamethasone modulates anxiety related behaviors in mice: an interaction with opioidergic neurons. *Pak J Pharm Sci.* 21(3):285-289.

Verago JL, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. 2001. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in foot shock stressed rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 34(9): 1197-1207.

Walsh RN, Cummins RA. 1976. *Psychological Bulletin*; 83(3): 482-504.

Warne JP. 2009. Shaping the stress response: interplay of palatable food choices, glucocorticoids, insulin and abdominal obesity. *Molecular Cellular Endocrinology*; 300(1-2): 137-46.

Willner P. 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*; 52:90-110.

Young JB. 2000. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 279: R1745–1752.

Legends to the Figures

Figure 1 – Body weight (g) of control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet (n=20/group); and rats with option between commercial and palatable diet (n=15/group). Body weight was evaluated before and after 3 days of experimental protocol ($p>0.05$, Two-way ANOVA).

Figure 2 – Percentage of entries in the open and closed arms of the elevated plus maze of control (n=20) and foot-shock stressed rats (n=18) fed with commercial diet; control (n=12) and stressed rats (n=11) with option between commercial and palatable diet (* significantly different from control groups, $p<0.05$, Two-way ANOVA and post-test of Newman-Keuls).

Figure 3 – Serum corticosterone concentration (ng/ml) of control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet or rats with option between commercial and palatable diet. The number of experiments was 6 for each group (* significantly different from control fed with commercial diet, # significantly different from stress fed with commercial diet; $p<0.05$, Two-way ANOVA and post-test Newman-Keuls).

Figure 1

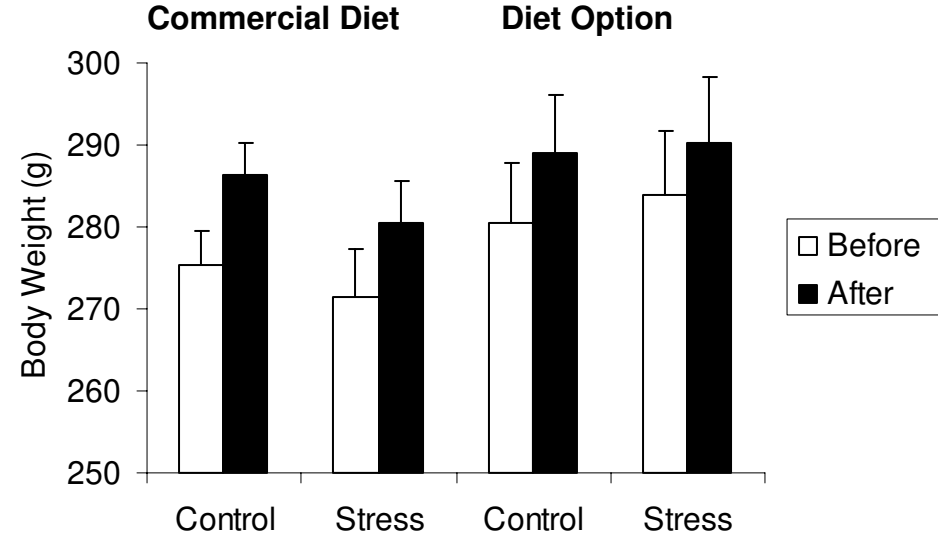


Figure 2

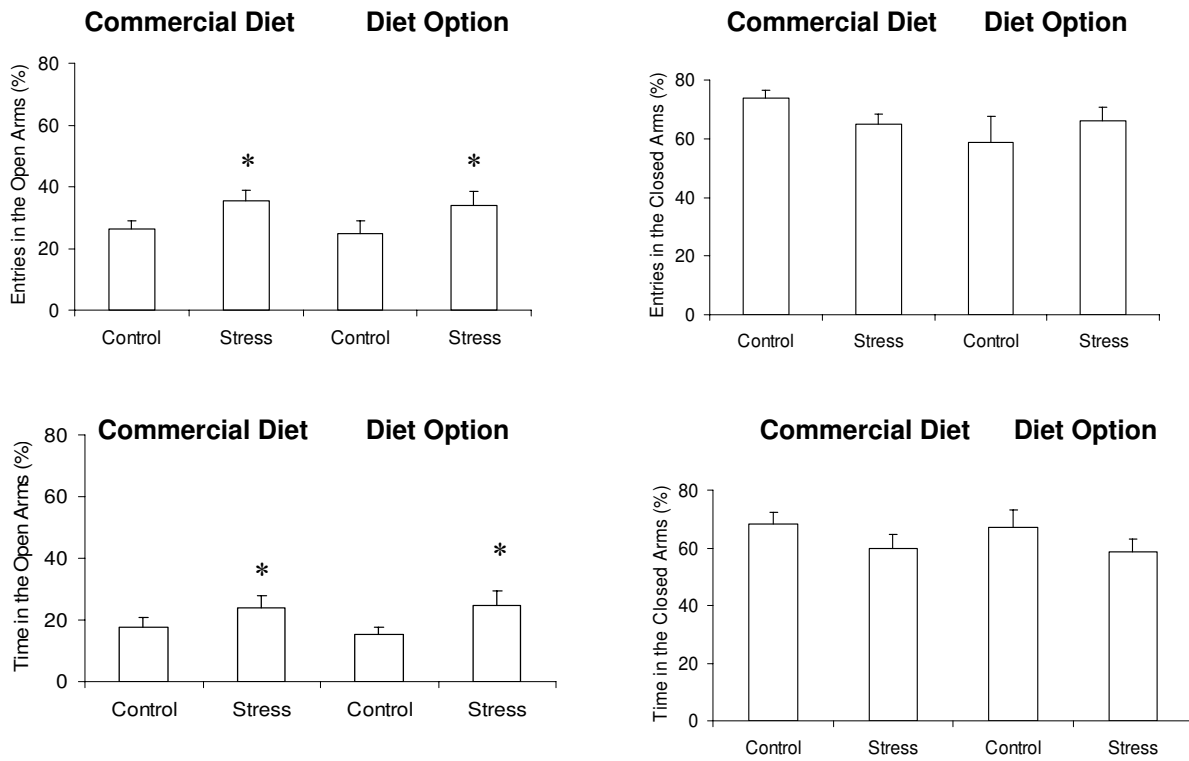


Figure 3

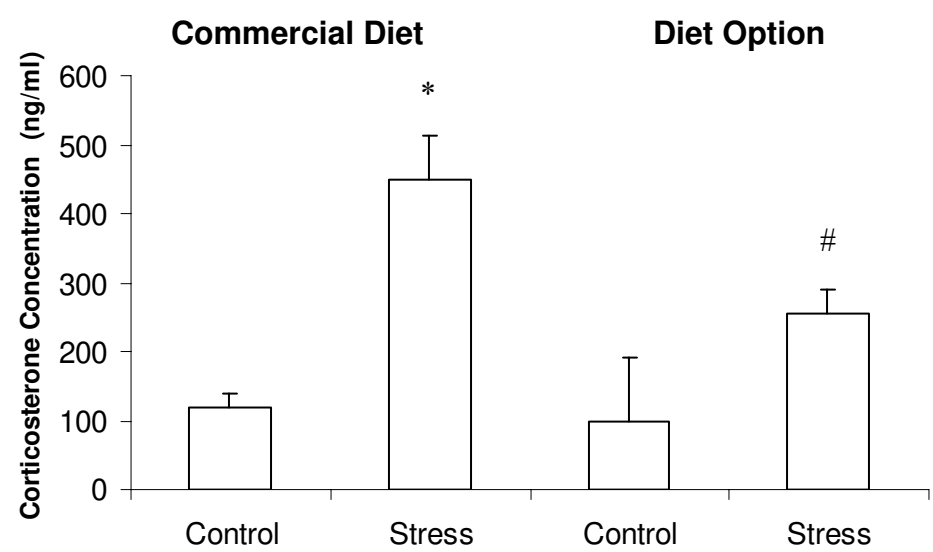


Table 1 – Daily food (g) and caloric intake (KJ) of control rats and rats submitted to inescapable, unsignaled foot-shock stress fed with commercial diet or with option between commercial and palatable diet.

Parameters / Groups	Commercial Diet		Diet Option	
	Control	Stress	Control	Stress
	(20)	(20)	(15)	(15)
Commercial (g)	24.05 ± 0.77	21.90 ± 0.61 *	1.43 ± 0.30	0.63 ± 0.22
Palatable (g)	---	---	21.77 ± 0.59 †	21.87 ± 1.39 †
Total calories (KJ)	409.57 ± 13.19	372.96 ± 10.35 #	490.22 ± 10.97 #	478.73 ± 29.51 #

The numbers between parentheses are the numbers of animals, * significantly different from control fed with commercial diet ($p < 0.05$, Student's *t* test), † significantly different from commercial diet in the same group, # significantly different from control fed with commercial diet ($p < 0.05$, Two-way ANOVA and post-test of Newman-Keuls).

Table 2 – Behaviors evaluated in the open arms of the elevated plus maze of control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet or with option between commercial and palatable diet.

Parameters / Groups	Commercial Diet		Diet Option	
	Control	Stress	Control	Stress
	(20)	(18)	(12)	(11)
Head dipping	13.85 ± 1.61	19.16 ± 2.85 *	12.58 ± 2.19	18.45 ± 2.07 *
Rearing	0	0	0	0
Fecal bolus	0.35 ± 0.18	0.61 ± 0.31	0.00	0.09 ± 0.09
Stretched-attend posture	13.05 ± 1.26	8.11 ± 1.19 *	12.25 ± 1.41	9.54 ± 1.25 *
Risk assessment	17.70 ± 0.92	13.44 ± 1.23 *	11.50 ± 0.73 *	9.63 ± 0.94 *
Grooming	0	0	0	0

The numbers between parentheses are the numbers of animals, * significantly different from control group fed with commercial diet ($p < 0.05$, Two-way ANOVA and post-test of Newman-Keuls).

Table 3 – Open field behaviors of control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet or rats with option between commercial and palatable diet.

Parameters / Groups	Commercial Diet		Diet Option	
	Control	Stress	Control	Stress
	(20)	(18)	(12)	(11)
Latency to the first crossing (s)	9.05 ± 2.44	8.27 ± 0.99	5.16 ± 0.95	15.18 ± 4.53 [#]
Time spent in the centre (s)	48.95 ± 4.20	46.83 ± 6.33	31.33 ± 4.69	85.09 ± 23.37 ^{# *}
Time spent in periphery (s)	253.75 ± 5.52	253.16 ± 6.33	265.75 ± 4.96	213.54 ± 23.52 ^{# *}
Crossing	67.25 ± 4.51	74.11 ± 3.88	70.91 ± 9.35	59.90 ± 8.13
Rearing	39.45 ± 2.73	38.66 ± 2.45	36.75 ± 3.02	30.80 ± 3.79
Grooming	1.70 ± 0.23	2.16 ± 0.31	1.58 ± 0.19	1.54 ± 0.28
Fecal bolus	2.00 ± 0.46	0.55 ± 0.32	1.66 ± 0.68	1.36 ± 0.79

The numbers between parentheses are the numbers of animals, ^{*} significantly different from control groups; [#] interaction between stress and palatable diet (p<0.05, Two-way ANOVA and post-test of Newman-Keuls).

Table 4 – Serum levels of glucose (mg/dl), triacylglycerol (mg/dl), insulin (ng/ml) and leptin (ng/ml) in control and foot-shock stressed rats fed with commercial diet, or with option between commercial and palatable diet.

Parameters/Groups	Commercial Diet		Option Diet	
	Control	Stress	Control	Stress
Insulin	0.55 ± 0.70	1.10 ± 0.21 *	0.28 ± 0.04	0.92 ± 0.18 *
Leptin	3.50 ± 0.12	3.50 ± 0.28	8.40 ± 1.00 #	8.60 ± 0.55 #
Glucose	73.8 ± 3.5	128.3 ± 22.9 *	95.27 ± 1.99 †	117.95 ± 3.69 *
Triacylglycerol	169.80 ± 5.67	157.67 ± 4.84 *	209.93 ± 13.05 †	169.23 ± 11.28 *+

Data are means ± sem of 6 animals per group, * significantly different from control groups; # significantly different from control and stress fed with commercial diet; † significantly different from the other groups; + significantly different from stress fed with commercial diet and from stress with diet option (p<0.05, Two-way ANOVA and post-test Newman-Keuls).

5.0 - Conclusões

Os resultados apresentados acima mostraram que:

- ratos submetidos a estresse por choque nas patas reduzem o consumo alimentar de ração comercial, sendo que esta redução da ingestão não está relacionada a um prejuízo locomotor,

- ratos submetidos a estresse por choque nas patas apresentam menor nível de ansiedade avaliados no LCE e no campo aberto, e menor índice de comportamentos relacionados à avaliação de risco,

- ratos controles e estressados preferiram ingerir dieta palatável, e seu acesso cancelou a redução da ingestão alimentar induzida pelo estresse, além de potencializar o efeito ansiolítico do estresse,

- o aumento da liberação de corticosterona induzido pelo estresse por choque nas patas foi atenuado pelo acesso à dieta palatável. O estresse também aumentou as concentrações séricas de insulina e de glicose, e reduziu as de triglicérides; e a ingestão de dieta palatável aumentou a glicemia, além de aumentar as concentrações séricas de leptina e de triglicérides, mas não de insulina.

Estes resultados permitem concluir que ratos submetidos a estresse por choque nas patas com acesso a dieta palatável apresentam modificações comportamentais e hormonais, que afetam variáveis metabólicas. A combinação de estresse por choque nas patas e dieta palatável pode ser utilizada para o estudo de fatores desencadeadores de quadros patológicos associados ao estresse, tais como resistência à insulina e à leptina.

6.0 – Referências

Abizaid A, Liu ZW, Andrews ZB, Shanabrough M, Borok E, Elsworth JD, Roth RH, Sleeman MW, Picciotto MR, Tschop MH, Gao XB, Horvath TL. 2006. Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *Journal Clinical of Investigation*; 116: 3229-3239.

Adam TC, Epel SE. 2007. Stress, eating and the reward system. *Physiology and Behavior*; 91: 449–458.

Aguar MS, Brandão ML. 1996. Effects of microinjections of the neuropeptide substance P in the dorsal periaqueductal gray on the behaviour of rats in the plus-maze test. *Physiology and Behavior*; 60(4): 1183-1186.

Air EL, Strowski MZ, Benoit SC, Conarello SL, Salituro GM, Guan XM, Liu K, Woods SC, Zhang BB. 2002. Small molecule insulin mimetics reduce food intake and body weight and prevent development of obesity. *Nature Medicine*; 8: 179-183.

American Psychiatric Association (1994) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder (DSM-IV). Washington, DC.

Anderson DE, Rosner W, Khan MS, New MI, Pang S, Wissel S, Kappas A. 1987. Diet-hormone interactions: protein-carbohydrate ratio alters reciprocally the plasma levels of testosterone and cortisol and their respective binding globulin in man. *Life Science*; 40: 1761-1768.

Anisman H, Zacharko RM. 1982. Depression: the predisposing influence of stress. *Behavior of Brain Science*; 5: 89-137.

Anseloni VCZ, Brandão ML. 1997. Ethopharmacological analysis of behaviour of rats using variations of the elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology*; 8: 533–540.

Anubhuti and Arora S. 2008. Leptina and its metabolic interactions – an update. *Diabetes, Obesity and Metabolism*; 10: 973-993.

Appel JK, Dikeman ME, Minton JE, McMurphy RM, Fedde MR, Leith DE, Unruh JA. 1995. Effects of restraint and isolation stress and epidural blockade on endocrine and blood metabolite status, muscle glycogen metabolism, and incidence of dark-cutting longissimus muscle of sheep. *Journal of Animal Science*; 73(8): 2295-2307.

Armário A, López-Calderón A, Jolín T, Castellanos JM. 1986. Sensitivity of anterior pituitary hormones to graded levels of psychological stress. *Life Science*; 471-475.

Armário A, Martí J, Gil M. 1990. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*; 341-347.

Axelrod J, Reisine TD. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*; 24: 452-459.

Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. 1998. The stomach is a source of leptin. *Nature*; 394: 790-793.

Bagdade JD, Bierman EL, Porte D Jr. 1967. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation*; 46: 1549-1557.

Baird JP, Travers SP, Travers JB. 2001. Integration of gastric distension and gustatory responses in the parabrachial nucleus. *American Journal of Physiology Regulation and Integration Comparative of Physiology*; 281: R1581-R1593.

Baldwin AE, Sadeghian K, Holahan MR, Kelley AE. 2002. Appetitive instrumental learning is impaired by inhibition of cAMP-dependent protein kinase within the nucleus accumbens. *Neurobiology Learn Memory*; 77: 44-62.

Balthazar CH, Oliveira Junior, AR, Marubayashi U, Reis AM, Coimbra CC. 2007. Chronic treatment with bromocriptine modifies metabolic adjustments in response to restraint stress in rats. *Auton. Autac. Pharmacol*; 27: 123-129.

Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. 1996. Molecular determinants of glucocorticoids receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrinology Review*; 17: 245-261.

Bamshad M, Aoki VT, Adkison G, Warren WS, Bartness TJ. 1998. Central nervous system origins of the sympathetic nervous system outflow to white adipose tissue. *American Journal of Physiology*; 44: R291- R299.

Baranowska B, Baranowska-Bik A, Bik W, Martynska L. 2008. The role of leptin and orexins in the dysfunction of hypothalamo-pituitary-gonadal regulation and in the mechanism of hyperactivity in patients with anorexia nervosa. *Neuroendocrinology Letters*; 29(1): 37-40.

Baskin DG, Schwartz MW, Sipols AJ, D'Alessio DA, Goldstein BJ, White MF. 1994. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology*; 134: 1952-1955.

Baskin DG, Hahn TM, Schwartz MW. 1999. Leptin sensitive neurons in the hypothalamus. *Hormonal Metabolic Research*; 31: 345-350.

Baura GD, Foster DM, Port D J, Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW. 1993. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo a mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *Journal of Clinical Investigation*; 92: 1824-1830.

Behan DP, Grigoriadis DE, Lovenberg T, Chalmers D, Heinrichs S, Liaw C, De Souza EB. 1996a. Neurobiology of corticotropin releasing factor (CRF) receptors and CRF-binding protein: implications for the treatment of CNS disorders. *Molecular Psychiatry*; 1(4): 265-277.

Behan DP, Khongsaly O, Ling N, De Souza EB. 1996b. Urocortin interaction with corticotropin-releasing factor (CRF) binding protein (CRF-BP): a novel mechanism for elevating free CRF levels in human brain. *Brain Research*; 725: 263-267.

Belzung, C., 1999. Measuring exploratory behavior. In: Crusio, W.E., Gerlai, R.T. (Eds.), *Handbook of Molecular Genetic Techniques for Brain and Behavior Research (Techniques in the Behavioral and Neural Sciences)*. Elsevier, Amsterdam, pp. 739– 749.

Benetti CD, Silveira PP, Portella KA, Diehl LA, Nunes E, Oliveira VS, et al. 2007. Could preference for palatable foods, in neonatal handled rats, alter metabolic patterns in adult life. *Pediatrics Research*; 62: 405–411.

Benoit S, Schwartz M, Baskin D, Woods SC, Seeley RJ. 2000. CNS melanocortina system involvement in the regulation of food intake. *Hormonal and Behavior*; 37: 299-305.

Benoit SC, Clegg DJ, Seeley RJ, Woods SC. 2004. Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Progress in Hormone Research*; 59: 267-285.

Berridge KC. 1991. Modulation of taste affect by hunger, caloric satiety, and sensory-specific satiety in the rat. *Appetite*; 16: 103-120.

Berridge KC, Robinson TE. 1998. What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Research Review*; 28: 309-369.

Berthoud HR. 2002. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. *Neuroscience Biobehavior Review*; 26: 393-428.

Berthoud HR, Morrison C. 2008. The brain, appetite, and obesity. *Annual Review of Psychology*; 59: 55–92.

Bittencourt JC, Presse F, Arias C, Peto C, Vaughan J, Nahon JL, Vale W, Sawchenko PE. 1992. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: an immuno- and hybridization histochemical characterization. *Journal Comparative of Neurology*; 319: 218-245.

Bjørbaek C, Elmquist JK, Frantz JD, Shoelson SE, Flier JS. 1998. Identification of SOCS-3 as a potential mediator of central leptin resistance. *Molecular Cell*; 1(4): 619-625.

Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC. 1993. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research*; 58(1-2): 155-165.

Bodnar RJ, Klein GE. 2006. Endogenous opiates and behavior: 2005. *Peptides* 27: 3391–3478.

Bouali SM, Fournier A, St-Pierre S, Jolicoeur FB. 1995. Effects of NPY and NPY2-36 on body temperature and food intake following administration into hypothalamic nuclei. *Brain Research Bulletin*; 36: 131-135.

Brandão ML, Vianna DM, Masson S, Santos J. 2003. Organização neural de diferentes tipos de medo e suas implicações na ansiedade. *Revista Brasileira de Psiquiatria*; 25(2): 33-41.

Bremner JD. 1999. Does stress damage the brain? *Biology of Psychiatry*; 45(7): 797-805.

Brito NA. 1996. Hiperglicemia provocada pela injeção de agentes colinérgicos no hipotálamo. Tese de doutoramento apresentada à FMRP-USP, p. 1-54.

Bruijnzeel AW, Stam R, Wiegant VM. 2001. Effect of a benzodiazepine receptor agonist and corticotropin-releasing hormone receptor antagonists on long term foot-shock-induced increase in defensive withdrawal behavior. *Psychopharmacology* 158: 132–139.

Campeau S, Day HE, Helmreich DL, Kollack-Walker S, Watson SJ. 1998. Principles of Psychoneuroendocrinology. *Psychiatric Clinical of North America*; 21: 259-276.

Cannon WB, De La Paz, D. 1911. Emotion stimulation of adrenal secretion. *American Journal of Physiology*; 28: 64-70.

Cannon WB. 1914. The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *American Journal of Physiology*; 33: 356-372.

Capaz FR, Vanconcellos LE, De Moraes S, Neto JP. 1981. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*; 251(2): 228-236.

Carobrez AP, Bertoglio LJ. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 1193–1205.

Carrasco GA, Van de Kar LD. 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. *European Journal of Pharmacology*; 463(1-3): 235-272.

Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF. 1987. The suprachiasmatic nuclei stimulate evening ACTH secretion in the rat. *Brain Research*; 423: 173-178.

Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. 2005. Endocrinology of the stress response. *Annual Review Physiology*; 67: 259–284.

Chen CT, Dun SL, Kwok EH, Dun NJ, Chang JK. 1999. Orexin A-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroscience Letters*; 260: 161-164.

Chrousos GP. 1992. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: the corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinology Metabolism Clinical of North America*; 21: 833-358.

Chrousos GP, Gold PW. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*; 267: 1244-1252.

Chrousos GP, Gold PW. 1995. Stress: basic mechanisms and clinical implications – Introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 77: 15-18.

Clifton PG, Vickers SP, Somerville EM. 1998. Little and often: ingestive behavior patterns following hippocampal lesions in rats. *Behavior Neuroscience*; 112: 502-511.

Cone RD, Cowley MA, Butler AA, Fan W, Marks DL, Low MJ. 2001. The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int J Obes Relat Metabolic Disorders*; 25: S63-67.

Cone RD. 2005. Anatomy and regulation of the central melanocortina system. *Nature Neuroscience*; 8: 571-578.

Corbit LH, Muir JL, Balleine BW. 2001. The role of the nucleus accumbens in instrumental conditioning: evidence of a functional dissociation between accumbens core and shell. *Journal of Neuroscience*; 21: 3251-3260.

Cottone P, Sabino V, Steardo L, Zorrilla EP. 2009. Consummatory, anxiety-related and metabolic adaptations in female rats with alternating access to preferred food. *Psychoneuroendocrinology*; 34(1): 38-49.

Cruz AP, Frei F, Graeff FG. 1994. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacology Biochemistry Behavior*; 49(1): 171-176.

Cunningham ET Jr., Sawchenko PE. 1988. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rats. *Journal of Comparative Neurology*; 274: 60-76.

Cunningham ET Jr, Bohn MC, Sawchenko PE. 1990. Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*; 292: 651-667.

Dallman MF, Strack MA, Akana SF, Bradbury MJ, Hanson ES, Scriber KA, Smith M. 1993. Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Frontiers Neuroendocrinology*; 14: 303-347.

Dallman MF, Pecoraro N, Akana SF, La Fleur SE, Gomez F, Houshyar H, et al. 2003. Chronic stress and obesity: A new view of “comfort food”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 100: 11696–11701.

Dallman MF, la Fleur SE, Pecoraro NC, Gomez F, Houshyar H, Akana SF. 2004. Minireview: glucocorticoids, food intake, abdominal obesity, and wealthy nations in 2004. *Endocrinology*; 145: 2633-2638.

Dallman MF, Pecoraro N, La Fleur SE. 2005. Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity. *Brain, Behavior and Immunity*; 19: 275–280.

D'Aquila PS, Brain P, Willner P. 1994. Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology and Behavior*; 56(5): 861-867.

De Boer SF, Koopmans SJ, Slanger JL, Van Der Gugten J. 1990. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length. *Physiology and Behavior*; 47: 1117-1124.

De Kloet ER. 2003. Hormones, brain and stress. *Endocr Regul*; 37:51 –68.

De Souza EB. 1995. Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology*; 20:789-819.

De Souza MM, Schenberg LC, Carobrez AP. 1998. NMDA-coupled periaqueductal gray glycine receptors modulate anxi-selective drug effects on plus-maze performance. *Behavioral Brain Research*; 90(2): 157-165.

Defalco J, Tomishima M, Liu H, Zhao C, Cai X, Marth JD, Enquist L, Friedman JM. 2001. Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in hypothalamus. *Science*; 291: 2608-2613.

Duarte ACGO; Fonseca DF; Manzoni MSJ, Soave CF, Sene-Fiorese M, Dâmaso AR, Cheik NC. 2006. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Revista Nutrição*; 19(3): 341-348.

Duarte FO. Adaptações metabólicas a dois tipos de treinamento moderado de natação, contínuo e intermitente, em ratos machos adultos alimentados com dieta normocalórica e hipercalórica [dissertação]. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos; 2001.

Dunn AJ, Berridge CW. 1990. Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Research Review*; 15: 71-100.

El Haschimi K, Pierroz DD, Hileman SM, Bjorbak C, Flier JS. 2000. Two defects contribute to hypothalamic leptin resistance in mice with diet-induced obesity. *Journal of Clinical Investigation*; 105: 1827-1832.

Ely DR, Dapper V, Marasca J, Corrêa JB, Gamaro GD, Xavier MH, et al. 1997. Effect of restraint stress on feeding behavior of rats. *Physiology and Behavior*; 61: 395–398.

Epel E, Lapidus R, McEwen B, Brownell K. 2001. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology*; 26: 37-49.

Estadella D, Oyama LM; Dâmaso AR, Ribeiro, EB; Do Nascimento, CO. 2004. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats *Nutrition*; 20:218–224.

Euker JS, Meites J, Riegler GD. 1975. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology*; 96(1):85-92.

Fachin A, Silva RK, Noschang CG, Pettenuzzo L, Bertinetti L, Billodre MN, Peres W, Busnello F, Dalmaz C. 2008. Stress effects on rats chronically receiving a highly palatable diet are sex-specific. *Appetite* 51: 592–598.

Farias-Silva E, Grassi-Kassisse DM, Wolf-Nunes V, Spadari Bratfisch RC. 1999. Stress-induced alteration in the lipolytic response to β -adrenoceptor agonists in rat white adipocytes. *Journal of Lipid Research*; 40(9): 1719-1727.

Farias-Silva E, Sampaio-Barros, MM, Amaral MEC, Carneiro EM, Boschero AC, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. 2002. Subsensitivity to insulin in adipocytes from rats submitted to foot shock stress. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 80(8): 783-789.

Farias-Silva E, Santos IN, Amaral MEC, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. *Annals of the New York Academy Science*; 1018: 328-332, 2004.

Figueiredo HF, Bodie BL, Tauchi M, Douglas CM, Herman. 2003. Stress integration after acute and chronic predator stress: differential activation of stress circuitry and sensitization of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Endocrinology*; 144: 5249-5258.

Forbes C, Blanchard JJ, Bennett M, Horan WP, Kring A, Gur R. 2010. Initial development and preliminary validation of a new negative symptom measure: The Clinical Assessment Interview for Negative Symptoms (CAINS). *Schizophrenia Research*.

Frederich RC, Lollmann B, Hamann A, Napolitano-Rosen A, Kahn BB, Lowell BB, Flier JS. 1995. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. *Journal of Clinical Investigation*; 96: 1658-1663.

Freedman MR, Castonguay TW, Stern JS. 1985. Effect of adrenalectomy and glucocorticoid replacement on development of obesity. *American Journal of Physiology*; 250: R595-607.

Furlanetto LM, Del Moral JAG, Gonçalves AHB, Rodrigues K, Jacomino MEMLP. 2006. Diagnosticando depressão em pacientes internados com doenças hematológicas: prevalência e sintomas associados. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*; 55(2): 96-101.

Gauriau C, Bernard JF. 2002. Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Experimental Physiology*; 87: 251-258.

Gavioli EC, Canteras NS, De Lima TCM. 1999. Anxiogenic-like effects induced by substance P injected into the lateral septal nucleus. *Neuroreport*; 10: 3399-3403.

Ge H, Huang L, Pourbahrami T, Li C. 2002. Generation of soluble leptin receptor by ectodomain shedding of membrane-spanning receptors in vitro and in vivo. *Journal of Biology Chemistry*; 277: 45898-45903.

Gibson EL. 2006. Emotional influences on food choice: sensory, physiological and psychological pathways. *Physiology and Behavior*; 89(1): 53-61.

Giguere V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. 1996. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*; 46: 645-652.

Giraud S, Kotz CM, Billington CJ, Levine AS. 1998. Association between the amygdala and nucleus of the solitary tract in mu-opioid induced feeding in the rat. *Brain Research*; 802: 184-188.

Glaum SR, Hara M, Bindokas VP, Lee CC, Polonsky KS, Bell GI, Miller RJ. 1996. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus. *Molecular Pharmacology*; 50: 230-235.

Gonzalez-Bono E, Rohleder N, Helhammer DH, Salvador A, Kirschbaum C. 2002. Glucose but not protein or fat load amplifies the cortisol response to psychosocial stress. *Hormone and Behavior*; 41: 328-333.

Gorwood P. 1999. From stressful life events to anxiety disorders. *Ver. Prat*; 49(14): S11-13.

Graeff FG. 1983. Psicobiologia da ansiedade. *Jornal Brasileiro de Psiquiatria*; 36: 345-350.

Graeff FG. 1994. Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medicine Biology Research*; 27: 811-829.

Grill HJ, Markison S, Ginsberg A, Kaplan JM. 2000. Long-term effects on feeding and body weight after stimulation of forebrain or hindbrain CRH receptors with urocortina. *Brain Research*; 867: 19-28.

Grill HJ, Kaplan JM. 2001. Interoceptive and integrative contributions of forebrain and brainstem to energy balance control. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*; 25: S73-77.

Grill HJ, Kaplan JM. 2002. The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Frontiers Neuroendocrinology*; 23: 2-40.

Guan JL, Saotome T, Wang QP, Funahashi H, Hori T, Tanaka S, Shioda S. 2001. Orexigenic innervation of POMC-containing neurons in the rat arcuate nucleus. *Neuroreport*; 12: 547-551.

Habib KE, Gold PW, Chrousos GP. 2001. Neuroendocrinology of stress. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*; 30: 695-728.

Hentges ST, Nishiyama M, Overstreet LS, Stenzel-Poore M, Williams JT, Low MJ. 2004. GABA release from proopiomelanocortin neurons. *Journal of Neuroscience*; 24: 1578-1583.

Holsboer F, Spengler D, Heuser I. 1992. The role of corticotropin-releasing hormone in the pathogenesis of Cushing's disease, anorexia nervosa, alcoholism, affective disorders and dementia. *Progress Brain Research*; 93: 385-417.

Holsboer F. 1999. The rationale for corticotropin-releasing hormone receptor (CRH-R) antagonists to treat depression and anxiety. *Journal of Psychiatric Research*; 33(3): 181-214.

Horvath TL, Bechmann I, Naftolin F, Kalra SP, Leranth C. 1997. Heterogeneity in the neuropeptide Y-containing neurons of the rat arcuate nucleus: GABAergic and non-GABAergic subpopulations. *Brain Research*; 756: 283-286.

Horvath TL, Diano S, van den Pol AN. 1999. Synaptic interaction between hypocretin (orexin) and neuropeptide Y cells in the rodent and primate hypothalamus: a novel circuit implicated in metabolic and endocrine regulations. *Journal of Neuroscience*; 19: 1072-1087.

Huether G, Doering S, Rüger U, Rütger E, Schüssler G. 1999. The stress-reaction process and the adaptive modification and reorganization of neuronal networks. *Psychiatry Research*; 87(1): 83-95.

Jain SK, Pandey SN, Srivastava RK, Ghosh SK. 2000 Stress and serum cholesterol levels an experimental study. *J. Ant. Soc*; 49(2): 165-167.

Jansen AS, Hoffman JL, Loewy AD. 1997. CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Research*; 766: 29-38.

Jerlhag E, Egecioglu E, Dickson SL, Andersson M, Svensson L, Engel JA. 2006. Ghrelin stimulates locomotor activity and accumbal dopamine-overflow via central cholinergic systems in mice: implications for its involvement in brain reward. *Addiction Biology*; 11: 45-54.

Joëls M, Baram Z. 2009. The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience*.; 10(6): 459-466.

Kamegai J, Minami S, Sugihara H, Hasegawa O, Higuchi H, Wakabayashi I. 1996. Growth hormone receptor gene is expressed in neuropeptide Y neurons in the hypothalamic arcuate nucleus of rats. *Endocrinology*; 37: 2109-2112.

Kant GJ, Bunnell BN, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL. 1983. Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP, and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* ; 18: 967-971.

Kant GJ, Egglestone T, Landman-Roberts L, Kenion CC, Driver GC, Meyerhoff JL. 1985. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*; 22: 631-634.

Kant GJ, Bauman R. 1993. Effect of chronic stress and time of day on preference for sucrose. *Physiology and Behavior*; 54: 499–502.

Kavushansky A, Ben-Shachar D, Richter-Levin G, Klein E. 2009. Physical stress differs from psychosocial stress in the pattern and time-course of behavioral responses, serum corticosterone and expression of plasticity-related genes in the rat. *Stress*; 12(5):412-25.

Keller-Wood M, Dallman MF. 1984. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocrinology Review*; 5: 1-24.

Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. 1999. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156: 837–841.

Koob GF, Heinrichs SC. 1999. A role for corticotropin releasing factor and urocortina in behavioral responses to stressors. *Brain Research*; 848: 141-152.

Krebs H, Macht M, Weyers P, Weijers HG, Janke W. 1996. Effects of stressful noise on eating and non-eating behavior in rats. *Appetite*; 26: 93-202.

Krolow RCG, Noschang D, Arcego AC, Andreazza W, Peres CA, Gonçalves C, Dalmaz MF. 2010. 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*.

La Fleur SE, Akana SF, Manalo SL, Dallman MF. 2004. Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology*; 145: 2174-2185.

La Fleur SE. 2006. The effects of glucocorticoids on feeding behavior in rats. *Physiology and Behavior* ; 89: 110–114.

Lang PJ, Davis M, Öhman A. 2000. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *Journal Affective Disorders*; 61(3): 137-159.

Lennquist S. 1975. Urinary excretion of hydroxyprolines in man under the influence of cold. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*; 35(2): 103-107.

Li C, Chen P, Smith MS. 1999. Identification of neuronal input to the arcuate nucleus (ARH) activated during lactation: implications in the activation of neuropeptide Y neurons. *Brain Research*; 824: 267-276.

Liang S, Byers DM, Irwin LN. 2008. Sex and diet affect the behavioral response of rats to chronic mild stressors. *Physiology and Behavior*; 93: 27-36.

Lin L, York DA. 1997. Enterostatin actions in the amygdale and PVN to suppress feeding in the rat. *Peptides*; 18: 1341-1347.

Maclean RR, Datta S. 2007. The relationship between anxiety and sleep-wake behavior after stressor exposure in the rat. *Brain Res*; 20;1164:72-80.

Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S. 1995. Leptin levels in humans and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine*; 1: 1155-1161.

Maniam J, Morris MJ. 2009. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment *Psychoneuroendocrinology*; 1-12.

Marcondes FK, Vanderlei LCM, Lanza LLB, Spadari-Bratfisch RC. 1996. Stress-induced subsensitivity to catecholamines depends on the estrous cycle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 74: 663-669.

Márquez C, Nadal R, Armário A. 2004. The hypothalamic pituitary adrenal and glucose responses to daily repeated immobilization stress in rats: individual differences. *Neuroscience*; 123(3): 601-612.

Márquez C, Nadal R, Armário A. 2006. Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult rats. *Behavior Brain Research*; 168: 13-22.

Martí O, Martí J, Armário A. 1994. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology and Behavior*; 55: 747-753.

Martí O, Armário A. 1998. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Journal of Development Neuroscience*; 7: 241-260.

Martí O, Andres R, Armário A. 1999. Defective ACTH response to stress in previously stressed rats: dependence on glucocorticoid status. *American Journal of Physiology*; 277: 869-877.

Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nadao K. 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine*; 3: 1029-1033.

McDougall. 1908. Introduction to social psychology. London. 49-59.

McEwen BS, Davis PG, Parsons B, Pfaff DW. 1992. The brain as a target for steroid hormone action. *Annual Review of Neuroscience*; 2: 65-112.

McEwen BS. 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *New England Journal of Medicine*; 33: 171-179.

McEwen BS. 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*; 886: 172-189.

McEwen MM. 2005. Stressed or stressed out: what is the difference? *Journal of Transcultural Nursing*; 16(4): 347-355.

McEwen BS. 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews*; 87(3): 873-904.

Melo, L.L.; Brandão, M.L. 1995. Involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptors of the inferior colliculus in aversive states induced by exposure of rats to the elevated plus-maze test. *Behavioural Pharmacology*; 6 (4) 413-417.

Mercer JG, Hoggard N, Williams LM, Lawrence CB, Hannah LT, Trayhurn P. 1996. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Letters*; 387: 113-116.

Migliorini RH, Garofalo MAR, Kettelhut IC. 1997. Increased sympathetic activity in rat white adipose tissue during prolonged fasting. *American Journal of Physiology*; 272: 656-661.

Millan MJ. 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*; 70: 83-244.

Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*; 42: 201-206.

Moreau JL, Bourson A, Jenck f, Martin JR, Mortas P. 1994. Curative Effects of the Atypical Antidepressant Mianserin in the Chronic Mild Stress-Induced Anhedonia Model of Depression. *Journal of Psychiatric Neuroscience*; 19(1).

Moura AL. 2002. Sensibilidade a agonistas β -adrenérgicos em átrio esquerdo isolado de ratos submetidos a estresse. 69 fs. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Müller MB, Zimmermann S, Sillaber I, Hagemeyer TP, Deussing JM, Timpl P, Kormann MS, Droste SK, Kühn R, Reul JM, Holsboer F, Wurst W. 2003. Limbic corticotropin-releasing

hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci*; 6:1100– 1107.

Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinology Review*; 5: 25-44.

Muroya S, Yada T, Shioda S, Takigawa M. 1999. Glucose-sensitive neurons in the rat arcuate nucleus contain neuropeptide Y. *Neuroscience Letters*; 264: 113-116.

Nakagawa T, Ono-Kishino M, Sogawa E, Yamanaka M, Taiji M, Noguchi H. 2002. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulates glucose and energy metabolism in diabetic mice. *Diabetes Metabolic Research Review*; 18: 185-191.

Nakagawa T, Ogawa Y, Ebihara K, Yamanaka M, Tsuchida A, Taiji M, Noguchi H, Nakao D. 2003. Anti-obesity and antidiabetic effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent models of leptin resistance. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*; 27: 557-565.

Natelson BH, Creighton D, McCarty R, Tapp WN, Pitman D, Ottenweller JE. 1987. Adrenal hormonal indices of stress in laboratory rats. *Physiology and Behavior*; 39: 117-125.

Olliver G, Wardle J, Gibson EL. 2000. Stress and food choice: a laboratory study. *Psychosomatic Medicine*; 62: 853-865.

Palermo-Neto J, de Oliveira Massoco C, Robespierre de Souza W. 2003. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav Immun*; 17(1):43-54.

Palkovits M, Baffi JS, Pacak K. 1999. The role of ascending neuronal pathways in stress-induced release of noradrenaline in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. *Journal of Neuroendocrinology*; 11: 529-539.

Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology*; 145(8): 3754-3762.

Peeters BW, Broekkamp CL. 1994. Involvement of corticosteroids in the processing of stressful life-events. A possible implication for the development of depression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*; 49(4-6): 417-427.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience and Methods*; 14(3):149-167.

Polonsky KS, Given BD, Van Cauter E. 1988. Twenty-four-hour profiles and pulsatile patterns of insulin secretion in normal and obese subjects. *Journal of Clinical Investigation*; 81: 442-448.

Pratt WB. 1990. Glucocorticoid receptor structure and the initial events in signal transduction. *Progress Clinical of Biology Research*; 322: 119-132.

Prut L, Belzung C. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*; 463: 3-33.

Reis FM, Oliveira Junior AR, Machado LJC, Guerra RM, Reis AM, Coimbra CC. 1998. Plasma prolactin and glucose alterations induced by surgical stress: a single or dual response? *Experimental Physiology*; 83: 1-10.

Reu JM, De Kloet ER. 1986. Anatomical resolution of two types of corticosterone receptor sites in rat brain with in vitro autoradiography and computerized image analysis. *Journal of Steroid Biochemistry*; 24: 269-272.

Ribeiro SJ. 1998. Envolvimento do receptor neurocinérgico NK3 na ansiedade experimental em camundongos avaliada no labirinto em cruz elevado. Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Farmacologia, Florianópolis, SC.

Ricardo JA, Koh ET. 1978. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Research*; 153: 1-26.

Riedger T, Traebert M, Schmid HA, Scheel C, Lutz TA, Scharrer E. 2003. Site-specific effects of ghrelin on the neuronal activity in the hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*; 341: 151-155.

Rios M, Fan G, Fekete C, Kelly J, Bates B, Kuehn R, Lechan RM, Jaenisch R. 2001. Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Molecular Endocrinology*; 15: 1748-1757.

Rodgers RJ, Cole JC. 1993. An ethological analysis of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro16-6028) in the murine elevated plus-maze. *Behavioural Pharmacology*; 4: 573-580.

Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. 1997. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 30(3): 289-304.

Rodgers RJ, Haller J, Holmes A, Halasz J, Walton TJ, Brain PF. 1999. Corticosterone response to the plus-maze: High correlation with risk assessment in rats and mice. *Physiology and Behavior*; 68: 47-53.

Rodrigues ML, Marcondes FK, Spadari-Bratfisch RC. 1995. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level, and estrous cycle in rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 73(5): 602-607.

Rossler AS, Joubert C, Chapouthier G. 2000. Chronic mild stress alleviates anxious behaviour in female mice in two situations. *Behav Processes*; 49:163–165.

Rupniak NMJ, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, De Felipe C, Hunt S, Wheeldon A. 2000. Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK1) receptors attenuates neonatal vocalization in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology*; 39: 1413-1421.

Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signaling and regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*; 414: 799-806.

Sampaio-Barros MM, Farias-Silva E, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. 2003. Effect of swimming session duration and repetition on metabolic markers in rat. *Stress*; 6(2).

Sanders SK, Shekhar A. 1995. Regulation of anxiety by GABAA receptors in the rat amygdala. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*; 52: 701-706.

Sandford JJ, Argyropoulos SV, Nutt DJ. 2000. The psychobiology of anxiolytic drugs. Part 1: basic neurobiology. *Pharmacology Therapy*; 88: 197-212.

Santos IN, Spadari-Bratfisch RC. 2001. Chronotropic response to (+/-)- CGP12177 in right atria of stressed rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 79(5): 393-399.

Santos IN. 2002. *Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular)* – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Santos IN, Antonini S, Castro M, Grasssi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. 2002. Glucocorticoid receptor (GR) and beta2-adrenoceptor in right atria from stressed female rats. *Stress*; 5 (suppl.):121.

Santos IN, Marcondes FK, Spadari-Bratfisch RC. 2003. The beta1-adrenoceptor site activated by CGP 12177 varies in behavior according to the estrous cycle phase and stress. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 81(5): 459-468.

Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating, permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*; 21: 55-89.

Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA. 1983. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Research*; 277: 355-360.

Sawchenko PE, Swanson LW. 1982. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Research*; 257: 275-325.

Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. 1995. Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science*; 270(5234): 283-286.

Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I. 2009. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity. *PLoS One*; 4:e4326.

Selye, H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*; 138: 32.

Shawchenko PE, Swanson LW. 1983. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Journal Comparative of Neurology*; 218: 121-144.

Shigemura N, Ohta R, Kusakabe Y, Miura H, Hino A, Koyano K, Nakashima K, Ninomiya Y. 2004. Leptin modulates behavioral responses to sweet substances by influencing peripheral taste structures. *Endocrinology*; 145(2): 839-847.

Shimazu T, Fukuda A, Ban T. 1966. Reciprocal influence of the ventromedial and lateral hypothalamic nuclei on blood glucose levels and liver glycogen content. *Nature*; 210: 1178-1179.

Skutella T, Probst JC, Renner U, Holsboer F, Beh C. 1998. Corticotropin-releasing hormone receptor (type I) antisense targeting reduces anxiety. *Neuroscience*; 85(3): 795-805.

Small DM, Jones-Gotman M, Dagher A. 2003. Feeding-induced dopamine release in dorsal striatum correlates with meal pleasantness ratings in healthy human volunteers. *Neuroimage*; 19: 1709-1705.

Southwick SM, Paige S, Morgan CA, Bremner JD, Krystal JH, Charney DS. 1999. Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*; 4(4): 242-248.

Souza ART. 2001. 57 fls. *Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular)* – Instituto de Biologia – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Spadari RC, Bassani RA, De Moraes S. 1988. Supersensitivity to isoprenaline and epinephrine in right atria isolated from rats submitted to a single swimming session. *General Pharmacology*; 19(1): 129-135.

Spadari RC, De Moraes S. 1988. Repeated swimming stress and responsiveness of the isolated rat pacemaker to the chronotropic effect of noradrenaline and isoprenaline: role of adrenal corticosteroids. *General Pharmacology*; 19(4): 553-557.

Spadari-Bratfisch RC, Santos IN, Vanderlei LCM, Marcondes FK. 1999. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 77: 432-440.

Spector AC. 1995. Gustatory function in the parabrachial nuclei: implications from lesion studies in rats. *Review Neuroscience*; 6: 143-175.

Steckler T, Holsboer F. 1999. Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biology of Psychiatry*; 46(11): 1480-1508.

Steinberg GR, Smith AC, Wormald S, Malenfant P, Collier C, Dyck DJ. 2004. Endurance training partially reverses dietary-induced leptin resistance in rodent skeletal muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*; 286(1): E57-63.

Sterling P, Eyer J. 1988. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In: Fisher S, Reason J, editors. *Handbook of life stress, cognition and health*. 629-649.

Sterson SM, Shepherd GM, Friedman JM. 2005. Topographic mapping of VMH/arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. *Nature Neuroscience*; 8: 1356-1363.

Strack AM, Sebastian RJ, Schwartz MW, Dallman MF. 1995. Glucocorticoids and insulin: reciprocal signals for energy balance. *American Journal of Physiology*; 268: R142-149.

Strohle A, Jahn H, Montkowski A, Liebsch G, Boll E, Landgraf R, Holsboer F, Wiedemann K. 1997. Central and peripheral administration of atriopeptin is anxiolytic in rats. *Neuroendocrinology*; 65: 210-215.

Sutano W, De Kloet ER. 1987. Species-specificity of corticosteroid receptors in hamster and rat brains. *Endocrinology*; 121: 1405-1411.

Sutoo D, Akiyama K. 2002. Neurochemical changes in mice following physical or psychological stress exposures. *Behavior Brain Research*; 134(1-2): 347-354.

Swanson LW, Sawchenko PE. 1983. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annuals Review of Neuroscience*; 6: 269-324.

Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD, Meaney MJ. 1997. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in rats. *American Journal of Physiology*; 273: E1168-11677.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*; 83: 1263-1271.

Tartaglia LA. 1997. The leptin receptor. *Journal of Biology Chemistry*; 272: 6093-6096.

Teegarden SL, Bale TL. 2007. Decreases in dietary preference produce increased emotionality and risk for dietary relapse. *Biological Psychiatry*; 61(9): 1021-1029.

Timo-Iaria C. 1990. Glucoreceptor Systems: From Control of Glycemia to Feeding Behavior. *News Physiology Science*; 5: 46-49.

Tong Y, Zhao HF, Labrie F, Pelletier G. 1990. Regulation of proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid content by sex steroids in the arcuate nucleus of the female rat brain. *Neuroscience Letters*; 112: 104-108.

Torres SJ, Nowson CA. 2007. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition*; 23: 887-894.

Traebert M, Riediger T, Whitebread S, Scharrer E, Schmid HÁ. 2002. Ghrelin acts on leptin-responsive neurons in the rat arcuate nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*; 14: 580-586.

Treit D. 1985. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. *Neuroscience Biobehavior*; 9: 203-223.

Tsigos C, Chrousos, GP. 1994. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinology Metabolism Clinical of North America*; 23: 451-466.

Tsigos C, Chrousos GP. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*; 53: 865-871.

Ursin H, Olff M. 1993. Psychobiology of coping and defence strategies. *Neuropsychobiology*; 28: 66-71.

Vafaei AA, Rashidy-Pour A, Taherian AA 2008. Peripheral injection of dexamethasone modulates anxiety related behaviors in mice: an interaction with opioidergic neurons. *Pak J Pharm Sci*. 21(3):285-289.

Vallès A, Martí O, García A, Armário A. 2000. Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 279: R1138-1144.

Van De Kar LD; Piechowski RA; Rittenhouse PA; Gray TA. 1991. Amygdaloid lesions: differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology*; 54: 89-95.

Van de Kar LD, Blair ML. 1999. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Frontiers Neuroendocrinology*; 20(1): 1-48.

Vanderlei LC, Marcondes FK, Lanza LL, Spadari-Bratfisch RC. 1996. Influence of the estrous cycle on the sensitivity to catecholamines in right atria from rats submitted to foot shock stress. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*; 74(6): 670-678.

Verago JL, Grassi-Kassisse DM, Spadari-Bratfisch RC. 2001. Metabolic markers following beta-adrenoceptor agonist infusion in foot shock stressed rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; 34(9): 1197-1207.

Walsh RN, Cummins RA. 1976. *Psychological Bulletin*; 83(3): 482-504.

Wang L, Saint-Pierre DH, Tache Y. 2002. Peripheral grelin selectively increases Fos expression in neuropeptide Y-synthesizing neurons in mouse hypothalamic arcuate nucleus. *Neuroscience Letters*; 325: 47-51.

Wardle J, Steptoe A, Oliver G, Lipsey Z. 2000. Stress, dietary restraint and food intake. *Journal of Psychosomatic Research*; 48: 195-202.

Warne JP. 2009. Shaping the stress response: interplay of palatable food choices, glucocorticoids, insulin and abdominal obesity. *Molecular Cellular Endocrinology*; 300(1-2): 137-46.

Willner P. 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology*; 52:90-110.

Woods SC, Seeley RJ, Baskin DG, Schwartz MW. 2003. Insulin and the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*; 9: 795-800.

Yamada F, Inoue S, Saitoh T, Tanaka K, Satoh S, Takamura Y. 1993. Glucoregulatory hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology*; 132: 2199-2205.

Young JB. 2000. Effects of neonatal handling on sympathoadrenal activity and body composition in adult male rats. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; 279: R1745–1752.

Zaia CTBV, Gaziri LCJ, Zaia DAM, Delatre E, Dolnikoff MS, Iaria CT. 1997. Effect of chemical stimulation of dorsomedial hypothalamic nucleus on blood plasma glucose, triglycerides and free fatty acid. *Brain Research Bulletin* 42(3): 195-198.

Zellner DA, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D, Wolf A. 2006. Food selection changes under stress. *Physiology and Behavior*; 87(4): 789-793.

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

Zhang M, Balmadrid C, Kelley AE. 2003. Nucleus accumbens opioid, GABAergic, and dopaminergic modulation of palatable food motivation: contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. *Behavior of Neuroscience*; 117: 202-211.

7.0 – Anexos



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1409-1, sobre "Efeitos dos alimentos palatáveis nos parâmetros endócrinos e comportamentais em ratos submetidos ao estresse" sob a responsabilidade de Profa. Dra. Regina Célia Spadari / Daniela Ortolani está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 19 de dezembro de 2007.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1409-1, entitled "Endocrine and behavioral parameters in stressed rats: effects of comfort foods", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on december 19, 2007.

Campinas, 19 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. Stephen Hyslop
Presidente em exercício

CEEA/Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Fátima Alonso
Secretária Executiva

Telefone: (19) 3521-6359
Telefax: (19) 3289-3124
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>