UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

ISOLAMENTO SOCIAL PRECOCE E CONSUMO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA: IMPLICAÇÕES NO COMPORTAMENTO DO TIPO DEPRESSIVO E EM ASPECTOS COGNITIVOS EM RATOS ADULTOS

Danusa Mar Arcego

Porto Alegre

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA

Título

Danusa Mar Arcego

Orientadora: Profª. Drª. Carla Dalmaz

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do Grau de Doutora em Ciências Biológicas: Bioquímica.

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Arcego, Danusa Mar
Isolamento social precoce e consumo de uma dieta hiperlipídica: implicações no comportamento do tipo depressivo e em aspectos cognitivos em ratos adultos / Danusa Mar Arcego. -- 2017.
158 f.

Orientadora: Carla Dalmaz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Neuroplasticidade. 2. Dieta rica em gordura. 3. Estresse. 4. Depressão. 5. Intervenções precoces. I. Dalmaz, Carla, orient. II. Título.

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

Dedico este trabalho à minha família e ao meu noivo

pela confiança e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Delcio e Marta, que sempre serão o alicerce da minha vida, os meus maiores incentivadores e grandes exemplos. Agradeço por sempre terem me motivado a ir atrás dos meus sonhos e também pela confiança depositada em mim. Também ao meu querido irmão, Alexandre, pelo carinho, amizade e apoio. E à minha madrinha, Marlise, pela ajuda constante, pelo apoio, incentivo e pelos conselhos sempre sábios.

Ao meu noivo, Adriano, pelo apoio constante, por toda a paciência, carinho, por ter me ajudado a superar as dificuldades que surgiram me motivando sempre e por ser meu parceiro de todas as horas.

À Profª Drª Carla Dalmaz, minha orientadora, por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa nesses quase nove anos, e pela confiança que depositou em mim. Obrigada por toda a atenção, pela disponibilidade, pelos ensinamentos, por toda compreensão e paciência em auxiliar sempre. Agradeço por tudo que contribuiu para a construção da minha vida acadêmica.

À minha grande amiga e colega, Rachel, praticamente uma irmã, que sempre esteve ao meu lado, incentivando e apoiando, mesmo à distância. Agradeço muito por toda a amizade, por toda ajuda (profissional e pessoal), pelos ensinamentos, pela motivação nos momentos difíceis e por todo teu esforço em me ajudar e estimular meu crescimento.

À Ana, Camilla e Carine, sempre disponíveis para tudo, colegas e grandes amigas, sempre tornaram o meu dia-a-dia no laboratório mais leve, mais descontraído, mas também sempre prontas e dispostas para ajudar em tudo. Obrigada por toda ajuda e parceria nos experimentos e também na vida pessoal.

A todos os colegas do laboratório 37, aos integrantes atuais e aos que passaram por lá nessa minha trajetória, pela amizade, pela convivência alegre e divertida, pela parceria e ajuda nos experimentos. Aos alunos de iniciação científica que passaram no laboratório 37, em especial, a Carol e a Emily, que sempre foram atenciosas e disponíveis, obrigada por toda a ajuda nos experimentos.

Ao pessoal do laboratório 35, pela parceria e momentos de descontração, em especial a Luz Elena, a Marília e ao Fabrício.

À professora Drª Cecília Scorza, pela oportunidade de realizar experimentos no seu laboratório, no Instituto Clemente Estable, em Montevidéu, e ao Gustavo, pela ajuda nos experimentos.

À professora Drª Ângela Wyse, pela colaboração e parceria na realização dos experimentos desta tese.

As meninas do laboratório 23, em especial a Ju, a Mari e a Carol, pela ajuda nos experimentos.

Aos professores da banca examinadora, por sua cordialidade e disponibilidade na avaliação deste trabalho.

Aos coordenadores, professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Bioquímica.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Departamento de Bioquímica pela oportunidade de realizar o doutorado. Aos órgãos financiadores de pesquisa, em especial ao CNPq pela bolsa de doutorado.

A todos meus amigos, familiares, que de alguma forma, contribuíram para meu desenvolvimento profissional.

Para esses citados e a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, deixo meu sincero obrigado.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO 1

LISTA DE ABREVIATURAS 2

RESUMO 3

ABSTRACT 4

1. INTRODUÇÃO 5

1.1 Fatores ambientais no início da vida programam a fisiologia do organismo **6**

1.2 Isolamento social no período pré-pubere **8**

1.3 A resposta ao estresse e alterações durante o desenvolvimento **11**

1.4 Estresse e comportamento alimentar **14**

1.5 Estresse, dietas hiperlipídicas e alterações cognitivas dependentes de plasticidade **17**

1.6 Estresse e dietas hiperlipídicas associadas a alterações emocionais e ao comportamento do tipo depressivo **22**

2. OBJETIVOS 26

2.1 Objetivo Geral **27**

2.2 Objetivos Específicos **27**

3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS 29

3.1 Capítulo I: Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects **31**

3.2 Capítulo II: Impact of high-fat diet and early stress on depressive-like

behavior and hippocampal plasticity in adult male rats **45**

3.3 Capítulo III: High-fat diet early in life reduces seeking-food behaviors for distinct palatable food in adulthood **77**

4. DISCUSSÃO 110

5. CONCLUSÕES 129

6. PERSPECTIVAS 131

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 133

APRESENTAÇÃO

A presente tese está organizada em: **Introdução; Objetivos; Materiais, Métodos e Resultados**: subdividos em *Capítulos 1 a 3* (referentes ao artigo publicado e aos manuscritos submetidos); **Discussão**; **Conclusões; Perspectivas**; e **Referências bibliográficas**.

Na **Introdução** encontra-se o embasamento teórico que fundamenta a proposta de estudo dessa tese. Os **Objetivos** (gerais e específicos) definem os propósitos centrais do trabalho, assim como de cada trabalho científico. A sessão **Materiais, Métodos e Resultados** está subdivida em Capítulos, sendo que cada Capítulo corresponde a um artigo científico específico referente aos trabalhos desenvolvidos durante o período do doutorado no Laboratório de Neurobiologia do Estresse (Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS).

A sessão **Discussão** corresponde à discussão geral da tese, integrando os resultados dos três capítulos. Nas **Conclusões** estão os principais achados da presente tese e nas **Perspectivas** as possibilidades de futuros estudos a partir dos resultados obtidos.

As **Referências Bibliográficas** contêm as referências dos trabalhos citados nas sessões: **Introdução** e **Discussão**. No final de cada Capítulo está listada a bibliografia referente a cada artigo, formatada de acordo com as especificações de cada revista.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico

ADN- ácido desoxirribonucléico

BDNF - fator neurotrófico derivado do encéfalo

CB1- receptor canabinóide-1

CRH – hormônio liberador de corticotropina

D1- receptor dopaminérgico-1

GABA - ácido gama-aminobutírico

GAD65 - glutamato descarboxilase

GCs- glicocorticóides

GR- receptores de glicocorticóides

HFD – dieta hiperlipídica

HHA - hipotálamo-hipófise-adrenal

MR – receptor de mineralocorticóides

Nac – núcleo accumbens

NMDA - N-metil-D-aspartato

PI3K - fosfatidil-inositol-3-cinase

PLC – fosfolipase C

PSD – densidade pós-sináptica

SNC – sistema nervoso central

TrkB – receptor de tropomiosina cinase

VTA - área tegmentar ventral

RESUMO

Intervenções ambientais, como a exposição precoce a estressores ou a dietas ricas em calorias, podem alterar a trajetória da maturação neural e influenciar na susceptibilidade a certas patologias a longo-prazo. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos de uma exposição ao isolamento social durante o período pré-pubere associado ou não ao consumo precoce e crônico de uma dieta hiperlipídica (HFD) sobre aspectos cognitivos e emocionais, e possíveis mecanismos neuroquímicos associados a essas alterações, no hipocampo, no córtex pré-frontal e no núcleo accumbens de ratos machos na idade adulta. Os resultados mostraram que os dois fatores, estresse e dieta (separadamente), induziram um comportamento do tipo depressivo nos animais na idade adulta. Além disso, os animais isolados apresentaram um déficit cognitivo associado à memória de curta-duração e de trabalho, enquanto que animais com acesso à HFD demonstraram prejuízo somente na memória de curta-duração. Curiosamente, a interação entre os fatores (estresse e dieta) causou uma reversão dos déficits na memória de curta-duração. Em relação às avaliações do comportamento alimentar hedônico, observamos que o grupo com consumo crônico de HFD apresentou uma menor motivação para obter diferentes tipos de alimentos palatáveis doces. Essa redução motivacional não parece ser associada a uma menor palatabilidade e/ou a uma maior saciedade induzida pela HFD. Em relação aos marcadores de plasticidade analisados no córtex pré-frontal, observamos interações entre os fatores estresse e dieta na atividade da enzima Na^+K^+-ATPase, nos níveis de BNDF e no imunoconteúdo das proteínas AKT e MAPK/ERK, sendo que os fatores quando aplicados isolados diminuem os níveis dos parâmetros analisados, porém quando associados, os níveis retornam ou aumentam em relação aos valores do grupo controle. O hipocampo foi a estrutura mais afetada pelas intervenções ambientais neste trabalho. Observamos que tanto o estresse, como a dieta hiperlipídica (separadamente) causaram uma redução da plasticidade sináptica hipocampal, por meio de diferentes mecanismos: o acesso crônico à HFD afeta proteínas relacionadas ao funcionamento das sinapses, enquanto o isolamento social parece afetar mais particularmente a via de sinalização do BDNF. Com relação aos achados neuroquímicos no núcleo accumbens, observamos uma redução dos receptores dopaminérgico-1 (D1) e canabinóide-1 (CB1) com o consumo de HFD, enquanto que os animais isolados na pré-puberdade apresentaram uma redução do metabolismo dopaminérgico nesta estrutura. Em suma, esta tese demonstra que tanto o isolamento social e como o consumo contínuo de HFD causam comportamento do tipo depressivo e outras alterações comportamentais, e reduzem marcadores de plasticidade importantes no córtex prefrontal e hipocampo. O acesso à HFD também causa uma menor motivação para o comportamento alimentar hedônico. Assim, tais eventos precoces podem afetar a plasticidade neural levando a importantes alterações comportamentais, e assim predispor a diferentes patologias durante a vida.

Palavras-chave: neuroplasticidade; dieta rica em gordura; estresse; depressão.

ABSTRACT

Environmental interventions, such as early exposure to stressors or high calorie-diets, can alter the trajectory of neural maturation and influence the susceptibility to some pathologies throughout life. In this context, the aim of the present study was to investigate the effects of exposure to social isolation, during the pre-pubertal period, associated or not with early and chronic consumption of a hyperlipid diet (HFD) on cognitive and emotional aspects, and possible mechanisms associated with these changes, in the hippocampus, the prefrontal cortex and the nucleus accumbens of male rats in adulthood. The results showed that both pre-pubertal social isolation and chronic access to a hyperlipidic diet induced a depressive-like behavior in animals during adulthood. In addition, isolated animals had a cognitive deficit associated with short-term and working memory, whereas animals with access to HFD demonstrated impairment only in short-term memory. Interestingly, the interaction between the factors (stress and diet) caused a reversal in relation to short-term memory, remaining similar to the control group. Regarding the evaluations of the hedonic eating behavior, we observed that HFD group presented a lower motivation to obtain different sweet palatable foods. This impaired motivation does not appear to be associated with less palatability and/or satiety induced by the high-fat diet. Concerning plasticity markers in the prefrontal cortex, we observed interactions between stress and diet on Na^+ K^+-ATPase activity, BNDF levels and AKT and MAPK/ERK immunocontents. These interactions follow a similar profile: when applied alone, the levels of the analyzed parameters decrease, but when associated, the levels return or increase in relation to the values of the control group.The hippocampus was the structure most affected by the environmental interventions. Both stress and HFD caused a reduction of hippocampal synaptic plasticity through different mechanisms: chronic access to HFD affects proteins related to synaptic function, while social isolation affects the BDNF signaling pathway more significantly. Regarding the neurochemical findings in the nucleus accumbens, we observed a reduction in dopaminergic-1 (D1) and cannabinoid-1 (CB1) receptors with chronic HFD intake, whereas isolated animals had a reduction of dopaminergic metabolism in this same structure. In summary, this thesis shows that both social isolation and chronic consumption of HFD lead to depressive-like behavior and to other behavioral changes; they reduce plasticity markers in prefrontal cortex and hippocampus. HFD access also induced a lower motivation for hedonic feeding. Therefore, these early interventions may affect neural plasticity, leading to important behavioral changes, and thus, predispose to different pathologies later in life.

Key-words: neuroplasticity; high fat diet; stress; depression.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fatores ambientais no início da vida programam a fisiologia do organismo

As experiências vivenciadas ao longo da vida, principalmente durante os períodos iniciais da vida, podem ter significante impacto sobre a maturação do sistema nervoso central (SNC) (Andersen & Teicher, 2008). Sabe-se que o desenvolvimento é marcado por períodos sensíveis e críticos, os quais tornam o organismo mais susceptível a modificações, tanto por fatores extrínsecos como intrínsecos, podendo levar a mudanças permanentes fisiológicas, neuroquímicas e comportamentais (Fawcett & Frankenhuis, 2015, Stevens et al., 2016).

Dessa forma, os períodos iniciais da vida, incluindo a infância e a adolescência, são fases específicas onde processos dependentes da genética de cada indivíduo associados à exposição a fatores ambientais interagem para estabelecer as características funcionais (Crews *et al.*, 2007). Nesses períodos ocorre uma elevada maturação encefálica marcada pela organização funcional das redes neurais, podas sinápticas, proliferação neural, migração, diferenciação, além de gliogênese e mielinização (Rice & Barone, 2000, Ismail et al., 2016), fatores esses que são fundamentais para o estabelecimento dos circuitos neuroquímicos no SNC.

Diversos estudos em humanos vêm demonstrando a interação entre genes e o ambiente, mostrando que fatores genéticos individuais associados a condições ambientais adversas durante períodos precoces podem afetar mecanismos do desenvolvimento neurológico, aumentando a vulnerabilidade a certas patologias e transtornos (Giovanoli et al., 2013, Davis et al., 2016, Fraguas et al., 2017).

É importante ressaltar que, as experiências ocorridas no início da vida podem agir de formas distintas no desenvolvimento encefálico e seus desfechos dependerão das

características dessas experiências vivenciadas, de sua intensidade e da percepção de cada indivíduo (Horn et al., 2016, Lavoie et al., 2016). Assim, os fatores ambientais podem favorecer processos adaptativos, como aqueles associados à resiliência ao longo da vida, promovendo estratégias de enfrentamento e agindo de forma benéfica ao indivíduo (Lavoie *et al.*, 2016), ou então, exercer um papel crítico na predisposição a patologias futuras e/ou transtornos psicológicos/psiquiátricos (Homberg *et al.*, 2016).

Diversas evidências apontam para essa interação entre o ambiente no início da vida e alterações neuroquímicas e comportamentais ao longo da vida. Estudos em humanos mostram que exposição a traumas e estressores na infância como, por exemplo, abuso ou negligência, estão associados com o aumento do risco em desenvolver psicopatologias na idade adulta, incluindo transtornos depressivos (Heim & Nemeroff, 2001, Shea et al., 2005, Teicher et al., 2006), além de causar alterações neuroendócrinas e disfunções em algumas estruturas cerebrais (como hipocampo e córtex pré-frontal) (Bremner, 2003, Vermetten et al., 2003), levando a prejuízos na cognição (Brietzke *et al.*, 2012) e na resposta ao estresse na idade adulta (Pariante & Lightman, 2008).

Essas alterações a longo prazo induzidas pela exposição a fatores ambientais precoces também são observadas em estudos com modelos animais, como exposição a estressores, que alteram a programação neural, podendo levar a alterações cognitivas, emocionais e no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), afetando as respostas ao estresse na idade adulta (Isgor et al., 2004, McEwen, 2008, Juruena, 2014).

Além disso, a exposição a dietas com alto conteúdo calórico nesses períodos sensíveis do desenvolvimento pode levar a alterações neuronais e metabólicas

associadas a mudanças permanentes no comportamento alimentar, e associado a predisposição à obesidade na idade adulta (Frazier et al., 2008, Teegarden et al., 2009).

Dessa forma, a exposição a diferentes intervenções ambientais precoces pode levar a mudanças na programação metabólica e do SNC, podendo causar efeitos a longo-prazo, modificando a vulnerabilidade para psicopatologias e predisposição a doenças ao longo da vida.

1.2 Isolamento social no período pré-pubere

O período pré-pubere compreende uma fase importante do desenvolvimento que antecede a maturação do sistema reprodutivo. Em roedores, esse período compreende o final do desmame, por volta do 21º dia pós-natal, estendendo-se até os dias 30º a 35º pós-natal (McCormick et al., 2010, Eiland & Romeo, 2013). Em humanos esse período é correspondente ao final da infância, por volta de 8-10 anos de idade (Eiland & Romeo, 2013).

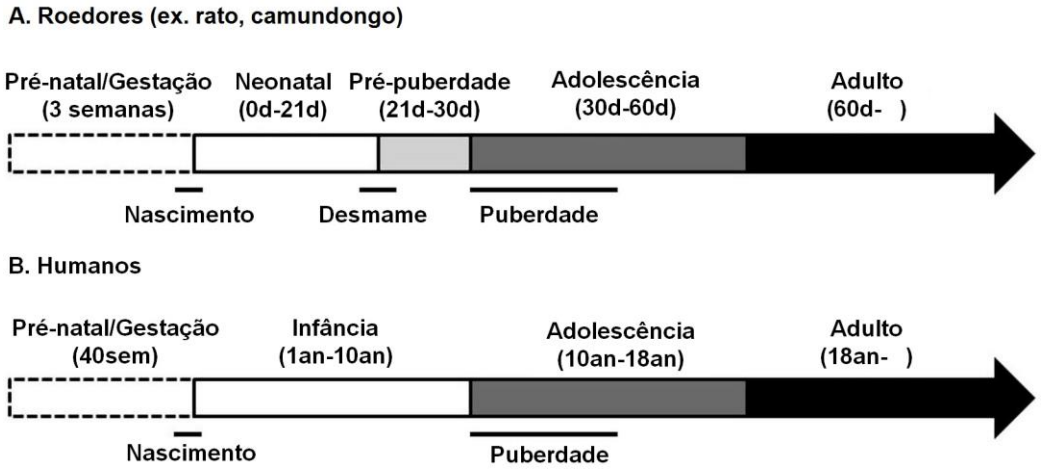

Figura 1. Linha do tempo do desenvolvimento em A. roedores e B. humanos. Fonte: adaptado de Eiland & Romeo (2013).

No período da pré-puberdade, o SNC passa por um intenso processo de transformação, em que ocorrem processos de maturação encefálica, sexual e organização dos circuitos neuroquímicos (Gogtay *et al.*, 2004). Essa maturação ocorre em diferentes estruturas encefálicas: no córtex prefrontal de roedores observa-se que tanto os espinhos dendríticos como o comprimento total das ramificações dendríticas aumentam entre o período de 20-35 dias pós-natal (Koss *et al.*, 2014); o hipocampo também apresenta um aumento na densidade de espinhos dendríticos e da neurogênese antes da puberdade (He & Crews, 2007, Yildirim et al., 2008), assim como o restante do sistema límbico, que possui uma maturação tardia dos seus sistemas neurotransmissores, como por exemplo, o sistema dopaminérgico (Spear, 2000).

Essa intensa plasticidade em diferentes estruturas encefálicas durante a pré-puberdade influencia o desenvolvimento dos comportamentos sociais e cognitivos, característicos desse período, que são demonstrados pelo aumento do comportamento exploratório e de comportamentos de brincadeiras (Sisk & Foster, 2004, McCormick et al., 2010). Dessa forma, as interações sociais durante essa fase são necessárias para um bom desenvolvimento sócio-emocional. Entretanto, quando ocorre uma restrição das influências sociais nesse período, podem ocorrer mudanças plásticas influenciando a estrutura e a função cerebral e assim, causar alterações e/ou disfunções que podem permanecer até a idade adulta (Einon & Morgan, 1977, Klein et al., 2010).

Estudos em humanos mostram que a privação social observada em orfanatos de crianças abandonadas (entre 8-10 anos de idade) leva a comprometimento cognitivo, déficit social e alterações em algumas estruturas encefálicas (Chugani et al., 2001, Eluvathingal et al., 2006, Nelson et al., 2007). Da mesma forma, o “bullying”, que é caracterizado como um comportamento agressivo, repetitivo e intencional (Olweus, 1994), faz com que a criança vítima desse tipo de comportamento acabe se isolando,

ocasionando prejuízos cognitivos e emocionais (Camodeca & Goossens, 2005, Medeiros et al., 2016).

Em modelos animais, o isolamento social é considerado um modelo de estresse por representar uma situação aversiva para ratos, uma vez que as interações sociais são recompensadoras para roedores e esses animais apresentam normalmente uma série de comportamentos sociais (Panksepp et al., 2007, Hong et al., 2012). O isolamento social após o desmame e aplicado cronicamente pode levar a alterações a longo-prazo, como aumento da atividade locomotora (Varty *et al.*, 2000) e da agressividade (Koike *et al.*, 2009), déficits cognitivos (Lu et al., 2003, Ibi et al., 2008), diminuição das interações sociais (Fone & Porkess, 2008, Koike et al., 2009), além de comportamento do tipo depressivo (Jahng *et al.*, 2012). Além disso, os animais isolados cronicamente apresentam alterações anatômicas e neuroquímicas, como diminuição dos espinhos dendríticos de neurônios piramidais no córtex prefrontal e hipocampo (Silva-Gomez *et al.*, 2003), diminuição de neurogênese e sinapses hipocampais (Varty et al., 1999, Ibi et al., 2008), além de alterações neuroquímicas, como aumento da liberação basal de dopamina e dessensibilização de receptores D2 no núcleo accumbens (Hall *et al.*, 1998).

Entretanto, a maioria dos estudos, incluindo os citados acima, avalia o isolamento social com exposição crônica, geralmente iniciando após o desmame e com duração até a idade adulta. Poucos estudos vêm analisando os efeitos do isolamento social antes da puberdade avaliando os seus efeitos comportamentais e neuroquímicos a longo prazo. É importante considerar que isolamentos por períodos mais curtos mimetizam de forma mais fidedigna a exposição a esse tipo de estressor em humanos, uma vez que são raros os casos de isolamento social por toda a vida.

1.3 A resposta ao estresse e alterações durante o desenvolvimento

Um estressor é definido como uma ameaça ou desafio ao indivíduo que pode potencialmente perturbar a homeostase do organismo (McEwen, 2007). A exposição a estressores físicos e/ou psicológicos gera diversas respostas do organismo, incluindo respostas neurovegetativas, imunológicas, comportamentais e neuroendócrinas (Tsigos & Chrousos, 2002) como uma forma de preparar o organismo para reagir e lidar com uma demanda adequada ao evento estressor (McEwen, 2007).

Classicamente, existem dois importantes sistemas que são ativados frente a um estressor: a) primeiramente, a ativação do sistema nervoso simpático que culmina na liberação de noradrenalina em diversos órgãos e de adrenalina pela glândula adrenal gerando respostas mais instantâneas frente a um estressor, descritas pelo paradigma das respostas de "luta ou fuga"; b) e a ativação do eixo HHA que inicia com a liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH) no hipotálamo, que por sua vez estimula a hipófise a secretar o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH age no córtex da glândula adrenal estimulando a liberação de glicocorticóides na circulação (cortisol em humanos e corticosterona em roedores) (Tsigos & Chrousos, 2002, Lupien et al., 2005, McEwen, 2007, 2008). Os glicocorticóides (GCs) possuem várias ações no controle da homeostase corporal e das respostas ao estresse, como o aumento da disponibilidade de substratos energéticos no organismo e melhora do fluxo sanguíneo para órgãos-alvo. Além disso, os GCs também exercem ações no SNC, tais como alterações na plasticidade sináptica, na expressão de proteínas e de receptores de neurotransmissores, mudanças na neurogênese, indução de morte celular, entre outros (McEwen, 2007, McEwen & Gianaros, 2011).

Adicionalmente, os GCs exercem controle inibitório sobre o próprio eixo HHA, por meio de um sistema de retroalimentação negativa que ocorre via ligação dos GCs aos seus receptores localizados em estruturas do SNC envolvidas no controle desse eixo, dentre elas o hipotálamo, o hipocampo e o córtex cerebral (Tsigos & Chrousos, 2002). Existem dois tipos de receptores para os glicocorticóides com diferentes afinidades a seus ligantes: a) os receptores de mineralocorticóides (MR) possuem alta afinidade ao ligante e estão ativados com as concentrações basais de GCs; b) e os receptores de glicocorticóides (GR), com baixa afinidade ao ligante, são mais sensíveis às mudanças de concentrações dos GCs e assim, com as respostas ao estresse (Harris *et al.*, 2013). Esses receptores estão localizados no citosol das células e, quando ativados pelos GCs, migram para o núcleo, aonde irão se ligar a uma região específica responsiva aos GCs presente no ADN (ácido desoxirribonucléico) e assim, regular a transcrição de vários genes (Hayashi *et al.*, 2004).

A ativação dos sistemas relacionados ao estresse geralmente leva a uma adaptação do organismo para melhorar as habilidades e ajustar sua homeostase, facilitando a sobrevivência frente ao estressor (Tsigos & Chrousos, 2002). Entretanto, quando o estressor se torna prolongado e de forma crônica, a ativação constante desses sistemas e a liberação de glicocorticóides de forma prolongada pode ser uma condição indesejável, com alterações metabólicas e neuroquímicas prejudiciais para o organismo (McIntosh & Sapolsky, 1996). Dados da literatura demonstram que alterações biológicas no sistema de resposta ao estresse, que levam a uma desregulação da atividade do eixo HHA, podem estar relacionadas ao aparecimento de uma série de distúrbios/transtornos, como por exemplo, depressão, ansiedade, e predisposição à obesidade (de Kloet et al., 2005, Ridder et al., 2005, Pervanidou & Chrousos, 2012).

A exposição a estressores durante períodos de desenvolvimento, incluindo o período pré-pubere, pode afetar o desenvolvimento encefálico, uma vez afetando sua plasticidade contínua durante esses períodos, pode causar modificações funcionais e anatômicas nas respostas ao estresse. Vários estudos mostram que as consequências da exposição a estressores diferem entre adolescentes e adultos (McCormick et al., 2010): a exposição a estressores agudos em animais pré-puberes resulta em maiores respostas hormonais ao estresse, como aumento dos níveis de ACTH e corticosterona, quando comparados a animais adultos (Goldman et al., 1973, Romeo et al., 2004a, Romeo et al., 2004b, Romeo & McEwen, 2006, Lui et al., 2012). Além disso, quando os animais são repetidamente expostos ao mesmo estressor, os animais adultos demonstram uma maior habituação observada pela resposta ao estresse nos níveis de ACTH e corticosterona, enquanto que animais pré-puberes possuem uma resposta mais sensibilizada (Romeo & McEwen, 2006, Doremus-Fitzwater et al., 2009, Lui et al., 2012).

Além disso, essas alterações na resposta ao estresse podem influenciar também a maturação encefálica e certos circuitos neuroquímicos, como observado em um estudo em que a mesma dose de corticosterona aumentou a expressão de subunidades do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) hipocampal (ex. NR2A e NR2B) em animais pré-puberes quando comparados a animais adultos (Lee *et al.*, 2003). Adicionalmente, a exposição a estressores na pré-puberdade (27-29 PND) altera a expressão de moléculas de adesão celular neural no sistema límbico, envolvidas no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica e em processos de aprendizado (Tsoory et al., 2008). Dessa forma, esses estudos em modelos animais demonstram que a exposição a estressores durante a pré-puberdade e puberdade pode alterar a maturação de estruturas encefálicas importantes para funções cognitivas e para as respostas ao estresse.

1.4 Estresse e comportamento alimentar

A disponibilidade de nutrientes e a exposição a estressores podem afetar o comportamento alimentar de diferentes formas. O estresse pode influenciar o comportamento alimentar, intensificando ou atenuando o apetite, alterando as preferências alimentares, dependendo da intensidade e duração do agente estressor (Marti et al., 1994, Ortolani et al., 2011).

Dados da literatura mostram que o estresse possui um efeito sobre a escolha do tipo de alimento consumido: pessoas estressadas geralmente apresentam uma preferência maior por alimentos palatáveis, ricos em calorias provindos principalmente de açucares e gorduras (Wardle et al., 2000, Cartwright et al., 2003, Zellner et al., 2006, Tomiyama et al., 2011, Tryon et al., 2013). Da mesma forma, essa preferência também é observada em modelos animais (Pecoraro et al., 2004, Silveira et al., 2010, Oliveira et al., 2015).

Algumas linhas de pesquisa apontam para a hipótese de que o aumento do consumo de alimentos palatáveis induzido pelo estresse estaria relacionado a uma tentativa da diminuição das respostas do estresse, sendo que esses alimentos calóricos agiriam como "alimentos confortantes" (chamados "comfort foods") (Adam & Epel, 2007). Entretanto, existem algumas diferenças quanto às ações dessas dietas na atividade do eixo HHA, dependendo do tipo de dieta consumida: dietas ricas em açúcares estão mais associadas à redução das respostas ao estresse (Pecoraro *et al.*, 2004), enquanto dietas ricas em gorduras possuem dados controversos na literatura, mostrando que elas podem tanto realçar os níveis de GCs basais e induzidos pelo estresse, podendo agir como um tipo de estressor (Tannenbaum et al., 1997, Kamara et al., 1998, McNeilly et al., 2015), ou então da mesma forma que dietas ricas em

açúcares, causarem uma diminuição da atividade do eixo HHA (Auvinen *et al.*, 2012). Além disso, um estudo utilizando animais na pré-puberdade demonstrou que o consumo de uma dieta rica em gordura nesse período não foi capaz de alterar os níveis plasmáticos de corticostorena em machos (Boukouvalas *et al.*, 2008). Essas divergências podem estar relacionadas às diferentes composições de dietas que são utilizadas nos estudos e ao tempo de consumo, além do período em que é ofertado esse tipo de alimento (Auvinen *et al.*, 2011).

A ingestão alimentar é essencialmente regulada por duas vias complementares: (a) a via homeostática mais associada ao controle hipotalâmico, relacionada ao aumento da motivação para comer em função do balanço energético, sendo ativada quando ocorre depleção dos estoques energéticos, e (b) a via hedônica, ou regulação baseada na recompensa, ligada aos aspectos emocionais e recompensadores do alimento, geralmente relacionada ao consumo de alimentos palatáveis (Tulloch *et al.*, 2015) e associada ao sistema de recompensa, incluindo o núcleo accumbens. Muitas vezes, a via hedônica pode sobrepor-se à via homeostática durante períodos de relativa abundância de energia (Tulloch *et al.*, 2015). Assim, o controle alimentar envolve mecanismos complexos que sofrem influência não apenas das demandas energéticas, mas também do estado emocional do indivíduo.

É importante notar que há uma distinção nos fatores que levam à ativação dos mecanismos de recompensa do encéfalo. Pesquisas coordenadas por Kent Berridge levaram a um modelo que propõem dois componentes de resposta distintos envolvidos nessa regulação do comportamento alimentar hedônico (Berridge, 2009). Um deles, denominado “gostar” (“liking”), está relacionado ao prazer e à palatabilidade que envolve o consumo de determinado alimento. O segundo componente envolvido, caracterizado como “querer” (“wanting”), está mais associado com o valor motivacional

da recompensa ou saliência de incentivo, refere-se ao impulso direcionado para o estímulo alimentar alvo, sendo relacionado com o apetite (Berridge, 2009).

Essas duas respostas relacionadas ao comportamento alimentar são distintas; entretanto, ambas são necessárias para o processo de recompensa normal (Berridge, 2009). A modulação das respostas de "querer" (relacionadas à motivação em buscar o alimento) e de "gostar" (relacionadas à resposta de prazer no consumo da recompensa alimentar) possuem envolvimento das vias dopaminérgicas (receptores e transportadores dopaminérgicos, assim como todo processo de metabolização da dopamina) (Nicola, 2016), além do sistema canabinóide (receptor canabinóide 1, CB1) (Di Marzo *et al.*, 2009) e opióide (receptor μ-opióide) (Pecina & Berridge, 2000).

Um importante centro encefálico relacionado com as respostas motivacionais e com as características hedônicas alimentares é o núcleo accumbens (Nac), importante centro de projeções de neurônios dopaminérgicos com origem na área tegmentar ventral (VTA) (Haber & Knutson, 2010). O sistema dopaminérgico para o Nac parece ser importante na busca e na modulação do incentivo percebido pela recompensa (Wyvell & Berridge, 2000).

Algumas linhas de estudo mostram que a ingestão de dietas palatáveis ricas em gorduras pode alterar a função dos sistemas neurotransmissores encefálicos que participam da regulação do comportamento alimentar. Em animais expostos a uma dieta crônica hiperlipídica, foram observadas diferenças na metilação do ADN, com a redução na expressão de genes relacionados ao sistema dopaminérgico em várias estruturas cerebrais, incluindo o VTA (redução da expressão de tirosina-hidroxilase e do transportador de dopamina) e o Nac (redução da expressão de receptor D1) (Vucetic *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem modificação epigenética do sistema dopaminérgico em função da dieta. Adicionalmente, uma exposição a esse tipo de dieta precocemente

também é capaz de alterar o sistema mesolímbico dopaminérgico e as respostas do eixo HHA frente a estressores na idade adulta, mostrando que animais que consomem esse tipo de dieta possuem menor sensibilização das respostas frente a um estressor crônico na idade adulta (Naef *et al.*, 2013). No mesmo sentindo, outros estudos também mostram alterações na neurotransmissão opióide (receptor μ-opióide) e canabinóide (receptor CB1) no sistema mesolímbico, associadas com o consumo de uma dieta rica em gordura, levando a alterações na regulação do comportamento alimentar (Deshmukh & Sharma, 2012, Pitman & Borgland, 2015).

Dessa forma, a exposição precoce e crônica a dietas hiperlipídicas, assim como a exposição a estressores no início da vida, podem causar alterações a longo-prazo na circuitaria envolvida no controle do comportamento alimentar e nas respostas hedônicas encefálicas, podendo levar a um aumento na predisposição ao ganho de peso e/ou obesidade ao longo da vida.

1.5 Estresse, dietas hiperlipídicas e alterações cognitivas dependentes de plasticidade

A plasticidade encefálica é a capacidade de remodelação do encéfalo frente às diferentes experiências do indivíduo, com reformulação de suas conexões em função das necessidades e dos fatores ambientais. Sendo essencialmente relacionada aos processos de desenvolvimento, aprendizado, resiliência, memória e de reparação (Pittenger, 2013).

A capacidade plástica é uma característica fundamental do SNC e prejuízos em processos de plasticidade sináptica, neurogênese, crescimento e remodelação celular

podem contribuir para déficits cognitivos e assim, podem induzir a uma variedade de doenças neuropsiquiátricas associadas (Pittenger, 2013).

É bem conhecido que a plasticidade neuronal mediada por alterações na morfologia e função sináptica está subjacente aos processos de aprendizado e memória (Lante *et al.*, 2006). Tais processos envolvem adaptações da circuitaria encefálica ao ambiente, ocorrendo ao longo de toda a vida. Define-se aprendizado como a aquisição de novas informações ou novos conhecimentos, enquanto que a memória é a retenção da informação aprendida (Korte & Schmitz, 2016, Kim & Kaang, 2017).

Existem diferentes tipos de memórias, sendo classificadas em: declarativas ou explícitas (memória para fatos e eventos) e não-declarativas ou implícitas (memória para habilidades, hábitos e comportamentos). As memórias também podem ser classificadas quanto a sua duração: memórias de longo-prazo são aquelas que podem ser evocadas por dias, meses ou anos após terem sido originalmente armazenadas; e as memórias de curto-prazo, que duram segundos a horas e são vulneráveis a perturbações (Korte & Schmitz, 2016). Um tipo de memória mantida por um curto período de tempo é a chamada memória de trabalho, que é uma forma temporária de armazenamento da informação, de capacidade limitada e exige certa repetição para ser conservada, mesmo que por período curto de tempo (por exemplo, armazenamento de um número de telefone por um tempo limitado) (Wang et al., 2017c).

Várias estruturas encefálicas fazem parte do processo de aquisição dos diferentes tipos de memórias. Classicamente, o envolvimento do hipocampo é bem discutido nos processos envolvendo memória e aprendizado (Squire, 1992), mas adicionalmente o córtex pré-frontal vem sendo reconhecido por mediar funções executivas, incluindo memórias de curta-duração, como a memória de trabalho (Levy & Goldman-Rakic, 1999, Tau & Peterson, 2010). Além disso, o córtex pré-frontal possui uma maturação

mais tardia, o que torna esta estrutura mais susceptível a intervenções ambientais durante o desenvolvimento (Gogtay *et al.*, 2004).

A exposição a fatores ambientais precoces, como estressores e as variações nutricionais, incluindo o consumo de dietas ricas em calorias, pode causar alterações em parâmetros biológicos relacionados à maturação neural e à plasticidade. Diversos estudos vêm demonstrando a associação entre o estresse precoce e alterações cognitivas ao longo da vida, induzidas por modificações na circuitaria encefálica. Estudos em roedores submetidos ao isolamento social crônico (durante o desenvolvimento até a idade adulta) relatam prejuízos, com mudanças comportamentais a longo-prazo, como hiperatividade em resposta à novidade (Fabricius et al., 2011, Watson et al., 2012) e prejuízo no aprendizado e na memória (Quan et al., 2010, Watson et al., 2012, McIntosh et al., 2013).

Da mesma forma, estudos em humanos demonstram que exposição a situações estressantes e/ou traumáticas durante certas fases do desenvolvimento, como a infância, afeta o desempenho em tarefas cognitivas envolvendo memória. Um estudo recente mostrou que indivíduos expostos a estressores precoces apresentaram menor velocidade de processamento e desempenho em tarefas envolvendo memória de trabalho, assim como menores volumes de várias áreas corticais (Saleh *et al.*, 2017), de acordo com estudos anteriores que mostraram essa associação entre estresse precoce e alterações volumétricas e funcionais em regiões encefálicas, observadas por estudos de neuroimagem (Cohen et al., 2006, van Harmelen et al., 2010, Dannlowski et al., 2012).

Além disso, o acesso a dietas altamente calóricas, especialmente as ricas em gorduras, também podem afetar a maturação e a plasticidade encefálica (Granholm *et al.*, 2008), alterando as respostas cognitivas, incluindo prejuízo no aprendizado e na memória, observado em roedores (Winocur & Greenwood, 2005, Granholm et al., 2008,

Valladolid-Acebes et al., 2011), assim como em humanos (Morris et al., 2004, Francis & Stevenson, 2011). Entretanto, mais estudos são necessários para identificar os mecanismos neurobiológicos que contribuem para essas modificações na plasticidade encefálica.

Alguns marcadores biológicos relacionados à plasticidade neuronal vêm sendo associados com as respostas de aprendizado e memória. Uma importante correlação entre o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) e alterações em funções cognitivas vem sendo relatada (Kennedy et al., 2015, Azeredo et al., 2017). Essa neurotrofina está envolvida em processos de neurogênese e na modulação da plasticidade encefálica, exercendo seus efeitos biológicos através de sua ligação e ativação de receptores específicos de tropomiosina cinase (TrkB), que por sua vez desencadeiam a ativação de múltiplas cascatas de sinalização intracelulares, incluindo a ativação das vias fosfatidil-inositol-3-cinase (PI3K/AKT), fosfolipase C (PLC) e SHC/RAS/MAP cinase (Binder & Scharfman, 2004, Bennett & Lagopoulos, 2014) (ver Figura 2). A ativação dessas vias está envolvida na regulação de plasticidade dependente de síntese proteica e no transporte e tradução de proteínas sinápticas (Yoshii & Constantine-Paton, 2010). São relatadas alterações nos níveis de BDNF associadas ao consumo de uma dieta rica em gordura (Theriault et al., 2016, Wang et al., 2017a), assim como a exposições a estressores, como o isolamento social (Barrientos et al., 2003, Berry et al., 2012). Pelo fato do BDNF modular a comunicação e plasticidade sináptica, além de ter um envolvimento em sinapses glutamatérgicas e gabaérgicas (Manju et al., 2017), reduções nos níveis e/ou nas vias de sinalização dessa neurotrofina podem comprometer processos de aprendizado e memória.

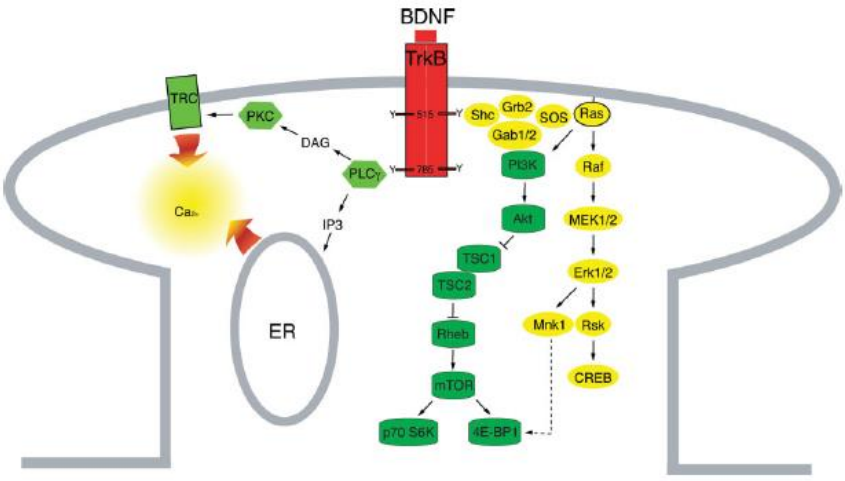

Figura 2. Vias de sinalização do BDNF (Fonte:Yoshii & Constantine-Paton, 2010).

Outro marcador relevante para processos de plasticidade e memória é a enzima Na^+,K^+-ATPase. Ela está envolvida com o transporte ativo de íons sódio e potássio, mantendo o gradiente eletroquímico necessário para excitabilidade e regulação do volume celular neuronal (Gloor, 1997). Adicionalmente, a Na^+,K^+-ATPase também exerce funções como transdutor de sinais da membrana plasmática para as organelas intracelulares (Xie & Askari, 2002). Sua modulação afeta diretamente a sinalização de neurotransmissores, a atividade neural bem como o comportamento. Além disso, a inibição da atividade dessa enzima está associada a prejuízos no aprendizado e memória (Zhan et al., 2004, Zhang et al., 2013). Estudos prévios mostram que a atividade da Na^+,K^+-ATPase pode ser influenciada por intervenções ambientais, como estressores no início da vida (Silveira et al., 2011, Noschang et al., 2012), assim como pela ingestão de dietas palatáveis durante a pré-puberdade (Krolow *et al.*, 2012).

Dessa forma, observa-se que variações ambientais em determinados períodos do desenvolvimento podem influenciar a plasticidade encefálica, modulando respostas cognitivas como, por exemplo, a memória. Entretanto, poucos estudos avaliaram a

interação a longo-prazo entre fatores como estresse e consumo de dietas hiperlipídicas durante a pré-puberdade.

1.6 Estresse e dietas hiperlipídicas associadas a alterações emocionais e ao comportamento do tipo depressivo.

A associação da vulnerabilidade genética com exposição a fatores ambientais específicos, especialmente em períodos importantes do desenvolvimento encefálico, pode estar relacionada a uma maior vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos de humor, incluindo a depressão (Lopizzo *et al.*, 2015).

Embora os mecanismos patofisiológicos da depressão ainda não estejam completamente esclarecidos, vários conceitos tentam caracterizar as bases neurobiológicas desse transtorno, incluindo prejuízo da plasticidade neuronal e da neurogênese hipocampal, associado à redução de fatores neurotróficos, alterações no controle do eixo HHA, além da clássica teoria da deficiência monoaminérgica e/ou um desequilíbrio entre vários sistemas neurotransmissores (Nestler et al., 2002, Duman & Monteggia, 2006, Serafini et al., 2014).

Entre os fatores ambientais, a exposição a estressores, especialmente nas primeiras fases da vida, exerce um impacto importante no desenvolvimento encefálico levando a mudanças funcionais que podem contribuir para a depressão (Heim & Binder, 2012). Além disso, nesses períodos de alta plasticidade neural, regiões encefálicas envolvidas na regulação da emoção e na mediação das respostas ao estresse parecem estar particularmente mais sensíveis a exposição a eventos estressores. Nesse contexto, estudos epidemiológicos mostram que pacientes depressivos apresentam prejuízos no controle da atividade do eixo HHA, associado a uma redução de GR em estruturas

encefálicas envolvidas no controle desse eixo, além de aumento dos níveis de cortisol circulante (Pariante & Miller, 2001, Swaab et al., 2005, Vreeburg et al., 2009). Dessa forma, a plasticidade induzida pelo ambiente pode produzir alterações na circuitaria neural, além de respostas mal adaptativas ao ambiente, causando assim um aumento do risco para o desenvolvimento de transtornos depressivos (Hornung & Heim, 2014).

Numerosos estudos epidemiológicos e clínicos têm demonstrando evidências de uma forte associação entre variadas formas de estresse no início da vida e sintomas depressivos. Adversidades na infância, como abuso, negligência, maus tratos, perda de familiares, entre outros, estão associados com o aumento dos sintomas depressivos ao longo da vida (Agid et al., 1999, Edwards et al., 2003, Chapman et al., 2004, Heim & Binder, 2012). Entretanto, é importante salientar que, embora as experiências estressantes precoces tenham um impacto na vulnerabilidade a transtornos depressivos, elas não levam a transtornos psiquiátricos em todos os indivíduos expostos, uma vez que esse processo é dependente de um fundo genético individual, que por sua vez pode influenciar a forma de lidar com os estímulos estressantes (Mann & Currier, 2010).

Estudos em roedores também têm demonstrado que exposição a estressores precoces, como o isolamento social, provoca sintomas comportamentais semelhantes aos observados na depressão em humanos (Brenes Saenz et al., 2006, Vargas et al., 2016, Wang et al., 2017b). Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos de um isolamento social a curto-prazo, no início da vida, na predisposição de comportamentos do tipo depressivo na idade adulta.

Além disso, o consumo de dietas altamente calóricas também vem sendo associado com maior predisposição a transtornos psiquiátricos. Estudos em humanos (Akbaraly *et al.*, 2009) e em modelos animais (Abildgaard et al., 2011, Sharma & Fulton, 2013) mostram que o consumo de dietas ricas em calorias pode aumentar a

probabilidade de desenvolver depressão. É importante salientar que o acesso a dietas altamente calóricas vem aumentando consideravelmente em crianças, o que pode modificar a maturação encefálica e levar a mudanças em processos cognitivos e emocionais ao longo da vida (Sasaki et al., 2013, Boitard et al., 2015).

Mudanças na plasticidade neural causadas por exposição a fatores ambientais (como estresse e dietas hipercalóricas) durante o desenvolvimento podem estar associadas com o desenvolvimento de sintomas depressivos. Alterações estruturais encefálicas, como perda de sinapses e espinhos dendríticos, assim como, redução da ramificação dendrítica e mudanças em células gliais no hipocampo vem sendo relacionadas com a depressão (Serafini *et al.*, 2014). Por exemplo, o BDNF, envolvido na neurogênese e modulação da plasticidade neural, diminui após adversidades no início da vida (Choy et al., 2008, Roth & Sweatt, 2011) e sua redução tem sido correlacionada com a patofisiologia da depressão (Polyakova *et al.*, 2015). Além disso, a depressão pode estar associada a alterações em diversos sistemas neurotransmissores, tais como sistemas serotoninérgicos, glutamatérgicos e gabaérgicos (Yuksel & Ongur, 2010, Gao et al., 2013), sendo que a conectividade neural desses sistemas ocorre durante períodos específicos e a exposição a certos fatores ambientais afeta o seu desenvolvimento.

Dessa forma, considerando que a exposição a estressores induz aumento do consumo de alimentos palatáveis, e que o acesso a tais alimentos vem aumentando de forma marcante durante a infância, torna-se relevante entender como variações no ambiente, como o isolamento social, com a concomitante exposição a dietas altamente calóricas, podem propiciar, a longo prazo, o aparecimento de transtornos como a depressão, especialmente se aplicados durante períodos em que a maturação encefálica é maior.

Assim, tendo em vista que:

- o período pré-pubere é um período de grande maturação neural e assim, uma fase sensível no desenvolvimento da função do sistema nervoso;
- perturbações nesse período, como a exposição a fatores ambientais, podem afetar o desenvolvimento encefálico e o comportamento;
- a exposição a fatores ambientais adversos, tais como o isolamento social e o consumo de uma dieta rica em gordura, têm aumentado de modo marcante em períodos precoces;
- esses fatores em períodos sensíveis do desenvolvimento podem afetar a plasticidade neural, a conectividade dos circuitos neuroquímicos e o controle das respostas ao estresse, podendo dessa forma afetar permanentemente os processos cognitivos e emocionais;

o presente trabalho de Tese têm como **hipótese** que a exposição a um estressor durante o período pré-pubere pode perturbar a plasticidade neural, ocasionando mudanças significativas em processos cognitivos e emocionais na idade adulta e que o concomitante consumo precoce de uma dieta rica em gordura possa potencializar os efeitos do estresse, além de seus efeitos deletérios próprios no desenvolvimento encefálico e comportamental.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo da presente Tese foi investigar os efeitos da exposição a um estressor durante o desenvolvimento (período pré-pubere) associado a uma exposição crônica a uma dieta hiperlipídica sobre funções cognitivas e emocionais e estudar os possíveis mecanismos neuroquímicos responsáveis por essas alterações em ratos machos na idade adulta.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar se a exposição ao isolamento social no período pré-pubere e o consumo precoce e crônico de uma dieta hiperlipídica causam:

a. Prejuízo da memória de curta-duração e alteram marcadores neuroquímicos envolvidos com a via de sinalização do BDNF, a enzima Na^+,K^+-ATPase e os receptores de glicocorticóides no córtex pré-frontal de ratos machos adultos (Capítulo I).

b. Comportamento do tipo depressivo e alterações em marcadores de plasticidade sináptica, assim como da atividade do eixo HHA no hipocampo de ratos machos na idade adulta (Capítulo II).

c. Modificações nas respostas hedônicas para o comportamento alimentar e alteram sistemas neurotransmissores envolvidos no sistema de recompensa alimentar,

como o dopaminérgico, o opióide e o canabinóide no núcleo accumbens de ratos machos na idade adulta (Capítulo III).

3. MATERIAIS, MÉTODOS E RESULTADOS

Os materiais, métodos e os resultados dessa Tese são apresentados a seguir, da seguinte forma:

- Capítulo I: Artigo publicado na revista *International Journal of Developmental Neuroscience;*

- Capítulo II: Artigo submetido para publicação na revista *Molecular Neurobiology*;

- Capítulo III: Artigo a ser submetido para publicação na revista *European Journal of Nutrition.*

3.1 Capítulo I

Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects.

Artigo publicado na revista *International Journal of Developmental Neuroscience.*

Int. J. Devl Neuroscience 50 (2016) 16–25

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijdevneu

Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects

Danusa Mar Arcego[a,*], Rachel Krolow[b], Carine Lampert[a], Ana Paula Toniazzo[a], Carolina Berlitz[a], Camilla Lazzaretti[a], Felipe Schmitz[a], André Felipe Rodrigues[a], Angela T.S. Wyse[a], Carla Dalmaz[a]

[a] Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil
[b] Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Universidade Católica de Pelotas (UCPel), Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 18 December 2015
Received in revised form 1 February 2016
Available online 4 March 2016

Keywords:
Early-life environment
Social isolation
High fat diet
Memory
Stress
BDNF

ABSTRACT

Environmental factors, like early exposure to stressors or high caloric diets, can alter the early programming of central nervous system, leading to long-term effects on cognitive function, increased vulnerability to cognitive decline and development of psychopathologies later in life. The interaction between these factors and their combined effects on brain structure and function are still not completely understood. In this study, we evaluated long-term effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic high fat diet access, on memory and on neurochemical markers in the prefrontal cortex of rats. We observed that early social isolation led to impairment in short-term and working memory in adulthood, and to reductions of Na^+,K^+-ATPase activity and the immunocontent of phospho-AKT, in prefrontal cortex. Chronic exposure to a high fat diet impaired short-term memory (object recognition), and decreased BDNF levels in that same brain area. Remarkably, the association of social isolation with chronic high fat diet rescued the memory impairment on the object recognition test, as well as the changes in BDNF levels, Na^+,K^+-ATPase activity, MAPK, AKT and phospho-AKT to levels similar to the control-chow group. In summary, these findings showed that a brief social isolation period and access to a high fat diet during a sensitive developmental period might cause memory deficits in adulthood. On the other hand, the interplay between isolation and high fat diet access caused a different brain programming, preventing some of the effects observed when these factors are separately applied.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Early in life, the nervous system undergoes an intense process of maturation and adaptation, and the constant influence of environmental factors help to shape the cognitive and emotional aspects of the individual (Burggren and Mueller, 2015; Knudsen, 2004; Takesian and Hensch, 2013; Vickers, 2014). Early life events, like stressful events, can induce long-lasting changes in the brain that may result in alterations in several neuroendrocrinal and behavioral processes (Hoeijmakers et al., 2014; Marco et al., 2011; Naninck et al., 2015; Pervanidou and Chrousos, 2007). In this context, social behavior during developmental periods, especially during prepuberty and adolescence, has a significant impact on stress responses and behavior later in life (McCormick and Mathews, 2007; Weiss et al., 2004). In animals with social organization, like rodents, it has been observed that social isolation is aversive, as social interactions are necessary to ensure good cognitive and emotional development during growth (Hong et al., 2012). It was shown that long-term social isolation (during developmental periods until young adult age) disturbs brain maturation (Lapiz et al., 2003; Quan et al., 2010), and causes a series of long-lasting behavioral changes, like hyperactivity in response to novelty (Fabricius et al., 2011; Watson et al., 2012), and impaired learning and memory (McIntosh et al., 2013; Quan et al., 2010; Watson et al., 2012). Furthermore, acute social isolation (72 h) in rodents, increases plasma corticosterone (Kamal et al., 2014), indicating that a brief social isolation can be characterized as a potent stressor in these animals.

* Corresponding author at: Departamento de Bioquímica, ICBS, UFRGS, Ramiro Barcelos, 2600 (Anexo) Lab. 37, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55 51 3308 5535.
E-mail address: danusa.arcego@gmail.com (D.M. Arcego).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.03.001
0736-5748/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

The exposure to stressful events leads to increased release of glucocorticoids (GCs), due to activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis. Additionally, key signaling molecules, like glucocortidoid receptor (GR), can be affected by stress exposure, since this receptor mediate the negative feedback of GCs on the HPA axis following stress (Abildgaard et al., 2014; Buwalda et al., 2001; Groeneweg et al., 2012). One of the consequences of stress exposure is the change in food intake. It has been proposed a reward-based eating model ("comfort foods") which the high caloric food intake has been suggested as a means to reduce the stress response (Adam and Epel, 2007). In this sense, the association between stressful environment and access to high caloric diets early in life can be one of the reasons of the alarming higher prevalence of obesity and overweight in children and adolescents (Ogden et al., 2012). Furthermore, the access to high caloric diets in sensitive developmental periods could also modify brain maturation, with changes in cognitive processes (Winocur and Greenwood, 2005), as impaired learning and memory function, which has been observed in both humans (Francis and Stevenson, 2011; Morris et al., 2004) and rodents (Granholm et al., 2008; Valladolid-Acebes et al., 2011).

Is well known that neuronal plasticity mediated by changes in synaptic morphology and function underlies learning and memory processes (Lante et al., 2006). Early life exposure to factors such as stress and high caloric diet intake may cause alterations on biological parameters related to neural maturation and plasticity. Levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), a neurotrophin involved in neurogenesis and modulation of brain plasticity, decreases after early-life adversities (Choy et al., 2008; Roth and Sweatt, 2011). This neurotrophin exerts many biological effects by binding and activating specific tropomyosin-related kinase (Trk) receptors, which in turn triggers multiple intracellular signaling cascades, including activation of phosphatidylinositol 3-kinase PI3 K/AKT, phospholipase Cγ (PLCγ), and SHC/RAS/MAPK pathways (Bennett and Lagopoulos, 2014). Alterations in BDNF have been associated with memory impairment induced by high fat diet intake (Cui et al., 2012; Granholm et al., 2008), or exposure to stressors early in life (Oomen et al., 2010; Wang et al., 2011). Also relevant to the development of central nervous system is the activity of Na^+,K^+-ATPase, an enzyme that maintains the neurochemical gradient essential for neuronal excitability, and which activity is influenced by environmental interventions, like stress in early life (Noschang et al., 2012; Silveira et al., 2011) and palatable diet intake (Krolow et al., 2012).

The prefrontal cortex is a brain structure involved in the orchestration of motor, cognitive, affective, and social behaviors (Kolb et al., 2012), mediating executive functions, including inhibitory control, attention and mental flexibility, reward sensitivity, and working memory (Blakemore and Choudhury, 2006; Crone, 2009; Tau and Peterson, 2010). In addition, the prefrontal cortex is also involved in stress responses (McEwen, 2008). This structure is susceptible to environmental interventions in early life, since its development and maturation occurs during childhood until early adulthood (Gogtay et al., 2004).

Here we studied a possible interplay between the effects of stress during the prepubertal period and the chronic access to a diet rich in calories on behavior, and on neurochemical aspects in prefrontal cortex in adulthood that could result from changes in early programming of central nervous system induced by early exposure to these factors. Thus, our aim was to evaluate whether the stress by social isolation in the prepubertal period and chronic high fat diet (HFD) intake induce memory impairments in male adult rats. Additionally, we analyzed neurochemical markers in the prefrontal cortex that could be related to the behavior alterations observed: BDNF levels and some markers of its signaling pathway (TrkB receptor, AKT, MAPK, phospho-AKT, and phospho-MAPK), Na^+,K^+-ATPase activity, and glucocorticoid receptors. Due to the effects of HFD on the stress response, our hypothesis was that these factors would interact, changing the outcome that is observed when they are applied alone.

2. Material and methods

2.1. Experimental subjects

All animal proceedings were performed in strict accordance to the recommendations of the Brazilian Society for Neurosciences (SBNeC) and Brazilian Law on the use of animals (Federal Law 11.794/2008), and were approved by the Institutional Ethical Committee (CEUA-UFRGS #25488). All efforts were made to minimize animal suffering, as well as to reduce the number of animals used. Animals were housed in home cages made of Plexiglas (65 × 25 × 15 cm) with the floor covered with sawdust, and maintained on a standard 12 h dark/light cycle (lights on between 7:00 h and 19:00 h), temperature of 22 ± 2 °C. On postnatal day (PND) 21, Wistar rats were weaned and only male pups were used in this study. Half of the animals were housed in groups of 4 per cage, the other half were subjected to stress by social isolation (one animal in a smaller home cage, 27 × 17 × 12 cm) (Douglas et al., 2004). Isolation stress was applied during one week, between postnatal days (PND) 21–28. On PND 28, isolated animals were returned to the regular home cages (65 × 25 × 15 cm) in groups of four. Each group (control or stressed) was subdivided into 2 other groups, according to the diet: (1) receiving standard lab chow (50% carbohydrate, 22% protein and 4% fat) or (2) receiving *ad libitum* both standard chow plus HFD (25% carbohydrate, 28% protein and 42% fat). Therefore, animals from this group could choose from the two diets available. Animals were maintained on these diets until adulthood. Only one animal per litter was used per group. These procedures resulted in four experimental groups: controls receiving standard chow (control-chow); controls receiving standard chow plus high-fat diet (control-HFD); isolated animals receiving standard chow (stressed-chow); and isolated animals receiving standard chow plus HFD (stressed-HFD). The results were quantified by an investigator blind to the experimental group. Beginning on PND 60, the following behavioral tests were performed in different days: Exposure to the open field and novel object recognition task (same animals), and spontaneous alternation (others animals), (see timeline in Fig. 1A). One week after finishing the behavioral tests, each animal was euthanized by decapitation between 1:00PM to 3:00PM, and the brain was removed, dissected on ice, and a coronal slice of the prefrontal cortex was taken (Bregma +3.70 to +2.20), and punched bilaterally at L = 0.6 and V = 4.6 mm (Bakker et al., 2015; Calabrese et al., 2013; Paxinos, 1998). The punches were immediately frozen and stored at −80 °C for further biochemical evaluations.

We have demonstrated in a previous work (Arcego et al., 2014), the animals with both diets access, consumed more HFD compared to standard chow, but this is not reflected in a higher caloric intake (see supplementary material Fig. S1 in the online version at DOI:10.1016/j.ijdevneu.2016.03.001). However, animals with HFD had more abdominal fat, particularly in the stressed group with HFD, which is reflected in higher weight gain in these animals.

Supplementry material related to this article found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.03.001.

2.2. High fat diet

The high fat diet (HFD) used in the study was enriched with fat (42%) from lard and soy oil. In addition, this diet contained vitamins and a salt mixture, purified soy protein, methionine, lysine and starch, in according with Arcego et al. (2014).

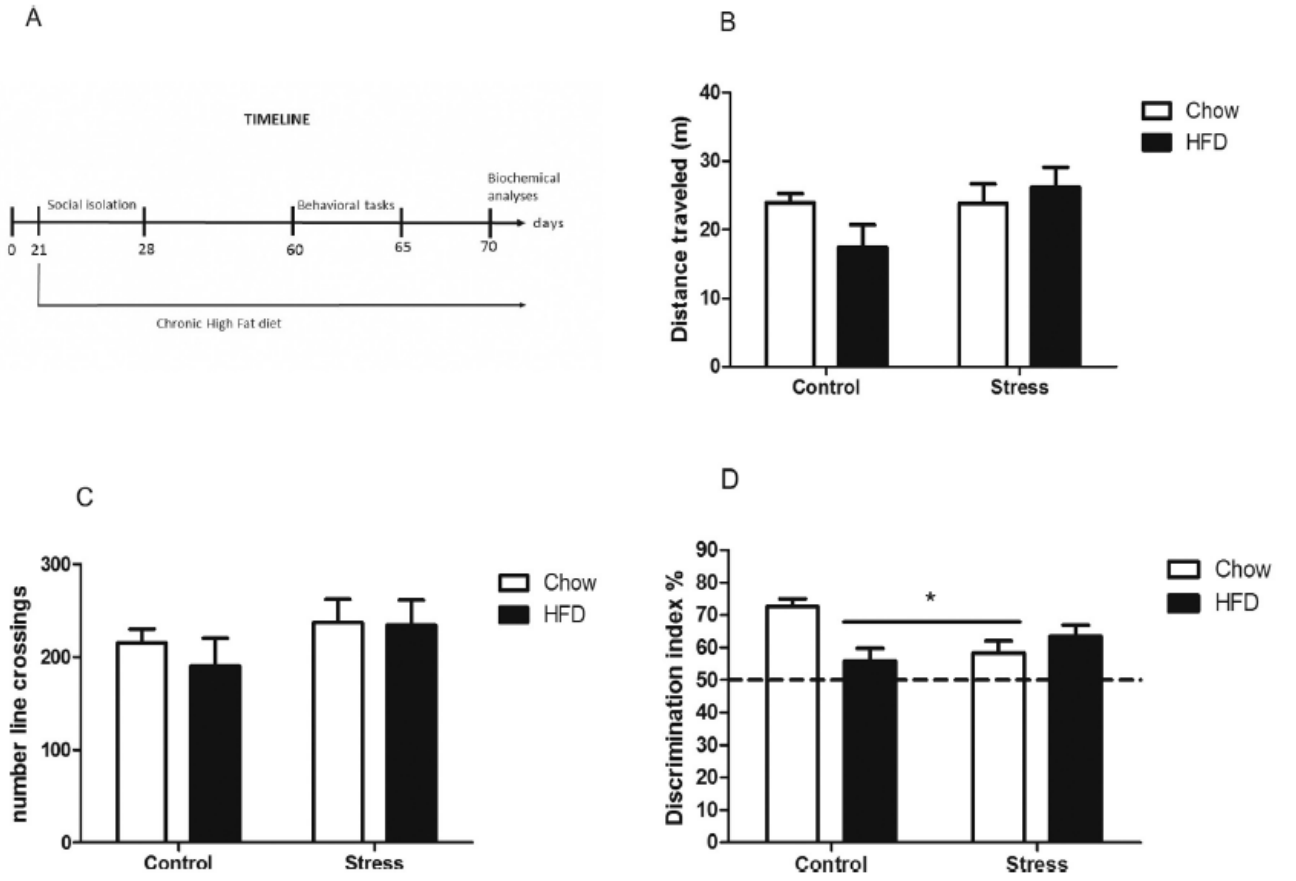

Fig. 1. Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD), on the performance in an open field (first exposition), and on the discrimination index in novel object recognition in the adulthood (A) Timeline (B) Distance traveled (C) Crossings (D) Discrimination index in novel object recognition. Data are expressed as mean ± SEM. N = 8 for Control-Chow, Control-HFD and Stressed-HFD; N = 10 for Stressed-Chow. No significant differences were found between the groups for distance traveled and crossings ($P > 0.05$). Discrimination index represents the percentage of time spent exploring the novel object. A two-way ANOVA showed an interaction between stress and diet ($P = 0.003$). * different from Control-Chow group (Tukey post hoc test, $P < 0.05$).

2.3. Behavioral tests

Before each behavioral task, rats were placed in the test room (temperature 21 ± 2 °C) for one hour to allow habituation with the environment and researcher. The behavior in the open field, the novel object recognition task, and spontaneous alternation was recorded and analyzed (only open field) using the ANY-Maze video-tracking system (Stoelting, CO). Between each trial, apparatuses were cleaned with ethanol 70%.

2.3.1. Open field exposure

Open field exposure was used to evaluate locomotor activity in a new environment. A 50-cm high, 50 × 50-cm open field was used. The floor was subdivided with white lines into 16 equal 12.5- by 12.5-cm squares, and each animal was gently placed facing the left corner and allowed to explore the arena for 10 min, in two consecutive days. The performance was observed and the distance traveled (m) and crossings were evaluated during the two exposures. The same apparatus was used in the novel object recognition task, and was also considered as a habituation trial for that task.

2.3.2. Novel object recognition task

The novel object recognition task was based on Ennaceur and Delacour (1988) and adapted from the task previously described by Ouchi et al. (2013). This test was used to evaluate the rodents' ability to recognize a novel object in the environment. It consists of 3 phases: habituation, training and testing. In habituation (before training), all animals were exposed to an open-field arena for 10 min without objects during two days. In the training phase (after 24 h the last habituation session), the animal was placed in the open-field arena containing two identical objects, arranged separately (two balls or two towers of Lego® bricks), for 5 min. To prevent coercion to explore the objects, rodents were released against the center of the opposite wall with its back to the objects. Then, animals returned to a separate housing box and one of the objects was changed. After 15 min the animal was again placed in the same arena (test phase) with two objects, one equal to the previously explored objects and one novel object, and it was left to explore them for 5 min. After each trial, objects were cleaned in an attempt to remove any olfactory cues. To prevent preference for a particular object, the objects used as new or familiar ones changed between subjects. The exploration time of the familiar and the new objects was compared. Exploration time was defined as the time when the animal's nose was directed towards the object at a distance of no more than 2 cm and/or touching the object with the nose and paws (Hernandez-Rapp et al., 2015). If the animal climbed on top of the object, this period was not included in the exploration time. The total exploration time of both objects in both trials was calculated. The results are expressed as a % discrimination index, defined as the time spent exploring the novel object/total time exploring objects (familiar + new) × 100. It was taken as a memory index to the task an increase in the exploration time of the novel object compared to the familiar object (Ouchi et al., 2013).

2.3.3. Spontaneous alternation

The spontaneous alternation test in the Y-maze is widely used as a tool for assessing the sensory/attention and cognitive functions like, working memory, in rodents. This task is based on the natural tendency of rodents to alternate successive choices of the Y-maze arms (Hughes, 2004). The apparatus used have three sym-

metrical arms (each arm: 49 cm long × 13 cm wide × 33 cm high), placed in a room illuminated with 40 lux. The spontaneous alternation task was based on Kunisawa et al. (2015).The animal was placed in the middle of the Y-maze and allowed to freely explore the apparatus for 8 min in a single session. The Y-maze had any hint or reward. It is considered alternation when the animal moves to the other two arms without repetition (as ABC, ACB, BAC, CBA, BCA). It was considered an arm entry as the hind paws of the rats being completely within the arm. If the animal remained immobile for more than 2 min was excluded the test. The percentage alternation was calculated by: (number of alternations/total number of arm entries-2) × 100.

2.4. Biochemical analysis

2.4.1. Na^+,K^+-ATPase activity assay

For Na^+,K^+-ATPase activity determination, prefrontal cortex was homogenized in 10 vol (w:v) of 0.32 M sucrose solution containing 5 mM HEPES and 1 mM EDTA, pH 7.4. The homogenates were centrifuged at 1000*g* for 10 min and the supernatants were used. The reaction mixture contained 5 mM $MgCl_2$, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, and 40 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, in a final volume of 200 μl. The reaction started by the addition of ATP (disodium salt, vanadium free) to a final concentration of 3 mM. Control was assayed under the same conditions with the addition of 1 mM ouabain. Na^+,K^+-ATPase activity was calculated by the difference between the two assays (de Souza Wyse et al., 2000; Tsakiris and Deliconstantinos, 1984). Released inorganic phosphate (Pi) was measured by the method of Chan et al. (1986). Enzyme specific activities were expressed as nmol Pi released per minute per milligram of protein [evaluated according to Bradford (1976)]. All assays were performed in duplicate, and the mean was used for statistical analysis.

2.4.2. Brain derived neurotrophic factor (BDNF) assay

Prefrontal cortex BDNF levels were measured by sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, using a commercial kit (BDNF Emax® Immunoassay system, Promega, USA). Briefly, prefrontal cortex were homogenized 1:10 in a lysis buffer pH 7.9 containing 137 mM NaCl, 2.5 M KCl, 10 mM Hepes, 0.6 mm EDTA, 1% SDS, 10% glycerol and 1% protease inhibitor cocktail (PIC). Microtiter plates (96-well, flat-bottomed) were coated for 24 h with anti-BDNF, sample and standards were diluted in sample diluent, and ranged from 7.8 to 500 pg of BDNF. Sequential processing of the samples was performed according to manufacturer instructions, and the results were expressed as pg BDNF/mg protein [determined by the method described by Lowry et al. (1951)].

2.4.3. Western blot

Prefrontal cortex was homogenized in ice-cold lysis buffer pH 7.9: 2.5 M KCl, 10 mM Hepes, 0.6 mM EDTA, 0.1% NP 40 and 1% protease inhibitor cocktail (PIC). Equal protein concentrations (40 μg/lane of total protein, determined using a commercial kit BCA Protein Assay [Thermo Scientific, U.S.A]) were loaded onto NuPAGE® 4–12% Bis-Tris Gels. After electrophoresis, proteins were transferred (XCell SureLock® Mini-Cell, Invitrogen) to nitrocellulose membranes (1 h at 50 V in transfer buffer [48 mM Trizma, 39 mM glycine, 20% methanol, and 0.25% SDS]) (Valentim et al., 2001). The blot was submitted to 2 h incubation in blocking solution (TBS plus 5% bovine serum albumin). After incubation, the blot was incubated overnight at 4 °C in blocking solution containing one of the following antibodies: anti-TrkB (1:1000, Milipore), anti-glucocorticoid receptor (GR, 1:1000; Sigma), anti-AKT (1:1000, Cell Signaling), anti-phospho-AKT (Ser473, 1:1000, Cell Signaling), anti-MAPK 1/2 (1:1000; Milipore), anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204, 1:1000, Cell Signaling), and anti-β-actin (1:2000, Milipore). The blot was then washed three times for 5 min with T-TBS and incubated for 2 h in solution containing peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (1:1000, Millipore). The blot was again washed four times for 5 min with T-TBS and then left in TBS. The blot was developed using a chemiluminescence ECL kit (Amersham, Oakville, Ontario). The chemiluminescence was detected using a digital imaging system (Image Quant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences) and analyzed using the Image J Software. Results were expressed as the ratio of intensity of the protein of interest to that of 1:2000 anti-β-actin (Milipore) from the same membrane.

2.5. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM of the mean, and analyzed using two-way ANOVA, with isolation stress and diet as factors. ANOVA tests were followed by the Tukey multiple range test, when indicated. All analyses were performed using IBM SPSS Statistic 22 software and significance level was set at $P < 0.05$ for all analyses.

3. Results

3.1. Behavioral results

Fig. 1 shows the results from exposure to the open field. No significant differences in number of crossings and distance traveled were observed between the groups in the first (Fig. 1B and C, respectively, $P > 0.05$) and second day (see supplementary material Fig. S2 in the online version at DOI: 10.1016/j.ijdevneu.2016.03.001, $P > 0.05$) of exposure to open field, showing that these animals had no difference in locomotor activity.

Supplementry material related to this article found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.03.001.

The novel object recognition task was carried out to assess short-term memory. In the training phase (two identical objects) there was no difference in the time exploring the two objects and there were no differences between groups (see Table 1, $P > 0.05$), consequently all groups explored the two objects by chance. In contrast, in the testing phase (familiar object × novel object), there was an interaction between stress and diet in the time in a new object ($P = 0.01$, $F[1,30] = 7.67$) and in the discrimination index ($P = 0.003$, $F[1,30] = 10.10$, followed by Tukey post-hoc). Groups exposed to stress only or to HFD only had decreased discrimination index, while the group receiving both treatments was not difference from the control-chow group (see Fig. 1D).

The spontaneous alternation in Y-maze was performed for evaluating working memory (Fig. 2). The stressed animals showed a reduced in percentage of spontaneous alternation ($P = 0.048$, $F[1,29] = 4.25$),(Fig. 2A), no interaction stress × HFD, and no HFD effect were observed ($P > 0.05$). There were no differences between the number of entries in the Y-maze arms during the 8-min task ($P > 0.05$ Fig. 2B).

3.2. Biochemical results

Changes in Na^+,K^+-ATPase activity and BDNF are important in learning and memory (Andero et al., 2014; Petzold et al., 2015; Sato et al., 2004). Therefore we evaluated the possible correlation of Na^+,K^+-ATPase activity and BDNF with behavioral findings. There was a significant interaction between stress and diet ($P = 0.001$, $F[1,24] = 13.04$, followed by Tukey post-hoc) on Na^+,K^+-ATPase activity, since the stress, during the prepubertal period reduced Na^+,K^+-ATPase activity in the adult prefrontal cortex, but in stressed animals with access to HFD, this enzyme activity increased (see Fig. 3). The BDNF levels in adult prefrontal cortex, also presented an interaction between stress and diet ($P = 0.048$, $F[1,15] = 4.63$, followed by Tukey post-hoc; see Fig. 4). Levels were reduced with

Table 1
Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD) in novel object recognition in adult rats.

	Training		Test	
	Time in the object A	Time in the object B	Time in new object	Time in familiar object
Control-Chow	21.66 ± 2.39	23.85 ± 3.12	29.35 ± 3.18	12.12 ± 2.31
Control-HFD	19.47 ± 2.91	24.76 ± 6.40	14.73 ± 3.02	12.08 ± 3.40
Stressed-Chow	22.01 ± 3.64	28.48 ± 3.62	24.25 ± 5.71	16.53 ± 4.51
Stressed-HFD	21.68 ± 2.28	28.44 ± 3.75	36.35 ± 5.77	20.20 ± 3.48

Time in the objects was expressed in seconds. Data are expressed as mean ± SEM, N = 8 for Control-Chow, Control-HFD and Stressed-HFD; N = 10 for Stressed-Chow. There was an interaction between stress and diet in the time in new object in test phase (Two-way ANOVA, P = 0.01).

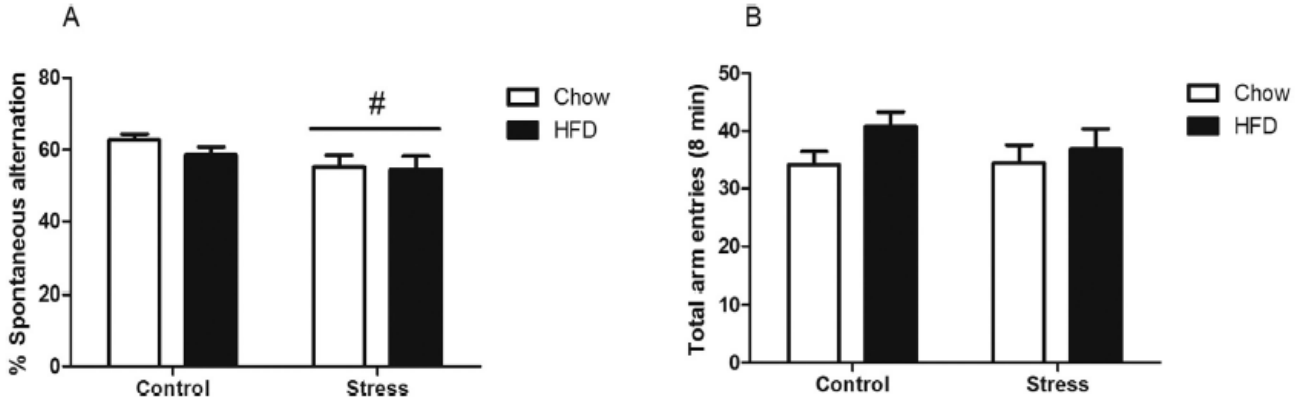

Fig. 2. Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD), on the spontaneous alternation in adult rats. Data are expressed as mean ± SEM. N = 8 for Control-Chow, Control-HFD and Stressed-HFD; N = 9 for Stressed-Chow. (A) Percentage of spontaneous alternation (B) total number entries. A two-way ANOVA showed an effect of stress (P = 0.048) in percentage of spontaneous alternations and no significant differences were found in total number of entries in arms (P > 0.05). # stressed animals are significantly different from non-stressed animals (two-way ANOVA).

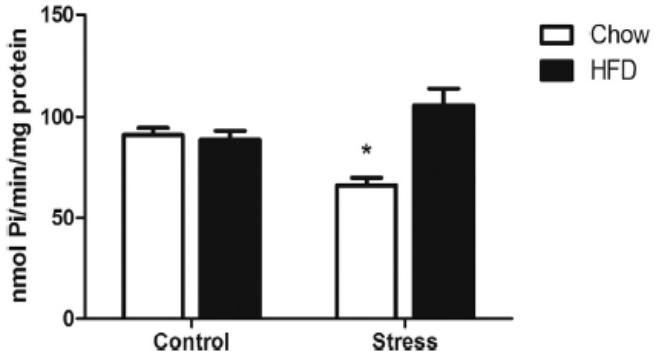

Fig. 3. Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD), on Na+,K+ATPase activity in prefrontal cortex of adult rats. Data are expressed as mean ± SEM. N = 7 for Control-Chow and Stressed-Chow; N = 6 for Control-HFD; and N = 8 for Stressed-HFD. Two-way ANOVA showed an interaction between stress and diet (P = 0.001). *different from the other groups (Tukey post hoc test, P < 0.05).

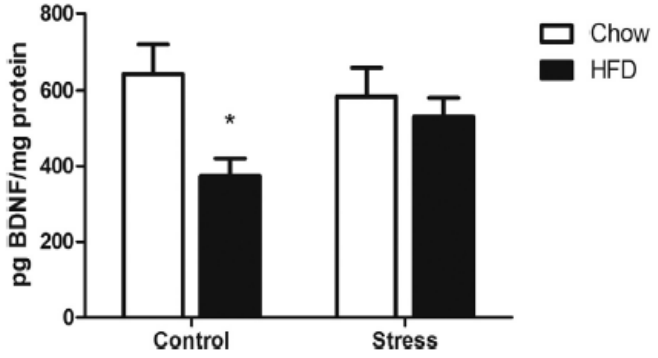

Fig. 4. Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD), on BDNF levels in prefrontal cortex of adult rats. Data are expressed as mean ± SEM. N = 4 for Control-Chow and Stressed-Chow; N = 6 for Control-HFD; and N = 5 for Stressed-HFD. Two-way ANOVA showed an interaction between stress and diet (P = 0.048). *different from Control-Chow group (Tukey post hoc test, P < 0.05).

HFD; however, in the group exposed to stress and receiving HFD, BDNF levels were not different from the control-chow group.

The immunocontents of the BDNF receptor (TrkB) and the glucocorticoid receptor (GR) in the adult prefrontal cortex were similar for all groups (P > 0.05, see Fig. 5). Since BDNF levels showed an interaction between stress and diet, we evaluated the intracellular cascade, which is activated by the interaction of BDNF with its receptor TrkB. As is displayed in Fig. 6, interactions between stress and HFD were observed both in the immunocontent of the MAPK (P = 0.02, F[1,20] = 6.59, followed by Tukey post-hoc), AKT (P = 0.02, F[1,20] = 6.36), and phospho-AKT (P = 0.01, F[1,21] = 7.62, followed by Tukey post-hoc), since the effects of these factors when isolated were distinct from their effect when both factors were presented simultaneously. The immunocontents of phospho-MAPK, and the ratio phospho-MAPK/MAPK, phospho-AKT/AKT were similar for all groups (P > 0.05, see Fig. 6C, E, and F).

4. Discussion

Emotional and cognitive behaviors are influenced by experiences during sensitive periods of development, like infancy, prepuberty and adolescence. In this study, social isolation in the prepubertal period impaired short-term memory and working memory in adulthood. Animals taking high-fat diet presented impairment only in short-term memory in a novel object discrimination task. However, our results showed that stress and HFD when applied together caused a slight improvement on the performance of short-term memory. This interaction between stress and chronic consumption of HFD was also observed in several of the parameters measured involved in cellular function, such as Na^+,K^+-ATPase activity, or with neural plasticity, as BDNF levels and proteins related to its intracellular cascade. Interestingly, in all cases, the stressed group receiving HFD showed similar results to the control group.

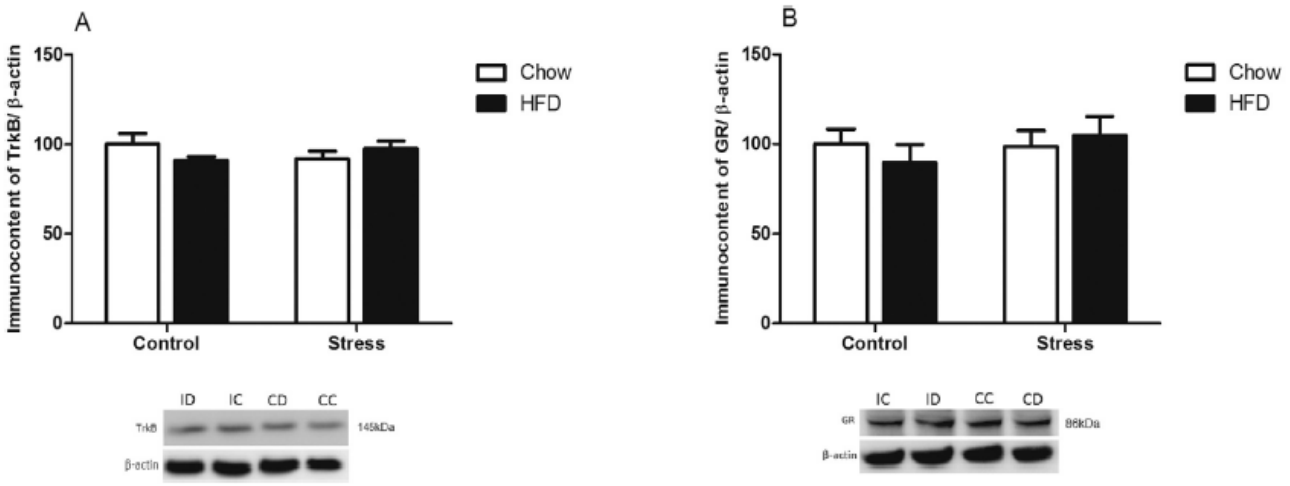

Fig. 5. Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD), on TrkB and Glucocorticoid receptor evaluated by Western blot, in prefrontal cortex of adult rats. Data are expressed as mean ± SEM. (A) TrkB receptor; N = 6/group. (B) Glucocorticoid receptor; N = 5 for Control-Chow and Stressed-HFD; N = 4 for Control-HFD; and N = 6 for Stressed-Chow. No significant differences were found between the groups for TrkB and Glucocorticoid receptor ($P > 0.05$). CC: Control-Chow; CD: Control-HFD; IC: Stressed-Chow; ID: Stressed-HFD.

According to our findings, events early in life, such as the chronic high caloric diet intake beginning at weaning, or social isolation stress induced impairments in short-term memory in a novel object recognition task. This task is based on the natural tendency of rodents to explore new environments and/or new objects. The novel object recognition task is a non-spatial memory, and it requires a series of cognitive operations, such as perception, discrimination, identification and comparisons (Warburton and Brown, 2015). It is important to note that the behavioral effects observed are not related to altered locomotion, since no differences were observed in the open field exploration. Previous studies using high caloric diet have also reported that its intake may lead to a cognitive deficit and memory impairment, when offered either in a short (Kaczmarczyk et al., 2013) or long-term period (Kosari et al., 2012; Wang et al., 2015). This result could be related to the lower levels of BDNF, which was observed in the present study. BDNF is a neurotrophin involved in neuronal survival, differentiation and synaptic plasticity, which is important for learning and memory processes (Tapia-Arancibia et al., 2004). Other studies have also observed that high caloric diets may reduce BDNF in prefrontal cortex in rodents (Camer et al., 2015; Kanoski et al., 2007). Interestingly, animals receiving HFD only have deficit in novel object recognition, with no significant difference in working memory measured in the spontaneous alternation. It is known that the prefrontal cortex is involved in working memory, observed by differences in neuronal firing patterns recorded in the prefrontal cortex in rodents when perform in working memory task (Fujisawa and Buzsaki, 2011; Goldman-Rakic, 1995; Pfefferbaum et al., 2001). It is possible that these different interventions, such as stress or ingestion of HFD, during development, may affect differently the prefrontal cortex by changing functions involved in different memory process related to this structure. In addition, it is important to observe the two tasks evaluated in the present study use different brain circuits. The role of the rodent medial prefrontal cortex is well recognized in the working memory; however, in object recognition memory, its role has been intensively debated (Gonzalez et al., 2014; Pezze et al., 2015; Warburton and Brown, 2015). Recent studies have suggested that lesions of the medial prefrontal cortex do not produce such severe impairment in this particular task of recognition memory, and that this structure would have an important role in tasks in which integration of object and spatial location information is needed (Barker et al., 2007).

Long-term social stress also has been implicated in cognitive deficits and memory impairment (Gaskin et al., 2014; Jones et al., 2011; McIntosh et al., 2013; Watson et al., 2012). However, we are the first to demonstrate that an early social isolation (one week only) in the prepubertal period leads to a deficit in short-term and working memory in adulthood. It is important to note that this sensitive period of development requires higher energy, since the brain is in a constant process of organizing and of neural maturation. This is true especially for the prefrontal cortex, which has a characteristic late maturation and is sensitive to external factors such as diet and stress (Krolow et al., 2012; Sherman et al., 2014). The present study showed that the effects of stress alone were different in some responses when associated with a chronic HFD, indicating that different environmental interventions in high plasticity periods may program distinct outcomes in adulthood.

The association between stress and HFD also increased Na^+,K^+-ATPase activity in the prefrontal cortex. Na^+,K^+-ATPase activity is necessary to maintain the ionic gradient for neural excitability, plasticity, function and cell survival. Its activity is important for processes related with memory, and, consequently, the reduced activity of this enzyme is associated with memory impairment (Abdalla et al., 2014; Jaques et al., 2013; Wyse et al., 2004). In this study, the increased activity of this pump can be associated with better performance in novel object recognition, but not in spontaneous alternation. When we analyze the effect of social isolation without influence of HFD, we observed a decrease in Na^+,K^+-ATPase activity. This may be associated with a lower neuronal excitability that could be affecting the performance of these animals in the memory tasks evaluated, both of short duration. Since the stress was applied in early life and we observed changes in early adulthood, this finding suggests that stress in the prepubertal period may program the prefrontal cortex of these animals, leading to long-term changes. Moreover, in the groups receiving chronic HFD, both stressed or not, the activity of Na^+,K^+-ATPase was similar to the control group. It is known that modifications in the membrane fatty acid profile will translate into effects in Na^+,K^+-ATPase activity (Rodrigo et al., 2014). It is possible that a chronic administration of a HFD could be causing some alteration in membrane fluidity, changing the activity of this pump.

The most striking observation of the present results was that, when both factors (social isolation during the prepubertal period and access to a high fat diet) were applied together, interactions were observed in several of the parameters evaluated, both behavioral and neurochemical ones, and these interactions always showed that animals isolated in prepubertal period with access to HFD had results which were similar to the control group. This inter-

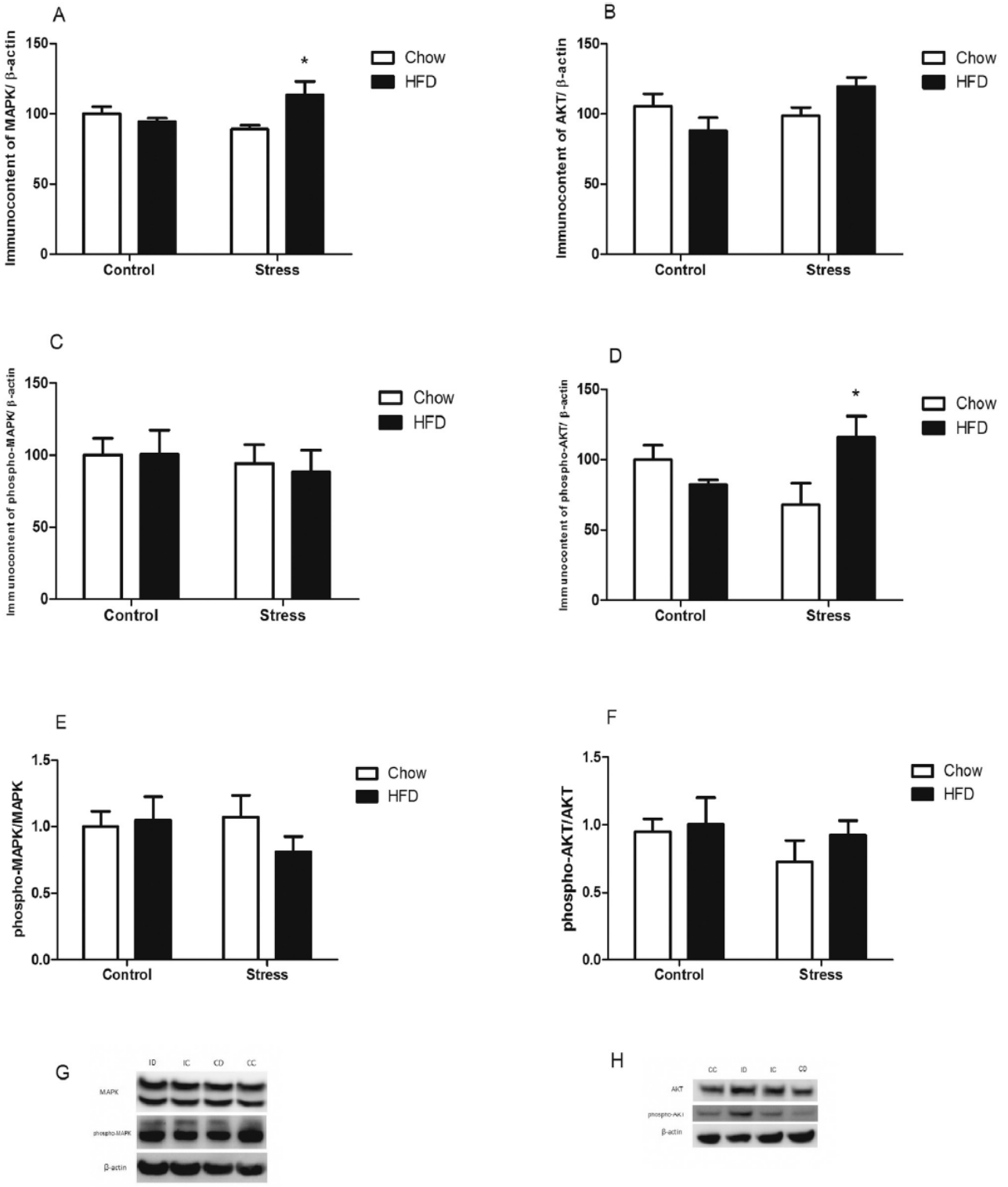

Fig. 6. Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD), on AKT and MAPK immunocontents (total and phosphorylated forms), evaluated by Western blot, in prefrontal cortex of adult rats. Data are expressed as mean ± SEM. (A) MAPK; N = 6/group. (B) AKT; N = 6/group (C) Phospho-MAPK; N = 6/group (D) Phospho-AKT, N = 6 for Control-Chow; N = 5 for Control-HFD, Stressed-Chow and Stressed-HFD (E) Phospho-MAPK/MAPK, N = 6/group (F) Phospho-AKT/AKT N = 6/group. Two-way ANOVA showed an interaction between stress and diet for MAPK ($P = 0.02$), AKT ($P = 0.02$) and phospho-AKT immunocontents ($P = 0.01$). CC: Control-Chow; CD: Control-HFD; IC: Stressed-Chow; ID: Stressed-HFD. *different from the respective Stressed-Chow group (Tukey post hoc test, $P < 0.05$).

action was observed for Na^+,K^+-ATPase activity, for BDNF levels, as well as for intracellular signaling cascades activated by BDNF. In the case of the mitogen-activated protein/signal-regulated kinase extracellular (MAPK/ERK), an interaction was only observed in its total immunocontent, and not in its phosphorylated form; on the other hand, AKT, a serine/threonine kinase, involved in the signaling pathway of BDNF (Patapoutian and Reichardt, 2001), showed interactions both in its total immunocontent and in its phosphorylated form. Further studies are needed to evaluate whether this pathway is related to the behavioral effects observed.

Another possible explanation for the interaction between stress and access to HFD observed here could involve the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, which may be a central mediator between stress and diet effects. Key signaling molecules of the HPA axis, as the glucocorticoid receptor (GR) and corticotrophin-releasing hormone (CRH) receptor, are susceptible

to environment influences. Some studies show that HFD intake alters some mediators of HPA axis, including GR expression, and post-stress plasma corticosterone levels in rats (Abildgaard et al., 2014; Auvinen et al., 2012; Laryea et al., 2015; McNeilly et al., 2015). In our study, however, no significant differences in glucocorticoid receptor (GR) immunocontent in the adult prefrontal cortex were found between groups. In relation to isolation stress, a previous study from our group (Arcego et al., 2014) showed that the adrenal weight was slightly increased in adult animals exposed to social isolation in the prepubertal period. In addition, acute social isolation (72 h) in rodents, increases plasma corticosterone (Kamal et al., 2014), indicating that these animals have an increased in HPA axis activation, thus releasing higher levels of glucocorticoids. In one previous study, we found increased plasma leptin levels in animals receiving HFD, while leptin was decreased in animals exposed to social isolation during the prepubertal period (Arcego et al., 2014). Many components of the HPA axis contain leptin receptors, and some studies have reported that leptin influences the stress responses. For example, leptin treatment blocks the increase in ACTH and corticosterone levels following stress (Heiman et al., 1997), decreases expression of mRNA CRH in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) (Arvaniti et al., 2001; Huang et al., 1998; Oates et al., 2000), and CRH release from the hypothalamus (Heiman et al., 1997). Thus, leptin appears to act by reducing HPA-responses to stress. It is possible that increased leptin levels in animals receiving HFD could reduce the activation of the HPA axis, and consequently minimize the effects of social isolation. Thereby, this interplay between HFD and hormones related to feeding behavior and stress consequences could contribute to the positive effect observed in this study on short-term memory in isolated animals receiving HFD. This possibility is supported by the theory that highly palatable foods rich in sugar and fats, can act reducing the HPA axis responses, and thereby reducing stress responses (Adam and Epel, 2007).

The present findings show that adverse experiences early in life, such as stress and highly caloric diet intake, may have notably negative effects on cognitive behavior, which may arise during prepuberty and persist into adulthood. The signaling pathway related to BDNF in the prefrontal cortex is sensitive to the effects of early life stress and HFD. However, more studies are needed to elucidate possible mechanisms involved in interplay of these two factors (stress and diet) on brain function. In view of the importance of the prefrontal cortex to the maturation of cognitive and emotional functions, the study of the mechanisms underlying the cognitive changes may help to understand the pathophysiology of some psychiatric disorders.

Acknowledgements

This work was financial supported by the National Research Council of Brazil (CNPq), and CAPES. We thank Dr. Maria Elisa Calcagnotto for helpful discussions.

References

Abdalla, F.H., Schmatz, R., Cardoso, A.M., Carvalho, F.B., Baldissarelli, J., de Oliveira, J.S., Rosa, M.M., Goncalves Nunes, M.A., Rubin, M.A., da Cruz, I.B., Barbisan, F., Dressler, V.L., Pereira, L.B., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Goncalves, J.F., Mazzanti, C.M., 2014. Quercetin protects the impairment of memory and anxiogenic-like behavior in rats exposed to cadmium: possible involvement of the acetylcholinesterase and Na(+), K(+)-ATPase activities. Physiol. Behav. 135, 152–167.

Abildgaard, A., Lund, S., Hougaard, K.S., 2014. Chronic high-fat diet increases acute neuroendocrine stress response independently of prenatal dexamethasone treatment in male rats. Acta Neuropsychiatr. 26, 8–18.

Adam, T.C., Epel, E.S., 2007. Stress, eating and the reward system. Physiol. Behav. 91, 449–458.

Andero, R., Choi, D.C., Ressler, K.J., 2014. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci. 122, 169–192.

Arcego, D.M., Krolow, R., Lampert, C., Noschang, C., Ferreira, A.G., Scherer, E., Wyse, A.T., Dalmaz, C., 2014. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. Physiol. Behav. 124, 23–32.

Arvaniti, K., Huang, Q., Richard, D., 2001. Effects of leptin and corticosterone on the expression of corticotropin-releasing hormone, agouti-related protein, and proopiomelanocortin in the brain of ob/ob mouse. Neuroendocrinology 73, 227–236.

Auvinen, H.E., Romijn, J.A., Biermasz, N.R., Pijl, H., Havekes, L.M., Smit, J.W., Rensen, P.C., Pereira, A.M., 2012. The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. J. Endocrinol. 214, 191–197.

Bakker, R., Tiesinga, P., Kotter, R., 2015. The scalable brain atlas: instant web-based access to public brain atlases and related content. Neuroinformatics 13, 353–366.

Barker, G.R., Bird, F., Alexander, V., Warburton, E.C., 2007. Recognition memory for objects, place, and temporal order: a disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. J. Neurosci. 27, 2948–2957.

Bennett, M.R., Lagopoulos, J., 2014. Stress and trauma: bDNF control of dendritic-spine formation and regression. Prog. Neurobiol. 112, 80–99.

Blakemore, S.J., Choudhury, S., 2006. Development of the adolescent brain: implications for executive function and social cognition. J. Child Psychol. Psychiatry 47, 296–312.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.

Burggren, W.W., Mueller, C.A., 2015. Developmental critical windows and sensitive periods as three-dimensional constructs in time and space *. Physiol. Biochem. Zool. 88, 91–102.

Buwalda, B., Blom, W.A., Koolhaas, J.M., van Dijk, G., 2001. Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. Physiol. Behav. 73, 371–377.

Calabrese, E., Badea, A., Watson, C., Johnson, G.A., 2013. A quantitative magnetic resonance histology atlas of postnatal rat brain development with regional estimates of growth and variability. Neuroimage 71, 196–206.

Camer, D., Yu, Y., Szabo, A., Fernandez, F., Dinh, C.H., Huang, X.F., 2015. Bardoxolone methyl prevents high-fat diet-induced alterations in prefrontal cortex signalling molecules involved in recognition memory. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 59, 68–75.

Chan, K.M., Delfert, D., Junger, K.D., 1986. A direct colorimetric assay for Ca2+ −stimulated ATPase activity. Anal. Biochem. 157, 375–380.

Choy, K.H., de Visser, Y., Nichols, N.R., van den Buuse, M., 2008. Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. Hippocampus 18, 655–667.

Crone, E.A., 2009. Executive functions in adolescence: inferences from brain and behavior. Dev. Sci. 12, 825–830.

Cui, Y., Shu, Y., Zhu, Y., Shi, Y., Le, G., 2012. High-fat diets impair spatial learning of mice in the Y-maze paradigm: ameliorative potential of alpha-lipoic acid. J. Med. Food 15, 713–717.

Douglas, L.A., Varlinskaya, E.I., Spear, L.P., 2004. Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social versus isolate housing of subjects and partners. Dev. Psychobiol. 45, 153–162.

Ennaceur, A., Delacour, J., 1988. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1 Behavioral data. Behav. Brain Res. 31, 47–59.

Fabricius, K., Helboe, L., Fink-Jensen, A., Wortwein, G., Steiniger-Brach, B., 2011. Pharmacological characterization of social isolation-induced hyperactivity. Psychopharmacology (Berl.) 215, 257–266.

Francis, H.M., Stevenson, R.J., 2011. Higher reported saturated fat and refined sugar intake is associated with reduced hippocampal-dependent memory and sensitivity to interoceptive signals. Behav. Neurosci. 125, 943–955.

Fujisawa, S., Buzsaki, G., 2011. A 4Hz oscillation adaptively synchronizes prefrontal, VTA, and hippocampal activities. Neuron 72, 153–165.

Gaskin, P.L., Alexander, S.P., Fone, K.C., 2014. Neonatal phencyclidine administration and post-weaning social isolation as a dual-hit model of 'schizophrenia-like' behaviour in the rat. Psychopharmacology (Berl.) 231, 2533–2545.

Gogtay, N., Giedd, J.N., Lusk, L., Hayashi, K.M., Greenstein, D., Vaituzis, A.C., Nugent 3rd, T.F., Herman, D.H., Clasen, L.S., Toga, A.W., Rapoport, J.L., Thompson, P.M., 2004. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 8174–8179.

Goldman-Rakic, P.S., 1995. Cellular basis of working memory. Neuron 14, 477–485.

Gonzalez, B., Raineri, M., Cadet, J.L., Garcia-Rill, E., Urbano, F.J., Bisagno, V., 2014. Modafinil improves methamphetamine-induced object recognition deficits and restores prefrontal cortex ERK signaling in mice. Neuropharmacology 87, 188–197.

Granholm, A.C., Bimonte-Nelson, H.A., Moore, A.B., Nelson, M.E., Freeman, L.R., Sambamurti, K., 2008. Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. J. Alzheimers Dis. 14, 133–145.

Groeneweg, F.L., Karst, H., de Kloet, E.R., Joels, M., 2012. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. Mol. Cell. Endocrinol. 350, 299–309.

Heiman, M.L., Ahima, R.S., Craft, L.S., Schoner, B., Stephens, T.W., Flier, J.S., 1997. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. Endocrinology 138, 3859–3863.
Hernandez-Rapp, J., Smith, P.Y., Filali, M., Goupil, C., Planel, E., Magill, S.T., Goodman, R.H., Hebert, S.S., 2015. Memory formation and retention are affected in adult miR-132/212 knockout mice. Behav. Brain Res. 287, 15–26.
Hoeijmakers, L., Lucassen, P.J., Korosi, A., 2014. The interplay of early-life stress, nutrition, and immune activation programs adult hippocampal structure and function. Front. Mol. Neurosc. 7, 103.
Hong, S., Flashner, B., Chiu, M., ver Hoeve, E., Luz, S., Bhatnagar, S., 2012. Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. Physiol. Behav. 105, 269–275.
Huang, Q., Rivest, R., Richard, D., 1998. Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. Endocrinology 139, 1524–1532.
Hughes, R.N., 2004. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. Neurosci. Biobehav. Rev. 28, 497–505.
Jaques, J.A., Doleski, P.H., Castilhos, L.G., da Rosa, M.M., Souza Vdo, C., Carvalho, F.B., Marisco, P., Thorstenberg, M.L., Rezer, J.F., Ruchel, J.B., Coradini, K., Beck, R.C., Rubin, M.A., Schetinger, M.R., Leal, D.B., 2013. Free and nanoencapsulated curcumin prevents cigarette smoke-induced cognitive impairment and redox imbalance. Neurobiol. Learn. Mem. 100, 98–107.
Jones, C.A., Brown, A.M., Auer, D.P., Fone, K.C., 2011. The mGluR2/3 agonist LY379268 reverses post-weaning social isolation-induced recognition memory deficits in the rat. Psychopharmacology (Berl.) 214, 269–283.
Kaczmarczyk, M.M., Machaj, A.S., Chiu, G.S., Lawson, M.A., Gainey, S.J., York, J.M., Meling, D.D., Martin, S.A., Kwakwa, K.A., Newman, A.F., Woods, J.A., Kelley, K.W., Wang, Y., Miller, M.J., Freund, G.G., 2013. Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice. Psychoneuroendocrinology 38, 1553–1564.
Kamal, A., Ramakers, G.M., Altinbilek, B., Kas, M.J., 2014. Social isolation stress reduces hippocampal long-term potentiation: effect of animal strain and involvement of glucocorticoid receptors. Neuroscience 256, 262–270.
Kanoski, S.E., Meisel, R.L., Mullins, A.J., Davidson, T.L., 2007. The effects of energy-rich diets on discrimination reversal learning and on BDNF in the hippocampus and prefrontal cortex of the rat. Behav. Brain Res. 182, 57–66.
Knudsen, E.I., 2004. Sensitive periods in the development of the brain and behavior. J. Cogn. Neurosci. 16, 1412–1425.
Kolb, B., Mychasiuk, R., Muhammad, A., Li, Y., Frost, D.O., Gibb, R., 2012. Experience and the developing prefrontal cortex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (Suppl 2), 17186–17193.
Kosari, S., Badoer, E., Nguyen, J.C., Killcross, A.S., Jenkins, T.A., 2012. Effect of western and high fat diets on memory and cholinergic measures in the rat. Behav. Brain Res. 235, 98–103.
Krolow, R., Noschang, C., Weis, S.N., Pettenuzzo, L.F., Huffell, A.P., Arcego, D.M., Marcolin, M., Mota, C.S., Kolling, J., Scherer, E.B., Wyse, A.T., Dalmaz, C., 2012. Isolation stress during the prepubertal period in rats induces long-lasting neurochemical changes in the prefrontal cortex. Neurochem. Res. 37, 1063–1073.
Kunisawa, K., Nakashima, N., Nagao, M., Nomura, T., Kinoshita, S., Hiramatsu, M., 2015. Betaine prevents homocysteine-induced memory impairment via matrix metalloproteinase-9 in the frontal cortex. Behav. Brain Res. 292, 36–43.
Lante, F., de Jesus Ferreira, M.C., Guiramand, J., Recasens, M., Vignes, M., 2006. Low-frequency stimulation induces a new form of LTP, metabotropic glutamate (mGlu5) receptor- and PKA-dependent, in the CA1 area of the rat hippocampus. Hippocampus 16, 345–360.
Lapiz, M.D., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., Marsden, C.A., 2003. Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. Neurosci. Behav. Physiol. 33, 13–29.
Laryea, G., Arnett, M., Muglia, L.J., 2015. Ontogeny of hypothalamic glucocorticoid receptor-mediated inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in mice. Stress, 1–8.
Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265–275.
Marco, E.M., Macri, S., Laviola, G., 2011. Critical age windows for neurodevelopmental psychiatric disorders: evidence from animal models. Neurotox. Res. 19, 286–307.
McCormick, C.M., Mathews, I.Z., 2007. HPA function in adolescence: role of sex hormones in its regulation and the enduring consequences of exposure to stressors. Pharmacol. Biochem. Behav. 86, 220–233.
McEwen, B.S., 2008. Central effects of stress hormones in health and disease: understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. Eur. J. Pharmacol. 583, 174–185.
McIntosh, A.L., Ballard, T.M., Steward, L.J., Moran, P.M., Fone, K.C., 2013. The atypical antipsychotic risperidone reverses the recognition memory deficits induced by post-weaning social isolation in rats. Psychopharmacology (Berl.) 228, 31–42.
McNeilly, A.D., Stewart, C.A., Sutherland, C., Balfour, D.J., 2015. High fat feeding is associated with stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and reduced anxiety in the rat. Psychoneuroendocrinology 52, 272–280.
Morris, M.C., Evans, D.A., Bienias, J.L., Tangney, C.C., Wilson, R.S., 2004. Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. Neurology 62, 1573–1579.
Naninck, E.F., Hoeijmakers, L., Kakava-Georgiadou, N., Meesters, A., Lazic, S.E., Lucassen, P.J., Korosi, A., 2015. Chronic early life stress alters developmental and adult neurogenesis and impairs cognitive function in mice. Hippocampus 25, 309–328.
Noschang, C., Krolow, R., Arcego, D.M., Laureano, D., Fitarelli, L.D., Huffell, A.P., Ferreira, A.G., da Cunha, A.A., Machado, F.R., Wyse, A.T., Dalmaz, C., 2012. The influence of early life interventions on olfactory memory related to palatable food, and on oxidative stress parameters and Na+/K+-ATPase activity in the hippocampus and olfactory bulb of female adult rats. Neurochem. Res. 37, 1801–1810.
Oates, M., Woodside, B., Walker, C.D., 2000. Chronic leptin administration in developing rats reduces stress responsiveness partly through changes in maternal behavior. Horm. Behav. 37, 366–376.
Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K., Flegal, K.M., 2012. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US children and adolescents, 1999–2010. JAMA 307, 483–490.
Oomen, C.A., Soeters, H., Audureau, N., Vermunt, L., van Hasselt, F.N., Manders, E.M., Joels, M., Lucassen, P.J., Krugers, H., 2010. Severe early life stress hampers spatial learning and neurogenesis, but improves hippocampal synaptic plasticity and emotional learning under high-stress conditions in adulthood. J. Neurosci. 30, 6635–6645.
Ouchi, H., Ono, K., Murakami, Y., Matsumoto, K., 2013. Social isolation induces deficit of latent learning performance in mice: a putative animal model of attention deficit/hyperactivity disorder. Behav. Brain Res. 238, 146–153.
Patapoutian, A., Reichardt, L.F., 2001. Trk receptors: mediators of neurotrophin action. Curr. Opin. Neurobiol. 11, 272–280.
Paxinos, G.W.C., 1998. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. Academic Press, San Diego.
Pervanidou, P., Chrousos, G.P., 2007. Post-traumatic stress disorder in children and adolescents: from Sigmund Freud's trauma to psychopathology and the (Dys) metabolic syndrome. Horm. Metab. Res. 39, 413–419.
Petzold, A., Psotta, L., Brigadski, T., Endres, T., Lessmann, V., 2015. Chronic BDNF deficiency leads to an age-dependent impairment in spatial learning. Neurobiol. Learn. Mem. 120, 52–60.
Pezze, M.A., Marshall, H.J., Fone, K.C., Cassaday, H.J., 2015. Dopamine D1 receptor stimulation modulates the formation and retrieval of novel object recognition memory: role of the prelimbic cortex. Eur. Neuropsychopharmacol. 25, 2145–2156.
Pfefferbaum, A., Desmond, J.E., Galloway, C., Menon, V., Glover, G.H., Sullivan, E.V., 2001. Reorganization of frontal systems used by alcoholics for spatial working memory: an fMRI study. Neuroimage 14, 7–20.
Quan, M.N., Tian, Y.T., Xu, K.H., Zhang, T., Yang, Z., 2010. Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. Neuroscience 169, 214–222.
Rodrigo, R., Miranda-Merchak, A., Valenzuela Grau, R., Bachler, J.P., Vergara, L., 2014. Modulation of (Na,K)-ATPase activity by membrane fatty acid composition: therapeutic implications in human hypertension. Clin. Exp. Hypertens. 36, 17–26.
Roth, T.L., Sweatt, J.D., 2011. Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences. Horm. Behav. 59, 315–320.
Sato, T., Tanaka, K., Ohnishi, Y., Teramoto, T., Irifune, M., Nishikawa, T., 2004. Effects of steroid hormones on (Na+, K+)-ATPase activity inhibition-induced amnesia on the step-through passive avoidance task in gonadectomized mice. Pharmacol. Res. 49, 151–159.
Sherman, L.E., Rudie, J.D., Pfeifer, J.H., Masten, C.L., McNealy, K., Dapretto, M., 2014. Development of the default mode and central executive networks across early adolescence: a longitudinal study. Dev. Cogn. Neurosci. 10, 148–159.
Silveira, P.P., Portella, A.K., Benetti Cda, S., Zugno, A.I., Scherer, E.B., Mattos, C.B., Wyse, A.T., Lucion, A.B., Dalmaz, C., 2011. Association between Na(+), K(+)-ATPase activity and the vulnerability/resilience to mood disorders induced by early life experience. Neurochem. Res. 36, 2075–2082.
Takesian, A.E., Hensch, T.K., 2013. Balancing plasticity/stability across brain development. Prog. Brain Res. 207, 3–34.
Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., Arancibia, S., 2004. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. Front. Neuroendocrinol. 25, 77–107.
Tau, G.Z., Peterson, B.S., 2010. Normal development of brain circuits. Neuropsychopharmacology 35, 147–168.
Tsakiris, S., Deliconstantinos, G., 1984. Influence of phosphatidylserine on (Na++K+)-stimulated ATPase and acetylcholinesterase activities of dog brain synaptosomal plasma membranes. Biochem. J. 220, 301–307.
Valentim, L.M., Geyer, A.B., Tavares, A., Cimarosti, H., Worm, P.V., Rodnight, R., Netto, C.A., Salbego, C.G., 2001. Effects of global cerebral ischemia and preconditioning on heat shock protein 27 immunocontent and phosphorylation in rat hippocampus. Neuroscience 107, 43–49.
Valladolid-Acebes, I., Stucchi, P., Cano, V., Fernandez-Alfonso, M.S., Merino, B., Gil-Ortega, M., Fole, A., Morales, L., Ruiz-Gayo, M., Del Olmo, N., 2011. High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. Neurobiol. Learn. Mem. 95, 80–85.
Vickers, M.H., 2014. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. Nutrients 6, 2165–2178.
Wang, X.D., Rammes, G., Kraev, I., Wolf, M., Liebl, C., Scharf, S.H., Rice, C.J., Wurst, W., Holsboer, F., Deussing, J.M., Baram, T.Z., Stewart, M.G., Muller, M.B., Schmidt, M.V., 2011. Forebrain CRF(1) modulates early-life stress-programmed cognitive deficits. J. Neurosci. 31, 13625–13634.
Wang, D., Yan, J., Chen, J., Wu, W., Zhu, X., Wang, Y., 2015. Naringin improves neuronal insulin signaling, brain mitochondrial function, and cognitive function in high-Fat diet-Induced obese mice. Cell. Mol. Neurobiol.

Warburton, E.C., Brown, M.W., 2015. Neural circuitry for rat recognition memory. Behav. Brain Res. 285, 131–139.
Watson, D.J., Marsden, C.A., Millan, M.J., Fone, K.C., 2012. Blockade of dopamine D(3) but not D(2) receptors reverses the novel object discrimination impairment produced by post-weaning social isolation: implications for schizophrenia and its treatment. Int. J. Neuropsychopharmacol. 15, 471–484.
Weiss, I.C., Pryce, C.R., Jongen-Relo, A.L., Nanz-Bahr, N.I., Feldon, J., 2004. Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. Behav. Brain Res. 152, 279–295.
Winocur, G., Greenwood, C.E., 2005. Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. Neurobiol. Aging 26 (Suppl 1), 46–49.
Wyse, A.T., Bavaresco, C.S., Reis, E.A., Zugno, A.I., Tagliari, B., Calcagnotto, T., Netto, C.A., 2004. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na+,K+-ATPase activity in rat hippocampus. Physiol. Behav. 80, 475–479.
de Souza Wyse, A.T., Streck, E.L., Worm, P., Wajner, A., Ritter, F., Netto, C.A., 2000. Preconditioning prevents the inhibition of Na+,K+-ATPase activity after brain ischemia. Neurochem. Res. 25, 971–975.

Supplementary Material

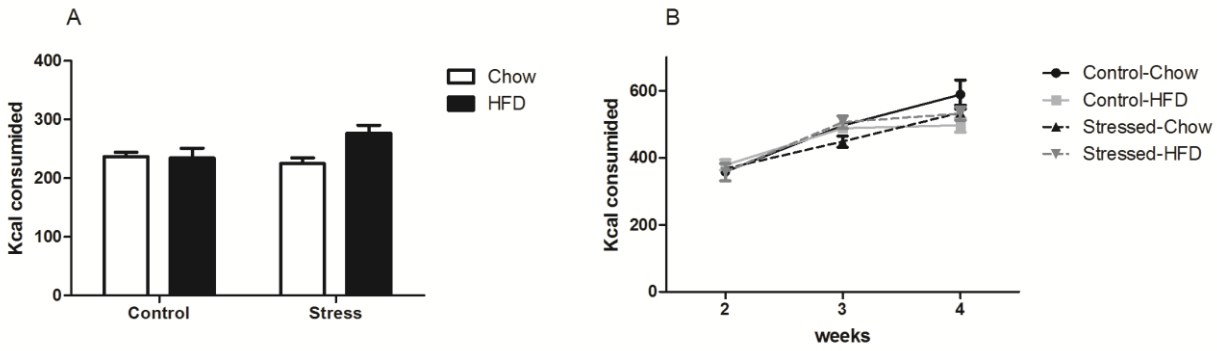

Fig. S1. Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD), on caloric consumption. Data are expressed as mean ± SEM. (A) Caloric consumption during the period of social isolation (week 1), N = 8 for Control-Chow and Control-HFD and N = 20 for Stressed-Chow and Stressed-HFD. (B) Caloric consumption of diets during 2–4 weeks after the beginning of the treatment, N = 7 for Control-Chow and Control-HFD and N = 5 for Stressed-Chow and Stressed-HFD. No significant differences were found between the groups for caloric consumption ($P > 0.05$).

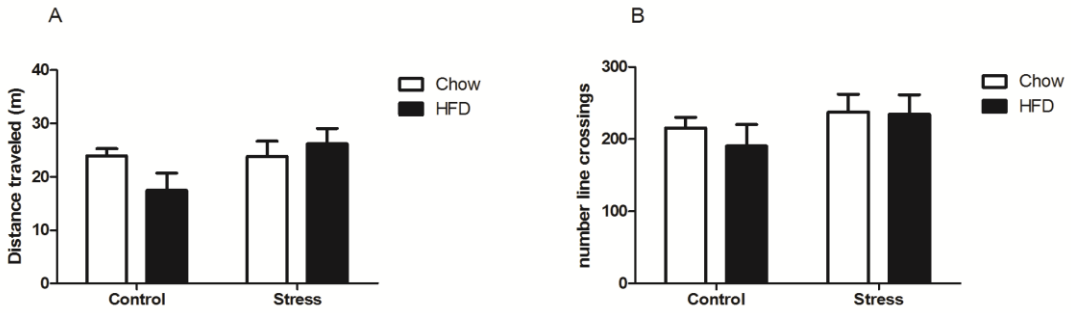

Fig. S2. Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD), on the performance in an open field in the adulthood (second day). Data are expressed as mean ± SEM. N = 8 for Control-Chow, Control-HFD and Stressed-HFD; N = 10 for Stressed-Chow. (A) Distance traveled (B) Crossings. No significant differences were found between the groups for distance traveled and crossings ($P > 0.05$).

Table 1.

Effects of social isolation in the prepubertal period, with or without chronic access to high fat diet (HFD) in novel object recognition in adult rats.

	Training		Test	
	Time in the object A	Time in the object B	Time in new object	Time in familiar object
Control-Chow	21.66 ± 2.39	23.85 ± 3.12	29.35 ± 3.18	12.12 ± 2.31
Control-HFD	19.47 ± 2.91	24.76 ± 6.40	14.73 ± 3.02	12.08 ± 3.40
Stressed-Chow	22.01 ± 3.64	28.48 ± 3.62	24.25 ± 5.71	16.53 ± 4.51
Stressed-HFD	21.68 ± 2.28	28.44 ± 3.75	36.35 ± 5.77	20.20 ± 3.48

Time in the objects was expressed in seconds. Data are expressed as mean ± SEM, N = 8 for Control-Chow, Control-HFD and Stressed-HFD; N = 10 for Stressed-Chow. There was an interaction between stress and diet in the time in new object in test phase (Two-way ANOVA, P = 0.01).

3.2 Capítulo II

Impact of high-fat diet and early stress on depressive-like behavior and hippocampal plasticity in adult male rats.

Artigo submetido para publicação na revista *Molecular Neurobiology*.

Molecular Neurobiology

IMPACT OF HIGH-FAT DIET AND EARLY STRESS ON DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOR AND HIPPOCAMPAL PLASTICITY IN ADULT MALE RATS

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Original Article
Keywords:	early life environment; prepubertal period; social isolation; emotional responses; anhedonia; BDNF.
Corresponding Author:	Danusa Mar Arcego Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS BRAZIL
First Author:	Danusa Mar Arcego
Order of Authors:	Danusa Mar Arcego
	Ana Paula Toniazzo
	Rachel Krolow
	Carine Lampert
	Carolina Berlitz
	Emily dos Santos Garcia
	Fabrício do Couto Nicola
	Juliana Bender Hoppe
	Mariana Maier Gaelzer
	Caroline Peres Klein
	Camilla Lazzaretti
	Carla Dalmaz
Abstract:	During development, the brain goes through fundamental processes, including organization of neural networks and plasticity. Environmental interventions may alter initial brain programming, leading to long-lasting effects, and altering the susceptibility to psychopathologies, including depression disorder. It is known that depression is a psychiatric disorder with a high prevalence worldwide, including high rates among adolescents. In this study, we evaluated whether social isolation in the prepubertal period and chronic use of high-fat diet (HFD), may induce depressive-like behavior in male adult rats. We also investigated hippocampal plasticity markers and neurotransmitter systems. We found both social isolation and HFD induced a depressive-like behavior in the forced-swimming task. Moreover, chronic HFD increased anhedonia, as verified by the sucrose preference test, and impaired hippocampal plasticity, demonstrated by reductions in βIII-tubulin (neuronal marker), PSD-95, SNAP-25, and neurotrophin-3. The HFD group also presented decreased glutamatergic and GABAergic receptors subunits. On the other hand, stress affected hippocampal BDNF signaling pathways, and increased expression of subunit of the NMDA receptor (NR2A). Both factors (stress and diet) decreased GR in the hippocampus without affecting plasma corticosterone at basal levels. Interaction between early stress and HFD access was observed only in the TrkB receptor and synaptophysin. In summary, these findings showed that a brief social isolation and chronic HFD, during a sensitive developmental period, cause depressive-like behavior in adulthood. The mechanisms underlying these behavioral effects may reflect hippocampal synaptic activity alterations, but in different ways; HFD consumption appears to affect synaptic plasticity, while social isolation affected BDNF signaling more significantly.

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

3.3 Capítulo III

Early high-fat diet exposure reduces food-seeking behavior for different palatable foods during adulthood

Artigo a ser submetido para publicação na revista *European Journal of Nutrition.*

4. DISCUSSÃO

As tabelas 1 e 2 abaixo resumem os principais resultados encontrados no presente trabalho de Tese.

Tabela 1. Resumo dos principais resultados neuroquímicos

Córtex pré-frontal	Na+,K+-ATPase: interação estresse*dieta BDNF: interação estresse*dieta TrkB: sem efeito GR: sem efeito ERK/MAPK total: interação estresse*dieta AKT fosforilada: interação estresse*dieta
Hipocampo	BDNF e pró-BDNF: sem efeito Receptor TrkB: interação estresse*dieta AKT fosforilada: estresse↓ β-III-tubulina: dieta ↓ Sinaptofisina: interação estresse*dieta Neurotrofina-3: dieta ↓ SNAP-25: dieta ↓ PSD-95: dieta ↓ GR: estresse↓ e dieta ↓ Receptor GABAa: sem efeito GAD-65: dieta ↓ Subunidade GluA2 receptor AMPA: dieta ↓ Subunidade NR2B fosforilada receptor NMDA: dieta ↓ Subunidade NR2A receptor NMDA: estresse ↑
Núcleo Accumbens	Receptor D1: dieta ↓ Receptor D2: sem efeito Tirosina hidroxilase (total e fosforilada): sem efeito DAT: estresse ↑ Dopamina: estresse ↑ DOPAC/DA: estresse↓ Receptor CB1: dieta ↓ Receptor μ-opióide: sem efeito

Tabela 2. Resumo dos principais resultados comportamentais

Memória de reconhecimento de objetos	Interação estresse*dieta
Memória de trabalho	estresse↓
Teste de preferência a sacarose	dieta ↓ preferência a sacarose
Nado Forçado	estresse↓ e dieta ↓ tempo de imobilidade
Consumo alimento palatável – Froot Loops®	Habituação: dieta ↑ latência para comer e ↓ quantidade consumida. Teste: interação estresse*dieta na latência para chegar; dieta ↑ latência para comer e ↓ quantidade consumida.
Consumo alimento palatável - Chocolate	Habituação: dieta ↑ latência para comer e ↓ quantidade consumida. Teste: interação estresse*dieta na latência para comer e dieta↓ quantidade consumida.
Consumo alimento palatável – Froot Loops® (com retirada da HFD)	Habituação: dieta ↑ latência para comer e ↓ quantidade consumida. Teste: dieta↓ quantidade consumida.
Teste de alimentação suprimida pela novidade	Dieta ↑ latência para começar a comer pellet de ração.

A hipótese da presente tese foi de que o isolamento social no período pré-pubere, associado ao consumo precoce e contínuo de uma dieta hiperlipídica, levaria a alterações da plasticidade neural, modificando sistemas neuroquímicos e, através dessas modificações, ocasionando mudanças nos processos cognitivos e emocionais na idade adulta. Alguns de nossos achados mostraram que a exposição a esses fatores ambientais precocemente pode alterar a programação do SNC de forma prejudicial na idade adulta, causando importantes mudanças comportamentais.

São observadas diversas alterações comportamentais na literatura em modelos animais que utilizam o isolamento social como um estressor. Entretanto, tais estudos utilizam métodos drásticos, como o isolamento social contínuo do desmame até a idade adulta, e poucos estudos avaliam os efeitos de um isolamento social breve no período antes da puberdade e seus efeitos a longo-prazo, na idade adulta. Neste trabalho, encontramos que uma exposição a esse tipo de estresse na pré-puberdade foi capaz de alterar comportamentos como do tipo depressivo e prejudicar a memória de curta-duração e de trabalho na idade adulta de ratos machos. É importante considerar que neste trabalho de tese foram apenas estudados ratos machos e que, na experiência de nosso grupo, intervenções precoces, mesmo antes da puberdade, muitas vezes resultam em efeitos sexo-específicos. Assim, não é possível generalizar nossos resultados e estudos com fêmeas seriam de grande importância.

Na avaliação da memória de curta-duração, utilizamos a tarefa de reconhecimento de objetos, que se baseia na tendência natural dos roedores para explorar ambientes novos/objetos novos. Esta tarefa pode envolver avaliações tanto de memória de curta, como de longa-duração, dependendo do tempo de intervalo entre o treino (dois objetos apresentados) e o teste (troca de um dos objetos). Neste trabalho avaliamos somente a memória de curta-duração, com um intervalo de 15 minutos entre as exposições. Vários estudos têm demonstrado que o isolamento social crônico (período do desmame até a idade adulta) causa prejuízo neste tipo de tarefa, geralmente associado a uma memória de longa-duração (Bianchi et al., 2006, Fone & Porkess, 2008, Gaskin et al., 2014), e que a capacidade de discriminação nesse modelo pode diminuir somente após 1 hora de intervalo (Bianchi *et al.*, 2006), inclusive não sendo encontrado déficit nesta tarefa com intervalo de 1 minuto entre as sessões (Lapiz *et al.*, 2000). No entanto, os resultados observados neste trabalho de tese demonstraram que a

exposição ao isolamento social precoce durante uma semana já foi capaz de causar prejuízo seletivo na discriminação de objetos com um intervalo curto (15 minutos) entre as exposições. Essa redução na memória de reconhecimento de objetos nos animais isolados deve-se provavelmente ao comprometimento cognitivo, uma vez que não houve diferença significativa na atividade locomotora desses animais, assim como no tempo gasto explorando ambos os objetos no treino. Poderíamos especular que esse prejuízo na memória de reconhecimento de objetos se devesse a uma inflexibilidade cognitiva, impedindo a atenção a um novo estímulo, entretanto outras tarefas comportamentais deveriam ser realizadas para confirmar essa hipótese.

Além disso, neste trabalho demonstramos que a memória de trabalho, avaliada no labirinto em Y, também foi prejudicada nos animais isolados. Um estudo realizado por Shao e colaboradores (2015) com animais isolados por oito semanas, a partir do desmame, mostrou um desempenho prejudicado neste tipo de tarefa. Contudo, este é o primeiro estudo demonstrando nos efeitos na idade adulta de um isolamento precoce nesse tipo de memória.

Uma das consequências mais notáveis do isolamento social crônico na literatura é o aparecimento do comportamento do tipo depressivo (Hong et al., 2015, Wang et al., 2017b). Neste trabalho, mostramos que o isolamento social aplicado somente no período pré-pubere já foi capaz de induzir um comportamento do tipo depressivo na idade adulta. Nossos achados corroboram com os de Takatsu-Coleman e colaboradores (2013), que demonstraram que uma exposição aguda ao isolamento por 12 horas causa comportamento do tipo depressivo em camundongos. Dessa forma, a partir dos resultados analisados, observamos que a exposição a um estressor social precocemente pode causar alterações persistentes na idade adulta, aumentando os sintomas depressivos, além de causar prejuízos em tarefas cognitivas envolvendo a memória.

Essas alterações comportamentais podem estar relacionadas, uma vez que uma das características de transtornos depressivos inclui prejuízos cognitivos (Austin *et al.*, 2001).

Da mesma forma, observamos que o consumo crônico de uma dieta hiperlipídica (HFD) desde o desmame até a idade adulta também ocasionou um prejuízo na memória de curta-duração (sem alteração na memória de trabalho) e levou a um comportamento do tipo depressivo, juntamente com aumento da anedonia (no teste de preferência a sacarose). Além disso, o consumo desse tipo de dieta foi capaz de alterar o comportamento alimentar hedônico nesses animais, mostrando que eles possuem menor motivação para obter diferentes alimentos palatáveis, sendo que esse fator não é associado a uma alteração na palatabilidade.

Cabe ressaltar que foi observado em um estudo prévio que os animais com acesso a ambas dietas simultaneamente consomem mais dieta hiperlipídica comparada a ração padrão, mas isso não é refletido em maior ganho calórico (Arcego et al., 2014). Entretanto, esses animais possuem maior ganho de gordura abdominal, particularmente no grupo com associação entre estresse e HFD, observado pelo maior ganho de peso nesses animais.

Alguns estudos já demonstram a associação entre obesidade e sintomas depressivos, inclusive em crianças (Muhlig et al., 2016, Schwartz et al., 2016). Sabendo que a obesidade está intrinsecamente relacionada ao consumo aumentado de alimentos ricos em calorias, é possível que uma dieta rica em gordura possa estar envolvida nos mecanismos que predispõem a depressão. Essa relação entre obesidade e depressão muitas vezes é associada a fatores psicológicos e culturais. Entretanto, a partir dos resultados encontrados nesta tese, observamos que tanto mecanismos fisiológicos, como moleculares estão envolvidos nessa associação. Além disso, estudos em humanos vêm

sugerindo que a redução do consumo calórico provindo de gorduras e alimentos processados possa estar associada com uma melhora no humor e uma redução do risco de desenvolver depressão (Akbaraly et al., 2009, Brinkworth et al., 2009).

Estudos prévios utilizando modelos animais sugerem que o consumo exagerado de alimentos altamente calóricos contribui para o ganho de peso e obesidade em associação com sintomas depressivos (Abildgaard et al., 2011, Sharma & Fulton, 2013), o que está de acordo com nossos achados. De modo interessante, as alterações comportamentais observadas neste trabalho, como prejuízo cognitivo e motivacional, nos animais com acesso crônico a uma dieta hiperlipídica talvez possam estar correlacionadas ao comportamento do tipo depressivo. Estudos considerando transtornos de humor vêm sendo associados com prejuízos cognitivos, como em processos de memória e aprendizado, além de diminuição da motivação e da capacidade de sentir prazer em resposta a estímulos positivos (anedonia) (Austin et al., 2001, Grillo, 2016, Rizvi et al., 2016). Adicionalmente, estudos em roedores relacionam o fenótipo de depressão causada por uma dieta hiperlipídica com prejuízos cognitivos em diferentes tarefas relacionadas à memória (Winocur & Greenwood, 2005, Pathan et al., 2008), incluindo a memória de reconhecimento de objetos (Abildgaard *et al*., 2011).

A diminuição da motivação para buscar alimentos palatáveis observada nos animais com consumo crônico de uma dieta hiperlipídica, aqui observada nas tarefas realizadas com alimentos doces (Froot Loops® e chocolate), bem como a menor preferência por sacarose, interpretada como anedonia, pode estar relacionada com as características da depressão que normalmente são observadas em pacientes (Grillo, 2016, Rizvi et al., 2016). Adicionalmente, as vias relacionadas ao sistema de recompensa e o comportamento alimentar hedônico vêm sendo cada vez mais associadas com a sintomatologia da depressão, tanto em humanos (Tremblay et al.,

2005, Epstein et al., 2006, Nauczyciel et al., 2013), como em modelos animais (Chaudhury *et al.*, 2013).

A partir desse panorama comportamental observado, foi realizado o teste de reatividade ao sabor doce para avaliar se esses efeitos ligados à menor motivação e à anedonia poderiam ser devidos a um menor prazer desses animais em resposta ao sabor doce. Não foram encontradas, no entanto, diferenças significativas entre os grupos, mostrando que esses efeitos não são mediados pelas características de "gostar".

Um questionamento adicional que levantamos em relação a esses achados foi tomando em consideração a possível saciedade provinda da dieta hiperlipídica, uma vez que essa dieta possui maior conteúdo calórico quando comparado à dieta padrão, mesmo tendo em vista que os testes de comportamento alimentar foram realizados sob restrição alimentar. Para isso, repetimos a mesma tarefa com alimento palatável (Froot Loops®), porém com a retirada total da dieta hiperlipídica uma semana antes da realização da avaliação comportamental, sendo que esses animais foram mantidos somente com ração padrão durante toda a análise. Os resultados foram semelhantes aos obtidos anteriormente, confirmando que a menor motivação encontrada nesses animais não se deve a uma maior saciedade provocada pela dieta hiperlipídica e nem a uma menor palatabilidade ao sabor doce. Além disso, foi excluída a possibilidade de deficiência locomotora nesses animais, uma vez que na tarefa do Campo Aberto não houve diferenças significativas entre os grupos na atividade locomotora.

Outro indicativo que sustenta nossa hipótese relacionada à sintomatologia da depressão nesses animas foram os resultados obtidos no teste de "alimentação suprimida pela novidade". Essa tarefa, apesar de ser usualmente utilizada para avaliar efeitos de ansiedade, também pode ser relacionada ao comportamento do tipo-depressivo (Savalli *et al.*, 2015). No nosso caso, a diminuição da motivação para buscar o alimento no

centro do aparato no grupo de animais com a dieta hiperlipídica pode estar relacionado ao fenótipo depressivo, uma vez que, em estudos anteriores, já foi observado que esse mesmo grupo de animais, quando testados nas tarefas do campo aberto e labirinto em cruz elevado, que são tarefas clássica para avaliar comportamento do tipo ansioso, não apresentaram diferenças significativas em relação a esse parâmetro (Arcego *et al.*, 2013).

Nossos resultados estão de acordo com evidências na literatura, que demonstram que o consumo crônico de uma dieta hiperlipidica pode estar associado a uma redução de comportamentos motivados, já observados por uma diminuição da auto-administração de alimentos palatáveis em tarefas de condicionamento operante (Ibias et al., 2016, McNeilly et al., 2016) e prejuízos na escolha de prefência de lugar (tarefa preferência condicionada de lugar) para diferentes tipos de recompensas, incluindo sacarose (Tracy *et al.*, 2015) e drogas de abuso (Blendy et al., 2005, Morales et al., 2012). Esses dados em conjunto demonstram que o acesso contínuo a HFD parece diminuir o valor de estímulos recompensadores, tanto associados a drogas de abuso como a alimentos palatáveis; entrentanto, os mecanismos subjacentes a esses comportamentos ainda não foram esclarecidos.

Surpreendentemente, observarmos nesse trabalho que a associação dos fatores isolamento social e consumo de HFD reverte o prejuízo observado no desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos em relação aos fatores isolados, sendo que o índice de discriminação entre o objeto novo/familiar apresenta-se em níveis similares dos controles. Da mesma forma, foram observadas algumas interações entre os fatores na avaliação do comportamento alimentar hedônico, no sentido de aumentar a motivação para a recompensa alimentar (latência para chegar ao alimento com Froot Loops® e

latência para comer o chocolate, quando os animais foram testados sem restrição alimentar).

Relacionando essas interações das tarefas comportamentais com os achados neuroquímicos realizados neste trabalho de tese, observamos que semelhantes interações entres os fatores (estresse e dieta) ocorreram na atividade da enzima $Na^{+}K^{+}$-ATPase, no imunoconteúdo de BDNF, MAPK/ERK e AKT total e fosforilada no córtex pré-frontal, assim como no imunoconteúdo do receptor do BDNF (TrkB) e sinaptofisina no hipocampo de ratos machos na idade adulta. Todas as interações seguem um perfil semelhante, os fatores quando aplicados isolados diminuem os níveis do parâmetro analisado, porém quando associados, os níveis retornam ou aumentam em relação aos valores do grupo controle. Assim, podemos observar que o isolamento social associado ao consumo de uma dieta hiperlipídica parece restaurar marcadores importantes para a plasticidade sináptica, tanto no córtex pré-frontal como no hipocampo, e isso poderia estar relacionado aos achados comportamentais, em que não ocorrem prejuízos na memória de reconhecimento de objetos quando os dois fatores estão associados. Entretanto, em relação à memória de trabalho e ao comportamento do tipo depressivo, essas interações não foram suficientes para melhorar a performance desse grupo nas tarefas avaliadas.

Uma possível explicação para essas interações seria o envolvimento dos fatores (estresse e dieta) na atividade do eixo HHA. No Capítulo I da presente tese, colocou-se a hipótese das ações do hormônio leptina no eixo HHA, diminuindo as respostas ao estresse (Heiman et al., 1997, Huang et al., 1998, Oates et al., 2000, Arvaniti et al., 2001). Uma vez que em resultados anteriores com o mesmo grupo experimental foi observado aumento da leptina em animais com HFD e diminuição em animais isolados no período pré-pubere (Arcego *et al.*, 2014), poderíamos esperar que quando os dois

fatores estivessem associados, o aumento da leptina pela HFD poderia minimizar os efeitos do isolamento social, e assim contribuir para os efeitos positivos observados na memória de curta-duração.

Outra possibilidade para explicar essas interações baseia-se na teoria de que os alimentos palatáveis, ricos em açúcares e gorduras, reduzem a ativação do eixo HHA e, dessa forma, diminuem as respostas ao estresse (Adam & Epel, 2007). Entretanto, para dietas ricas em gorduras, ainda não há um consenso sobre os seus efeitos no eixo HHA, como discutido na Introdução desta tese.

A partir disso, nós investigamos alguns marcadores relacionados à atividade do eixo HHA nesses grupos experimentais. Em relação ao imunoconteúdo do receptor de glicocorticóides (GR), não encontramos diferença significativa entre os grupos no córtex pré-frontal, porém no hipocampo esse receptor se encontra diminuído tanto no grupo isolado como no grupo com acesso à HFD, sem interação entre os fatores. Entretanto, os níveis plasmáticos de corticosterona basal não alteraram entre os grupos.

Para melhor investigarmos a hipótese da influência da ativação diferenciada do eixo HHA nas interações observadas, outras medidas neuroquímicas devem ser realizadas. Cabe ressaltar também que a ausência de alteração nos níveis basais de corticosterona não significa necessariamente a ausência dos efeitos desses fatores no funcionamento do eixo HHA, uma vez que essas medidas foram realizadas em uma situação basal e podem ser diferentes frente a uma exposição a estressores.

O que podemos concluir com os resultados encontrados é que quando os fatores como estresse e dieta são associados, ocorre uma programação encefálica diferente daquela que resultaria da aplicação desses fatores isoladamente. Além disso, apesar de parecer ocorrer um possível efeito positivo na memória de curta-duração com a interação de estresse e dieta hiperlipídica, muitos efeitos deletérios observados no grupo

com acesso à HFD não foram revertidos pela associação com o estresse (e da mesma forma com o grupo estresse isoladamente).

Acerca dos resultados neuroquímicos, relacionados ao consumo crônico de uma dieta rica em gordura isoladamente, eles mostraram que em geral houve uma diminuição de marcadores de plasticidade e de neurotransmissão no córtex pré-frontal, hipocampo e núcleo accumbens na idade adulta. Destas, a estrutura mais afetada foi o hipocampo.

No córtex pré-frontal observamos que a dieta hiperlipídica causou uma diminuição nos níveis de BDNF (mais marcante no grupo não associado ao estresse), enquanto que no hipocampo não houve alteração no imunoconteúdo dessa neurotrofina. Apesar disso, no hipocampo, houve uma interação entre os fatores isolados (estresse ou dieta) em relação ao receptor desta neurotrofina (receptor TrkB), cujos níveis encontraram-se diminuídos, porém retornam aos níveis do grupo controle quando os fatores estão associados. Por sua vez, no córtex pré-frontal não houve diferença entre os grupos nos níveis deste receptor. Esses resultados sugerem que a sinalização do BDNF possa ser reduzida pelos fatores estudados nessas duas estruturas através de mecanismos distintos. Além disso, diversos marcadores de plasticidade sináptica no hipocampo apresentaram-se diminuídos, tais como a neurotrofina-3, a β-III-tubulina (considerada um marcador neuronal), a SNAP-25 (proteína associada a vesículas sinápticas, envolvida no processo de exocitose), a PSD-95 (marcador de densidade pós-sináptica) e a sinaptofisina (proteína sináptica associada a vesículas; não diminui no grupo dieta associado ao estresse).

A diminuição significativa de importantes marcadores sinápticos com a dieta hiperlipídica reflete um prejuízo na neuroplasticidade desses animais na idade adulta. Como demonstrado no Capítulo II, essas alterações na plasticidade sináptica podem

estar relacionadas ao comportamento do tipo depressivo apresentado por esse grupo. Assim, esses achados estão de acordo com a hipótese dos mecanismos patofisiológicos da depressão, uma vez que prejuízos de plasticidade no hipocampo vêm sendo atribuídos a etiologia desse transtorno (Serafini *et al.*, 2014). Além disso, a formação hipocampal parece ter um papel especial no desenvolvimento da depressão, uma vez que pacientes depressivos muitas vezes apresentam uma redução do volume dessa estrutura encefálica (Sheline *et al.*, 1996), o que também é observado em modelos de depressão em roedores (Veena *et al.*, 2011), podendo esse fato estar relacionado com a redução da plasticidade e diminuição dos fatores neurotróficos.

Adicionalmente, uma redução da plasticidade sináptica também pode mediar processos envolvendo memória (Lante *et al.*, 2006). Dessa forma, o déficit cognitivo observado nos animais com acesso à HFD na tarefa de reconhecimento de objetos pode estar associado a uma diminuição da plasticidade neural hipocampal, além da diminuição do BDNF encontrada nesses animais no córtex pré-frontal, uma vez que essa tarefa possui também um envolvimento hipocampal, apesar da avaliação realizada nesta tese ser uma memória não-espacial de curta-duração (Gonzalez et al., 2014, Warburton & Brown, 2015).

Em relação ao imunoconteúdo de alguns marcadores de sistemas neurotransmissores, como o glutamatérgico e gabaérgico, foram observadas alterações no hipocampo de ratos com acesso à dieta hiperlipídica, tais como redução da subunidade GluA2 do receptor AMPA e da subunidade NR2B fosforilada do receptor NMDA, além de diminuição da enzima glutamato descarboxilase (GAD65), responsável pela síntese de GABA (ácido gama-aminobutírico), um importante neurotransmissor inibitório do SNC.

A diminuição das subunidades dos receptores AMPA e NMDA pode sugerir que esses animais possuem um prejuízo na neurotransmissão glutamatérgica no hipocampo, entretanto, mais estudos necessitam ser realizados para compreender melhor essa modificação. Alterações na atividade sináptica levam a mudanças na composição da densidade pós-sináptica (PSD), incluindo alteração em níveis de receptores (Keith & El-Husseini, 2008), sendo que nas sinapses excitatórias glutamatérgicas a principal proteína envolvida no ancoramento dos receptores é a PSD-95. Uma vez que alterações na quantidade de PSD-95 podem influenciar no recrutamento de receptores AMPA na sinapse, é possível que a diminuição observada da PSD-95 possa estar correlacionada a uma redução do imunoconteúdo da subunidade do receptor AMPA encontrada nos animais com acesso à HFD e, portanto, à regulação da plasticidade sináptica (Keith & El-Husseini, 2008). Adicionalmente, o provável prejuízo na neurotransmissão glutamatérgica desses animais pode também ser associado aos níveis reduzidos da neurotrofina-3. Essa neurotrofina está envolvida com aumento de correntes glutamatérgicas *in vitro* (Paul *et al.*, 2001), além de ativar a síntese de algumas proteínas envolvidas na modulação de conexões sinápticas e na plasticidade relacionada à potenciação de longa-duração (Je et al., 2005, Je et al., 2006).

Além disso, é possível que esses animais com acesso à HFD tenham uma diminuição na neurotransmissão inibitória no hipocampo, pois foi observada uma diminuição do imunoconteúdo da enzima GAD65, o que pode significar uma redução nos níveis de GABA, uma vez que ela é a enzima responsável por sua síntese. Associado a isso, alguns estudos têm reportado uma redução na função gabaérgica em pacientes com transtornos de humor (Karolewicz *et al.*, 2010), e também em modelos animais para depressão (Holm *et al.*, 2011), o que corrobora com os nossos achados comportamentais para esse grupo.

A dieta hiperlipídica também afetou o sistema dopaminérgico e canabinóide no núcleo accumbens, observado pela redução do imunoconteúdo dos receptores dopaminérgico-1 (D1) e canabinóide-1 (CB1). Apesar de não haver diferença nos níveis de dopamina e seus metabólitos nessa estrutura, é possível que a redução desses receptores possa se refletir na menor motivação hedônica apresentada pelos animais que consomem esse tipo de dieta. Além disso, a função do receptor D1 parece estar mais envolvida na ativação das respostas orientadas para a recompensa, enquanto que o receptor D2 possui um papel na avaliação da recompensa (D'Aquila, 2010, Galistu & D'Aquila, 2012). Como a dieta hiperlipídica não alterou o imunoconteúdo dos receptores D2, é possível que a menor ativação de receptores D1 possa estar relacionada aos achados comportamentais de redução da saliência de incentivo (na busca do alimento palatável), diminuindo assim a motivação. Entretanto, para afirmar isso, mais parâmetros necessitam ser analisados, incluindo avaliações *in vivo* da neurotransmissão dopaminérgica e canabinóide frente a um alimento palatável, além de um possível mecanismo sinérgico entre os receptores D1 e CB1 no comportamento hedônico desses animais.

Alguns estudos mostram que os receptores dopaminérgicos (D1 e D2) e CB1 interagem aumentando o disparo de potenciais de ação em neurônios no Nac (Seif et al., 2011). Além disso, camundongos nocaute para receptor CB1 em neurônios que expressam receptor D1 apresentam uma menor preferência para soluções doces comparados ao grupo controle (Terzian et al., 2011), mostrando que a interação entre o sistema dopaminérgico e canabinóide pode influenciar na modulação de comportamentos alimentares motivados. Uma possível diminuição nos receptores D1 e CB1 encontrada nos animais com acesso a HFD, também pode estar relacionada ao comportamento do tipo depressivo observado no Capítulo II nesse animais, uma vez que

muitos estudos vêm demonstrando que a perda de motivação e a anedonia encontradas em pacientes com depressão possam estar ligadas a uma disfunção no sistema de recompensa e motivacional, principalmente relacionada ao sistema mesolímbico dopaminérgico (Tremblay et al., 2005, Epstein et al., 2006, Nauczyciel et al., 2013). Além disso, o sistema canabinóide também pode influenciar nesse tipo de resposta, já que possui uma influência na neurotransmissão do sistema monoaminérgico, como serotoninérgico e dopaminérgico (Esteban & Garcia-Sevilla, 2012), assim como pode causar alterações na liberação de neurotransmissores importantes para a plasticidade encefálica, como o GABA e glutamato (Alger, 2002, Dow-Edwards & Silva, 2017).

Com relação à sinalização opióide no núcleo accumbens, não encontramos diferenças significativas entre os grupos para o imunoconteúdo do receptor μ-opióide. Sabendo que o sistema opióide influencia as respostas hedônicas relacionadas à palatabilidade (Berridge, 2009), esse resultado corrobora com os achados comportamentais observados na tarefa de reatividade ao sabor doce (que avaliou as respostas hedônicas relacionadas ao "gostar" em relação a uma solução doce), em que não houve diferença nessa característica nos grupos experimentais analisados.

A respeito dos efeitos neuroquímicos analisados com o isolamento social, observamos também um prejuízo em marcadores de plasticidade hipocampal, na idade adulta. Entretanto, parece que seus efeitos foram mais relacionados à via de sinalização PI3K/AKT ligada ao BDNF, observada pela redução do imunoconteúdo de TrkB (sem interação com a HFD) e da proteína AKT na forma fosforilada. Essa via de ativação está relacionada com o transporte e com a tradução de proteínas sinápticas (Yoshii & Constantine-Paton, 2010). Como relatado anteriormente, quando os fatores são associados (estresse e dieta) não ocorre alteração nos níveis de TrkB no hipocampo, que se mantêm semelhantes aos níveis do grupo controle. Apesar desse grupo apresentar-se

aparentemente protegido quanto a essa redução nos níveis de TrkB, esses animais possuem igualmente uma diminuição da ativação da via PI3K/AKT, demonstrada pela redução do imunoconteúdo da proteína AKT fosforilada.

Associado a isso, os animais isolados também apresentaram diminuição do imunoconteúdo de sinaptofisina e aumento da subunidade NR2A do receptor NMDA no hipocampo. Já no córtex pré-frontal, observamos uma diminuição nos níveis de Na^+K^+-ATPase somente nos animais isolados com acesso à ração padrão, e o mesmo padrão de interação foi observado no imunoconteúdo de MAPK/ERK e de AKT fosforilada. Todos esses fatores podem estar associados a diferenças na plasticidade sináptica, no hipocampo e no córtex pré-frontal. A redução dos níveis da enzima Na^+K^+-ATPase nos animais estressados pode estar relacionada a uma baixa excitabilidade neuronal, o que pode em parte explicar o desempenho prejudicado desses animais nas tarefas de memória avaliadas.

Notavelmente, os resultados acerca dos marcadores de plasticidade hipocampal nos animais isolados indicam um prejuízo nessa estrutura encefálica, mesmo que em menor proporção que o grupo com acesso a HFD. Da mesma forma, esses achados podem ser relacionados ao fenótipo depressivo encontrado nesses animais.

Além disso, no núcleo accumbens dos animais isolados no período pré-pubere, observamos uma diminuição do metabolismo dopaminérgico. Apesar de ser observado um aumento nos níveis de dopamina nesta estrutura, ocorre uma diminuição da razão dopamina/DOPAC, sendo o DOPAC um metabólito da dopamina. Essa razão diminuída significa que menor quantidade de dopamina é liberada na fenda sináptica e posteriormente metabolizada, ficando dessa forma, estocada nas vesículas sinápticas. Além disso, o imunoconteúdo do transportador de dopamina (DAT) encontra-se

aumentado neste grupo, sugerindo uma mais ágil recaptação da dopamina a partir da fenda sináptica.

Apesar dessa diminuição no metabolismo dopaminérgico no núcleo accumbens de ratos isolados, isso não se refletiu nos achados comportamentais relacionados à busca de alimento palatável. Sabendo que o isolamento social foi aplicado no início da vida e as análises comportamentais e neuroquímicas realizadas na idade adulta, é possível que esses resultados demonstrem uma regulação negativa compensatória da resposta do sistema dopaminérgico. Esta hipótese é baseada em estudos que observaram uma redução de 50% na atividade tônica dopaminérgica após exposição a um estressor ou na retirada da anfetamina (um fármaco responsável por aumentar os disparos neuronais tônicos no sistema dopaminérgico) (Chang & Grace, 2013, Belujon et al., 2016). Possivelmente, a diminuição do metabolismo dopaminérgico é resultado de uma menor ativação das projeções dopaminérgicas tônicas da área tegmentar ventral (VTA), uma vez que as medidas foram realizadas no estado basal. Entretanto, a resposta dopaminérgica fásica (ativada em resposta a um estímulo, como a exposição a um alimento palatável), não parece ter sido afetada nesses animais, pois não houve prejuízo na resposta à exposição a um estímulo (alimento palatável) na tarefa de comportamento alimentar hedônico.

Em suma, os resultados apresentados na presente tese demonstraram que o período correspondente à pré-puberdade se mostra uma fase sensível a fatores ambientais, como exposição a estresse e a uma dieta rica em gordura, levando a alterações a longo-prazo e predispondo ao aparecimento de psicopatologia como a depressão e alterações comportamentais associadas. Essas experiências precoces deixam marcas na programação neural, principalmente relacionadas a fatores neurotróficos e à plasticidade sináptica, incluindo modificações em alguns sistemas neurotransmissores

encefálicos, o que leva a alterações comportamentais cognitivas e emocionais relacionadas à memória, à depressão e ao comportamento alimentar na idade adulta. Das estruturas encefálicas avaliadas neste trabalho, o hipocampo apresentou-se bastante susceptível aos fatores ambientais precoces utilizados. Dessa forma, uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nessas alterações pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e/ou terapêuticas, diminuindo a vulnerabilidade ao aparecimento de psicopatologias na idade adulta causadas por adversidades ambientais precoces.

5. CONCLUSÕES

- O acesso precoce e crônico a uma dieta hiperlipídica levou a um prejuízo na memória de curta-duração, induziu comportamento do tipo depressivo, com aumento de anedonia, e alterou o comportamento alimentar hedônico, causando uma menor motivação para a busca de outros tipos de alimentos palatáveis na idade adulta. Também foram observadas diminuições em marcadores de plasticidade sináptica no hipocampo e no córtex pré-frontal. Além disso, a dieta hiperlipídica afetou marcadores da neurotransmissão glutamatérgica e gabaérgica, sugerindo uma diminuição da neurotransmissão hipocampal desses dois sistemas neurotransmissores. No núcleo accumbens, houve uma redução do imunoconteúdo de receptores D1 e CB1, nos animais com acesso a esse tipo de dieta.

- A exposição precoce ao isolamento social durante o período pré-pubere causou prejuízos cognitivos relacionados à memória de curta-duração e de trabalho, bem como induziu comportamento do tipo depressivo na idade adulta. Além disso, foram observadas alterações em marcadores de plasticidade sináptica no hipocampo e córtex pré-frontal, bem como uma sugestiva mudança na composição de receptores NMDA no hipocampo. No núcleo accumbens, o isolamento social diminuiu o metabolismo dopaminérgico na idade adulta.

- A interação entre estresse e dieta hiperlipídica reverteu o déficit cognitivo na memória de reconhecimento de objetos observado pelos fatores isolados. Da mesma forma, a interação preveniu a longo-prazo os efeitos deletérios dos fatores isolados na atividade da enzima Na^+K^+-ATPase, nos níveis de BDNF, imunoconteúdo de MAPK/ERK e AKT fosforilada no córtex pré-frontal, assim como no imunoconteúdo de sinaptofisina e no receptor TrkB no hipocampo.

6. PERSPECTIVAS

- Estudar a ontogenia das alterações no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal;
- Avaliar diferentes aspectos das capacidades cognitivas nesses animais;
- Realizar um estudo epigenético referente às alterações encontradas;
- Avaliar diferenças sexo-específicas quanto à influência das intervenções ambientais utilizadas nesta Tese;
- Investigar possíveis fatores capazes de reverter o comportamento do tipo depressivo e as alterações neuroquímicas que observamos no modelo experimental utilizado nesta Tese.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abildgaard A, Lund S, Hougaard KS (Chronic high-fat diet increases acute neuroendocrine stress response independently of prenatal dexamethasone treatment in male rats. Acta Neuropsychiatr 26:8-18.2014).

Abildgaard A, Solskov L, Volke V, Harvey BH, Lund S, Wegener G (A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. Psychoneuroendocrinology 36:623-633.2011).

Adam TC, Epel ES (Stress, eating and the reward system. Physiol Behav 91:449-458.2007).

Agid O, Shapira B, Zislin J, Ritsner M, Hanin B, Murad H, Troudart T, Bloch M, Heresco-Levy U, Lerer B (Environment and vulnerability to major psychiatric illness: a case control study of early parental loss in major depression, bipolar disorder and schizophrenia. Mol Psychiatry 4:163-172.1999).

Akbaraly TN, Brunner EJ, Ferrie JE, Marmot MG, Kivimaki M, Singh-Manoux A (Dietary pattern and depressive symptoms in middle age. Br J Psychiatry 195:408-413.2009).

Alger BE (Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. Prog Neurobiol 68:247-286.2002).

Anacker C, Zunszain PA, Carvalho LA, Pariante CM (The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? Psychoneuroendocrinology 36:415-425.2011).

Andersen SL, Teicher MH (Stress, sensitive periods and maturational events in adolescent depression. Trends Neurosci 31:183-191.2008).

Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Ferreira AG, Scherer E, Wyse AT, Dalmaz C (Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. Physiol Behav 124:23-32.2014).

Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Pettenuzzo LF, Marcolin ML, Toniazzo AP, Dalmaz C (Stress during the pre-pubertal period leads to long-term diet-dependent changes in anxiety-like behavior and in oxidative stress parameters in male adult rats. Neurochem Res 38:1791-1800.2013).

Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Toniazzo AP, Berlitz C, Lazzaretti C, Schmitz F, Rodrigues AF, Wyse AT, Dalmaz C (Early life adversities or high fat diet intake reduce cognitive function and alter BDNF signaling in adult rats: Interplay of these factors changes these effects. Int J Dev Neurosci 50:16-25.2016).

Arvaniti K, Huang Q, Richard D (Effects of leptin and corticosterone on the expression of corticotropin-releasing hormone, agouti-related protein, and proopiomelanocortin in the brain of ob/ob mouse. Neuroendocrinology 73:227-236.2001).

Austin MP, Mitchell P, Goodwin GM (Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology. Br J Psychiatry 178:200-206.2001).

Auvinen HE, Romijn JA, Biermasz NR, Havekes LM, Smit JW, Rensen PC, Pereira AM (Effects of high fat diet on the Basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice: a systematic review. Horm Metab Res 43:899-906.2011).

Auvinen HE, Romijn JA, Biermasz NR, Pijl H, Havekes LM, Smit JW, Rensen PC, Pereira AM (The effects of high fat diet on the basal activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in mice. J Endocrinol 214:191-197.2012).

Azeredo LA, De Nardi T, Levandowski ML, Tractenberg SG, Kommers-Molina J, Wieck A, Irigaray TQ, Silva IGF, Grassi-Oliveira R (The brain-derived

neurotrophic factor (BDNF) gene Val66Met polymorphism affects memory performance in older adults. Rev Bras Psiquiatr 0.2017).
Baik JH (Dopamine signaling in reward-related behaviors. Front Neural Circuits 7:152.2013).
Barrientos RM, Sprunger DB, Campeau S, Higgins EA, Watkins LR, Rudy JW, Maier SF (Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist. Neuroscience 121:847-853.2003).
Belujon P, Jakobowski NL, Dollish HK, Grace AA (Withdrawal from Acute Amphetamine Induces an Amygdala-Driven Attenuation of Dopamine Neuron Activity: Reversal by Ketamine. Neuropsychopharmacology 41:619-627.2016).
Bennett MR, Lagopoulos J (Stress and trauma: BDNF control of dendritic-spine formation and regression. Prog Neurobiol 112:80-99.2014).
Berridge KC (Food reward: brain substrates of wanting and liking. Neurosci Biobehav Rev 20:1-25.1996).
Berridge KC (Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. Neurosci Biobehav Rev 24:173-198.2000).
Berridge KC (Motivation concepts in behavioral neuroscience. Physiol Behav 81:179-209.2004).
Berridge KC ('Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. Physiol Behav 97:537-550.2009).
Berry A, Bellisario V, Capoccia S, Tirassa P, Calza A, Alleva E, Cirulli F (Social deprivation stress is a triggering factor for the emergence of anxiety- and depression-like behaviours and leads to reduced brain BDNF levels in C57BL/6J mice. Psychoneuroendocrinology 37:762-772.2012).
Bianchi M, Fone KF, Azmi N, Heidbreder CA, Hagan JJ, Marsden CA (Isolation rearing induces recognition memory deficits accompanied by cytoskeletal alterations in rat hippocampus. Eur J Neurosci 24:2894-2902.2006).
Binder DK, Scharfman HE (Brain-derived neurotrophic factor. Growth Factors 22:123-131.2004).
Blendy JA, Strasser A, Walters CL, Perkins KA, Patterson F, Berkowitz R, Lerman C (Reduced nicotine reward in obesity: cross-comparison in human and mouse. Psychopharmacology (Berl) 180:306-315.2005).
Bogdanova OV, Kanekar S, D'Anci KE, Renshaw PF (Factors influencing behavior in the forced swim test. Physiol Behav 118:227-239.2013).
Boitard C, Maroun M, Tantot F, Cavaroc A, Sauvant J, Marchand A, Laye S, Capuron L, Darnaudery M, Castanon N, Coutureau E, Vouimba RM, Ferreira G (Juvenile obesity enhances emotional memory and amygdala plasticity through glucocorticoids. J Neurosci 35:4092-4103.2015).
Borsini F, Meli A (Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? Psychopharmacology (Berl) 94:147-160.1988).
Boukouvalas G, Antoniou K, Papalexi E, Kitraki E (Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. Neuroscience 153:373-382.2008).
Bredt DS, Nicoll RA (AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. Neuron 40:361-379.2003).
Bremner JD (Long-term effects of childhood abuse on brain and neurobiology. Child Adolesc Psychiatr Clin N Am 12:271-292.2003).

Brenes Saenz JC, Villagra OR, Fornaguera Trias J (Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats. Behav Brain Res 169:57-65.2006).

Brietzke E, Kauer Sant'anna M, Jackowski A, Grassi-Oliveira R, Bucker J, Zugman A, Mansur RB, Bressan RA (Impact of childhood stress on psychopathology. Rev Bras Psiquiatr 34:480-488.2012).

Brinkworth GD, Buckley JD, Noakes M, Clifton PM, Wilson CJ (Long-term effects of a very low-carbohydrate diet and a low-fat diet on mood and cognitive function. Arch Intern Med 169:1873-1880.2009).

Burke NJ, Hellman JL, Scott BG, Weems CF, Carrion VG (The impact of adverse childhood experiences on an urban pediatric population. Child Abuse Negl 35:408-413.2011).

Buwalda B, Blom WA, Koolhaas JM, van Dijk G (Behavioral and physiological responses to stress are affected by high-fat feeding in male rats. Physiol Behav 73:371-377.2001).

Camodeca M, Goossens FA (Aggression, social cognitions, anger and sadness in bullies and victims. J Child Psychol Psychiatry 46:186-197.2005).

Carnell S, Kim Y, Pryor K (Fat brains, greedy genes, and parent power: a biobehavioural risk model of child and adult obesity. Int Rev Psychiatry 24:189-199.2012).

Cartwright M, Wardle J, Steggles N, Simon AE, Croker H, Jarvis MJ (Stress and dietary practices in adolescents. Health Psychol 22:362-369.2003).

Cavuoto P, Wittert GA (The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy expenditure. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 23:79-86.2009).

Chang CH, Grace AA (Amygdala beta-noradrenergic receptors modulate delayed downregulation of dopamine activity following restraint. J Neurosci 33:1441-1450.2013).

Chapman DP, Whitfield CL, Felitti VJ, Dube SR, Edwards VJ, Anda RF (Adverse childhood experiences and the risk of depressive disorders in adulthood. J Affect Disord 82:217-225.2004).

Chaudhury D, Walsh JJ, Friedman AK, Juarez B, Ku SM, Koo JW, Ferguson D, Tsai HC, Pomeranz L, Christoffel DJ, Nectow AR, Ekstrand M, Domingos A, Mazei-Robison MS, Mouzon E, Lobo MK, Neve RL, Friedman JM, Russo SJ, Deisseroth K, Nestler EJ, Han MH (Rapid regulation of depression-related behaviours by control of midbrain dopamine neurons. Nature 493:532-536.2013).

Choy KH, de Visser Y, Nichols NR, van den Buuse M (Combined neonatal stress and young-adult glucocorticoid stimulation in rats reduce BDNF expression in hippocampus: effects on learning and memory. Hippocampus 18:655-667.2008).

Chugani HT, Behen ME, Muzik O, Juhasz C, Nagy F, Chugani DC (Local brain functional activity following early deprivation: a study of postinstitutionalized Romanian orphans. Neuroimage 14:1290-1301.2001).

Claustre Y, Rivy JP, Dennis T, Scatton B (Pharmacological studies on stress-induced increase in frontal cortical dopamine metabolism in the rat. J Pharmacol Exp Ther 238:693-700.1986).

Cohen RA, Grieve S, Hoth KF, Paul RH, Sweet L, Tate D, Gunstad J, Stroud L, McCaffery J, Hitsman B, Niaura R, Clark CR, McFarlane A, Bryant R, Gordon E, Williams LM (Early life stress and morphometry of the adult anterior cingulate cortex and caudate nuclei. Biol Psychiatry 59:975-982.2006).

Colantuoni C, Schwenker J, McCarthy J, Rada P, Ladenheim B, Cadet JL, Schwartz GJ, Moran TH, Hoebel BG (Excessive sugar intake alters binding to dopamine and mu-opioid receptors in the brain. Neuroreport 12:3549-3552.2001).

Costa G, Abin-Carriquiry JA, Dajas F (Nicotine prevents striatal dopamine loss produced by 6-hydroxydopamine lesion in the substantia nigra. Brain Res 888:336-342.2001).

Couto-Pereira NS, Ferreira CF, Lampert C, Arcego DM, Toniazzo AP, Bernardi JR, da Silva DC, Von Poser Toigo E, Diehl LA, Krolow R, Silveira PP, Dalmaz C (Neonatal interventions differently affect maternal care quality and have sexually dimorphic developmental effects on corticosterone secretion. Int J Dev Neurosci 55:72-81.2016).

Crespi EJ, Unkefer MK (Development of food intake controls: neuroendocrine and environmental regulation of food intake during early life. Horm Behav 66:74-85.2014).

Crews F, He J, Hodge C (Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. Pharmacol Biochem Behav 86:189-199.2007).

Czeh B, Lucassen PJ (What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 257:250-260.2007).

D'Aquila PS (Dopamine on D2-like receptors "reboosts" dopamine D1-like receptor-mediated behavioural activation in rats licking for sucrose. Neuropharmacology 58:1085-1096.2010).

Dannlowski U, Stuhrmann A, Beutelmann V, Zwanzger P, Lenzen T, Grotegerd D, Domschke K, Hohoff C, Ohrmann P, Bauer J, Lindner C, Postert C, Konrad C, Arolt V, Heindel W, Suslow T, Kugel H (Limbic scars: long-term consequences of childhood maltreatment revealed by functional and structural magnetic resonance imaging. Biol Psychiatry 71:286-293.2012).

Davis J, Eyre H, Jacka FN, Dodd S, Dean O, McEwen S, Debnath M, McGrath J, Maes M, Amminger P, McGorry PD, Pantelis C, Berk M (A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis. Neurosci Biobehav Rev 65:185-194.2016).

Davis JF, Tracy AL, Schurdak JD, Tschop MH, Lipton JW, Clegg DJ, Benoit SC (Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat. Behav Neurosci 122:1257-1263.2008).

de Kloet ER, Joels M, Holsboer F (Stress and the brain: from adaptation to disease. Nat Rev Neurosci 6:463-475.2005).

Deshmukh RR, Sharma PL (Stimulation of accumbens shell cannabinoid CB(1) receptors by noladin ether, a putative endocannabinoid, modulates food intake and dietary selection in rats. Pharmacol Res 66:276-282.2012).

Di Marzo V, Ligresti A, Cristino L (The endocannabinoid system as a link between homoeostatic and hedonic pathways involved in energy balance regulation. Int J Obes (Lond) 33 Suppl 2:S18-24.2009).

Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI, Spear LP (Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. Physiol Behav 97:484-494.2009).

Douglas LA, Varlinskaya EI, Spear LP (Rewarding properties of social interactions in adolescent and adult male and female rats: impact of social versus isolate housing of subjects and partners. Dev Psychobiol 45:153-162.2004).

Dow-Edwards D, Silva L (Endocannabinoids in brain plasticity: Cortical maturation, HPA axis function and behavior. Brain Res 1654:157-164.2017).
Duman RS, Monteggia LM (A neurotrophic model for stress-related mood disorders. Biol Psychiatry 59:1116-1127.2006).
Edwards VJ, Holden GW, Felitti VJ, Anda RF (Relationship between multiple forms of childhood maltreatment and adult mental health in community respondents: results from the adverse childhood experiences study. Am J Psychiatry 160:1453-1460.2003).
Eiland L, Romeo RD (Stress and the developing adolescent brain. Neuroscience 249:162-171.2013).
Einon DF, Morgan MJ (A critical period for social isolation in the rat. Dev Psychobiol 10:123-132.1977).
El-Husseini AE, Schnell E, Chetkovich DM, Nicoll RA, Bredt DS (PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses. Science 290:1364-1368.2000).
Eluvathingal TJ, Chugani HT, Behen ME, Juhasz C, Muzik O, Maqbool M, Chugani DC, Makki M (Abnormal brain connectivity in children after early severe socioemotional deprivation: a diffusion tensor imaging study. Pediatrics 117:2093-2100.2006).
Epstein J, Pan H, Kocsis JH, Yang Y, Butler T, Chusid J, Hochberg H, Murrough J, Strohmayer E, Stern E, Silbersweig DA (Lack of ventral striatal response to positive stimuli in depressed versus normal subjects. Am J Psychiatry 163:1784-1790.2006).
Erreger K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJ, Traynelis SF (Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. J Physiol 563:345-358.2005).
Esteban S, Garcia-Sevilla JA (Effects induced by cannabinoids on monoaminergic systems in the brain and their implications for psychiatric disorders. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 38:78-87.2012).
Fabricius K, Helboe L, Fink-Jensen A, Wortwein G, Steiniger-Brach B (Pharmacological characterization of social isolation-induced hyperactivity. Psychopharmacology (Berl) 215:257-266.2011).
Fabricius K, Helboe L, Fink-Jensen A, Wortwein G, Steiniger-Brach B, Sotty F (Increased dopaminergic activity in socially isolated rats: an electrophysiological study. Neurosci Lett 482:117-122.2010).
Fawcett TW, Frankenhuis WE (Adaptive explanations for sensitive windows in development. Front Zool 12 Suppl 1:S3.2015).
Finger BC, Dinan TG, Cryan JF (Diet-induced obesity blunts the behavioural effects of ghrelin: studies in a mouse-progressive ratio task. Psychopharmacology (Berl) 220:173-181.2012).
Finkelstein EA, Ruhm CJ, Kosa KM (Economic causes and consequences of obesity. Annu Rev Public Health 26:239-257.2005).
Fone KC, Porkess MV (Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. Neurosci Biobehav Rev 32:1087-1102.2008).
Fraguas D, Diaz-Caneja CM, Corripio I, Gonzalez-Pinto A, Lobo A, Bioque M, Cuesta MJ, Sanjuan J, Rodriguez-Toscano E, Arias B, Sarro S, Cabrera B, Bulbena A, Vieta E, Castro-Fornieles J, Arango C, Bernardo M, Parellada M (Gene-

environment interaction as a predictor of early adjustment in first episode psychosis. Schizophr Res.2017).
Francis HM, Stevenson RJ (Higher reported saturated fat and refined sugar intake is associated with reduced hippocampal-dependent memory and sensitivity to interoceptive signals. Behav Neurosci 125:943-955.2011).
Frazier CR, Mason P, Zhuang X, Beeler JA (Sucrose exposure in early life alters adult motivation and weight gain. PLoS One 3:e3221.2008).
Frye MA, Tsai GE, Huggins T, Coyle JT, Post RM (Low cerebrospinal fluid glutamate and glycine in refractory affective disorder. Biol Psychiatry 61:162-166.2007).
Fuchs E, Flugge G (Cellular consequences of stress and depression. Dialogues Clin Neurosci 6:171-183.2004).
Galistu A, D'Aquila PS (Effect of the dopamine D1-like receptor antagonist SCH 23390 on the microstructure of ingestive behaviour in water-deprived rats licking for water and NaCl solutions. Physiol Behav 105:230-233.2012).
Gao SF, Klomp A, Wu JL, Swaab DF, Bao AM (Reduced GAD(65/67) immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus in depression: a postmortem study. J Affect Disord 149:422-425.2013).
Gaskin PL, Alexander SP, Fone KC (Neonatal phencyclidine administration and post-weaning social isolation as a dual-hit model of 'schizophrenia-like' behaviour in the rat. Psychopharmacology (Berl) 231:2533-2545.2014).
Giovanoli S, Engler H, Engler A, Richetto J, Voget M, Willi R, Winter C, Riva MA, Mortensen PB, Feldon J, Schedlowski M, Meyer U (Stress in puberty unmasks latent neuropathological consequences of prenatal immune activation in mice. Science 339:1095-1099.2013).
Gloor SM (Relevance of Na,K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. FEBS Lett 412:1-4.1997).
Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM (Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. Proc Natl Acad Sci U S A 101:8174-8179.2004).
Gold PW, Chrousos GP (Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: high vs low CRH/NE states. Mol Psychiatry 7:254-275.2002).
Goldman L, Winget C, Hollingshead GW, Levine S (Postweaning development of negative feedback in the pituitary-adrenal system of the rat. Neuroendocrinology 12:199-211.1973).
Gomez-Palacio-Schjetnan A, Escobar ML (Neurotrophins and synaptic plasticity. Curr Top Behav Neurosci 15:117-136.2013).
Gonzalez B, Raineri M, Cadet JL, Garcia-Rill E, Urbano FJ, Bisagno V (Modafinil improves methamphetamine-induced object recognition deficits and restores prefrontal cortex ERK signaling in mice. Neuropharmacology 87:188-197.2014).
Grace AA (Dysregulation of the dopamine system in the pathophysiology of schizophrenia and depression. Nat Rev Neurosci 17:524-532.2016).
Granholm AC, Bimonte-Nelson HA, Moore AB, Nelson ME, Freeman LR, Sambamurti K (Effects of a saturated fat and high cholesterol diet on memory and hippocampal morphology in the middle-aged rat. J Alzheimers Dis 14:133-145.2008).

Grillo L (A Possible Role of Anhedonia as Common Substrate for Depression and Anxiety. Depress Res Treat 2016:1598130.2016).
Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M (Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. Mol Cell Endocrinol 350:299-309.2012).
Guidotti G, Calabrese F, Auletta F, Olivier J, Racagni G, Homberg J, Riva MA (Developmental influence of the serotonin transporter on the expression of npas4 and GABAergic markers: modulation by antidepressant treatment. Neuropsychopharmacology 37:746-758.2012).
Gundersen C, Mahatmya D, Garasky S, Lohman B (Linking psychosocial stressors and childhood obesity. Obes Rev 12:e54-63.2011).
Haber SN, Knutson B (The reward circuit: linking primate anatomy and human imaging. Neuropsychopharmacology 35:4-26.2010).
Haj-Mirzaian A, Amiri S, Kordjazy N, Rahimi-Balaei M, Marzban H, Aminzadeh A, Dehpour AR, Mehr SE (Blockade of NMDA receptors reverses the depressant, but not anxiogenic effect of adolescence social isolation in mice. Eur J Pharmacol 750:160-166.2015).
Hall FS, Wilkinson LS, Humby T, Inglis W, Kendall DA, Marsden CA, Robbins TW (Isolation rearing in rats: pre- and postsynaptic changes in striatal dopaminergic systems. Pharmacol Biochem Behav 59:859-872.1998).
Harris AP, Holmes MC, de Kloet ER, Chapman KE, Seckl JR (Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. Psychoneuroendocrinology 38:648-658.2013).
Hayashi R, Wada H, Ito K, Adcock IM (Effects of glucocorticoids on gene transcription. Eur J Pharmacol 500:51-62.2004).
He J, Crews FT (Neurogenesis decreases during brain maturation from adolescence to adulthood. Pharmacol Biochem Behav 86:327-333.2007).
Heidbreder CA, Weiss IC, Domeney AM, Pryce C, Homberg J, Hedou G, Feldon J, Moran MC, Nelson P (Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. Neuroscience 100:749-768.2000).
Heim C, Binder EB (Current research trends in early life stress and depression: review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. Exp Neurol 233:102-111.2012).
Heim C, Nemeroff CB (The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. Biol Psychiatry 49:1023-1039.2001).
Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS (Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. Endocrinology 138:3859-3863.1997).
Holm MM, Nieto-Gonzalez JL, Vardya I, Henningsen K, Jayatissa MN, Wiborg O, Jensen K (Hippocampal GABAergic dysfunction in a rat chronic mild stress model of depression. Hippocampus 21:422-433.2011).
Homberg JR, Kyzar EJ, Scattoni ML, Norton WH, Pittman J, Gaikwad S, Nguyen M, Poudel MK, Ullmann JF, Diamond DM, Kaluyeva AA, Parker MO, Brown RE, Song C, Gainetdinov RR, Gottesman, II, Kalueff AV (Genetic and environmental modulation of neurodevelopmental disorders: Translational insights from labs to beds. Brain Res Bull 125:79-91.2016).

Hong S, Flashner B, Chiu M, ver Hoeve E, Luz S, Bhatnagar S (Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. Physiol Behav 105:269-275.2012).
Hong YP, Lee HC, Kim HT (Treadmill exercise after social isolation increases the levels of NGF, BDNF, and synapsin I to induce survival of neurons in the hippocampus, and improves depression-like behavior. J Exerc Nutrition Biochem 19:11-18.2015).
Horn SR, Charney DS, Feder A (Understanding resilience: New approaches for preventing and treating PTSD. Exp Neurol 284:119-132.2016).
Hornung OP, Heim CM (Gene-environment interactions and intermediate phenotypes: early trauma and depression. Front Endocrinol (Lausanne) 5:14.2014).
Huang Q, Rivest R, Richard D (Effects of leptin on corticotropin-releasing factor (CRF) synthesis and CRF neuron activation in the paraventricular hypothalamic nucleus of obese (ob/ob) mice. Endocrinology 139:1524-1532.1998).
Ibi D, Takuma K, Koike H, Mizoguchi H, Tsuritani K, Kuwahara Y, Kamei H, Nagai T, Yoneda Y, Nabeshima T, Yamada K (Social isolation rearing-induced impairment of the hippocampal neurogenesis is associated with deficits in spatial memory and emotion-related behaviors in juvenile mice. J Neurochem 105:921-932.2008).
Ibias J, Miguens M, Del Rio D, Valladolid-Acebes I, Stucchi P, Ambrosio E, Martin M, Morales L, Ruiz-Gayo M, Del Olmo N (Decreased rates of operant food self-administration are associated with reward deficits in high-fat feeding mice. Eur J Nutr 55:1615-1622.2016).
Ieraci A, Mallei A, Popoli M (Social Isolation Stress Induces Anxious-Depressive-Like Behavior and Alterations of Neuroplasticity-Related Genes in Adult Male Mice. Neural Plast 2016:6212983.2016).
Isgor C, Kabbaj M, Akil H, Watson SJ (Delayed effects of chronic variable stress during peripubertal-juvenile period on hippocampal morphology and on cognitive and stress axis functions in rats. Hippocampus 14:636-648.2004).
Ismail FY, Fatemi A, Johnston MV (Cerebral plasticity: Windows of opportunity in the developing brain. Eur J Paediatr Neurol.2016).
Jacobsson SE, Jonsson S, Lindberg C, Svensson LA (Determination of terbutaline in plasma by gas chromatography chemical ionization mass spectrometry. Biomed Mass Spectrom 7:265-268.1980).
Jahng JW, Yoo SB, Ryu V, Lee JH (Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. Int J Dev Neurosci 30:47-53.2012).
Je HS, Yang F, Zhou J, Lu B (Neurotrophin 3 induces structural and functional modification of synapses through distinct molecular mechanisms. J Cell Biol 175:1029-1042.2006).
Je HS, Zhou J, Yang F, Lu B (Distinct mechanisms for neurotrophin-3-induced acute and long-term synaptic potentiation. J Neurosci 25:11719-11729.2005).
Juruena MF (Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression. Epilepsy Behav 38:148-159.2014).
Kamara K, Eskay R, Castonguay T (High-fat diets and stress responsivity. Physiol Behav 64:1-6.1998).
Karolewicz B, Maciag D, O'Dwyer G, Stockmeier CA, Feyissa AM, Rajkowska G (Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. Int J Neuropsychopharmacol 13:411-420.2010).

Keith D, El-Husseini A (Excitation Control: Balancing PSD-95 Function at the Synapse. Front Mol Neurosci 1:4.2008).
Kempermann G (Regulation of adult hippocampal neurogenesis - implications for novel theories of major depression. Bipolar Disord 4:17-33.2002).
Kempermann G, Kronenberg G (Depressed new neurons--adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. Biol Psychiatry 54:499-503.2003).
Kennedy KM, Reese ED, Horn MM, Sizemore AN, Unni AK, Meerbrey ME, Kalich AG, Jr., Rodrigue KM (BDNF val66met polymorphism affects aging of multiple types of memory. Brain Res 1612:104-117.2015).
Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, Walters EE (Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. Arch Gen Psychiatry 62:617-627.2005).
Kim S, Kaang BK (Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. Exp Mol Med 49:e281.2017).
Kirkham TC (Endocannabinoids and the non-homeostatic control of appetite. Curr Top Behav Neurosci 1:231-253.2009).
Klein ZA, Padow VA, Romeo RD (The effects of stress on play and home cage behaviors in adolescent male rats. Dev Psychobiol 52:62-70.2010).
Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K, Nabeshima T, Yoneda Y, Yamada K (Behavioral abnormality and pharmacologic response in social isolation-reared mice. Behav Brain Res 202:114-121.2009).
Koletzko B (Childhood Obesity: Current Situation and Future Opportunities. J Pediatr Gastroenterol Nutr 63 Suppl 1:S18-21.2016).
Korte M, Schmitz D (Cellular and System Biology of Memory: Timing, Molecules, and Beyond. Physiol Rev 96:647-693.2016).
Koss WA, Belden CE, Hristov AD, Juraska JM (Dendritic remodeling in the adolescent medial prefrontal cortex and the basolateral amygdala of male and female rats. Synapse 68:61-72.2014).
Krolow R, Noschang C, Weis SN, Pettenuzzo LF, Huffell AP, Arcego DM, Marcolin M, Mota CS, Kolling J, Scherer EB, Wyse AT, Dalmaz C (Isolation stress during the prepubertal period in rats induces long-lasting neurochemical changes in the prefrontal cortex. Neurochem Res 37:1063-1073.2012).
Lampert C, Arcego DM, Laureano DP, Diehl LA, da Costa Lima IF, Krolow R, Pettenuzzo LF, Dalmaz C, Vendite D (Effect of chronic administration of tamoxifen and/or estradiol on feeding behavior, palatable food and metabolic parameters in ovariectomized rats. Physiol Behav 119:17-24.2013).
Lante F, de Jesus Ferreira MC, Guiramand J, Recasens M, Vignes M (Low-frequency stimulation induces a new form of LTP, metabotropic glutamate (mGlu5) receptor- and PKA-dependent, in the CA1 area of the rat hippocampus. Hippocampus 16:345-360.2006).
Lapiz MD, Mateo Y, Parker T, Marsden C (Effects of noradrenaline depletion in the brain on response on novelty in isolation-reared rats. Psychopharmacology (Berl) 152:312-320.2000).
Laryea G, Arnett M, Muglia LJ (Ontogeny of hypothalamic glucocorticoid receptor-mediated inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in mice. Stress 1-8.2015).
Laureano DP, Dalle Molle R, Alves MB, Luft C, Desai M, Ross MG, Silveira PP (Intrauterine growth restriction modifies the hedonic response to sweet taste in

newborn pups - Role of the accumbal mu-opioid receptors. Neuroscience 322:500-508.2016).
Lavoie J, Pereira LC, Talwar V (Children's Physical Resilience Outcomes: Meta-Analysis of Vulnerability and Protective Factors. J Pediatr Nurs 31:701-711.2016).
Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL (Reward processing by the opioid system in the brain. Physiol Rev 89:1379-1412.2009).
Lee B, Sur B, Park J, Kim SH, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH (Chronic administration of baicalein decreases depression-like behavior induced by repeated restraint stress in rats. Korean J Physiol Pharmacol 17:393-403.2013).
Lee PR, Brady D, Koenig JI (Corticosterone alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA expression before puberty. Brain Res Mol Brain Res 115:55-62.2003).
Levine AS, Billington CJ (Opioids as agents of reward-related feeding: a consideration of the evidence. Physiol Behav 82:57-61.2004).
Levy R, Goldman-Rakic PS (Association of storage and processing functions in the dorsolateral prefrontal cortex of the nonhuman primate. J Neurosci 19:5149-5158.1999).
Lopizzo N, Bocchio Chiavetto L, Cattane N, Plazzotta G, Tarazi FI, Pariante CM, Riva MA, Cattaneo A (Gene-environment interaction in major depression: focus on experience-dependent biological systems. Front Psychiatry 6:68.2015).
Lu B, Pang PT, Woo NH (The yin and yang of neurotrophin action. Nat Rev Neurosci 6:603-614.2005).
Lu L, Bao G, Chen H, Xia P, Fan X, Zhang J, Pei G, Ma L (Modification of hippocampal neurogenesis and neuroplasticity by social environments. Exp Neurol 183:600-609.2003).
Lui P, Padow VA, Franco D, Hall BS, Park B, Klein ZA, Romeo RD (Divergent stress-induced neuroendocrine and behavioral responses prior to puberty. Physiol Behav 107:104-111.2012).
Lupien SJ, Fiocco A, Wan N, Maheu F, Lord C, Schramek T, Tu MT (Stress hormones and human memory function across the lifespan. Psychoneuroendocrinology 30:225-242.2005).
Manju S, Vignoli B, Canossa M, Blum R (Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. Pflugers Arch.2017).
Mann JJ, Currier DM (Stress, genetics and epigenetic effects on the neurobiology of suicidal behavior and depression. Eur Psychiatry 25:268-271.2010).
Marti O, Marti J, Armario A (Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. Physiol Behav 55:747-753.1994).
McCormick CM, Mathews IZ, Thomas C, Waters P (Investigations of HPA function and the enduring consequences of stressors in adolescence in animal models. Brain Cogn 72:73-85.2010).
McEwen BS (Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol Rev 87:873-904.2007).
McEwen BS (Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. Metabolism 57 Suppl 2:S11-15.2008).
McEwen BS, Gianaros PJ (Stress- and allostasis-induced brain plasticity. Annu Rev Med 62:431-445.2011).

McIntosh AL, Ballard TM, Steward LJ, Moran PM, Fone KC (The atypical antipsychotic risperidone reverses the recognition memory deficits induced by post-weaning social isolation in rats. Psychopharmacology (Berl) 228:31-42.2013).

McIntosh LJ, Sapolsky RM (Glucocorticoids increase the accumulation of reactive oxygen species and enhance adriamycin-induced toxicity in neuronal culture. Exp Neurol 141:201-206.1996).

McNeilly AD, Gao A, Hill AY, Gomersall T, Balfour DJ, Sutherland C, Stewart CA (The effect of dietary intervention on the metabolic and behavioural impairments generated by short term high fat feeding in the rat. Physiol Behav 167:100-109.2016).

McNeilly AD, Stewart CA, Sutherland C, Balfour DJ (High fat feeding is associated with stimulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and reduced anxiety in the rat. Psychoneuroendocrinology 52:272-280.2015).

Medeiros W, Torro-Alves N, Malloy-Diniz LF, Minervino CM (Executive Functions in Children Who Experience Bullying Situations. Front Psychol 7:1197.2016).

Meikle MN, Prieto JP, Urbanavicius J, Lopez X, Abin-Carriquiry JA, Prunell G, Scorza MC (Anti-aggressive effect elicited by coca-paste in isolation-induced aggression of male rats: influence of accumbal dopamine and cortical serotonin. Pharmacol Biochem Behav 110:216-223.2013).

Mennella JA, Beauchamp GK (Flavor experiences during formula feeding are related to preferences during childhood. Early Hum Dev 68:71-82.2002).

Mineur YS, Picciotto MR, Sanacora G (Antidepressant-like effects of ceftriaxone in male C57BL/6J mice. Biol Psychiatry 61:250-252.2007).

Miura H, Qiao H, Ohta T (Attenuating effects of the isolated rearing condition on increased brain serotonin and dopamine turnover elicited by novelty stress. Brain Res 926:10-17.2002).

Morales L, Del Olmo N, Valladolid-Acebes I, Fole A, Cano V, Merino B, Stucchi P, Ruggieri D, Lopez L, Alguacil LF, Ruiz-Gayo M (Shift of circadian feeding pattern by high-fat diets is coincident with reward deficits in obese mice. PLoS One 7:e36139.2012).

Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Wilson RS (Dietary fat intake and 6-year cognitive change in an older biracial community population. Neurology 62:1573-1579.2004).

Muhlig Y, Antel J, Focker M, Hebebrand J (Are bidirectional associations of obesity and depression already apparent in childhood and adolescence as based on high-quality studies? A systematic review. Obes Rev 17:235-249.2016).

Naef L, Gratton A, Walker CD (Exposure to high fat during early development impairs adaptations in dopamine and neuroendocrine responses to repeated stress. Stress 16:540-548.2013).

Nauczyciel C, Robic S, Dondaine T, Verin M, Robert G, Drapier D, Naudet F, Millet B (The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in resistant major depressive disorder. J Mol Psychiatry 1:17.2013).

Nelson CA, 3rd, Zeanah CH, Fox NA, Marshall PJ, Smyke AT, Guthrie D (Cognitive recovery in socially deprived young children: the Bucharest Early Intervention Project. Science 318:1937-1940.2007).

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, Gold SJ, Monteggia LM (Neurobiology of depression. Neuron 34:13-25.2002).

Nicola SM (Reassessing wanting and liking in the study of mesolimbic influence on food intake. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol ajpregu 00234 02016.2016).

Noschang C, Krolow R, Arcego DM, Laureano D, Fitarelli LD, Huffell AP, Ferreira AG, da Cunha AA, Machado FR, Wyse AT, Dalmaz C (The influence of early life interventions on olfactory memory related to palatable food, and on oxidative stress parameters and Na+/K+-ATPase activity in the hippocampus and olfactory bulb of female adult rats. Neurochem Res 37:1801-1810.2012).

O'Keane V, Frodl T, Dinan TG (A review of Atypical depression in relation to the course of depression and changes in HPA axis organization. Psychoneuroendocrinology 37:1589-1599.2012).

Oates M, Woodside B, Walker CD (Chronic leptin administration in developing rats reduces stress responsiveness partly through changes in maternal behavior. Horm Behav 37:366-376.2000).

Ogden CL, Carroll MD, Kit BK, Flegal KM (Prevalence of childhood and adult obesity in the United States, 2011-2012. JAMA 311:806-814.2014).

Oliveira C, Oliveira CM, de Macedo IC, Quevedo AS, Filho PR, Silva FR, Vercelino R, de Souza IC, Caumo W, Torres IL (Hypercaloric diet modulates effects of chronic stress: a behavioral and biometric study on rats. Stress 18:514-523.2015).

Olweus D (Bullying at school. Basic facts and an effective intervention programme. Promot Educ 1:27-31, 48.1994).

Ortolani D, Oyama LM, Ferrari EM, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC (Effects of comfort food on food intake, anxiety-like behavior and the stress response in rats. Physiol Behav 103:487-492.2011).

Padovan CM, Guimaraes FS (Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats. Pharmacol Biochem Behav 77:15-19.2004).

Pandit R, Mercer JG, Overduin J, la Fleur SE, Adan RA (Dietary factors affect food reward and motivation to eat. Obes Facts 5:221-242.2012).

Panksepp JB, Jochman KA, Kim JU, Koy JJ, Wilson ED, Chen Q, Wilson CR, Lahvis GP (Affiliative behavior, ultrasonic communication and social reward are influenced by genetic variation in adolescent mice. PLoS One 2:e351.2007).

Pariante CM (Risk factors for development of depression and psychosis. Glucocorticoid receptors and pituitary implications for treatment with antidepressant and glucocorticoids. Ann N Y Acad Sci 1179:144-152.2009).

Pariante CM, Lightman SL (The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. Trends Neurosci 31:464-468.2008).

Pariante CM, Miller AH (Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. Biol Psychiatry 49:391-404.2001).

Park MH, Falconer C, Viner RM, Kinra S (The impact of childhood obesity on morbidity and mortality in adulthood: a systematic review. Obes Rev 13:985-1000.2012).

Pathan AR, Gaikwad AB, Viswanad B, Ramarao P (Rosiglitazone attenuates the cognitive deficits induced by high fat diet feeding in rats. Eur J Pharmacol 589:176-179.2008).

Paul J, Gottmann K, Lessmann V (NT-3 regulates BDNF-induced modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. Neuroreport 12:2635-2639.2001).

Paus T, Keshavan M, Giedd JN (Why do many psychiatric disorders emerge during adolescence? Nat Rev Neurosci 9:947-957.2008).
Pecina S, Berridge KC (Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic 'liking' for food: map based on microinjection Fos plumes. Brain Res 863:71-86.2000).
Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF (Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. Endocrinology 145:3754-3762.2004).
Pervanidou P, Chrousos GP (Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. Metabolism 61:611-619.2012).
Pitman KA, Borgland SL (Changes in mu-opioid receptor expression and function in the mesolimbic system after long-term access to a palatable diet. Pharmacol Ther 154:110-119.2015).
Pittenger C (Disorders of memory and plasticity in psychiatric disease. Dialogues Clin Neurosci 15:455-463.2013).
Pittenger C, Duman RS (Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. Neuropsychopharmacology 33:88-109.2008).
Polyakova M, Stuke K, Schuemberg K, Mueller K, Schoenknecht P, Schroeter ML (BDNF as a biomarker for successful treatment of mood disorders: a systematic & quantitative meta-analysis. J Affect Disord 174:432-440.2015).
Porsolt RD, Bertin A, Blavet N, Deniel M, Jalfre M (Immobility induced by forced swimming in rats: effects of agents which modify central catecholamine and serotonin activity. Eur J Pharmacol 57:201-210.1979).
Przegalinski E, Tatarczynska E, Deren-Wesolek A, Chojnacka-Wojcik E (Antidepressant-like effects of a partial agonist at strychnine-insensitive glycine receptors and a competitive NMDA receptor antagonist. Neuropharmacology 36:31-37.1997).
Quan MN, Tian YT, Xu KH, Zhang T, Yang Z (Post weaning social isolation influences spatial cognition, prefrontal cortical synaptic plasticity and hippocampal potassium ion channels in Wistar rats. Neuroscience 169:214-222.2010).
Rice D, Barone S, Jr. (Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. Environ Health Perspect 108 Suppl 3:511-533.2000).
Ridder S, Chourbaji S, Hellweg R, Urani A, Zacher C, Schmid W, Zink M, Hortnagl H, Flor H, Henn FA, Schutz G, Gass P (Mice with genetically altered glucocorticoid receptor expression show altered sensitivity for stress-induced depressive reactions. J Neurosci 25:6243-6250.2005).
Rizvi SJ, Pizzagalli DA, Sproule BA, Kennedy SH (Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls. Neurosci Biobehav Rev 65:21-35.2016).
Romeo RD, Lee SJ, Chhua N, McPherson CR, McEwen BS (Testosterone cannot activate an adult-like stress response in prepubertal male rats. Neuroendocrinology 79:125-132.2004a).
Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS (Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. Neuroendocrinology 80:387-393.2004b).
Romeo RD, McEwen BS (Stress and the adolescent brain. Ann N Y Acad Sci 1094:202-214.2006).
Roth TL, Sweatt JD (Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences. Horm Behav 59:315-320.2011).

Saleh A, Potter GG, McQuoid DR, Boyd B, Turner R, MacFall JR, Taylor WD (Effects of early life stress on depression, cognitive performance and brain morphology. Psychol Med 47:171-181.2017).

Sasaki A, de Vega WC, St-Cyr S, Pan P, McGowan PO (Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. Neuroscience 240:1-12.2013).

Savalli G, Diao W, Berger S, Ronovsky M, Partonen T, Pollak DD (Anhedonic behavior in cryptochrome 2-deficient mice is paralleled by altered diurnal patterns of amygdala gene expression. Amino Acids 47:1367-1377.2015).

Schnell E, Sizemore M, Karimzadegan S, Chen L, Bredt DS, Nicoll RA (Direct interactions between PSD-95 and stargazin control synaptic AMPA receptor number. Proc Natl Acad Sci U S A 99:13902-13907.2002).

Schwartz BS, Glass TA, Pollak J, Hirsch AG, Bailey-Davis L, Moran TH, Bandeen-Roche K (Depression, its comorbidities and treatment, and childhood body mass index trajectories. Obesity (Silver Spring) 24:2585-2592.2016).

Scorza MC, Carrau C, Silveira R, Zapata-Torres G, Cassels BK, Reyes-Parada M (Monoamine oxidase inhibitory properties of some methoxylated and alkylthio amphetamine derivatives: structure-activity relationships. Biochem Pharmacol 54:1361-1369.1997).

Seif T, Makriyannis A, Kunos G, Bonci A, Hopf FW (The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol mediates D1 and D2 receptor cooperative enhancement of rat nucleus accumbens core neuron firing. Neuroscience 193:21-33.2011).

Serafini G, Hayley S, Pompili M, Dwivedi Y, Brahmachari G, Girardi P, Amore M (Hippocampal neurogenesis, neurotrophic factors and depression: possible therapeutic targets? CNS Neurol Disord Drug Targets 13:1708-1721.2014).

Shang X, Li Y, Liu A, Zhang Q, Hu X, Du S, Ma J, Xu G, Guo H, Du L, Ma G (Dietary pattern and its association with the prevalence of obesity and related cardiometabolic risk factors among Chinese children. PLoS One 7:e43183.2012).

Shao Y, Yan G, Xuan Y, Peng H, Huang QJ, Wu R, Xu H (Chronic social isolation decreases glutamate and glutamine levels and induces oxidative stress in the rat hippocampus. Behav Brain Res 282:201-208.2015).

Sharma S, Fulton S (Diet-induced obesity promotes depressive-like behaviour that is associated with neural adaptations in brain reward circuitry. Int J Obes (Lond) 37:382-389.2013).

Shea A, Walsh C, Macmillan H, Steiner M (Child maltreatment and HPA axis dysregulation: relationship to major depressive disorder and post traumatic stress disorder in females. Psychoneuroendocrinology 30:162-178.2005).

Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW (Hippocampal atrophy in recurrent major depression. Proc Natl Acad Sci U S A 93:3908-3913.1996).

Shikanai H, Kimura S, Togashi H (Early life stress affects the serotonergic system underlying emotional regulation. Biol Pharm Bull 36:1392-1395.2013).

Silva-Gomez AB, Rojas D, Juarez I, Flores G (Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. Brain Res 983:128-136.2003).

Silveira PP, Portella AK, Assis SA, Nieto FB, Diehl LA, Crema LM, Peres W, Costa G, Scorza C, Quillfeldt JA, Lucion AB, Dalmaz C (Early life experience alters behavioral responses to sweet food and accumbal dopamine metabolism. Int J Dev Neurosci 28:111-118.2010).

Silveira PP, Portella AK, Benetti Cda S, Zugno AI, Scherer EB, Mattos CB, Wyse AT, Lucion AB, Dalmaz C (Association between Na(+),K(+)-ATPase activity and the vulnerability/resilience to mood disorders induced by early life experience. Neurochem Res 36:2075-2082.2011).

Sisk CL, Foster DL (The neural basis of puberty and adolescence. Nat Neurosci 7:1040-1047.2004).

Slattery DA, Cryan JF (Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. Nat Protoc 7:1009-1014.2012).

Solinas M, Goldberg SR (Motivational effects of cannabinoids and opioids on food reinforcement depend on simultaneous activation of cannabinoid and opioid systems. Neuropsychopharmacology 30:2035-2045.2005).

Spear LP (The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neurosci Biobehav Rev 24:417-463.2000).

Squire LR (Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev 99:195-231.1992).

Stevens JS, van Rooij SJ, Jovanovic T (Developmental Contributors to Trauma Response: The Importance of Sensitive Periods, Early Environment, and Sex Differences. Curr Top Behav Neurosci.2016).

Swaab DF, Bao AM, Lucassen PJ (The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. Ageing Res Rev 4:141-194.2005).

Takatsu-Coleman AL, Patti CL, Zanin KA, Zager A, Carvalho RC, Borcoi AR, Ceccon LM, Berro LF, Tufik S, Andersen ML, Frussa-Filho R (Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: mood-congruent memory in male mice? J Psychiatry Neurosci 38:259-268.2013).

Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman MF, McArthur MD, Meaney MJ (High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. Am J Physiol 273:E1168-1177.1997).

Tau GZ, Peterson BS (Normal development of brain circuits. Neuropsychopharmacology 35:147-168.2010).

Teegarden SL, Scott AN, Bale TL (Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling. Neuroscience 162:924-932.2009).

Teicher MH, Tomoda A, Andersen SL (Neurobiological consequences of early stress and childhood maltreatment: are results from human and animal studies comparable? Ann N Y Acad Sci 1071:313-323.2006).

Terzian AL, Drago F, Wotjak CT, Micale V (The Dopamine and Cannabinoid Interaction in the Modulation of Emotions and Cognition: Assessing the Role of Cannabinoid CB1 Receptor in Neurons Expressing Dopamine D1 Receptors. Front Behav Neurosci 5:49.2011).

Theriault P, ElAli A, Rivest S (High fat diet exacerbates Alzheimer's disease-related pathology in APPswe/PS1 mice. Oncotarget 7:67808-67827.2016).

Tomiyama AJ, Dallman MF, Epel ES (Comfort food is comforting to those most stressed: evidence of the chronic stress response network in high stress women. Psychoneuroendocrinology 36:1513-1519.2011).

Tracy AL, Wee CJ, Hazeltine GE, Carter RA (Characterization of attenuated food motivation in high-fat diet-induced obesity: Critical roles for time on diet and reinforcer familiarity. Physiol Behav 141:69-77.2015).

Tremblay LK, Naranjo CA, Graham SJ, Herrmann N, Mayberg HS, Hevenor S, Busto UE (Functional neuroanatomical substrates of altered reward processing in major depressive disorder revealed by a dopaminergic probe. Arch Gen Psychiatry 62:1228-1236.2005).

Tryon MS, DeCant R, Laugero KD (Having your cake and eating it too: a habit of comfort food may link chronic social stress exposure and acute stress-induced cortisol hyporesponsiveness. Physiol Behav 114-115:32-37.2013).

Tsigos C, Chrousos GP (Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. J Psychosom Res 53:865-871.2002).

Tsoory M, Guterman A, Richter-Levin G (Exposure to stressors during juvenility disrupts development-related alterations in the PSA-NCAM to NCAM expression ratio: potential relevance for mood and anxiety disorders. Neuropsychopharmacology 33:378-393.2008).

Tulloch AJ, Murray S, Vaicekonyte R, Avena NM (Neural responses to macronutrients: hedonic and homeostatic mechanisms. Gastroenterology 148:1205-1218.2015).

Valladolid-Acebes I, Stucchi P, Cano V, Fernandez-Alfonso MS, Merino B, Gil-Ortega M, Fole A, Morales L, Ruiz-Gayo M, Del Olmo N (High-fat diets impair spatial learning in the radial-arm maze in mice. Neurobiol Learn Mem 95:80-85.2011).

Valtorta F, Pennuto M, Bonanomi D, Benfenati F (Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? Bioessays 26:445-453.2004).

van Harmelen AL, van Tol MJ, van der Wee NJ, Veltman DJ, Aleman A, Spinhoven P, van Buchem MA, Zitman FG, Penninx BW, Elzinga BM (Reduced medial prefrontal cortex volume in adults reporting childhood emotional maltreatment. Biol Psychiatry 68:832-838.2010).

Vargas J, Junco M, Gomez C, Lajud N (Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. PLoS One 11:e0162665.2016).

Varty GB, Marsden CA, Higgins GA (Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats. Brain Res 824:197-203.1999).

Varty GB, Paulus MP, Braff DL, Geyer MA (Environmental enrichment and isolation rearing in the rat: effects on locomotor behavior and startle response plasticity. Biol Psychiatry 47:864-873.2000).

Veena J, Srikumar BN, Mahati K, Raju TR, Shankaranarayana Rao BS (Oxotremorine treatment restores hippocampal neurogenesis and ameliorates depression-like behaviour in chronically stressed rats. Psychopharmacology (Berl) 217:239-253.2011).

Vermetten E, Vythilingam M, Southwick SM, Charney DS, Bremner JD (Long-term treatment with paroxetine increases verbal declarative memory and hippocampal volume in posttraumatic stress disorder. Biol Psychiatry 54:693-702.2003).

Vreeburg SA, Hoogendijk WJ, van Pelt J, Derijk RH, Verhagen JC, van Dyck R, Smit JH, Zitman FG, Penninx BW (Major depressive disorder and hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: results from a large cohort study. Arch Gen Psychiatry 66:617-626.2009).

Vucetic Z, Carlin JL, Totoki K, Reyes TM (Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity. J Neurochem 120:891-898.2012).

Wang H, Wang B, Yin H, Zhang G, Yu L, Kong X, Yuan H, Fang X, Liu Q, Liu C, Shi L (Reduced neurotrophic factor level is the early event before the functional

neuronal deficiency in high-fat diet induced obese mice. Metab Brain Dis 32:247-257.2017a).
Wang HT, Huang FL, Hu ZL, Zhang WJ, Qiao XQ, Huang YQ, Dai RP, Li F, Li CQ (Early-Life Social Isolation-Induced Depressive-Like Behavior in Rats Results in Microglial Activation and Neuronal Histone Methylation that Are Mitigated by Minocycline. Neurotox Res.2017b).
Wang Y, Zhang YB, Liu LL, Cui JF, Wang J, Shum DH, van Amelsvoort T, Chan RC (A Meta-Analysis of Working Memory Impairments in Autism Spectrum Disorders. Neuropsychol Rev 27:46-61.2017c).
Wang YC, Ho UC, Ko MC, Liao CC, Lee LJ (Differential neuronal changes in medial prefrontal cortex, basolateral amygdala and nucleus accumbens after postweaning social isolation. Brain Struct Funct 217:337-351.2012).
Warburton EC, Brown MW (Neural circuitry for rat recognition memory. Behav Brain Res 285:131-139.2015).
Wardle J, Steptoe A, Oliver G, Lipsey Z (Stress, dietary restraint and food intake. J Psychosom Res 48:195-202.2000).
Watson DJ, Marsden CA, Millan MJ, Fone KC (Blockade of dopamine D(3) but not D(2) receptors reverses the novel object discrimination impairment produced by post-weaning social isolation: implications for schizophrenia and its treatment. Int J Neuropsychopharmacol 15:471-484.2012).
West AP (Neurobehavioral studies of forced swimming: the role of learning and memory in the forced swim test. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 14:863-877.1990).
Willner P (Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology (Berl) 134:319-329.1997).
Wilson SM, Sato AF (Stress and paediatric obesity: what we know and where to go. Stress Health 30:91-102.2014).
Winocur G, Greenwood CE (Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. Neurobiol Aging 26 Suppl 1:46-49.2005).
Wyvell CL, Berridge KC (Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. J Neurosci 20:8122-8130.2000).
Xie Z, Askari A (Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer. Eur J Biochem 269:2434-2439.2002).
Yildirim M, Mapp OM, Janssen WG, Yin W, Morrison JH, Gore AC (Postpubertal decrease in hippocampal dendritic spines of female rats. Exp Neurol 210:339-348.2008).
Yoshii A, Constantine-Paton M (Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease. Dev Neurobiol 70:304-322.2010).
Yuksel C, Ongur D (Magnetic resonance spectroscopy studies of glutamate-related abnormalities in mood disorders. Biol Psychiatry 68:785-794.2010).
Zellner DA, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D, Wolf A (Food selection changes under stress. Physiol Behav 87:789-793.2006).
Zhan H, Tada T, Nakazato F, Tanaka Y, Hongo K (Spatial learning transiently disturbed by intraventricular administration of ouabain. Neurol Res 26:35-40.2004).
Zhang J, Wang N, Chen B, Wang Y, He J, Cai X, Zhang H, Wei S, Li S (Blockade of Cannabinoid CB1 receptor attenuates the acquisition of morphine-induced conditioned place preference along with a downregulation of ERK, CREB

phosphorylation, and BDNF expression in the nucleus accumbens and hippocampus. Neurosci Lett 630:70-76.2016).

Zhang LN, Sun YJ, Pan S, Li JX, Qu YE, Li Y, Wang YL, Gao ZB (Na(+)-K(+)-ATPase, a potent neuroprotective modulator against Alzheimer disease. Fundam Clin Pharmacol 27:96-103.2013).