

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Vanessa Feistauer

**Sistema dopaminérgico e dieta: uma
investigação de variantes genéticas em
humanos e expressão gênica em roedores**

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2019

Vanessa Feistauer

**Sistema dopaminérgico e dieta: uma
investigação de variantes genéticas em
humanos e expressão gênica em
roedores**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências da Fundação Universidade Federal
de Ciências da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientador(a): Dra. Silvana de Almeida

Coorientador(a): Dra. Márcia Giovenardi

Porto Alegre

2019

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

Biotério da UFCSPA

Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica da UFCSPA

Laboratório de Biologia Molecular da UFCSPA

Fontes financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -
408864/2016-8

Programa de Bolsas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - Brasil (CAPES).

Dedico esse trabalho aos meus pais,

Luís e Susana.

Esse sonho é nosso.

AGRADECIMENTOS

A Deus, inteligência suprema, causa primária de todas as coisas.

Às minhas “mães científicas”, Prof.^a Dr.^a Silvana de Almeida e Prof.^a Dr.^a Márcia Giovenardi. Posso afirmar que tive duas orientadoras, presentes em todos os momentos, que vestiram o jaleco e foram para a bancada comigo. Poucos são tão privilegiados como eu de ter duas excelentes orientadoras, pesquisadoras e professoras trabalhando lado a lado. Sou muito grata pela confiança que me dedicaram para iniciar esse projeto.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Silvana de Almeida, meu exemplo na docência, na pesquisa e na vida. Obrigada por ter me orientado nesses últimos seis anos de pós-graduação. Obrigada por todos os ensinamentos, e por me tornar docente e pesquisadora.

À minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a Márcia Giovenardi, um exemplo de profissional competente e dedicada. Agradeço por ter me acolhido no grupo de pesquisa de fisiologia, por todo o conhecimento que me transmitiu e por estar sempre disponível para me auxiliar.

À MSc. Ananda Galvão (*in memoriam*). Agradeço pelos ensinamentos no meu estágio curricular, e por todo o trabalho que desempenhou nas análises moleculares da coorte de crianças.

À Joana, minha querida colega. Obrigada por todo apoio, por ter trabalhado lado a lado comigo. Sem teus conhecimentos e experiência com os animais, teria sido muito mais difícil.

A meus colegas do grupo de pesquisa, Andressa, Vanessa B., Carolina K., Mariana, e Gustavo. O auxílio de vocês foi fundamental para construir esse imenso banco de materiais para estudo. Ana, obrigada por dividir comigo teus conhecimentos e pelo amparo em tantas etapas deste trabalho.

Às técnicas do laboratório de biologia molecular, Grasi e Marília. O apoio profissional de vocês e a companhia no dia a dia da rotina no laboratório tornou tudo mais fácil e divertido.

A meus pais, Luís e Susana. Obrigada por tudo. Por terem me criado com muito amor, por terem me ensinado que o conhecimento é a única coisa que nunca poderá ser tirada de mim, e que a família vem sempre em primeiro lugar. Vocês são exemplos de pessoas dignas, caridosas e íntegras, mesmo perante as maiores injustiças dos homens. Obrigada por me ensinarem a ter fé.

A meu irmão Lucas e minha cunhada Joana. Agradeço pelos momentos de alegria, e pelo exemplo de dedicação aos estudos.

A meu namorado, Douglas. Obrigada pelo companheirismo, por me incentivar a continuar mesmo quando já não tinha mais ânimo. Por acreditar em mim, quando eu já não acreditava. Por me apoiar, independente das minhas escolhas. E até mesmo por me ajudar na correção dos textos dessa tese.

A meus avós, Opa (*in memorian*), Oma (*in memorian*), Vô Ary (*in memorian*) e Vó Carmen. Agradeço pelo amor que sempre me transmitiram e que me proporcionou uma infância extremamente feliz.

Às minhas amigas, Caro e Fefe. Agradeço por todos esses 10 anos que passamos juntas e pelos muitos que virão. Por todas as experiências, ensinamentos, conselhos, estímulos, risadas, e por estarem sempre disponíveis. Enfim, por tudo.

Às minhas amigas, Le e Mona, vocês são meus exemplos de alegria e força. Obrigada pelos incontáveis anos dessa eterna amizade.

Aos meus amigos, Vaniza e Diomar, obrigada por me auxiliarem a atravessar os momentos de escuridão. Vocês são meus exemplos de dedicação, de caridade, de resignação e de fé.

SUMÁRIO

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS	5
AGRADECIMENTOS	9
SUMÁRIO	11
ABREVIATURAS	13
LISTA DE FIGURAS	15
RESUMO	17
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 Necessidade nutricional.....	21
1.2 Nutrição na gestação e lactação	21
1.3 Desenvolvimento intrauterino e efeitos da dieta materna na prole.....	23
1.4 Ingesta alimentar e recompensa.....	25
1.5 Sistema dopaminérgico.....	28
1.5.1 Como variantes genéticas no sistema dopaminérgico alteram o comportamento alimentar?	32
1.5.2 Como a dieta modifica a expressão gênica do sistema dopaminérgico?	33
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.2 Objetivos específicos.....	37
3. DESCRIÇÃO DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS	39
ARTIGO CIENTÍFICO 1	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
8. ANEXOS	60
9. CURRÍCULO LATTES	64

ABREVIATURAS

DNA: ácido desoxirribonucleico

RNA: ácido ribonucleico

miRNAs: micro-RNAs

mRNA: RNA mensageiro

GABA: neurotransmissor ácido gama-aminobutírico

DA: neurotransmissor dopamina

ATV: área tegmentar ventral

HPT: hipotálamo

TNF: fator de necrose tumoral

IMC: índice de massa corporal

L-DOPA: L-3,4-diidroxifenilalanina

TH: enzima tirosina hidroxilase

DDC: enzima dopa descarboxilase

DAT: transportador específico da dopamina

MAO: enzima monoaminoxidase (A e B)

COMT: catecol-O-metiltransferase

AMPC: monofosfato cíclico de adenosina

FAD: dinucleotídeo de flavina e adenina

MSN: *medium spiny neurons*

ARC: núcleo arqueado do hipotálamo

NTAD: cluster dos genes *NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2*

RIP: proteína serina-treonina-quinases de interação com receptores

NF- κ B: fator nuclear *kappa* B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As vias dopaminérgicas. (1) Via nigroestriatal: neurônios que se projetam da substância negra para o estriado; (2) Via mesolímbica e mesocortical, ou via mesocorticolímbica: projeções da ATV para NAc, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal; (3) Via tuberoinfundibular: projeções dopaminérgicas do hipotálamo (HPT) até a glândula pituitária.

Figura 2. Sinapse dopaminérgica. TH, tirosina hidroxilase; L-DOPA, L-3,4-diidroxifenilalanina; DDC, dopa descarboxilase; DA, dopamina; MAO, monoaminoxidases; COMT, catecol-O-metiltransferases; DAT, transportador de dopamina; D1, receptor de dopamina D1; D2, receptor de dopamina D2; D3, receptor de dopamina D3; D4, receptor de dopamina D4; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina.

RESUMO

A ingesta de alimentos ricos em gordura e açúcar, tanto em humanos quanto em animais, aumenta drasticamente a síntese e secreção de dopamina em áreas do sistema de recompensa. Em humanos, essa sensação de recompensa após a ingestão alimentar, é particular e mais intensa em alguns indivíduos, em comparação a outros. Variantes genéticas, portanto, principalmente em genes do sistema dopaminérgico, podem influenciar na resposta de diferentes pessoas expostas aos mesmos fatores ambientais. Para investigarmos a relação do sistema dopaminérgico com a ingesta alimentar e como a dieta pode alterar esse sistema, dois tipos de estudo foram utilizados. Inicialmente, em uma coorte de crianças acompanhadas desde o nascimento, investigamos a associação de variantes no gene *ANKK1/DRD2* com padrões de ingestão alimentar e parâmetros de adiposidade. O alelo *A1 da variante *TaqIA* (rs1800497) foi relacionada com o aumento da ingestão alimentar de lipídeos em crianças de 7-8 anos, mas o polimorfismo -141C Ins/Del (rs1799732) não foi associado a nenhuma das variáveis analisadas. Em modelo animal, as dietas restritiva e hipercalórica modificaram a expressão gênica na área tegmentar ventral (ATV) e no hipotálamo (HPT) de genitoras e de sua prole. Na ATV, ambas as dietas foram relacionadas a uma elevação nos níveis de mRNA dos genes *Th*, *Drd1*, *Drd2* e *Drd3*, no entanto, o gene *Slc6a3/Dat1* teve sua expressão aumentada apenas nas fêmeas que receberam a dieta hipercalórica. Na prole dessas fêmeas, observamos, pelo contrário, uma redução generalizada na expressão gênica *Th*, *Ddc*, *Drd2*, *Drd3* e *Slc6a3/Dat1*, devido a interação entre a dieta materna e a dieta da prole. Já no HPT, demonstramos que a alteração na expressão gênica ocasionada pela dieta foi mais expressiva nas genitoras. As dietas restritiva e hipercalórica elevaram os níveis de mRNA dos genes *Drd1*, *Drd3*, *Maoa* e *Th*, mas apenas as fêmeas que receberam dieta hipercalórica tiveram expressão aumentada de *Comt* e *Ddc*. Em contrapartida, as dietas reduziram a expressão do gene *Drd4*. A expressão gênica da prole foi menos alterada pela dieta nessa área, uma vez que a interação entre a dieta materna e a dieta materna foi relacionada com a redução dos níveis de mRNA apenas do gene *Maob*. A dieta da prole aumentou a expressão do gene *Drd3*, e reduziu a expressão de *Comt*. Através dos dados apresentados, observa-se a importância do sistema dopaminérgico e sua relação com a alimentação, tanto em humanos quanto em camundongos. Variantes em genes relacionados ao sistema dopaminérgico podem

modificar a transmissão dopaminérgica, provocando maior ou menor sensação de recompensa após a ingestão alimentar, e ocasionando desfechos como sobrepeso e obesidade. Além disso, alterações na expressão de genes do sistema dopaminérgico podem ser ocasionadas tanto pela alimentação materna durante a gestação e a lactação, quanto pela alimentação na vida adulta.

Palavras-chave: Sistema dopaminérgico, dieta, variantes genéticas, expressão gênica.

ABSTRACT

High-fat and high-sugar food intake, both in humans and in animals, dramatically increases the synthesis and secretion of dopamine in areas of the reward system. In humans, the rewarding sensation after food intake is very particular and more intense in some individuals compared to others. Genetic variants, therefore, especially in genes of the dopaminergic system, can influence the response of different people exposed to the same environmental factors. To investigate the relationship between the dopaminergic system and dietary intake, and how diet can alter this system, two types of study were used. Initially, in a cohort of children followed since birth, we investigated the association of variants in *ANKK1/DRD2* gene with food intake and adiposity parameters. The *A1 allele of the *TaqIA* variant (rs1800497) was related to increased lipid food intake in children aged 7-8 years, but the -141C Ins/Del polymorphism (rs1799732) was not associated with any of the variables analyzed. In the animal model, restrictive and hypercaloric diets modified gene expression in ventral tegmental area (VTA) and hypothalamus (HPT) of mice dams and their offspring. In VTA, mRNA levels of *Th*, *Drd1*, *Drd2* and *Drd3* genes were increased in mice dams who received a restrictive and hypercaloric diet, but the *Slc6a3/Dat1* gene had its expression increased only in females receiving a hypercaloric diet. In the male offspring of these females, we observed, on the contrary, a generalized reduction in the expression of *Th*, *Ddc*, *Drd2*, *Drd3* and *Slc6a3/Dat1* genes. In HPT, we demonstrated that the alteration in the gene expression caused by the diet was more expressive in mice dams. Restrictive and hypercaloric diets elevated the mRNA levels of *Drd1*, *Drd3*, *Maoa* and *Th* genes, but only females receiving a hypercaloric diet had increased *Comt* and *Ddc* genes expression. In contrast, diets reduced *Drd4* gene expression. Offspring's gene expression was less affected by diet in this area, since the interaction between the maternal and the offspring diets was related with a reduction in the mRNA levels of *Maob* gene only. The offspring diet elevated the expression of *Drd3* gene and reduced the expression of *Comt* gene. Therefore, with the presented data, we can observe the importance of the dopaminergic system and its relation with feeding, both in humans and mice. Variants in dopaminergic-related genes may modify dopaminergic transmission, causing increased or decreased reward sensation after food intake, which may lead to outcomes such as overweight and obesity. In addition, alterations in

dopaminergic gene expression can be caused by maternal nutrition during pregnancy and lactation, and by ingested diet in adult life.

Keywords: Dopaminergic system, diet, genetic variants, gene expression.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Necessidade nutricional

Os seres vivos necessitam de energia para manter todas as funções biológicas, visto que a ação contínua do cérebro, pulmões e coração tem um gasto energético elevado [1]. A necessidade nutricional pode ser definida pela quantidade de energia que um indivíduo sadio deve ingerir para satisfazer suas necessidades fisiológicas normais, além da energia adicional para crescimento, gravidez e lactação [1, 2]. Portanto, as necessidades nutricionais são valores fisiológicos individuais que são expressos em médias de calorias, por exemplo, para grupos semelhantes (mulheres, homens, crianças) [2].

A energia para as funções metabólicas e fisiológicas é derivada dos alimentos e seus macronutrientes: carboidratos, gorduras e proteínas [1]. Manter níveis adequados de macronutrientes na dieta (consumo energético), e balanceá-los com o gasto energético é essencial em uma dieta saudável [3]. Uma dieta balanceada previne a desnutrição, a obesidade e o aumento do risco de desenvolvimento de doenças crônicas como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer [3].

1.2 Nutrição na gestação e lactação

A nutrição materna no período gestacional é essencial para o correto desenvolvimento do embrião, o qual necessita de água, aminoácidos, lipídeos, carboidratos, minerais e vitaminas [4]. Durante o crescimento fetal, ocorrem diversos processos biológicos que necessitam de energia, principalmente proveniente de macronutrientes (carboidratos, lipídeos e proteínas). A glicose é essencial para as hemácias, cérebro, células da retina, e células da medula renal, enquanto que o lactato é utilizado como fonte de energia para o coração, tanto da gestante quanto do feto [4]. A oxidação do glutamato, aspartato e glutamina geram energia para o intestino delgado de ambos. Ácidos graxos são os substratos energéticos do fígado, músculo esquelético, coração e rins da gestante, já o feto oxida ácidos graxos a gás carbônico em uma quantidade expressiva. Portanto, a alimentação materna deve ser ajustada de acordo com as necessidades nutricionais da gestante e do feto para esse período [5].

Os carboidratos da dieta têm como função o fornecimento de energia para as células, principalmente no cérebro, que é o único órgão glicose-dependente [2]. Portanto carboidratos são macronutrientes essenciais na fase do desenvolvimento do cérebro fetal e também para o cérebro materno [2]. A maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento tem como problema de saúde pública a supernutrição, ocasionada por dietas ricas em carboidratos e gorduras [6]. Em modelo animal, dietas ricas em carboidratos simples (como dextrose e maltodextrina) durante a gestação tiveram como desfecho nos filhotes: ganho de peso, aumento do percentual de gordura, desregulação na expressão de genes lipogênicos e adipogênicos, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, resistência à insulina, hiperglicemia e aumento de triglicérides [7-9].

Proteínas são macronutrientes essenciais durante a gestação, uma vez que têm um importante papel estrutural (queratina, colágeno) e funcional (enzimas, proteínas de transporte, hormônios) [10]. A gestação é um período excepcional da vida, caracterizado por um rápido crescimento e desenvolvimento do feto, além de diversas alterações fisiológicas na mãe, sendo, portanto, necessário um aporte maior de proteínas [10]. Desse modo, a restrição proteica é extremamente prejudicial para o feto, e já foi associada a diversas consequências, inclusive na vida adulta da prole. Em modelo animal, a restrição proteica durante a gestação e a lactação foi associada a diversos desfechos na prole, como restrição do crescimento, aumento da pressão arterial, alteração nos níveis de insulina e lipídeos, além de alterações na expressão de diversos genes [10]. Quando adultos, a prole submetida à restrição proteica durante o desenvolvimento fetal apresenta aumento no ganho de peso, aumento do peso corporal e elevação da adiposidade, além de um aumento do comportamento do tipo ansioso [11].

Os lipídeos são a principal fonte de energia da dieta, além de essenciais para a absorção de vitaminas lipossolúveis e carotenoides. No entanto, as recomendações sugerem a redução da ingestão de colesterol, ácidos graxos *trans* e gorduras saturadas, em função da relação dessas moléculas com aumento do risco de doenças cardiovasculares [2]. Em humanos, dietas ricas em gorduras (mais de 30% das calorias provenientes de gorduras) já foram associadas com obesidade e resistência à insulina nas mães submetidas a essa dieta durante a gestação e a lactação [12]. Na prole, os efeitos da dieta hiperlipídica

materna, em humanos são: aumento do crescimento fetal, aumento do peso ao nascer, além de desenvolvimento de obesidade e diabetes tipo 2 durante a vida adulta [13].

1.3 Desenvolvimento intrauterino e efeitos da dieta materna na prole

Early life programming, ou as origens fetais e pueris das doenças adultas, também referidos como a hipótese de Barker [14, 15], postula que a exposição a certos fatores ambientais durante períodos críticos no desenvolvimento e crescimento podem levar a adaptações no feto ocasionando consequências significativas em sua saúde tanto a curto quanto a longo prazo [16, 17]. A exposição a um ambiente intrauterino hostil, ocasionado por nutrição inadequada, infecções e perturbações químicas, metabólicas e hormonais, resulta em adaptações (respostas adaptativas preditivas) que são desenvolvidas pelo feto e que permitem a sua viabilidade imediata, além de prepará-lo para exposições semelhantes que possam ocorrer ao longo da vida[18]. Durante o desenvolvimento fetal, o epigenoma sofre modificações consideráveis, devido a ondas de deleção e reestabelecimento de marcadores epigenéticos. A desregulação epigenética tem sido proposta como um potencial mecanismo para explicar a programação fetal anormal[19].

O período em que o feto é exposto ao estímulo é crítico para determinar o desfecho, sendo que os períodos de maior sensibilidade são os de maior crescimento e maturação [16]. O órgão mais suscetível durante a gestação é o cérebro, devido ao seu extenso crescimento e o desenvolvimento de novas vias neuronais que se prolongam até os anos iniciais da infância [16]. A formação do sistema de recompensa ocorre durante o desenvolvimento perinatal e, portanto, alterações do ambiente intrauterino durante períodos críticos podem programar mecanismos imperfeitos de apetite e saciedade, alterando assim o comportamento da ingestão alimentar durante toda a vida do indivíduo [20]. Estudos epidemiológicos têm observado associações entre alterações do ambiente intrauterino com padrões de crescimento e alterações metabólicas na vida adulta [20]. A fome holandesa durante o inverno de 1944-45 oportunizou a determinação dos efeitos da subnutrição durante o período perinatal em bebês que posteriormente receberiam alimentos em abundância. Observou-se que os filhos cujas mães foram expostas à fome durante os primeiros dois trimestres da gestação tiveram maior incidência de obesidade do que a população em geral [14, 21-23]. Recentemente, estudos têm analisado os desfechos gerados pela dieta ocidental e pela ingesta materna excessiva durante a gestação, por meio

de modelos animais. Em porcos, assim como em humanos, a subnutrição materna modifica permanentemente o crescimento e desenvolvimento da prole, além de promover defeitos na maturação de diversos órgãos e sistemas, principalmente no sistema imune, pâncreas e intestinos [24, 25]. A restrição da dieta materna, em roedores, para 50% das calorias durante a última semana de gestação, causa danos no desenvolvimento pancreático da prole [26]. Outro estudo em ratos indica que a redução de 30% das calorias da dieta padrão durante os primeiros 18 dias de gestação resulta em crescimento intrauterino restrito, predominantemente em machos, além de associações com hiperinsulinemia, hiperfagia, obesidade e hipertensão [27].

Fatores externos que modificam a expressão de determinados genes, sem modificar a sequência do DNA genômico, são denominados de fatores epigenéticos. Essas modificações descritas no sistema de recompensa, que ocorreram durante o desenvolvimento fetal, podem estar relacionadas a processos epigenéticos que ativam ou silenciam certos genes, como a modificação de histonas, regulação por RNAs não-codificantes e metilação [28]. Além disso, o perfil epigenético de um indivíduo é, ao mesmo tempo, herdado e modificável, uma vez que os padrões de expressão do DNA podem ser transmitidos dos pais para a prole, podendo também ser modificados em resposta a fatores ambientais [29, 30].

Nutrientes provenientes da dieta materna tem grande importância no desenvolvimento fetal por modificarem processos epigenéticos. Essas mudanças induzidas por fatores externos parecem ser mantidas durante a vida, levando a alterações permanentes no fenótipo [31]. O melhor exemplo de como a dieta pode alterar o fenótipo é observado em estudos com abelhas [31]. Larvas fêmeas, dependendo do tipo de dieta que recebem, desenvolvem-se em abelhas operárias estéreis ou abelhas-rainha férteis, mesmo sendo geneticamente idênticas [32]. Estudos com humanos e animais mostram que a deficiência de folato resulta em uma redução dos níveis de S-adenosilmetionina, cofator enzimático envolvido na transferência de grupamentos metil, levando à hipometilação do DNA genômico [33]. O consumo elevado de vitamina B12 na gestação foi associado à diminuição da metilação global de DNA em recém-nascidos [34], enquanto que a vitamina D foi relacionada a modificações de histonas através do recrutamento de acetilases de histona [35]

A dieta, portanto, é essencial para o desenvolvimento do perfil epigenético do feto. Qualquer alteração no ambiente intrauterino ocorrida durante esse período pode modificar essas marcações no genoma, afetando a expressão gênica até mesmo na vida adulta. Apesar de não avaliarmos a quantificação de marcadores epigenéticos diretamente, nesta tese, as alterações na expressão de determinados genes podem ser decorrentes de modificações epigenéticas no genoma da prole.

1.4 Ingesta alimentar e recompensa

A recompensa resultante da ingestão alimentar é um processo composto pelo “gostar” de determinado alimento, o que nos leva a “querer” esse alimento [36]. “Gostar” está envolvido com a palatabilidade dos alimentos, ou seja, eles evocam uma resposta hedônica prazerosa, enquanto que o “querer” corresponde ao apetite e ao desejo de consumir determinado alimento [36, 37]. Apesar de serem definições que muitas vezes se confundem, são diferentes áreas e sistemas cerebrais que estão envolvidos no “gostar” e no “querer”, visto que não há um centro da fome nem um centro do prazer no cérebro [36, 38]. Áreas como núcleo *accumbens* (NAc), globo pálido ventral e tronco encefálico, através de neurotransmissores como opioides endógenos, ácido gama-aminobutírico (GABA), canabinoides e orexina, medeiam o “gostar” através de uma atividade coordenada [37]. No entanto, para o “querer”, o sistema necessário é o sistema dopaminérgico mesocorticolímbico [37]. Portanto, a sensação de recompensa ocasionada após a ingestão do alimento pode ser elevada ou reduzida, dependendo do estado metabólico do indivíduo, além das variações interindividuais [37]. Catellanos et. al (2009) [39] observou que pessoas obesas respondem mais fortemente a sugestões de alimentos do que pessoas magras quando saciadas. Diferenças genéticas podem, portanto, estar relacionadas com essas diferenças interindividuais.

A ingestão de alimentos ricos em gordura e açúcar, tanto em humanos quanto em animais, aumenta drasticamente a síntese e secreção de opioides e dopamina (DA) em áreas do sistema de recompensa, que envolve as vias nigroestriatal, mesocorticolímbica e tuberoinfundibular (ver figura 1) [40-43]. Esse tipo de alimento altamente palatável estimula áreas cerebrais relacionadas à motivação e recompensa, de uma maneira muito semelhante ao álcool e drogas de abuso, e levam a ingestão alimentar excessiva [44, 45]. A sensação de recompensa ocasionada após o consumo de drogas de abuso e de alimentos

palatáveis está associada à intensificação na sinalização dopaminérgica [46]. Portanto, a ingestão de alimentos palatáveis estimula a síntese de opioides endógenos, que se ligam a receptores μ -opioides em neurônios GABAérgicos inibitórios, localizados na área tegmentar ventral (ATV) [47]. Esses neurônios inibitórios são então bloqueados e deixam de exercer sua função inibitória em neurônios dopaminérgicos nessa área cerebral, intensificando, dessa forma, a sinalização dopaminérgica [48]. As porções terminais desses neurônios dopaminérgicos se projetam para diversas áreas do cérebro, relacionadas com o sistema de recompensa, como amígdala, NAc, estriado e hipocampo [47].

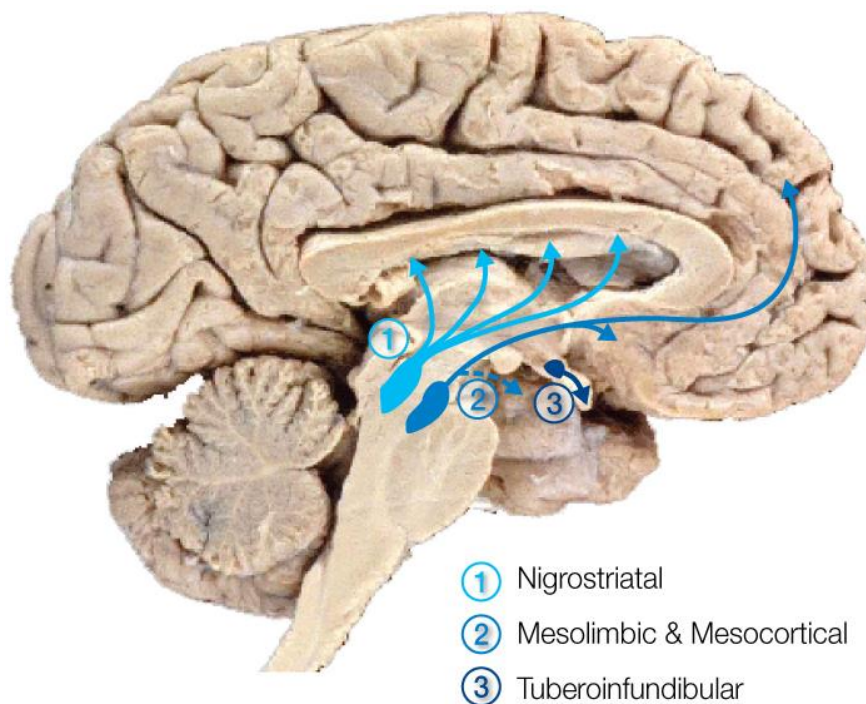


Figura 1. As vias dopaminérgicas. (1) Via nigrostriatal: neurônios que se projetam da substância negra para o estriado; (2) Via mesolímbica e mesocortical, ou via mesocorticolímbica: projeções da ATV para NAc, amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal; (3) Via tuberoinfundibular: projeções dopaminérgicas do hipotálamo (HPT) até a glândula pituitária. Fonte: Genetic Science Learning Center. (2013, August 30) Beyond the Reward Pathway. Disponível em <https://learn.genetics.utah.edu/content/addiction/beyond/>. Acesso em 05 de fevereiro de 2019.

Em humanos, a impossibilidade de controlar o real consumo dietético de mulheres durante a gravidez e lactação, devido a diversos fatores intrínsecos e extrínsecos que podem afetar a quantificação, acaba por dificultar o estudo da relação entre a dieta materna e suas consequências a curto e longo prazo na prole. Um estudo prospectivo de 5717 pares de mãe-filho e 3009 pares pai-filho denominado *Avon longitudinal Study of Parents and Children*, avaliou a relação entre os macronutrientes ingeridos pela mãe e pelo pai antes e durante a gravidez, e os macronutrientes ingeridos pelas crianças aos 9-10 anos de idade. Esse estudo mostrou que há uma correlação muito forte entre a ingestão materna de lipídeos durante a gravidez e as preferências da criança aos 9-10 anos de idade. No entanto, não foi observada nenhuma relação entre a ingestão de lipídeos do pai em nenhuma fase do desenvolvimento da criança [49]. Estudos em outros períodos do desenvolvimento da criança indicam que a exposição a certos sabores (como por exemplo, cenoura e alho), tanto durante a gestação quanto durante a amamentação, aumentam a preferência da criança para o mesmo sabor após o desmame [50-52]. Além disso, crianças alimentadas com fórmulas preparadas com soja, que possuem um sabor mais amargo, preferem alimentos mais amargos e ácidos ao 4-5 anos de idade, em comparação com crianças que foram alimentadas com fórmulas preparadas com leite, que são mais adocicadas [53]. Portanto, a exposição perinatal a alimentos ricos em gorduras e açúcares pode estar relacionada com o desenvolvimento de preferências a sabores de alimentos mais palatáveis [47]. Estudos farmacológicos em humanos buscam relacionar o sistema dopaminérgico com a ingestão e preferências alimentares. A administração de naloxona, um antagonista de receptores opióides, reduz a ingestão de alimentos palatáveis, sem alterar a ingestão dos demais alimentos [54].

A fome holandesa de 1944/45, como anteriormente citado, possibilitou a determinação de efeitos perinatais da desnutrição em bebês que, futuramente, estariam expostos a calorias em excesso. Ao completarem 60 anos de idade, esses indivíduos expostos à fome durante as duas últimas semanas de gestação possuíam metilação alterada de alguns genes relacionados à obesidade, em comparação com seus irmãos do mesmo sexo, não expostos à fome [55, 56]. Essa associação foi específica para uma exposição periconcepcional, reforçando que as fases iniciais do desenvolvimento são cruciais para o estabelecimento e manutenção de marcadores epigenéticos [55, 56]. A obesidade materna e o ganho de peso durante a gravidez estão associados a elevado peso ao nascer e aumento

do risco do desenvolvimento de obesidade e diabetes na vida adulta [57-59]. Mais recentemente, estudos associaram características maternas de ganho de peso e diabetes gestacional com elevada metilação do gene da leptina em placenta [60, 61]. A metilação de histonas específicas (H3K4 e H3K9) e certos miRNAs foram positivamente associados com índice de massa corporal (IMC) [62-64]. Outro estudo analisou a metilação dessas histonas em células primárias de adipócitos humanos com e sem diabetes do tipo 2, e descreveram que, em comparação com indivíduos de peso normal, indivíduos com sobrepeso e não-diabéticos apresentavam 40% menos dimetilação de K4, e 40% mais trimetilação de K4 em adipócitos do que indivíduos com sobrepeso e diabéticos. Além disso, indivíduos obesos e normais apresentam variação nos níveis de metilação do DNA em genes específicos e seus pré-adipócitos e adipócitos maduros em cultura possuem diferente expressão de miRNAs [63]. Similarmente, um estudo de miRNAs de tecido adiposo de biópsias de humanos mostra uma expressão diferencial e desregulada de miRNAs quando se compara indivíduos obesos com indivíduos normais [64].

1.5 Sistema dopaminérgico

Responsável por diversas funções fisiológicas (como atividade locomotora, cognição, emoção, recompensa, sono e alimentação), a DA é a principal catecolamina no cérebro de mamíferos [65]. Projeções dopaminérgicas partem da ATV para diferentes áreas do cérebro como amígdala, NAc, estriado e hipocampo, que estão relacionadas com a recompensa [66]. Além disso, essas áreas controlam a motivação para comer, tanto através fome fisiológica quanto pela fome hedônica [66].

A síntese de DA inicia com uma etapa limitante da velocidade que consiste na conversão de tirosina a L-3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA) pela enzima tirosina hidroxilase (TH), seguida de descarboxilação à DA pela enzima dopa descarboxilase (DDC) (Figura 2). Após sua liberação nos terminais nervosos, esse neurotransmissor é amplamente recaptado por um transportador específico da DA (DAT) e metabolizado pelas enzimas monoaminoxidases (MAO) A e B e catecol-O-metiltransferases (COMT), localizadas principalmente em células gliais. Sua ação ocorre após ligação a receptores presentes nas células-alvo, os ativadores (classe D1) ou os inibidores (classe D2) da adenilciclase [65, 67]. Os receptores da classe D1 (subtipos D1 e D5) aumentam o

monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) intracelular quando ativados, enquanto que os receptores da classe D2 (subtipos D2, D3 e D4) o inibem [67-69].

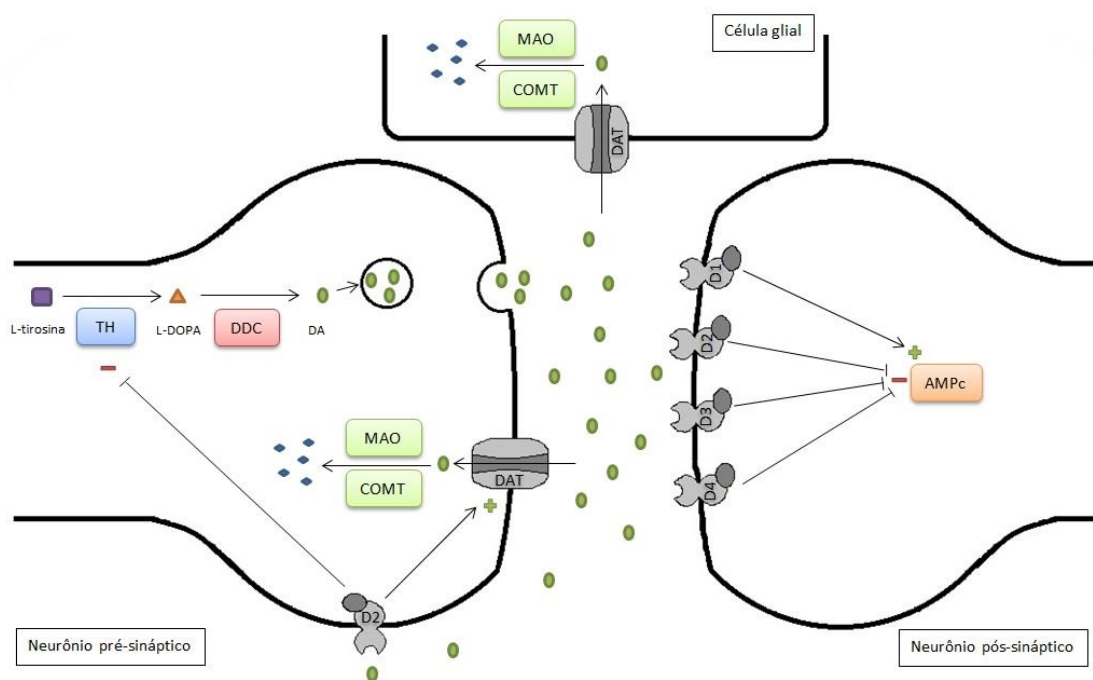


Figura 2. Sinapse dopaminérgica. TH, tirosina hidroxilase; L-DOPA, L-3,4-diidroxifenilalanina; DDC, dopa descarboxilase; DA, dopamina; MAO, monoaminoxidases; COMT, catecol-O-metiltransferases; DAT, transportador de dopamina; D1, receptor de dopamina D1; D2, receptor de dopamina D2; D3, receptor de dopamina D3; D4, receptor de dopamina D4; AMPc, monofosfato cíclico de adenosina.

A TH catalisa a hidroxilação da cadeia lateral de seu substrato, a tirosina, através da reação de tetrahydrobiopterina, oxigênio molecular e tirosina para formar L-DOPA [70]. Essa é a etapa limitante da reação de síntese de DA, uma vez que, quando há liberação diminuída de catecolaminas pelo terminal axonal ocorre também um aumento da sua concentração no citosol, levando à inibição da enzima TH pelo produto final da reação, a DA [71]. A TH está localizada nos corpos dos neurônios dopaminérgicos, principalmente na ATV e substância negra [70]. O gene *TH* está localizado, em humanos, no cromossomo 11p15.5 e contém 14 éxons, que codificam 4 isoformas de TH, através de *splicing*

alternativo [71, 72]. Em camundongos, o gene *Th* está localizado no cromossomo 7 F5, possui 13 éxons separados por 12 íntrons [72].

A DA age em cinco diferentes receptores pertencentes à família de receptores ligados à proteína G, dividida em subtipo D1 (D1 e D5) e subtipo D2 (D2, D3 e D4). Cada receptor possui propriedades únicas, incluindo a distribuição, a afinidade por DA e a especificidade pela proteína G [73]. A afinidade dos receptores D2 pela DA é 10 a 100 vezes maior do que receptores do tipo D1, sendo que os receptores D3 e D4 apresentam a maior afinidade e D1 a menor afinidade pela DA [74, 75]. Os receptores do tipo D1 são observados apenas nos neurônios pós-sinápticos, enquanto que os do tipo D2 são expressos em neurônios pré e pós-sinápticos [73].

Receptores de DA D1 estão envolvidos diretamente com recompensa e motivação [74, 76-78]. O gene *DRD1* de humanos está localizado no cromossomo 5q35.1, não possui íntrons na região codificadora e, portanto, não possui variantes de *splicing* [72, 75, 79]. Em camundongos, o *Drd1* está localizado no cromossomo 13 B1 e possui 3 éxons [72]. É amplamente expresso nas áreas nigroestriatal, mesocorticolímbica, como no caudado-putâmen (estriado), NAc, substância negra, bulbo olfatório, amígdala e córtex pré-frontal, bem como, em níveis mais reduzidos, no hipocampo, cerebelo e áreas do tálamo e HPT [75].

Receptores de DA D2 são expressos tanto em neurônios pré-sinápticos quanto em neurônios pós-sinápticos e estão relacionados ao controle do feedback negativo e controle da transmissão dopaminérgica [74, 76-78, 80]. São os principais autorreceptores envolvidos com a regulação pré-sináptica da síntese e liberação de DA, localizados principalmente no soma e dendritos de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, na ATV e na substância negra [75, 81]. Sua ação quando ativado pela DA é inibitória, sendo o seu principal papel no mecanismo de *feedback* negativo, ajustando a sinapse dopaminérgica através da redução da síntese e liberação de DA, além de estimular a sua recaptação [81-83]. Esse receptor é um dos mais abundantes do sistema nervoso central, é essencial na coordenação motora, atividade locomotora, motivação/aversão e recompensa [83, 84]. O gene *DRD2* está localizado no cromossomo 11q23.1 em humanos, possui 6 íntrons e duas variantes de *splicing* D2L e D2S [72, 75, 79]. Essas variantes apresentam diferentes distribuições neuronais, sendo o D2S predominantemente pré-sináptico e o D2L pós-

sináptico. Em camundongos, o gene *Drd2* localiza-se no cromossomo 9 A5 e possui 8 éxons [72]. Os maiores níveis de expressão do receptor D2 ocorrem no estriado, NAc e bulbo olfatório. Também são expressos em níveis significativos na substância negra, ATV, áreas corticais, septo, amígdala e hipocampo [74, 85-87].

A função fisiológica específica do receptor de DA D4 no cérebro ainda não foi elucidada. O gene *DRD4* de humanos está localizado no cromossomo 4p16.1, possui 3 íntrons e variantes de *splicing* [72, 75, 79]. Em camundongos, o gene *Drd4* está localizado no cromossomo 7 F5 e possui 4 éxons [72]. É o receptor de DA menos expresso no cérebro, mas é detectado no córtex frontal, amígdala, hipocampo, HPT, globo pálido, substância negra e tálamo [74, 88].

DAT é uma proteína localizada na membrana plasmática do neurônio pré-sináptico, e sua função é transportar ativamente a DA livre na fenda sináptica para o citoplasma. Pertencente à família de transportadores SLC6 (*SLC6A3*), dependentes de Na^+ e Cl^- , regula os níveis de DA, influenciando a ingestão alimentar [89-92]. O gene *SLC6A3* de humanos está localizado no cromossomo 5p15.3 e contém 15 éxons e 14 íntrons [72, 93, 94]. Em camundongos, o gene *Slc6a3* está localizado no cromossomo 13 C1 e possui 15 éxons [72]. Estudos com animais demonstram que ratos obesos apresentam diminuição na densidade de DAT na superfície celular dos neurônios estriatais, além diminuição na expressão do gene *Slc6a3* [95-99].

A MAO é uma amina oxidase contendo um dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), cuja função é a desaminação oxidativa de monoaminas biogênicas e xenobióticas [100]. Possui duas isoformas, a MAO-A e a MAO-B, identificadas de acordo com diferenças em suas especificidades para inibidores e substratos [100, 101]. A DA é substrato para ambas as isoformas em humanos, mas em ratos é preferencialmente substrato da MAOA [100]. Os genes *MAOA* e *MAOB* estão localizados, em humanos, no cromossomo Xp11.23 e Xp22.1, respectivamente, enquanto que em camundongos, os genes *Maoa* e *Maob* estão localizados no cromossomo X A2 e X A1.2, respectivamente [72]. Ambos os genes, em ambas as espécies, possuem uma organização semelhante com 15 éxons [72, 100, 102]. A expressão de MAOA no cérebro ocorre em neurônios catecolaminérgicos, enquanto que MAOB é primariamente encontrada em astrócitos em diversas partes do cérebro como HPT, córtex pré-frontal e amígdala [102, 103]. Estudos

em humanos observaram uma associação do fumo com hipermetilação do promotor de *MAOB*, e a regulação epigenética do gene *MAOA* tem sido relacionada com propensão gênero-específica para dependência de nicotina [104, 105]. As regiões promotoras dos genes *MAOA* e *MAOB* são caracterizados por sequências ricas em GC (ilhas CpG), que interagem com fatores de transcrição [102, 106]. A modificação epigenética da ilha CpG do promotor do gene *MAOB* reduz a expressão da proteína, e o mesmo é esperado do gene *MAOA* [107, 108].

A enzima COMT é encontrada em astrócitos adjacentes a sinapses dopaminérgicas e também em espinhos dendríticos pós-sinápticos, não existindo elevada atividade de COMT em neurônios pré-sinápticos [109]. A rota primária de terminação da sinapse dopaminérgica ocorre através da recaptação da DA excedente na fenda para o interior do neurônio pré-sináptico, onde ocorre a internalização do neurotransmissor em vesículas para reutilização ou então degradação [109]. Existe, no entanto, uma rota secundária que é a recaptação da DA por células gliais, seguida de degradação pelas enzimas MAO e COMT [109]. Em humanos, o gene *COMT* fica localizado no cromossomo 22q11.21, enquanto que em camundongos o gene *Comt* está codificado no cromossomo 16 A3. A expressão do gene *Comt* está reduzida em ratos submetidos à dieta rica em gorduras e açúcares [110]. No entanto, outro estudo [111] não observou diferença na expressão de *Comt* em camundongos expostos à dieta baixa em gorduras *versus* camundongos expostos à dieta rica em gorduras, indicando que a alteração da expressão desse gene pela dieta não está bem esclarecida.

1.5.1 Como variantes genéticas no sistema dopaminérgico alteram o comportamento alimentar?

Em humanos, descobriu-se que a sensação de recompensa após a ingestão alimentar, principalmente de alimentos ricos em gorduras e açúcares, era particular para alguns indivíduos, em comparação a outros [112]. A exposição contínua a alimentos palatáveis devido à sensação de recompensa após a ingestão acaba ocasionando diversos desfechos, como, por exemplo, o acúmulo excessivo de gordura e conseqüentemente o aumento de peso e IMC. Estudos que comparam semelhanças entre gêmeos idênticos e não-idênticos estimam que a herdabilidade do IMC é extremamente alta: genes estão relacionados com 50 até 90% das diferenças individuais no IMC [113]. Variantes

genéticas, portanto, principalmente em genes do sistema dopaminérgico, podem influenciar na resposta de diferentes pessoas aos mesmos estímulos. Estudos com modelos animais demonstraram a relação entre o sistema dopaminérgico e a recompensa em ratos. O uso de agonistas do receptor dopaminérgico D2 diminui o consumo alimentar em ratos [114]. O receptor D2 pode ser um autorreceptor, ou seja, possui um papel importante no *feedback* negativo, ajustando o ritmo dos disparos neuronais, a síntese e a recaptção de DA [75, 81]. Um estudo, em humanos, analisou a densidade desse receptor no estriado, e descreveu que em indivíduos obesos o receptor D2 estava diminuído [115].

O alelo *A1 do polimorfismo *TaqIA* (rs1800497), no gene *ANKK1* localizado 10 kb a jusante do gene *DRD2*, já foi associado a reduzida densidade e atividade do receptor D2 em diferentes áreas do SNC [116-119]. Outro polimorfismo -141C Ins/Del (rs1799732) na região flanqueadora do gene *DRD2* já foi associado a alterações na transcrição gênica *in vitro* [120], além de alterar a ligação da DA ao receptor no estriado [116, 120]. Além disso, polimorfismos do gene *ANKK1/DRD2* são frequentemente associados a ganho de peso e a dificuldade na perda de peso [121, 122]. Dessa forma, o estudo de polimorfismos no gene do receptor de DA D2 torna-se essencial para a melhor compreensão de como os indivíduos de uma população respondem de modo diferente quando expostos ao mesmo ambiente obesogênico, ou seja, aos mesmos fatores ambientais.

1.5.2 Como a dieta modifica a expressão gênica do sistema dopaminérgico?

Alguns estudos demonstraram que a exposição prolongada à gordura e ao açúcar em ratos está associada a adaptações moleculares, como a redução na expressão de receptores de DA D2 e redução dos níveis de DA no NAc, de um modo semelhante ao observado nos casos de dependência em drogas de abuso [40, 123, 124]. Ratos alimentados com dieta de “cafeteria”, que consiste em alimentos processados hipercalóricos e altamente palatáveis, apresentaram uma redução nos níveis de TH, semelhante ao observado após exposição crônica de drogas opioides como a morfina [125, 126]. A exposição a alimentos palatáveis por longos períodos de tempo resultam em mudanças comportamentais indicativas do desenvolvimento de dependência [47]. Ratos com livre acesso a dietas ricas em gordura, ou ricas em açúcar, consomem quantidades cada vez maiores do alimento ao longo do tempo, e exibem clássicos sinais de abstinência quando a dieta é removida [127, 128].

O efeito da dieta materna também é abordado em alguns estudos, que demonstram que expressão de genes do sistema dopaminérgico em áreas relacionadas à recompensa no cérebro da prole. Estudos de restrição proteica, indicam que a exposição a esse tipo de dieta durante a reprodução, gestação e lactação resulta em níveis elevados de mRNA do gene *Th* na ATV e no HPT [129] e do gene *Drd1* no estriado ventral [130]. No córtex pré-frontal, Hehar, Ma [131] identificou uma redução na expressão do gene *Drd2* na prole de genitoras submetidas a uma dieta restritiva de 40% durante a gestação. Diferentes gerações também podem ser afetadas pela dieta restritiva, conforme descrito por Giraud, Della-Fera [132], em um estudo que submeteu genitoras a uma restrição calórica durante a gestação, e analisou que a dieta rica em gordura alterou a expressão gênica do *Th* no HPT nas três gerações subsequentes. Até mesmo a restrição alimentar apenas na última semana de gestação pode reduzir os níveis de mRNA dos genes *Drd1* e *Drd2* no HPT da prole [133]. No entanto, fica claro que mais estudos são necessários, quando se observa que pode não ocorrer alteração na expressão gênica do *Drd1*, *Drd2* e *Comt* no HPT da prole de genitoras expostas à restrição proteica durante a reprodução, gestação e lactação [129].

Dietas ricas em gordura também afetam a expressão desses genes. Sanchez-Hernandez, Poon [134] descreveu elevação nos níveis de mRNA do gene *Drd1* no hipocampo da prole de genitoras que se alimentaram de dieta rica em gordura durante a gestação. Outro estudo observou aumento da expressão gênica de *Th* no HPT da prole neonata de genitoras expostas à dieta rica em gordura [135]. É notável, portanto, que estudos que analisam a expressão de genes relacionados ao sistema dopaminérgico na prole, são decorrentes de uma alta variedade de protocolos dietéticos, dificultando comparações. Em contrapartida, não há estudos que analisam o efeito da dieta durante a gestação e a lactação na expressão de genes do sistema dopaminérgico na ATV e no HPT das genitoras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a associação de variantes do gene do receptor de dopamina D2 na ingestão alimentar em humanos e da dieta na expressão de genes do sistema dopaminérgico em modelo animal.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a associação das variantes *TaqIA* (rs1800497) e -141C Ins/Del (rs1799732) no gene *ANKK1/DRD2* com parâmetros de adiposidade (índice de massa corporal, circunferência da cintura e dobras cutâneas) em humanos.
- Investigar a associação das variantes *TaqIA* (rs1800497) e -141C Ins/Del (rs1799732) no gene *ANKK1/DRD2* com ingestão alimentar (consumo total de calorias, consumo de lipídeos, de açúcares e de alimentos altamente energéticos) em humanos.
- Analisar, em modelo animal, o efeito de diferentes dietas nos comportamentos do tipo ansioso, atividade locomotora, medo inato e memória de curto e longo prazo das genitoras.
- Analisar, em modelo animal, o efeito de diferentes dietas na expressão de genes do sistema dopaminérgico na ATV e HPT das genitoras.
- Analisar, em modelo animal, o efeito de diferentes dietas nos comportamentos do tipo ansioso, atividade locomotora, medo inato e memória de curto e longo prazo da prole.
- Analisar, em modelo animal, o efeito de diferentes dietas na expressão de genes do sistema dopaminérgico na ATV e HPT da prole.

3. DESCRIÇÃO DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS

O sistema dopaminérgico está diretamente associado à ingestão alimentar e à recompensa. O estudo dessa relação alimentos-recompensa, em humanos e animais, é extremamente relevante para a melhor compreensão de causas genéticas e ambientais relacionadas com alterações no comportamento alimentar, que podem levar a desfechos como o sobrepeso e a obesidade. Nosso grupo de pesquisa participou do estudo de duas coortes de crianças, que eram acompanhadas desde o nascimento até a adolescência. Variantes em diversos genes já foram relacionadas a parâmetros antropométricos e de adiposidade nesses estudos. Um deles, que faz parte da presente tese, estudou variantes no gene do receptor de DA D2 (gene *DRD2*). Os resultados desta análise compõem o artigo intitulado “*Evaluation of association of DRD2 TaqIA and -141C InsDel polymorphisms with food intake and anthropometric data in children at the first stages of development*” publicado na revista *Genetics and Molecular Biology*.

Apesar das muitas associações com variantes genéticas em humanos, na mais recente coorte analisada pelo grupo, não se pode observar o efeito dos polimorfismos (alelos considerados protetores e alelos de risco), ou seja, apenas alterações na sequência do DNA não estavam sendo suficientes para detectar associações com alterações no padrão de ingestão alimentar. Isso provavelmente ocorreu, porque seus efeitos, por serem pequenos, estavam sendo encobertos pelos efeitos ambientais, visto que atualmente, o acesso a alimentos ricos em gordura e açúcar está facilitado, favorecendo o desenvolvimento da obesidade. Observou-se, portanto, a necessidade de estudar, de uma maneira mais aprofundada, os efeitos ambientais e como eles influenciam na expressão gênica. Recentemente, estudos epigenéticos mostram que diversos fatores, como dieta, medicamentos e alterações no ambiente intrauterino, podem influenciar a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA.

Com esse objetivo, nosso grupo de pesquisa passou a estudar, em modelo animal, o efeito da dieta materna, da dieta da prole e da interação de ambas, na expressão de genes do sistema dopaminérgico. Com esse modelo, poderíamos ter maior controle da composição e da duração de exposição à dieta, além de estudar a alteração da expressão

gênica diretamente nas áreas cerebrais que estão relacionadas ao sistema dopaminérgico. Para tal, submetemos fêmeas de camundongo a diferentes dietas (dieta controle, dieta restritiva e dieta hipercalórica), durante a fase reprodutiva, gestação e lactação. A prole também foi dividida entre esses grupos dietéticos, de modo que cada genitora tivesse pelo menos um filhote em cada dieta. Analisamos, portanto, o efeito dessas dietas na expressão de genes relacionados ao sistema dopaminérgico, na ATV que é uma área rica em neurônios dopaminérgicos e fortemente associada à recompensa alimentar. Os resultados desta etapa são apresentados no artigo intitulado “*Restriction and hypercaloric diets modulate the expression of genes related to the dopaminergic system in ventral tegmental area of mice dams and offspring*”, submetido à revista *Neuroscience*.

Também, analisamos o efeito dessas dietas no HPT das genitoras e dos filhotes, visto que essa área está relacionada à fome e à alimentação. Estudos recentes indicam a existência de neurônios dopaminérgicos nessa região cerebral, os quais enviam projeções para regiões intra-hipotalâmicas envolvidas na homeostase energética, resultando em ativação de vias orexigênicas e anorexigênicas. Além disso, há projeções para regiões extra-hipotalâmicas, como ATV e NAc, que são áreas ricas em sinapses dopaminérgicas, relacionadas à recompensa alimentar. Para detectarmos o efeito da dieta em outro sistema relacionado à alimentação, não relacionados ao sistema de recompensa, analisamos a expressão de genes do sistema dopaminérgico também no HPT. Os resultados obtidos a partir dessas análises resultaram no artigo intitulado “*Altered expression of dopaminergic system related genes in the hypothalamus of mice dams and male offspring submitted to restriction and hypercaloric diets*”, que será submetido para a revista *Molecular and Cellular Neuroscience*.

Para a execução dos trabalhos de expressão, fez-se necessária inicialmente a seleção de genes constitutivos, que tivessem a expressão estável para posterior comparação da expressão com os genes-alvo. Esse trabalho foi realizado durante o doutorado, na coorientação do Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina, da acadêmica Bruna Nórdio, e anexado à presente tese. O artigo desenvolvido denomina-se “*Study of gene expression in the ventral tegmental area and hypothalamus of mice dams and male offspring: which internal control gene should be used?*”, e será submetido para a revista *Einstein*.

Por fim, sabemos que o material coletado é valioso, e desta forma pretendemos complementar os estudos concluídos neste doutoramento. As alterações descritas na expressão de genes na ATV e HPT da prole podem estar relacionadas a fatores epigenéticos, devido a alterações na ingesta de dieta pelas mães no período de reprodução, gestação e lactação. Portanto, fatores epigenéticos de interesse, como metilação da região promotora do gene e miRNAs, serão futuramente analisados por colegas do grupo de pesquisa, com o objetivo de complementar os resultados obtidos na presente tese.



ARTIGO CIENTÍFICO 1

Evaluation of association of DRD2 TaqIA and -141C InsDel polymorphisms with food intake and anthropometric data in children at the first stages of development

Publicado no periódico Genetics and Molecular Biology em 23 de julho de 2018, fator de impacto 1.493.



Evaluation of association of *DRD2 TaqIA* and *-141C InsDel* polymorphisms with food intake and anthropometric data in children at the first stages of development

Vanessa Feistauer¹, Márcia R. Vitolo², Paula D. B. Campagnolo³, Vanessa S. Mattevi^{1,4}  and Silvana Almeida^{1,4} 

¹Laboratório de Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

²Departamento de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Curso de Nutrição, Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS, Brazil.

⁴Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

The reward sensation after food intake may be different between individuals and variants in genes related to the dopaminergic system may indicate a different response in people exposed to the same environmental factors. This study investigated the association of *TaqIA* (rs1800497) and *-141C InsDel* (rs1799732) variants in *DRD2/ANKK1* gene with food intake and adiposity parameters in a cohort of children. The sample consisted of 270 children followed until 7 to 8 years old. DNA was extracted from blood and polymorphisms were detected by PCR-RFLP analysis. Food intake and nutritional status were compared among individuals with different SNP genotypes. Children carrying the *A1* allele (*TaqIA*) had higher energy of lipid dense foods (LDF) when compared with *A2/A2* homozygous children at 7 to 8 years old (GLM $p=0.004$; Mann Whitney $p=0.005$). No association was detected with *-141C Ins/Del* polymorphism. To our knowledge, this is the first association study of the *DRD2 TaqIA* and *-141C Ins/Del* polymorphism with food intake and anthropometric parameters in children. *DRD2 TaqIA* polymorphism has been associated with a reduction in D_2 dopamine receptor availability. Therefore, the differences observed in LDF intake in our sample may occur as an effort to compensate the hypodopaminergic functioning.

Keywords: Child obesity, *DRD2* polymorphisms, food intake.

Received: July 4, 2017; Accepted: January 9, 2018.

Introduction

The prevalence of childhood overweight and obesity had a dramatic increase between 1990 and 2010, rising from 4.2% to 6.7%, and it is estimated that in 2020 the rate will be 9.1%, or approximately 60 million children (de Onis *et al.*, 2010). The obesity prevalence in developed countries is twice higher than in developing countries. However, most of the affected children (35 million) live in developing countries (de Onis *et al.*, 2010). Moreover, the relative increase rate of obesity in recent decades was higher in developing countries (+65%) than in developed countries (+48%) (de Onis *et al.*, 2010; Oggioni *et al.*, 2014). Obese children are more likely to become obese adults, and have

higher risk of developing coronary heart diseases and other related diseases, which diminish life expectancy (Must, 1996; Rossner, 1998; Berenson, 2012). Insulin resistance, metabolic syndrome, and type 2 diabetes are also consequences of childhood obesity (Gupta *et al.*, 2012).

Some factors contribute to overweight and obesity, such as low physical activity, high intake of high fat and sugar foods, change from the rural lifestyle to the urban, sociocultural factors, age, gender, and genetic factors (Popkin, 2006; Gupta *et al.*, 2012; Oggioni *et al.*, 2014). The sensation of reward after food intake, especially of palatable foods, may be different among individuals and might cause different amounts of food ingestion (Berridge *et al.*, 2010). The dopaminergic system regulates food intake through a reward system, and although its function in eating disorders is poorly understood, it is known that the use of dopamine D_2 receptors agonists decreases food intake in rats (Terry *et al.*, 1995). A study that analyzed images via

Positron Emission Tomography (PET) scans shows that obese individuals have low concentration of striatal D2 dopamine receptors as a mechanism of downregulation due to high levels of dopamine, indicating that the reduction of these receptors could be associated with an addictive behavior also observed in drug users (Wang *et al.*, 2001). *DRD2/ANKK1* gene polymorphisms alter the density of dopamine receptors, and thus may explain the different food intake levels in individuals exposed to the same environmental factors (Stelzel *et al.*, 2010).

Several studies have associated the *TaqIA* (rs1800497) polymorphism with obesity, body mass index (BMI), and food intake (Barnard *et al.*, 2009; Winkler *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2013; Carpenter *et al.*, 2013). However, to our knowledge, there is no study linking the *-141C Ins/Del* (rs1799732) polymorphism to obesity, although it was associated with other pathologies such as alcoholism and schizophrenia (Jonsson *et al.*, 1999a; Johann *et al.*, 2005; Lafuente *et al.*, 2008a,b). Therefore, the objective of the present study was to analyze the association of *TaqIA* and *-141C Ins/Del* polymorphisms with adiposity parameters and food intake of children.

Materials and Methods

Subjects

The sample consisted of 270 children followed until 7 to 8 years old on average. The nutritional and anthropometrics data were collected at 12 to 16 months, 3 to 4 and 7 to 8 years. The children included in the present study participated in a randomized controlled trial of dietary counseling on breast feeding and diet during the first year of life. The trial consisted of 500 children, randomized in a control or intervention group, of which mothers received a dietary advice about breastfeeding and complementary feeding during home visits in children's first year of life. This dietary advice was based on the "Ten steps to Healthy Feeding", a Brazilian national health policy for primary care, supported by World Health Organization (2006). More information of the first phase of the study can be found elsewhere (Vitolo *et al.*, 2010), but in Table 1 we described the main characteristics of the sample. A substantial reduction of the sample occurred throughout the study and the main reason for the losses was the inability to locate the participants' homes, usually due to the family moving to another city. Other reasons for losses were refusal to continue and children or maternal death. This intervention was not the primary objective of the present research and the participation in the intervention or control group was used as a confounding factor in statistical analyses.

Ethnicity was defined by the interviewer by skin color (i.e., whites and non-whites). More details of the traits studied are described elsewhere (Galvão, 2012; Louzada *et al.*, 2012; Fontana *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2015). This study was conducted according to the guidelines of the

Table 1 - Main characteristics of the sample.

Characteristics	
Ethnicity (whites) ^a	210 (77.8)
Sex (boys) ^a	149 (55.2)
12 to 16 months	
Child's BMI (Z-score) ^b	0.59 ± 1.07
Average daily energy intake (kcal) ^b	948.51 ± 398.56
3 to 4 years	
Child's BMI (Z-score) ^b	0.27 ± 1.16
Average daily energy intake (kcal) ^b	1520.21 ± 391.36
Sugar dense food intake (SDF; kcal) ^b	105.94 ± 86.15
Lipid dense food intake (LDF; kcal) ^b	177.18 ± 190.81
Average daily energy intake per kilogram (kcal/kg) ^b	91.23 ± 27.27
7 to 8 years	
Child's BMI (Z-score) ^b	0.41 ± 1.38
Average daily energy intake (kcal) ^b	1564.54 ± 381.34
Sugar dense food intake (SDF; kcal) ^b	230.02 ± 194.97
Lipid dense food intake (LDF; kcal) ^b	85.10 ± 80.33
Average daily energy intake per kilogram (kcal/kg) ^b	59.75 ± 18.10

^aData are presented as % (n).

^bData are presented as mean ± standard deviation.

Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (n. 286/06), and all participants provided written informed consent before commencing the study.

Nutritional status assessment

At 12 to 26 months, children were weighted using a portable digital scale (Techline, São Paulo, Brazil) and length was measured by an infant stadiometer (Serwital Inc, Porto Alegre, Brazil). At 3 to 4 and 7 to 8 years, children were weighted using a digital scale (Techline), and height was measured using a stadiometer (SECA, Hamburg, Germany). BMI was calculated [weight (kg)/height²(m²)], and the values were transformed into Z-scores.

Dietary data assessment

One 24-hour dietary recall was collected for each child at 12 to 16 months, and two 24-hour dietary recalls, on two nonconsecutive days, were collected for each child at the ages of 3 to 4 and 7 to 8 years. The 24-hour dietary recall was carried out by a trained undergraduate nutrition student, and the child's food intake was recorded on the day before the last home visit. A food portion measurement device and the common household measures (e.g. teaspoons, tablespoons, cups) were used to quantify portion sizes.

Dietary information was entered into the Nutrition Support Program software from the Escola Paulista de Medicina, Federal University of São Paulo, based on the United States Department of Agriculture chemical composition tables. The energy intake was calculated using only one dietary recall or the average of two dietary recalls. The items listed in the response were classified as sugar-dense foods (SDF) if the percentage of simple carbohydrates was higher than 50% (e.g., soda, Jell-O, candies, and artificially flavored juice) and as lipid-dense foods (LDF) if there was more than 30% fat (e.g. fried pastries, cookies with fillings, cold cuts and sausages, fried foods, and chocolate).

DNA analyses

Blood samples for DNA extraction were collected in EDTA tubes (6 mL). Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the Lahiri and Nurnberger procedure (Lahiri and Nurnberger, 1991). *DRD2/ANKK1 TaqIA* (rs1800497) and *-141C InsDel* (rs1799732) polymorphisms were detected by PCR-RFLP analysis using primer sequences and conditions described by Grandy *et al.* (1993) and Ohara *et al.* (1998), respectively. Primers sequences (IDT Coralville, IA, USA) were as follows: *TaqIA*, forward primer 5'-CACCTTCCTGAGTGTCATCAA-3' and reverse primer 5'-AGACAACCTGGCCAGCCGTG-3'; *-141C InsDel*, forward primer 5'-ACTGGC GAGCAGACGGTGAGG and reverse primer 5'-TGCGCGCGTGAGGCTGCCGGT. PCR products were digested separately with either *TaqI* (*TaqIA* polymorphism) or *MvaI* (*-141C InsDel* polymorphism) enzyme (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA), according to the manufacturer's instructions. Genotypes were determined after electrophoresis in 2 or 3% agarose gels that had been stained with ethidium bromide. For the *DRD2/ANKK1 TaqIA* polymorphism, the *C* allele contains a *TaqI* restriction site and is designated as the *A2* allele, while the *T* allele is designated as the *A1* allele. For the *-141C InsDel* polymorphism, the *-141C*Ins* allele contains a restriction site for *MvaI* while the *-141C*Del* allele does not.

Statistical analyses

Allele frequencies were estimated by gene counting. A chi-square test for goodness-of-fit was used to determine whether the observed genotype frequency distributions agreed with those expected under Hardy-Weinberg equilibrium. Linkage disequilibrium was estimated using the Haploview software Version 4.2 (Broad Institute, Barrett *et al.*, 2005).

Pearson's chi-squared or Fisher's Exact Test was used to compare genotype or allele frequencies between white and non-white children. Since the first publication of an association study with the *TaqIA* polymorphism (Blum *et al.*, 1990), and because of the rare occurrence of the *A1* allele, genotypes are normally grouped as *A1* allele presence or *A1* allele carriers (*A1/A1* and *A1/A2*, n=102), *versus*

A2/A2 homozygotes (n=116). Similarly, due to low frequencies of the *Del* allele, genotypes of the *-141C InsDel* polymorphism were grouped by *Del* allele presence or *Del* allele carriers (*Del/Del* and *Ins/Del*, n=61), *versus* *Ins/Ins* homozygotes (n=157). All data are presented as mean and standard deviation. Statistical analysis of SDF and LDF variables were performed on natural logarithm transformed data to normalize their distribution. This allowed including these variables in multivariate analysis; non-transformed values are shown in Table 2. Means of food intake (average daily energy intake, SDF, LDF and average daily energy intake per kilogram) and adiposity (BMI Z-score) parameters were compared among genotype groups by a multivariate general linear model (GLM). The multivariate GLM was performed including all dependent continuous variables in one model, using the categorical variables (1) the control or intervention variable of the randomized trial, (2) sex, and (3) ethnicity as covariates, and genotypes of *-141C InsDel* (rs1799732) and *TaqIA* (rs1800497) polymorphisms as fixed factors (see Table 2). This first step of the analysis verified whether the group of dependent continuous variables was significantly affected by the group of independent categorical variables. Only LDF intake at 7 to 8 years old was associated with *TaqIA* polymorphism, and the covariates did not influence this dependent variable. Therefore, to test the association of *TaqIA* polymorphism alone with LDF intake at 7 to 8 years, we performed a Mann-Whitney test. A *p*-value of < 0.05 was considered significant. All tests and transformations were performed using the Statistical Package for Social Sciences, Version 20.0 (SPSS[®], Chicago, IL, USA).

Results

This longitudinal survey sample was composed of 270 children, 149 (55.2%) boys and 121 (44.8%) girls, followed up from 12 to 16 months until 7 to 8 years old (Table 1). Minor allele frequencies (MAF) of the *DRD2/ANKK1* gene variants observed in the sample were 0.14 of *Del* allele of the *-141C InsDel* (rs1799732) polymorphism and 0.28 of *A1* allele of the *TaqIA* (rs1800497) polymorphism, which were intermediary to those described in the 1000 Genomes Project database for European (MAF 0.08 (*Del*) and 0.19 (*A1*)) and African (MAF 0.57 (*Del*) and 0.38 (*A1*)) populations. All genotype frequencies in this sample were in agreement with those expected under the Hardy-Weinberg equilibrium. The two gene variants were not in linkage disequilibrium ($D'=0.3$, $r=0$).

In Table 2, anthropometric and food intake variables are shown according to the analyzed polymorphisms. As some children could not be found at the third home visit at 7 to 8 years, and some samples could not be analyzed in the laboratory, the total number of children included in the multivariate analysis is different from the initial sample size. Children carrying the *A1* allele (*TaqIA* rs1800497) had higher energy of LDF when compared with *A2/A2* ho-

Table 2 - Food intake and anthropometrics parameters according to polymorphisms in *DRD2/ANKK1* gene (-141C *Ins/Del* and *TaqIA*) in children at 1, 3 to 4, and 7 to 8 years old.

	<i>-141C Ins/Del</i>			<i>TaqIA</i>		
	<i>Ins/Ins</i> (n=157)	<i>Del</i> carriers (n=61)	<i>p</i>	<i>A1</i> carriers(n=102)	<i>A2A2</i> (n=116)	<i>p</i>
12 to 16 months						
Average daily energy intake (kcal)	930.95 ± 400.09	957.82 ± 390.89	0.601	917.78 ± 395.82	956.66 ± 398.51	0.845
BMI Z-score	0.60 ± 1.13	0.48 ± 1.04	0.609	0.52 ± 1.05	0.62 ± 1.15	0.436
3 to 4 years						
Average daily energy intake (kcal)	1506.24 ± 396.82	1579.95 ± 419.60	0.175	1476.62 ± 337.72	1571.04 ± 450.73	0.453
SDF (kcal) ^a	112.00 ± 97.91	110.77 ± 77.42	0.969	110.0 ± 86.95	113.11 ± 97.40	0.623
LDF (kcal) ^a	191.55 ± 197.10	162.20 ± 189.60	0.288	168.83 ± 179.06	196.09 ± 208.03	0.884
BMI Z-score	0.27 ± 0.96	0.28 ± 1.62	0.839	0.29 ± 1.17	0.25 ± 1.19	0.774
Average daily energy intake per kilogram (kcal/kg)	91.92 ± 27.74	94.84 ± 29.75	0.448	89.43 ± 24.96	95.65 ± 30.71	0.327
7 to 8 years						
Average daily energy intake (kcal)	1560.73 ± 355.60	1581.21 ± 414.36	0.756	1581.13 ± 354.41	1553.56 ± 388.07	0.481
SDF (kcal) ^a	90.52 ± 75.95	68.03 ± 58.51	0.164	76.97 ± 62.02	90.60 ± 79.62	0.847
LDF (kcal) ^a	238.38 ± 203.75	223.48 ± 181.94	0.782	282.85 ± 207.96	191.77 ± 178.34	0.004 ^b
BMI Z-score	0.45 ± 1.26	0.25 ± 1.65	0.514	0.50 ± 1.36	0.30 ± 1.40	0.258
Average daily energy intake per kilogram (kcal/kg)	59.99 ± 17.00	60.97 ± 20.91	0.861	59.83 ± 17.45	60.65 ± 18.78	0.739

Data are presented as mean ± standard deviation.

BMI – body mass index. SDF – sugar dense foods. LDF – lipid dense foods. General Linear Model (GLM) multivariates with the following co-variables: group (intervention or control), sex, ethnicity. ^aStatistical analysis from logarithm form, non-transformed values are shown; ^bMann-Whitney test $p=0.005$

mozygous children at 7 to 8 years old (multivariate GLM $p=0.004$; Mann-Whitney test $p=0.005$). No association was detected among *DRD2 -141C Ins/Del* polymorphism with food intake and anthropometric parameters.

Discussion

The dopaminergic pathway has been associated with midbrain reward circuit activation (Roth et al., 2013), and individual differences in D_2 receptor expression are hypothesized to contribute to differences in motivated behaviors, such as the motivation to eat (Gluskin and Mickey, 2016). Therefore, polymorphisms of the *ANKK1/DRD2* gene are frequently associated with altered perception of food reward and weight gain (Ariza et al., 2012; Muller et al., 2012; Roth et al., 2013). *TaqIA* is the most commonly tested polymorphism, and is characterized by a single nucleotide change [C(A2)/T(A1)] located downstream of the termination codon of *DRD2* gene at the *ankyrin repeat and kinase domain containing 1 (ANKK1)* gene (Dubertret et al., 2004; Neville et al., 2004; Li et al., 2015; Ponce et al.,

2016). This SNP produces a Glu713-to-Lys (E713K) substitution in the *ANKK1* amino acid sequence, at the eleventh ankyrin, which may alter the affinity of the *ANKK1* protein and its substrate (Neville et al., 2004). It is not clear by which molecular mechanisms the *ANKK1* protein could be associated with the dopaminergic system and how *ANKK1* polymorphic alleles would impact addiction vulnerability. However, *ANKK1* and *DRD2* genes belong to the same gene cluster, the NTAD cluster, an ancient cluster of which genes are apparently co-regulated and may have emerged when the central nervous system became more complex (Mota et al., 2012). Since genes of related function are sometimes found in the same cluster, it is possible that *ANKK1* is somehow involved in the dopaminergic reward processes via a signal transduction pathway (or other cellular response) (Neville et al., 2004). A few *in vitro* studies with *ANKK1* gene mRNAs and proteins were able to show a potential connection between this gene and the dopaminergic system (Hoenicka et al., 2007; Garrido et al., 2011).

In our sample, the *A1* allele (*TaqIA* rs1800497) was found associated with higher intake of LDF when compared with children *A2/A2* homozygous at 7 to 8 years. This allele has been associated with a reduction in D_2 receptor availability (Pohjalainen *et al.*, 1998; Ritchie and Noble, 2003; Eisenstein *et al.*, 2016). Stice *et al.* (2008) found that the dorsal striatum is less responsive to food reward in obese relative to lean individuals, probably because obese individuals have reduced D_2 receptor density that compromises dopamine signaling. This hypodopaminergic functioning or reward deficiency syndrome may induce obese patients to overeat in an effort to compensate for this reward deficit; several studies are consistent with this theory (van Strien *et al.*, 2010; Duran-Gonzalez *et al.*, 2011; Winkler *et al.*, 2012; Cameron *et al.*, 2013). van Strien *et al.* (2010) associated the *A1* allele with an increase in emotional eating in Dutch adolescents. The *A1* allele was also most frequent in young obese Mexican-American subjects than in non-obese, as well as subjects with central-obesity versus subjects with no central-obesity (Duran-Gonzalez *et al.*, 2011). Winkler *et al.* (2012) observed in an intervention study that carriers of the *A1* allele had a higher BMI at all time-points (baseline, after weight loss, and after weight maintenance), and showed less overall weight loss. Similarly, Cameron *et al.* (2013) observed that post-menopausal women carriers of the *A1* allele lost significantly less body weight and fat mass than women with the *A2/A2* genotype after undergoing an intervention-induced weight loss and increased carbohydrate intake. Some studies were not able to find any association of the *DRD2 TaqIA* polymorphism with adiposity parameters (Hardman *et al.*, 2014).

In the present study, no association was detected between *DRD2 -141C Ins/Del* polymorphism with food intake and anthropometric parameters, despite previous findings relating *Del* carriers of the *DRD2 -141C Ins/Del* polymorphism with higher D_2 receptor density (Jonsson *et al.*, 1999b). The *DRD2 -141C Ins/Del* polymorphism corresponds to a deletion of one cytosine from a run of two cytosines at position -141 of the *DRD2* gene (Arinami *et al.*, 1997). This polymorphism has been associated with risk of schizophrenia in different populations (Arinami *et al.*, 1997; Ohara *et al.*, 1998; Jonsson *et al.*, 1999a; Himei *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2005; Lafuente *et al.*, 2008a,b; Cordeiro *et al.*, 2009; Saiz *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2016), as well as with weight gain (Lencz *et al.*, 2010) and other responses due to schizophrenia drug treatment (Lencz *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Associations have been described with propensity to alcohol dependence in different populations (Ishiguro *et al.*, 1998; Konishi *et al.*, 2004a,b; Johann *et al.*, 2005; Du and Wan, 2009; Prasad *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2013), suicide attempts (Suda *et al.*, 2009), psychiatric disorders (Kishida *et al.*, 2004; Ujike *et al.*, 2009; Lencer *et al.*, 2014), different responses to medication and higher quit rates in smokers (Lerman *et al.*, 2006). To the best of our knowledge, there is

no other study that associated the *DRD2 -141C Ins/Del* polymorphism with anthropometric parameters or food intake.

The lack of associations in the two other phases of development (12 to 16 months and 3 to 4 years) may have occurred because children at these ages have restricted access to food, and depend on adults for meals, despite their own preferences. Notwithstanding, at 7 to 8 years, children have many opportunities to eat without parental supervision (Briefel *et al.*, 2009), and the differences observed in LDF intake in our sample may have occurred as an effort to compensate hypodopaminergic functioning.

Palatability is the induced sensitive response of foods that are usually rich in lipids and/or sugar (Cansell and Luquet, 2016). The sense of taste during food ingestion is the most important aspect in the decision to consume or avoid foods (Besnard, 2016). Contrary to sugar, oral fat perception was considered dependent only on its textural and olfactory cues, but recent identification of lipid-receptors in taste buds of both rodents and humans strongly suggests that lipids might also be perceived by the gustatory pathway (Besnard, 2016). Stimulation of taste buds triggers a signaling cascade leading to subsequent neurotransmitter releases in different brain areas responsible for taste perception (e.g., anterior insula, frontal operculum, orbitofrontal cortex, and the mesolimbic system) (Besnard, 2016). The exchange between these areas results in information of the hedonic experience related to the food's taste (Berridge, 1996). Therefore, not only sugar, but also lipids generate a hedonic experience, producing a positive reinforcement that stimulates dopamine secretion in the brain (Salamone, 1994; Volkow *et al.*, 2002), which is a stimulus associated with "wanting" (Berridge *et al.*, 2010). "Wanting" is an incentive salience or motivation for reward triggered by reward-related cues, such as LDF (Berridge *et al.*, 2010). The attribution of incentive salience makes a cue and its reward more attractive, or more "wanted", without being necessarily more "liked" (Berridge *et al.*, 2010). Consistent with our findings, other studies of our group detected associations of palatable food intake with another polymorphism related to the dopaminergic system in children of the same cohort at 12 to 16 months and 3 to 4 years old (Galvão *et al.*, 2012; Fontana *et al.*, 2015). However, further research is needed to confirm the association of *DRD2 TaqIA* polymorphism with LDF intake and its potential mechanisms.

In summary, our results showed that *TaqIA* polymorphism may have an influence on the children's eating behavior, due to the presence of the *A1* allele associated with lower D_2 receptor density that may lead children to compensate the hypodopaminergic functioning with palatable foods. To our knowledge, this is the first association study of the *DRD2 TaqIA* and *-141C Ins/Del* polymorphism with food intake and anthropometric parameters in children at the first stages of development. Notwithstanding, it is nec-

essary to replicate this findings in other populations and identify the mechanisms by which the dopaminergic system may influence food intake. Nevertheless, the investigation of other polymorphisms in this and other genes of the dopaminergic system and their relation to food intake and anthropometric parameters may be interesting.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil; grant number 471186/2009-0), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, Brazil; grant number 070026-9), Programa de Bolsas CAPES and PIBIC/CNP, and PROAP-CAPES. The authors thank MSc. Ananda Galvão (*in memoriam*) for her crucial participation in this study.

References

- Arinami T, Gao M, Hamaguchi H and Toru M (1997) A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia. *Hum Mol Genet* 6:577-582.
- Ariza M, Garolera M, Jurado M, Garcia-Garcia I, Hernan I, Sanchez-Garre C, Vernet-Vernet M, Sender-Palacios MJ, Marques-Iturria I, Pueyo R, *et al.* (2012) Dopamine genes (DRD2/ANKK1-TaqA1 and DRD4-7R) and executive function: their interaction with obesity. *PLoS One* 7:e41482.
- Barnard, ND, Noble EP, Ritchie T, Cohen J, Jenkins DJ, Turner-McGrievy G, Gloede L, Green AA and Ferdowsian H (2009) D2 dopamine receptor Taq1A polymorphism, body weight, and dietary intake in type 2 diabetes. *Nutrition* 25:58-65.
- Barrett JC, Fry B, Maller J and Daly MJ (2005) Haploview: Analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265.
- Berenson GS (2012) Health consequences of obesity. *Pediatr Blood Cancer* 58:117-121.
- Berridge KC (1996) Food reward: Brain substrates of wanting and liking. *Neurosci Biobehav Rev* 20:1-25.
- Berridge KC, Ho CY, Richard JM and DiFeliceantonio DM (2010) The tempted brain eats: Pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders. *Brain Res* 1350:43-64.
- Besnard P (2016) Lipids and obesity: Also a matter of taste? *Rev Endocr Metab Disord* 17:159-170.
- Blum K, Noble EP, Sheridan PJ, Montgomery A, Ritchie T, Jagadeeswaran P, Nogami H, Briggs AH and Cohn JB (1990) Allelic association of human dopamine D2 receptor gene in alcoholism. *JAMA* 263:2055-2060.
- Briefel RR, Crepinsek MK, Cabili C, Wilson A and Gleason PM (2009) School food environments and practices affect dietary behaviors of US public school children. *J Am Diet Assoc* 109(2 Suppl):S91-S107.
- Cameron JD, Riou ME, Tesson F, Goldfield GS, Rabasa-Lhoret R, Brochu M and Doucet E (2013) The Taq1A RFLP is associated with attenuated intervention-induced body weight loss and increased carbohydrate intake in post-menopausal obese women. *Appetite* 60:111-116.
- Cansell C and Luquet S (2016) Triglyceride sensing in the reward circuitry: A new insight in feeding behaviour regulation. *Biochimie* 120:75-80.
- Carpenter CL, Wong AM, Li Z, Noble EP and Heber D (2013) Association of dopamine D2 receptor and leptin receptor genes with clinically severe obesity. *Obesity* 21:E467-473.
- Cordeiro Q, Siqueira-Roberto J, Zung S and Vallada H (2009) Association between the DRD2-141C Insertion/Deletion polymorphism and schizophrenia. *Arq Neuropsiquiatr* 67:191-194.
- de Onis M, Blossner M and Borghi E (2010) Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr* 92:1257-1264.
- Du Y and Wan YJ (2009) The interaction of reward genes with environmental factors in contribution to alcoholism in mexican americans. *Alcohol Clin Exp Res* 33:2103-2112.
- Dubertret C, Gouya L, Hanoun N, Deybach JC, Ades J, Hamon M and Gorwood P (2004) The 3' region of the DRD2 gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia. *Schizophr Res* 67:75-85.
- Duran-Gonzalez J, Ortiz I, Gonzales E, Ruiz N, Ortiz M, Gonzalez A, Sanchez EK, Curet E, Fisher-Hoch S, Rentfro A, *et al.* (2011) Association study of candidate gene polymorphisms and obesity in a young Mexican-American population from South Texas. *Arch Med Res* 42:523-531.
- Eisenstein SA, Bogdan R, Love-Gregory L, Corral-Frias NS, Koller JM, Black KJ, Moerlein SM, Perlmutter JS, Barch DMC and Hershey T (2016). Prediction of striatal D2 receptor binding by DRD2/ANKK1 TaqIA allele status. *Synapse* 70:418-431.
- Fontana C, Vitolo MR, Campagnolo PD, Mattevi VS, Genro JP and Almeida S (2015) DRD4 and SLC6A3 gene polymorphisms are associated with food intake and nutritional status in children in early stages of development. *J Nutr Biochem* 26: 1607-1612.
- Galvão AC, Krüger RC, Campagnolo PDB, Mattevi VS, Vitolo MR and Almeida S (2012) Association of MAOA and COMT gene polymorphisms with palatable food intake in children. *J Nutr Biochem* 23:272 - 277.
- Garrido E, Palomo T, Ponce G, Garcia-Consuegra I, Jimenez-Arriero MA and Hoenicka J (2011) The ANKK1 protein associated with addictions has nuclear and cytoplasmic localization and shows a differential response of Ala239Thr to apomorphine. *Neurotox Res* 20:32-39.
- Gluskin BS and Mickey BJ (2016) Genetic variation and dopamine D2 receptor availability: A systematic review and meta-analysis of human in vivo molecular imaging studies. *Transl Psychiatry* 6:e747.
- Grandy DK, Zhang Y and Civelli O (1993) PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet* 2:2197.
- Gupta N, Goel K, Shah P and Misra A (2012) Childhood obesity in developing countries: epidemiology, determinants, and prevention. *Endocr Rev* 33:48-70.
- Hardman CA, Rogers PJ, Timpson NJ and Munafò MR (2014) Lack of association between DRD2 and OPRM1 genotypes and adiposity. *Int J Obes* 38:730-736.
- Himei A, Koh J, Sakai J, Inada Y, Akabame K and Yoneda H (2002) The influence on the schizophrenic symptoms by the DRD2Ser/Cys311 and -141C Ins/Del polymorphisms. *Psychiatry Clin Neurosci* 56:97-102.

- Hoenicka J, Ponce G, Jimenez-Arriero MA, Ampuero I, Rodriguez-Jimenez R, Rubio G, Aragues M, Ramos JA and Palomo T (2007) Association in alcoholic patients between psychopathic traits and the additive effect of allelic forms of the CNR1 and FAAH endocannabinoid genes, and the 3' region of the DRD2 gene. *Neurotox Res* 11:51-60.
- Ishiguro H, Arinami T, Saito T, Akazawa S, Enomoto M, Mitushio H, Fujishiro H, Tada K, Akimoto Y, Mifune H, *et al.* (1998) Association study between the -141C Ins/Del and TaqI A polymorphisms of the dopamine D2 receptor gene and alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res* 22:845-848.
- Johann M, Putzhammer A, Eichhammer P and Wodarz N (2005) Association of the -141C Del variant of the dopamine D2 receptor (DRD2) with positive family history and suicidality in German alcoholics. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 132B:46-49.
- Jonsson EG, Nothen MM, Neidt H, Forslund K, Rylander G, Mattila-Evenden M, Asberg M, Propping P and Sedvall GC (1999a) Association between a promoter polymorphism in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia. *Schizophr Res* 40:31-36.
- Jonsson EG, Nothen MM, Grunhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P and Sedvall GC (1999b) Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 4:290-296.
- Kishida I, Kawanishi C, Furuno T, Kato D, Ishigami T and Kosaka K (2004) Association in Japanese patients between neuroleptic malignant syndrome and functional polymorphisms of the dopamine D(2) receptor gene. *Mol Psychiatry* 9:293-298.
- Konishi T, Calvillo M, Leng AS, Lin KM and Wan YJ (2004a) Polymorphisms of the dopamine D2 receptor, serotonin transporter, and GABA(A) receptor beta(3) subunit genes and alcoholism in Mexican-Americans. *Alcohol* 32:45-52.
- Konishi T, Luo HR, Calvillo M, Mayo MS, Lin KM and Wan YJ (2004b) ADH1B*1, ADH1C*2, DRD2 (-141C Ins), and 5-HTTLPR are associated with alcoholism in Mexican American men living in Los Angeles. *Alcohol Clin Exp Res* 28:1145-1152.
- Lafuente A, Bernardo M, Mas S, Crescenti A, Aparici M, Gasso P, Goti J, Sanchez V, Catalan R and Carne X (2008a) -141C Ins/Del polymorphism of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia in a Spanish population. *Psychiatr Genet* 18:122-127.
- Lafuente A, Bernardo M, Mas S, Crescenti A, Aparici M, Gasso P, Deulofeu R, Mane A, Catalan R and Carne X (2008b) Polymorphism of dopamine D2 receptor (TaqIA, TaqIB, and -141C Ins/Del) and dopamine degradation enzyme (COMT G158A, A-278G) genes and extrapyramidal symptoms in patients with schizophrenia and bipolar disorders. *Psychiatry Res* 161:131-141.
- Lahiri DK and Nurnberger Jr JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
- Lee SH, Lee BH, Lee JS, Chai YG, Choi MR, Han DM, Ji H, Jang GH, Shin HE and Choi IG (2013) The association of DRD2 -141C and ANKK1 TaqIA polymorphisms with alcohol dependence in Korean population classified by the Lesch typology. *Alcohol Alcohol* 48:426-432.
- Lencer R, Bishop JR, Harris MS, Reilly JL, Patel S, Kittles R, Prasad KM, Nimgaonkar VL, Keshavan MS and Sweeney JA (2014) Association of variants in DRD2 and GRM3 with motor and cognitive function in first-episode psychosis. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 264:345-355.
- Lencz T, Robinson DG, Xu K, Ekholm J, Sevy S, Gunduz-Bruce H, Woerner MG, Kane JM, Goldman D and Malhotra AK (2006) DRD2 promoter region variation as a predictor of sustained response to antipsychotic medication in first-episode schizophrenia patients. *Am J Psychiatry* 163:529-531.
- Lencz T, Robinson DG, Napolitano B, Sevy S, Kane JM, Goldman D and Malhotra AK (2010) DRD2 promoter region variation predicts antipsychotic-induced weight gain in first episode schizophrenia. *Pharmacogenet Genomics* 20:569-572.
- Lerman C, Jepson C, Wileyto EP, Epstein LH, Rukstalis M, Patterson F, Kaufmann V, Restine S, Hawk L, Niaura R, *et al.* (2006) Role of functional genetic variation in the dopamine D2 receptor (DRD2) in response to bupropion and nicotine replacement therapy for tobacco dependence: results of two randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology* 31:231-242.
- Li H, Wang X, Zhou Y, Ni G, Su Q, Chen Z, Chen Z, Li J, Chen X, Hou X, *et al.* (2015) Association of LEPR and ANKK1 gene polymorphisms with weight gain in epilepsy patients receiving valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol* 18:pyv021.
- Louzada ML, Campagnolo PD, Rauber F and Vitolo MR (2012) Long-term effectiveness of maternal dietary counseling in a low-income population: A randomized field trial. *Pediatrics* 129:e1477-1484.
- Miranda RC, Vetter SB, Genro JP, Campagnolo PD, Mattevi VS, Vitolo MR and Almeida S (2015) SLC6A14 and 5-HT2C polymorphisms are associated with food intake and nutritional status in children. *Clin Biochem* 48:1277-1282.
- Mota NR, Araujo-Jr EV, Paixao-Cortes VR, Bortolini MC and Bau CH (2012) Linking dopamine neurotransmission and neurogenesis: The evolutionary history of the NTAD (NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2) gene cluster. *Genet Mol Biol* 35:912-918.
- Muller DJ, Zai CC, Sicard M, Remington E, Souza RP, Tiwari AK, Hwang R, Likhodi O, Shaikh S, Freeman N, *et al.* (2012) Systematic analysis of dopamine receptor genes (DRD1-DRD5) in antipsychotic-induced weight gain. *Pharmacogenomics J* 12:156-164.
- Must A (1996) Morbidity and mortality associated with elevated body weight in children and adolescents. *Am J Clin Nutr* 63(3 Suppl):445S-447S.
- Neville MJ, Johnstone EC and Walton RT (2004) Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum Mutat* 23:540-545.
- Oggioni C, Lara J, Wells JC, Soroka K and Siervo M (2014) Shifts in population dietary patterns and physical inactivity as determinants of global trends in the prevalence of diabetes: An ecological analysis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 24:1105-1111.
- Ohara K, Nagai M, Tani K, Nakamura Y, Ino A and Ohara K (1998) Functional polymorphism of -141C Ins/Del in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia. *Psychiatry Res* 81:117-123.

- Pohjalainen T, Rinne JO, Nagren K, Lehtikainen P, Anttila K, Syvalahti RK and Hietala J (1998) The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 3:256-260.
- Ponce G, Quinones-Lombrana A, Martin-Palanco MG, Rubio-Solsona E, Jimenez-Arriero MA, Palomo T and Hoenicka J (2016) The addiction-related gene *Ankkl1* is oppositely regulated by D1R- and D2R-like dopamine receptors. *Neurotox Res* 29:345-350.
- Popkin BM (2006) Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *Am J Clin Nutr* 84:289-298.
- Prasad P, Ambekar A and Vaswani M (2010) Dopamine D2 receptor polymorphisms and susceptibility to alcohol dependence in Indian males: A preliminary study. *BMC Med Genet* 11:24.
- Ritchie T and Noble EP (2003) Association of seven polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene with brain receptor-binding characteristics. *Neurochem Res* 28:73-82.
- Rossner S (1998) Childhood obesity and adulthood consequences. *Acta Paediatr* 87:1-5.
- Roth CL, Hinney A, Schur EA, Elfers CT and Reinehr T (2013) Association analyses for dopamine receptor gene polymorphisms and weight status in a longitudinal analysis in obese children before and after lifestyle intervention. *BMC Pediatr* 13:197.
- Saiz PA, Garcia-Portilla MP, Arango C, Morales B, Arias B, Corcoran P, Fernandez JM, Alvarez V, Coto E, Bascaran MT, *et al.* (2010) Genetic polymorphisms in the dopamine-2 receptor (DRD2), dopamine-3 receptor (DRD3), and dopamine transporter (SLC6A3) genes in schizophrenia: Data from an association study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 34:26-31.
- Salamone JD (1994) The involvement of nucleus accumbens dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav Brain Res* 61:117-133.
- Stelzel C, Basten U, Montag C, Reuter M and Fiebach CJ (2010) Frontostriatal involvement in task switching depends on genetic differences in d2 receptor density. *J Neurosci* 30:14205-14212.
- Stice E, Spoor S, Bohon C and Small DM (2008) Relation between obesity and blunted striatal response to food is moderated by TaqIA A1 allele. *Science* 322:449-452.
- Suda A, Kawanishi C, Kishida I, Sato R, Yamada T, Nakagawa M, Hasegawa H, Kato D, Furuno T and Hirayasu Y (2009) Dopamine D2 receptor gene polymorphisms are associated with suicide attempt in the Japanese population. *Neuropsychobiology* 59:130-134.
- Terry P, Gilbert DB and Cooper SJ (1995) Dopamine receptor subtype agonists and feeding behavior. *Obes Res* 3 (Suppl 4):515S-523S.
- Ujike H, Katsu T, Okahisa Y, Takaki M, Kodama M, Inada T, Uchimura N, Yamada M, Iwata N, Sora I, *et al.* (2009) Genetic variants of D2 but not D3 or D4 dopamine receptor gene are associated with rapid onset and poor prognosis of methamphetamine psychosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33:625-629.
- van Strien T, Snoek HM, van der Zwaluw CS and Engels RC (2010) Parental control and the dopamine D2 receptor gene (DRD2) interaction on emotional eating in adolescence. *Appetite* 54:255-261.
- Vitolo MR, Rauber F, Campagnolo PD, Feldens CA and Hoffman DJ (2010) Maternal dietary counseling in the first year of life is associated with a higher healthy eating index in childhood. *J Nutr* 140:2002-2007.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Logan J, Jayne M, Franceschi D, Wong C, Gatley SJ, Gifford AN, Ding YS, *et al.* (2002) "Nonhedonic" food motivation in humans involves dopamine in the dorsal striatum and methylphenidate amplifies this effect. *Synapse* 44:175-180.
- Wang GJ, Volkow ND, Logan J, Pappas NR, Wong CT, Zhu W, Netusil N and Fowler JS (2001) Brain dopamine and obesity. *Lancet* 357:354-357.
- Wang Y, Liu L, Xin L, Fan D, Ding N, Hu Y, Cai G, Wang L, Xia Q, Li X, *et al.* (2016) The -141C Ins/Del and Taq1A polymorphism in the dopamine D2 receptor gene may confer susceptibility to schizophrenia in Asian populations. *J Clin Neurosci* 30:1-7.
- Winkler JK, Woehning A, Schultz JH, Brune M, Beaton N, Challa TD, Minkova S, Roeder E, Nawroth PP, Friederich HC, *et al.* (2012) TaqIA polymorphism in dopamine D2 receptor gene complicates weight maintenance in younger obese patients. *Nutrition* 28:996-1001.
- Wu S, Xing Q, Gao R, Li X, Gu N, Feng G and He L (2005) Response to chlorpromazine treatment may be associated with polymorphisms of the DRD2 gene in Chinese schizophrenic patients. *Neurosci Lett* 376: 1-4.
- Xiao L, Shen T, Peng DH, Shu C, Jiang KD and Wang GH (2013) Functional -141C Ins/Del polymorphism in the dopamine D2 receptor gene promoter and schizophrenia in a Chinese Han population. *J Int Med Res* 41:1171-1178.
- Zhang JP, Lencz T and Malhotra AK (2010) Dopamine D2 receptor genetic variation and clinical response to antipsychotic drug treatment: A meta-analysis. *Am J Psychiatry* 167:763-772.
- Zhao X, Huang Y, Chen K, Li D, Han C and Kan Q (2016) -141C insertion/deletion polymorphism of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia in Chinese Han population: Evidence from an ethnic group-specific meta-analysis. *Asia Pac Psychiatry* 8:189-198.

Internet Resources

World Health Organization (2006) The WHO Child Growth Standards. from <http://www.who.int/childgrowth/standards/en/>.

Associate Editor: Angela M. Vianna-Morgante

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAO, U.N.U.U.W.H.O.W.F.a.A.O.o.t.U.N. *Human Energy Requirements: Report of a Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation*. 2001; Available from: <http://www.fao.org/docrep/007/y5686e/y5686e00.htm>.
2. CUPPARI, L., *Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto (Guias de Medicina Ambulatorial e Hospitalar da Unifesp-EPM)* 3rd ed ed. 2005, Barueri: Manole. 474.
3. WHO, *Fact sheet nº394: Healthy Diet*. 2018.
4. Wang, J., et al., *Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome*. *Antioxid Redox Signal*, 2012. **17**(2): p. 282-301.
5. Lowensohn, R.I., D.D. Stadler, and C. Naze, *Current Concepts of Maternal Nutrition*. *Obstet Gynecol Surv*, 2016. **71**(7): p. 413-26.
6. Kereliuk, S.M., G.M. Brawerman, and V.W. Dolinsky, *Maternal Macronutrient Consumption and the Developmental Origins of Metabolic Disease in the Offspring*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
7. Shankar, K., et al., *Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008. **294**(2): p. R528-38.
8. Shankar, K., et al., *Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring*. *Endocrinology*, 2010. **151**(6): p. 2577-89.
9. Borengasser, S.J., et al., *Maternal obesity enhances white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in male rat offspring*. *Endocrinology*, 2013. **154**(11): p. 4113-25.
10. Elango, R. and R.O. Ball, *Protein and Amino Acid Requirements during Pregnancy*. *Adv Nutr*, 2016. **7**(4): p. 839S-44S.
11. Ramirez-Lopez, M.T., et al., *Maternal Caloric Restriction Implemented during the Preconceptional and Pregnancy Period Alters Hypothalamic and Hippocampal Endocannabinoid Levels at Birth and Induces Overweight and Increased Adiposity at Adulthood in Male Rat Offspring*. *Front Behav Neurosci*, 2016. **10**: p. 208.
12. Shapiro, A.L., et al., *Testing the fuel-mediated hypothesis: maternal insulin resistance and glucose mediate the association between maternal and neonatal adiposity, the Healthy Start study*. *Diabetologia*, 2015. **58**(5): p. 937-41.
13. Shapiro, A.L.B., et al., *Infant Adiposity is Independently Associated with a Maternal High Fat Diet but not Related to Niacin Intake: The Healthy Start Study*. *Matern Child Health J*, 2017. **21**(8): p. 1662-1668.
14. Barker, D.J., *The developmental origins of adult disease*. *Eur J Epidemiol*, 2003. **18**(8): p. 733-6.
15. Barker, D.J., *The fetal and infant origins of adult disease*. *BMJ*, 1990. **301**(6761): p. 1111.
16. Langley-Evans, S.C., *Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review*. *J Hum Nutr Diet*, 2015. **28 Suppl 1**: p. 1-14.
17. Vickers, M.H., *Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease*. *Nutrients*, 2014. **6**(6): p. 2165-78.
18. Mandy, M. and M. Nyirenda, *Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations*. *Int Health*, 2018. **10**(2): p. 66-70.
19. John, R.M. and C. Rougeulle, *Developmental Epigenetics: Phenotype and the Flexible Epigenome*. *Front Cell Dev Biol*, 2018. **6**: p. 130.
20. Ross, M.G. and M. Desai, *Developmental programming of appetite/satiety*. *Ann Nutr Metab*, 2014. **64 Suppl 1**: p. 36-44.

21. Ravelli, A.C., et al., *Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(5): p. 811-6.
22. Monteiro, P.O. and C.G. Victora, *Rapid growth in infancy and childhood and obesity in later life--a systematic review*. Obes Rev, 2005. **6**(2): p. 143-54.
23. Euser, A.M., et al., *Associations between prenatal and infancy weight gain and BMI, fat mass, and fat distribution in young adulthood: a prospective cohort study in males and females born very preterm*. Am J Clin Nutr, 2005. **81**(2): p. 480-7.
24. Attig, L., et al., *Postnatal leptin promotes organ maturation and development in IUGR piglets*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64616.
25. Attig, L., et al., *Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-weight piglets and effects of leptin supplementation on neonatal growth and development*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **295**(5): p. E1117-25.
26. Fernandez-Twinn, D.S. and S.E. Ozanne, *Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome*. Physiol Behav, 2006. **88**(3): p. 234-43.
27. Ozaki, T., et al., *Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring*. J Physiol, 2001. **530**(Pt 1): p. 141-52.
28. Desai, M., J.K. Jellyman, and M.G. Ross, *Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome*. Int J Obes (Lond), 2015. **39**(4): p. 633-41.
29. Whitelaw, N.C. and E. Whitelaw, *How lifetimes shape epigenotype within and across generations*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 2**: p. R131-7.
30. Smith, C.J. and K.K. Ryckman, *Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2015. **8**: p. 295-302.
31. Lillycrop, K.A., *Effect of maternal diet on the epigenome: implications for human metabolic disease*. Proc Nutr Soc, 2011. **70**(1): p. 64-72.
32. Kucharski, R., et al., *Nutritional control of reproductive status in honeybees via DNA methylation*. Science, 2008. **319**(5871): p. 1827-30.
33. Luka, Z., et al., *Histone demethylase LSD1 is a folate-binding protein*. Biochemistry, 2011. **50**(21): p. 4750-6.
34. McKay, J.A., et al., *Genetic and non-genetic influences during pregnancy on infant global and site specific DNA methylation: role for folate gene variants and vitamin B12*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e33290.
35. Mathias, P.C., et al., *Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming*. Eur J Nutr, 2014. **53**(3): p. 711-22.
36. Berridge, K.C., *Food reward: brain substrates of wanting and liking*. Neurosci Biobehav Rev, 1996. **20**(1): p. 1-25.
37. Higgs, S., *Cognitive processing of food rewards*. Appetite, 2016. **104**: p. 10-7.
38. Berthoud, H.R., N.R. Lenard, and A.C. Shin, *Food reward, hyperphagia, and obesity*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011. **300**(6): p. R1266-77.
39. Castellanos, E.H., et al., *Obese adults have visual attention bias for food cue images: evidence for altered reward system function*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(9): p. 1063-73.
40. Rada, P., N.M. Avena, and B.G. Hoebel, *Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell*. Neuroscience, 2005. **134**(3): p. 737-44.
41. Liang, N.C., A. Hajnal, and R. Norgren, *Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **291**(5): p. R1236-9.
42. Sahr, A.E., et al., *Activation of mesolimbic dopamine neurons during novel and daily limited access to palatable food is blocked by the opioid antagonist LY255582*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008. **295**(2): p. R463-71.

43. Onaolapo, A.Y. and O.J. Onaolapo, *Food additives, food and the concept of 'food addiction': Is stimulation of the brain reward circuit by food sufficient to trigger addiction?* Pathophysiology, 2018. **25**(4): p. 263-276.
44. Erlanson-Albertsson, C., *How palatable food disrupts appetite regulation.* Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2005. **97**(2): p. 61-73.
45. Saper, C.B., T.C. Chou, and J.K. Elmquist, *The need to feed: homeostatic and hedonic control of eating.* Neuron, 2002. **36**(2): p. 199-211.
46. Adinoff, B., *Neurobiologic processes in drug reward and addiction.* Harv Rev Psychiatry, 2004. **12**(6): p. 305-20.
47. Gugusheff, J.R., Z.Y. Ong, and B.S. Muhlhauser, *The early origins of food preferences: targeting the critical windows of development.* FASEB J, 2015. **29**(2): p. 365-73.
48. Nestler, E.J., *Is there a common molecular pathway for addiction?* Nat Neurosci, 2005. **8**(11): p. 1445-9.
49. Brion, M.J., et al., *Maternal macronutrient and energy intakes in pregnancy and offspring intake at 10 y: exploring parental comparisons and prenatal effects.* Am J Clin Nutr, 2010. **91**(3): p. 748-56.
50. Forestell, C.A. and J.A. Mennella, *Early determinants of fruit and vegetable acceptance.* Pediatrics, 2007. **120**(6): p. 1247-54.
51. Mennella, J.A. and G.K. Beauchamp, *The effects of repeated exposure to garlic-flavored milk on the nursling's behavior.* Pediatr Res, 1993. **34**(6): p. 805-8.
52. Mennella, J.A., C.P. Jagnow, and G.K. Beauchamp, *Prenatal and postnatal flavor learning by human infants.* Pediatrics, 2001. **107**(6): p. E88.
53. Mennella, J.A. and G.K. Beauchamp, *Flavor experiences during formula feeding are related to preferences during childhood.* Early Hum Dev, 2002. **68**(2): p. 71-82.
54. Grimm, J.W., et al., *Effects of systemic or nucleus accumbens-directed dopamine D1 receptor antagonism on sucrose seeking in rats.* Psychopharmacology (Berl), 2011. **216**(2): p. 219-33.
55. Tobi, E.W., et al., *DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific.* Hum Mol Genet, 2009. **18**(21): p. 4046-53.
56. Heijmans, B.T., et al., *Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(44): p. 17046-9.
57. Boney, C.M., et al., *Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus.* Pediatrics, 2005. **115**(3): p. e290-6.
58. Oken, E., et al., *Maternal gestational weight gain and offspring weight in adolescence.* Obstet Gynecol, 2008. **112**(5): p. 999-1006.
59. Armitage, J.A., L. Poston, and P.D. Taylor, *Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity.* Front Horm Res, 2008. **36**: p. 73-84.
60. Bouchard, L., et al., *Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction.* Am J Clin Nutr, 2010. **91**(2): p. 309-20.
61. Morales, E., et al., *DNA methylation signatures in cord blood associated with maternal gestational weight gain: results from the ALSPAC cohort.* BMC Res Notes, 2014. **7**: p. 278.
62. Wang, X., et al., *Obesity related methylation changes in DNA of peripheral blood leukocytes.* BMC Med, 2010. **8**: p. 87.
63. Jufvas, A., et al., *Global differences in specific histone H3 methylation are associated with overweight and type 2 diabetes.* Clin Epigenetics, 2013. **5**(1): p. 15.
64. Ortega, F.J., et al., *MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation.* PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9022.
65. Rang, H.P.D., M. Maureen, *Rang & Dale's pharmacology.* 6th ed. 2007, London: Churchill Livingstone/Elsevier. 829.

66. Mark F. Bear, B.W.C., Michael A. Paradiso, *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. 3ª ed. 2007, Porto Alegre, RS: Artmed Editora.
67. Luijten, M., et al., *Brain activation associated with attentional bias in smokers is modulated by a dopamine antagonist*. *Neuropsychopharmacology*, 2012. **37**(13): p. 2772-9.
68. Dearry, A., et al., *Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor*. *Nature*, 1990. **347**(6288): p. 72-6.
69. Sunahara, R.K., et al., *Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1*. *Nature*, 1991. **350**(6319): p. 614-9.
70. Roberts, K.M. and P.F. Fitzpatrick, *Mechanisms of tryptophan and tyrosine hydroxylase*. *IUBMB Life*, 2013. **65**(4): p. 350-7.
71. Tekin, I., et al., *Complex molecular regulation of tyrosine hydroxylase*. *J Neural Transm*, 2014. **121**(12): p. 1451-81.
72. Maglott, D.P., K; Tatusova, T, *Gene: A Directory of Genes*, in *The NCBI Handbook [Internet]*, J.O. McEntyre, J, Editor. 2011, National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21085/>; Bethesda (MD).
73. Pistillo, F., et al., *Nicotinic, glutamatergic and dopaminergic synaptic transmission and plasticity in the mesocorticolimbic system: focus on nicotine effects*. *Prog Neurobiol*, 2015. **124**: p. 1-27.
74. Missale, C., et al., *Dopamine receptors: from structure to function*. *Physiol Rev*, 1998. **78**(1): p. 189-225.
75. Beaulieu, J.M. and R.R. Gainetdinov, *The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors*. *Pharmacol Rev*, 2011. **63**(1): p. 182-217.
76. Hyman, S.E., R.C. Malenka, and E.J. Nestler, *Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory*. *Annu Rev Neurosci*, 2006. **29**: p. 565-98.
77. Di Chiara, G. and V. Bassareo, *Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do*. *Curr Opin Pharmacol*, 2007. **7**(1): p. 69-76.
78. Koob, G.F. and N.D. Volkow, *Neurocircuitry of addiction*. *Neuropsychopharmacology*, 2010. **35**(1): p. 217-38.
79. Gingrich, J.A. and M.G. Caron, *Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors*. *Annu Rev Neurosci*, 1993. **16**: p. 299-321.
80. Sokoloff, P., et al., *The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2006. **5**(1): p. 25-43.
81. Ford, C.P., *The role of D2-autoreceptors in regulating dopamine neuron activity and transmission*. *Neuroscience*, 2014. **282**: p. 13-22.
82. Keeler, J.F., D.O. Pretsell, and T.W. Robbins, *Functional implications of dopamine D1 vs. D2 receptors: A 'prepare and select' model of the striatal direct vs. indirect pathways*. *Neuroscience*, 2014. **282C**: p. 156-175.
83. Gong, P., et al., *Genetic variations in COMT and DRD2 modulate attentional bias for affective facial expressions*. *PLoS One*, 2013. **8**(12): p. e81446.
84. Garcia-Tornadu, I., et al., *New insights into the endocrine and metabolic roles of dopamine D2 receptors gained from the Drd2 mouse*. *Neuroendocrinology*, 2010. **92**(4): p. 207-14.
85. Gerfen, C.R., *Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways*. *Trends Neurosci*, 2000. **23**(10 Suppl): p. S64-70.
86. Vallone, D., R. Picetti, and E. Borrelli, *Structure and function of dopamine receptors*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2000. **24**(1): p. 125-32.
87. Seeman, P., *Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia*. *Expert Opin Ther Targets*, 2006. **10**(4): p. 515-31.

88. Rondou, P., G. Haegeman, and K. Van Craenenbroeck, *The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(12): p. 1971-86.
89. Vaughan, R.A. and J.D. Foster, *Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(9): p. 489-96.
90. Amara, S.G. and M.J. Kuhar, *Neurotransmitter transporters: recent progress*. Annu Rev Neurosci, 1993. **16**: p. 73-93.
91. Giros, B. and M.G. Caron, *Molecular characterization of the dopamine transporter*. Trends Pharmacol Sci, 1993. **14**(2): p. 43-9.
92. Grunhage, F., et al., *Systematic screening for DNA sequence variation in the coding region of the human dopamine transporter gene (DAT1)*. Mol Psychiatry, 2000. **5**(3): p. 275-82.
93. Genro, J.P.P., G.V.; Zeni, C.; Oliveira, A.S.; Roman, T.; Rohde, L.A.; Hutz, M.H., *A Common Haplotype at the Dopamine Transporter Gene 50 Region is Associated With Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder*. American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics), 2008. **147B**: p. 1568-1575.
94. Bannon, M.J., et al., *The human dopamine transporter gene: gene organization, transcriptional regulation, and potential involvement in neuropsychiatric disorders*. Eur Neuropsychopharmacol, 2001. **11**(6): p. 449-55.
95. Vucetic, Z., et al., *Epigenetic dysregulation of the dopamine system in diet-induced obesity*. J Neurochem, 2012. **120**(6): p. 891-8.
96. van de Giessen, E.H., S.; Caan, M.W.A.; Zientek, F.; Dickson, J.C.; Tossici-Bolt, L.; Sera, L.; Asenbaum, S.; Guignard, R.; Akdemir, U.O.; Knudsen, G.M.; Nobili, F.; Pagani, M.; Vander Borght, T.; Van Laere, K.; Varrone, A.; Tatsch, K.; Booij, J.; Sabri, O., *No association between striatal dopamine transporter binding and body mass index: A multi-center European study in healthy volunteers*. NeuroImage, 2013. **64**: p. 61-67.
97. South, T.H., X.F., *High-fat diet exposure increases dopamine D2 receptor and decreases dopamine transporter receptor binding density in the nucleus accumbens and caudate putamen of mice*. Neurochemical research, 2008. **33**(3): p. 598-605.
98. Speed, N., et al., *Impaired striatal Akt signaling disrupts dopamine homeostasis and increases feeding*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e25169.
99. Geiger, B.M., et al., *Evidence for defective mesolimbic dopamine exocytosis in obesity-prone rats*. FASEB J, 2008. **22**(8): p. 2740-6.
100. Mousseau, D.D. and G.B. Baker, *Recent developments in the regulation of monoamine oxidase form and function: is the current model restricting our understanding of the breadth of contribution of monoamine oxidase to brain [dys]function?* Curr Top Med Chem, 2012. **12**(20): p. 2163-76.
101. Ochiai, Y., et al., *Substrate selectivity of monoamine oxidase A, monoamine oxidase B, diamine oxidase, and semicarbazide-sensitive amine oxidase in COS-1 expression systems*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(12): p. 2362-6.
102. Wang, C.C., et al., *Monoamine oxidases in development*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(4): p. 599-630.
103. Juárez Olguín, H., et al., *The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016. **2016**: p. 13.
104. Philibert, R.A., et al., *MAOA methylation is associated with nicotine and alcohol dependence in women*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2008. **147B**(5): p. 565-70.
105. Launay, J.M., et al., *Smoking induces long-lasting effects through a monoamine-oxidase epigenetic regulation*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e7959.
106. Chen, Z.Y., et al., *Structure of the human gene for monoamine oxidase type A*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(16): p. 4537-41.

107. Wong, W.K., K. Chen, and J.C. Shih, *Decreased methylation and transcription repressor Sp3 up-regulated human monoamine oxidase (MAO) B expression during Caco-2 differentiation*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36227-35.
108. Shumay, E. and J.S. Fowler, *Identification and characterization of putative methylation targets in the MAOA locus using bioinformatic approaches*. Epigenetics, 2010. **5**(4): p. 325-42.
109. Huotari, M., et al., *Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice*. Eur J Neurosci, 2002. **15**(2): p. 246-56.
110. Reichelt, A.C., et al., *An intermittent hypercaloric diet alters gut microbiota, prefrontal cortical gene expression and social behaviours in rats*. Nutr Neurosci, 2018: p. 1-15.
111. Kaczmarczyk, M.M., et al., *Methylphenidate prevents high-fat diet (HFD)-induced learning/memory impairment in juvenile mice*. Psychoneuroendocrinology, 2013. **38**(9): p. 1553-64.
112. Berridge, K.C., et al., *The tempted brain eats: pleasure and desire circuits in obesity and eating disorders*. Brain Res, 2010. **1350**: p. 43-64.
113. Llewellyn, C. and J. Wardle, *Behavioral susceptibility to obesity: Gene-environment interplay in the development of weight*. Physiol Behav, 2015. **152**(Pt B): p. 494-501.
114. Terry, P., D.B. Gilbert, and S.J. Cooper, *Dopamine receptor subtype agonists and feeding behavior*. Obes Res, 1995. **3 Suppl 4**: p. 515S-523S.
115. Wang, G.J., et al., *Brain dopamine and obesity*. Lancet, 2001. **357**(9253): p. 354-7.
116. Jonsson, E.G., et al., *Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers*. Mol Psychiatry, 1999. **4**(3): p. 290-6.
117. Pohjalainen, T., et al., *The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers*. Mol Psychiatry, 1998. **3**(3): p. 256-60.
118. Eisenstein, S.A., et al., *Prediction of striatal D2 receptor binding by DRD2/ANKK1 TaqIA allele status*. Synapse, 2016.
119. Gluskin, B.S. and B.J. Mickey, *Genetic variation and dopamine D2 receptor availability: a systematic review and meta-analysis of human in vivo molecular imaging studies*. Transl Psychiatry, 2016. **6**: p. e747.
120. Arinami, T., et al., *A functional polymorphism in the promoter region of the dopamine D2 receptor gene is associated with schizophrenia*. Hum Mol Genet, 1997. **6**(4): p. 577-82.
121. Muller, D.J., et al., *Systematic analysis of dopamine receptor genes (DRD1-DRD5) in antipsychotic-induced weight gain*. Pharmacogenomics J, 2012. **12**(2): p. 156-64.
122. Roth, C.L., et al., *Association analyses for dopamine receptor gene polymorphisms and weight status in a longitudinal analysis in obese children before and after lifestyle intervention*. BMC Pediatr, 2013. **13**: p. 197.
123. Johnson, P.M. and P.J. Kenny, *Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats*. Nat Neurosci, 2010. **13**(5): p. 635-41.
124. Davis, J.F., et al., *Exposure to elevated levels of dietary fat attenuates psychostimulant reward and mesolimbic dopamine turnover in the rat*. Behav Neurosci, 2008. **122**(6): p. 1257-63.
125. Ong, Z.Y. and B.S. Muhlhauser, *Consuming a low-fat diet from weaning to adulthood reverses the programming of food preferences in male, but not in female, offspring of 'junk food'-fed rat dams*. Acta Physiol (Oxf), 2014. **210**(1): p. 127-41.
126. Spangler, R., et al., *Opiate-like effects of sugar on gene expression in reward areas of the rat brain*. Brain Res Mol Brain Res, 2004. **124**(2): p. 134-42.
127. Avena, N.M., P. Rada, and B.G. Hoebel, *Evidence for sugar addiction: behavioral and neurochemical effects of intermittent, excessive sugar intake*. Neurosci Biobehav Rev, 2008. **32**(1): p. 20-39.

128. Colantuoni, C., et al., *Evidence that intermittent, excessive sugar intake causes endogenous opioid dependence*. *Obes Res*, 2002. **10**(6): p. 478-88.
129. Vucetic, Z., et al., *Early life protein restriction alters dopamine circuitry*. *Neuroscience*, 2010. **168**(2): p. 359-70.
130. de Melo Martimiano, P.H., et al., *Perinatal malnutrition stimulates motivation through reward and enhances drd(1a) receptor expression in the ventral striatum of adult mice*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015. **134**: p. 106-14.
131. Hehar, H., I. Ma, and R. Mychasiuk, *Effects of Metabolic Programming on Juvenile Play Behavior and Gene Expression in the Prefrontal Cortex of Rats*. *Dev Neurosci*, 2016. **38**(2): p. 96-104.
132. Giraudo, S.Q., et al., *Maternal high fat feeding and gestational dietary restriction: effects on offspring body weight, food intake and hypothalamic gene expression over three generations in mice*. *Pharmacol Biochem Behav*, 2010. **97**(1): p. 121-9.
133. Manuel-Apolinar, L., et al., *Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: implications of food intake*. *Mol Med Rep*, 2014. **9**(2): p. 407-12.
134. Sanchez-Hernandez, D., et al., *A gestational diet high in fat-soluble vitamins alters expression of genes in brain pathways and reduces sucrose preference, but not food intake, in Wistar male rat offspring*. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2015. **40**(4): p. 424-431.
135. Barrand, S., et al., *Impact of maternal high fat diet on hypothalamic transcriptome in neonatal Sprague Dawley rats*. *PLoS One*, 2017. **12**(12): p. e0189492.
136. Neville, M.J., E.C. Johnstone, and R.T. Walton, *Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1*. *Hum Mutat*, 2004. **23**(6): p. 540-5.
137. Mota, N.R., et al., *Linking dopamine neurotransmission and neurogenesis: The evolutionary history of the NTAD (NCAM1-TTC12-ANKK1-DRD2) gene cluster*. *Genet Mol Biol*, 2012. **35**(4 (suppl)): p. 912-8.
138. Meylan, E. and J. Tschopp, *The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress*. *Trends Biochem Sci*, 2005. **30**(3): p. 151-9.
139. Bontempi, S., et al., *Identification and characterization of two nuclear factor-kappaB sites in the regulatory region of the dopamine D2 receptor*. *Endocrinology*, 2007. **148**(5): p. 2563-70.
140. Fiorentini, C., et al., *Nerve growth factor regulates dopamine D(2) receptor expression in prolactinoma cell lines via p75(NGFR)-mediated activation of nuclear factor-kappaB*. *Mol Endocrinol*, 2002. **16**(2): p. 353-66.
141. Lobo, M.K., et al., *Cell type-specific loss of BDNF signaling mimics optogenetic control of cocaine reward*. *Science*, 2010. **330**(6002): p. 385-90.
142. Wise, R.A., *Dual roles of dopamine in food and drug seeking: the drive-reward paradox*. *Biol Psychiatry*, 2013. **73**(9): p. 819-26.
143. Morales, M. and E.B. Margolis, *Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour*. *Nat Rev Neurosci*, 2017. **18**(2): p. 73-85.
144. Vucetic, Z., et al., *Maternal high-fat diet alters methylation and gene expression of dopamine and opioid-related genes*. *Endocrinology*, 2010. **151**(10): p. 4756-64.
145. Chen, P.Y., et al., *Intrauterine calorie restriction affects placental DNA methylation and gene expression*. *Physiol Genomics*, 2013. **45**(14): p. 565-76.
146. Goyal, R., et al., *Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy*. *Reprod Sci*, 2010. **17**(3): p. 227-38.

147. Grissom, N.M. and T.M. Reyes, *Gestational overgrowth and undergrowth affect neurodevelopment: similarities and differences from behavior to epigenetics*. Int J Dev Neurosci, 2013. **31**(6): p. 406-14.
148. Morganstern, I., et al., *Stimulation of nicotine reward and central cholinergic activity in Sprague-Dawley rats exposed perinatally to a fat-rich diet*. Psychopharmacology (Berl), 2013. **230**(4): p. 509-24.
149. Bocarsly, M.E., et al., *Effects of perinatal exposure to palatable diets on body weight and sensitivity to drugs of abuse in rats*. Physiol Behav, 2012. **107**(4): p. 568-75.
150. Naef, L., et al., *Maternal high-fat intake alters presynaptic regulation of dopamine in the nucleus accumbens and increases motivation for fat rewards in the offspring*. Neuroscience, 2011. **176**: p. 225-36.
151. King, B.M., *The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight*. Physiol Behav, 2006. **87**(2): p. 221-44.
152. Bouret, S.G., *Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development*. J Nutr, 2010. **140**(3): p. 653-7.
153. Crowley, W.R., *Neuroendocrine regulation of lactation and milk production*. Compr Physiol, 2015. **5**(1): p. 255-91.
154. Grattan, D.R., *60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis*. J Endocrinol, 2015. **226**(2): p. T101-22.
155. Timper, K. and J.C. Bruning, *Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity*. Dis Model Mech, 2017. **10**(6): p. 679-689.
156. Vickers, M.H., et al., *Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(1): p. E83-7.
157. Orozco-Solis, R., et al., *Nutritional programming in the rat is linked to long-lasting changes in nutrient sensing and energy homeostasis in the hypothalamus*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13537.
158. Khurana, I., et al., *DNA methylation regulates hypothalamic gene expression linking parental diet during pregnancy to the offspring's risk of obesity in *Psammomys obesus**. Int J Obes (Lond), 2016. **40**(7): p. 1079-88.
159. Paternain, L., et al., *Transcriptomic and epigenetic changes in the hypothalamus are involved in an increased susceptibility to a high-fat-sucrose diet in prenatally stressed female rats*. Neuroendocrinology, 2012. **96**(3): p. 249-60.
160. Ryczko, D. and R. Dubuc, *Dopamine and the Brainstem Locomotor Networks: From Lamprey to Human*. Frontiers in neuroscience, 2017. **11**: p. 295-295.
161. Sharples, S.A., et al., *Dopamine: a parallel pathway for the modulation of spinal locomotor networks*. Front Neural Circuits, 2014. **8**: p. 55.
162. Speciale, S.G., et al., *Activation of specific central dopamine pathways: locomotion and footshock*. Brain Res Bull, 1986. **16**(1): p. 33-8.
163. Beninger, R.J., *The role of dopamine in locomotor activity and learning*. Brain Res, 1983. **287**(2): p. 173-96.
164. Nasehi, M., et al., *The effect of CA1 dopaminergic system in harmaline-induced amnesia*. Neuroscience, 2015. **285**: p. 47-59.
165. Lawford, B.R., et al., *The D2 dopamine receptor (DRD2) gene is associated with co-morbid depression, anxiety and social dysfunction in untreated veterans with post-traumatic stress disorder*. Eur Psychiatry, 2006. **21**(3): p. 180-5.
166. Hostetler, C.M., S.L. Harkey, and K.L. Bales, *D2 antagonist during development decreases anxiety and infanticidal behavior in adult female prairie voles (*Microtus ochrogaster*)*. Behav Brain Res, 2010. **210**(1): p. 127-30.

167. Trainor, B.C., *Stress responses and the mesolimbic dopamine system: social contexts and sex differences*. *Horm Behav*, 2011. **60**(5): p. 457-69.
168. Nasehi, M., et al., *Involvement of dopamine D1/D2 receptors on harmaline-induced amnesia in the step-down passive avoidance test*. *Eur J Pharmacol*, 2010. **634**(1-3): p. 77-83.
169. Zweifel, L.S., et al., *Activation of dopamine neurons is critical for aversive conditioning and prevention of generalized anxiety*. *Nat Neurosci*, 2011. **14**(5): p. 620-6.
170. Backman, L. and L. Nyberg, *Dopamine and training-related working-memory improvement*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2013. **37**(9 Pt B): p. 2209-19.
171. Puig, M.V., E.G. Antzoulatos, and E.K. Miller, *Prefrontal dopamine in associative learning and memory*. *Neuroscience*, 2014. **282**: p. 217-29.

8. ANEXOS



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 171/15

2) DATA DO PARECER: 09/03/2016

Parecer 388/15

3) TÍTULO DO PROJETO:

Análise comportamental, bioquímica e epigenética do efeito da nutrição materna em modelo animal.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Márcia Giovenardi

5) RESUMO DO PROJETO:

O projeto visa analisar parâmetros comportamentais, bioquímicos e epigenéticos dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico em camundongos expostos a diferentes dietas (restrição calórica-DR, normal-DC e hipercalórica-DHC). Protocolo 1: camundongas serão acasaladas na proporção de 3:1 e iniciarão a dieta quando confirmada a prenhez (esfregaço vaginal), sendo avaliadas no 1º e 10º dia pós-natal, quanto a massa corporal e no 7º dia pós-natal quanto ao comportamento maternal, 8º dia – ansiedade (labirinto em cruz) e 9º dia, quanto a locomoção (campo aberto). Estas serão avaliadas também, quanto a massa corporal nos dias 3, 9, 15 e 21 pós-natal e eutanasiadas por decaptação no 22º dia, para coleta de sangue troncular para avaliação bioquímica (glicemia, colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL e colesterol) e regiões cerebrais para análise da expressão de genes envolvidos nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico. Protocolo 2: as ninhadas serão padronizadas ao nascimento, em oito filhotes cada e, 3 machos e 3 fêmeas de cada ninhada serão submetidos as respectivas dietas (independentemente da dieta materna). Será verificado na prole: massa corporal nos dias

3, 9, 15 e 21 pós-natal, 55º dia - ansiedade (labirinto em cruz) e 60º dia - locomoção (campo aberto), sendo as fêmeas acompanhadas quanto ao ciclo estral (3 ciclos regulares) e testadas em diestro. A eutanásia será realizada em torno de 65 dias pós-natal, da mesma forma e com avaliação das mesmas variáveis descritas para as mães.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Geral: Analisar parâmetros comportamentais, bioquímicos e epigenéticos dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico em camundongos expostos a diferentes dietas (restrição calórica-DR, normal-DC e hipercalórica-DHC).

Específicos:

- analisar o efeito das diferentes dietas nos comportamentos maternal, de ansiedade e de locomoção das genitoras;

- analisar o efeito das diferentes dietas na expressão de genes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico das genitoras;

- analisar o efeito das diferentes dietas nos comportamentos de ansiedade e locomoção da prole;

- analisar o efeito das diferentes dietas na expressão de genes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico da prole;

Identificar padrão de metilação nos genes que possuam modificação da expressão de genes do sistema dopaminérgico da prole;

- identificar padrão de metilação nos genes que possuam modificação da expressão de genes do sistema serotoninérgico da prole;

- analisar o efeito de diferentes dietas no perfil lipídico da genitora e da prole.

7) FINALIDADE DO PROJETO:

Ensino

Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:**Título**

Adequado

Comentários

Introdução

Adequada

Comentários

Objetivos

Adequados

Comentários

Relevância e Justificativa

Adequados

Comentários

Materiais e Métodos

Adequados

Comentários

Detalhar na metodologia:

- o cálculo do tamanho da amostra foi apresentado e referenciado;

- o procedimento de acasalamento e adequado a espécie em consonância com os objetivos da pesquisa.

- a justificativa para a decaptação foi apresentada e referenciada.

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie:

Número Amostral:

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Laboratório): Biotério da UFCSPA, Laboratório de Fisiologia comportamental e metabólica e o Laboratório de Biologia Molecular.

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
Não referida	Camundongos	Macho	15
Não referida	Camundongas	Fêmeas	45

12) RECOMENDAÇÃO:

Aprovado

Com Pendência

Não aprovado

Data de início 10/03/2016 Data de Término 30/12/2019

Comentários gerais sobre o projeto:

O tema é relevante, o uso dos animais é justificado por necessitar avaliação genética, metabólica e comportamental *in vivo*. O projeto está adequado para ser desenvolvido na forma apresentada.

9. CURRÍCULO LATTES