



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANA LUIZA MACHADO WUNDERLICH

**AÇÕES DA COLECISTOCININA E DO  
LIPOPOLISSACARÍDEO NA INGESTÃO ALIMENTAR E  
ATIVACÃO NEURONAL EM RATOS ADULTOS  
SUBMETIDOS A ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS PÓS-  
NATAIS POR MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

ANA LUIZA MACHADO WUNDERLICH

**AÇÕES DA COLECISTOCININA E DO  
LIPOPOLISSACARÍDEO NA INGESTÃO ALIMENTAR E  
ATIVÇÃO NEURONAL EM RATOS ADULTOS  
SUBMETIDOS A ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS PÓS-  
NATAIS POR MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa

Londrina  
2023

Wunderlich, Ana Luiza Machado.

ações da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na ingestão alimentar e ativação neuronal em ratos adultos submetidos a alterações nutricionais pós-natais por manipulação do tamanho da ninhada / Ana Luiza Machado Wunderlich. - Londrina, 2023.  
156 f.

Orientador: Ernane Torres Uchôa.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2023.

Inclui bibliografia.

1. Saciedade - Tese. 2. Inflamação - Tese. 3. Núcleo do Trato Solitário - Tese. 4. Núcleo Paraventricular do Hipotálamo - Tese. I. Uchôa, Ernane Torres. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

ANA LUIZA MACHADO WUNDERLICH

**AÇÕES DA COLECISTOCININA E DO  
LIPOPOLISSACARÍDEO NA INGESTÃO ALIMENTAR E  
ATIVÇÃO NEURONAL EM RATOS ADULTOS  
SUBMETIDOS A ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS PÓS-  
NATAIS POR MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador: Prof. Dr. Ernane T. Uchôa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andressa de Freitas M. Dionísio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sabrina Grassioli  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná -  
UNIOESTE

---

Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Beatriz de Carvalho Borges  
University of Michigan

Londrina, 28 de fevereiro de 2023.

Dedico este trabalho a todos os que me ensinaram, me apoiaram e sustentaram (e suportaram) durante esses quatro anos.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer publicamente, em primeiro lugar, a Deus, meu Pai Celestial que me deu tudo o que eu precisava para a realização deste doutorado. Ele colocou em minha vida dons, pessoas e circunstâncias essenciais para que tudo acontecesse de acordo com a vontade dEle e eu chegasse onde estou hoje. *“Todo louvor a Ti, aquele que tudo em mim realizou.”*

Agradeço pela vida, amor e apoio incondicional do meu marido, Fernando, meus pais, minha irmã e cunhado, meu sobrinho que com três anos alegra a minha vida e minhas madrinhas. Saber que eles estavam sempre ao meu lado, acreditando em mim, me motivava quando eu estava desanimada.

Agradeço imensamente as minhas amigas de laboratório, por todo ensinamento técnico e pessoal que me passaram nesses últimos anos. Com vocês eu aprendi os reais frutos do doutorado, a amizade e a humildade.

Agradeço ao meu orientador, por ter crescido junto comigo durante o meu doutorado. Me incentivando, acalmando, e me ensinando a ser melhor. Rogo a Deus para que eu possa, um dia, ser uma professora e orientadora como ele.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos professores e colegas de laboratórios parceiros, que me abriram as portas para melhorar a qualidade desse trabalho. E aos professores que compõem a banca examinadora, agradeço pelo sim, pelo tempo desprendido para a leitura deste trabalho e pelo dom da sabedoria que compartilharão comigo.

**Como um pai, Ele nos livra  
Sabe bem quão frágil somos  
Nos sustenta gentilmente e  
Resgata dos inimigos.**

**H. F. Lyte, 1834**

WUNDERLICH, Ana Luiza Machado. **Ações da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na ingestão alimentar e ativação neuronal em ratos adultos submetidos a alterações nutricionais pós-natais por manipulação do tamanho da ninhada.** 2023. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

## RESUMO

A programação metabólica pode ser induzida pela redução ou aumento do tamanho da ninhada, o que leva à super ou subnutrição neonatal, respectivamente. Alterações na nutrição no período neonatal podem desafiar alguns processos regulatórios na idade adulta, como o efeito hipofágico da colecistocinina (CCK) e as respostas fisiológicas à inflamação sistêmica induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS). O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos a longo prazo da super e da subnutrição pós-natal na resposta anorexígena da CCK e do LPS em ratos. Os animais foram criados em ninhadas reduzidas (SL, 3 filhotes por matriz), normais (NL, 10 filhotes por matriz) ou expandidas (LL, 16 filhotes por matriz). No dia pós-natal 60, os ratos foram tratados por via intraperitoneal (IP) com solução veículo (salina 0,9%) ou CCK (10 µg/Kg) ou LPS (500 µg/Kg) e avaliados quanto à ingestão alimentar e expressão de c-Fos na área postrema (AP), no núcleo do trato solitário (NTS) e nos núcleos paraventricular (PVN), arqueado (ARC), ventromedial (VMH) e dorsomedial (DMH) do hipotálamo. Os ratos supernutridos (SL) apresentaram aumento no ganho de peso corporal, o qual estava inversamente correlacionado com a ativação neuronal dos neurônios do PaPo (subnúcleo posterior da região parvocelular do PVN), VMH e DMH, enquanto ratos subnutridos (LL) apresentaram menor peso corporal, correlacionado inversamente com a ativação neuronal aumentada apenas no PaPo. Ratos SL não apresentaram a resposta anorexígena e tiveram menor ativação neuronal no NTS e PVN induzidas pela CCK. Animais LL exibiram hipofagia e ativação de neurônios na AP, no NTS e PVN preservadas em resposta à CCK. A injeção de CCK não desencadeou efeito na imunorreatividade ao c-Fos no ARC, no VMH e no DMH em nenhuma ninhada. A administração periférica de LPS reduziu a ingestão alimentar e induziu o aumento na ativação neuronal no tronco encefálico, no PVN e no ARC e levou à diminuição no número de neurônios imunorreativos ao c-Fos no DMH em animais NL e LL. Ratos supernutridos apresentaram resposta hipofágica reduzida, menor ativação neuronal no NTS e PVN e ausência de resposta no DMH induzida pelo LPS. Esses resultados indicam que a supernutrição neonatal reduz a ativação neuronal mediada por CCK e LPS no tronco encefálico e em núcleos hipotalâmicos, comprometendo a ação anorexígena dessas moléculas. No entanto, essas respostas não foram alteradas pela subnutrição neonatal. Assim, os dados sugerem que o suprimento excessivo ou insuficiente de nutrientes durante a lactação apresenta efeitos divergentes na programação da saciedade CCK e na sinalização anorexígena mediada pelo LPS em ratos adultos.

**Palavras-chave:** Saciedade. Inflamação. Núcleo do trato solitário. Núcleo paraventricular do hipotálamo. Hipofagia.

WUNDERLICH, Ana Luiza Machado. **Effects of cholecystinin and lipopolysaccharide on food intake and neuronal activation in adult rats that submitted to postnatal nutritional alterations by manipulation of litter size.** 2023. 160pp. Thesis (Doctorate's degree in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2023.

## ABSTRACT

Metabolic programming may be induced by reduction or enhancement of litter size, which lead to neonatal over or undernutrition, respectively. Changes in neonatal nutrition can challenge some regulatory processes in adulthood, such as the hypophagic effect of cholecystinin (CCK) and physiological responses to systemic inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS). The aim of this study was to investigate the long-term effects of postnatal over- and undernutrition on the anorexigenic function of CCK and LPS. Animals were raised in small (SL, 3 pups per dam), normal (NL, 10 pups per dam), or large litters (LL, 16 pups per dam). On postnatal day 60, male rats were intraperitoneally (IP) treated with vehicle (0.9% saline) or CCK (10 µg/Kg) or LPS (500 µg/Kg) for the evaluation of food intake and c-Fos expression in the area postrema (AP), nucleus of solitary tract (NTS), and paraventricular (PVN), arcuate (ARC), ventromedial (VMH), and dorsomedial (DMH) nuclei of the hypothalamus. Overnourished rats (SL) showed increased body weight gain that was inversely correlated with neuronal activation of PaPo (posterior parvocellular subdivision of PVN), VMH, and DMH, whereas undernourished rats (LL) had lower body weight, inversely correlated with increased neuronal activation of PaPo only. SL rats did not show the anorexigenic response and had lower neuron activation in the NTS and PVN induced by CCK. LL exhibited preserved hypophagia and neuron activation in the AP, NTS, and PVN in response to CCK. CCK showed no effect in c-Fos immunoreactivity in the ARC, VMH, and DMH in any litter. Peripheral LPS reduced food intake and induced an increase in neuronal activation in the brainstem, PVN, and ARC and a decrease in the number of c-Fos-ir neurons in the DMH in NL and LL animals. Overnourished rats showed a reduced hypophagic response, lower neuron activation in the NTS and PVN, and no response in the DMH induced by LPS. These results indicate that neonatal overnutrition impairs CCK- and LPS-mediated neuron activation in the brainstem and in hypothalamic nuclei. However, these responses were not disrupted by neonatal undernutrition. Thus, data suggest that an excess or poor supply of nutrients during lactation display divergent effects on programming CCK satiation signaling and on LPS-mediated anorexia in male adult rats.

**Key-words:** Satiety. Inflammation. Nucleus of solitary tract. Paraventricular nucleus of hypothalamus. Hypophagia.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Principais vias de regulação da alimentação e balanço energético. .... 18
- Figura 2** – Arquitetura da parede celular de bactérias Gram-negativas e as vias de sinalização pró-inflamatórias do TLR4. .... 35
- Figura 3** – Esquema representativo de núcleos do (A) tronco encefálico e (B) do hipotálamo..... 57
- Figura 4** – Efeito do tamanho da ninhada no peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee de ratos *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL)..... 60
- Figura 5** – Efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na ingestão alimentar (g/100g peso corporal) de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL). .... 61
- Figura 6** – Efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal ao c-Fos no tronco encefálico de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL). .... 63
- Figura 7** – Efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal ao c-Fos nas subdivisões do PVN de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL)..... 65
- Figura 8** – Efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal ao c-Fos em núcleos hipotalâmicos de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL)..... 66
- Figura 9** – Fotomicrografias representativas (objetiva de 10x) de cortes coronais, apresentando o efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na imunorreatividade ao c-Fos nos núcleos Arqueado do hipotálamo (ARC), Ventromedial do hipotálamo (VMH) e Dorsomedial do hipotálamo (DMH) de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL)..... 67
- Figura 10** – Gráficos de dispersão demonstrando a relação entre o ganho de peso corporal (g) desde o nascimento até o DPN 60 de ratos da

linhagem <i>Wistar</i> de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL) e imunorreatividade ao c-Fos em núcleos hipotalâmicos. ....	68
<b>Figura 11</b> –Efeito do tamanho da ninhada no peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee de ratos <i>Wistar</i> de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL). ....	84
<b>Figura 12</b> –Efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na ingestão alimentar (g/100g peso corporal) de ratos adultos da linhagem <i>Wistar</i> de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL). ....	85
<b>Figura 13</b> –Efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal do tronco encefálico de ratos adultos da linhagem <i>Wistar</i> de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL). ....	89
<b>Figura 14</b> –Efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal das subdivisões do PVN de ratos adultos da linhagem <i>Wistar</i> de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL). ....	90
<b>Figura 15</b> –Efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal em núcleos hipotalâmicos de ratos adultos da linhagem <i>Wistar</i> de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL). ....	91
<b>Figura 16</b> –Fotomicrografias representativas (objetiva de 10x) de cortes coronais, apresentando o efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na imunorreatividade ao c-Fos nos núcleos Arqueado do hipotálamo (ARC), Ventromedial do hipotálamo (VMH) e Dorsomedial do hipotálamo (DMH) de ratos adultos da linhagem <i>Wistar</i> de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL). ....	92
<b>Figura 17</b> –Gráficos de dispersão demonstrando a relação entre o ganho de peso corporal (g) desde o nascimento até o DPN 60 de ratos <i>Wistar</i> de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL) e a imunorreatividade ao c-Fos. ....	93
<b>Figura 18</b> –Esquema representativo dos principais resultados obtidos nos estudos. ....	103

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Efeito dos fatores tempo, tamanho da ninhada e tratamento com colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) e interação entre fatores na análise de ingestão alimentar de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzida (SL), normal (NL) e expandida (LL). 61
- Tabela 2** – Efeito dos fatores tamanho da ninhada, tratamento com colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) e interação entre os fatores na imunorreatividade de neurônios em núcleos cerebrais de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzida (SL), normal (NL) e expandida (LL). 64
- Tabela 3** – Efeito dos fatores tempo, tamanho da ninhada e tratamento com lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) e interação entre fatores na análise de ingestão alimentar de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzida (SL), normal (NL) e expandida (LL). 86
- Tabela 4** – Efeito dos fatores tamanho da ninhada, tratamento com lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) e interação entre os fatores na imunorreatividade de neurônios em núcleos cerebrais de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzida (SL), normal (NL) e expandida (LL). 88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
AgRP	Proteína relacionada ao Agouti
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AP	Área Postrema
ARC	Núcleo Arqueado do Hipotálamo
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CCK	Colecistocinina
CCK-R	Receptor de colecistocinina
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DMH	Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo
DOHaD	Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença
GABA	Ácido aminobutírico
GLP-1	Peptídeo semelhante ao glucagon 1
icv	Intracerebroventricular
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
IR	Receptor de insulina
LBP	Proteína ligante de lipopolissacarídeo
LHA	Área Hipotalâmica Lateral
LL	Ninhada expandida (do inglês, <i>large little</i> )
LPS	Lipopolissacarídeo
MC-R	Receptor de melanocortina
MD-2	Fator de diferenciação mieloide 2
MyD88	Fator de diferenciação mieloide 88

NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NL	Ninhada normal (do inglês, <i>normal litter</i> )
NPY	Neuropeptídeo Y
NTS	Núcleo do Trato Solitário
Ob-R	Receptor de leptina
OLETF	<i>Otsuka Long Evans Tokushima Fatty</i>
PaMP	Subdivisão medial do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
PaPo	Subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
PaV	Subdivisão ventral do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
PYY	Peptídeo YY
RNAm	RNA mensageiro
RRP	Receptor de reconhecimento de padrões
SF-1	Fator esteroideogênico 1
SL	Ninhada reduzida (do inglês, <i>small litter</i> )
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TGI	Trato Gastrointestinal
TLR	Receptor Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAF6	Fator 6 associado ao receptor de fator de necrose tumoral
TRH	Hormônio tireotrófico
VMH	Núcleo Ventromedial do Hipotálamo
YR	Receptor de Neuropeptídeo Y
α-MSH	Hormônio estimulante dos alfa-melanócitos

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b> .....	<b>17</b>
2.1	SINAIS PERIFÉRICOS .....	18
2.1.1	Colecistocinina.....	20
2.2	REGULAÇÃO HIPOTALÂMICA.....	22
2.2.1	Núcleo Arqueado do Hipotálamo .....	23
2.2.2	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo.....	27
2.2.3	Núcleo Ventromedial do Hipotálamo.....	29
2.2.4	Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo.....	31
2.3	RESPOSTA IMUNOLÓGICA .....	32
2.3.1	Lipopolissacarídeo .....	34
2.4	MODELO EXPERIMENTAL: MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA EM ROEDORES.....	39
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>47</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
4.1	OBJETIVOS GERAIS .....	49
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	49
<b>5</b>	<b>ESTUDO 1 – A SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL, MAS NÃO A SUBNUTRIÇÃO NEONATAL, REDUZ A HIPOFAGIA E A ATIVAÇÃO NEURONAL NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO E NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO INDUZIDAS PELA COLECISTOCININA EM RATOS <i>WISTAR</i></b> .....	<b>51</b>
5.1	INTRODUÇÃO .....	51
5.2	MÉTODOS.....	53
5.2.1	Animais .....	53
5.2.2	Avaliação do efeito do tamanho da ninhada em parâmetros biométricos e índice de Lee .....	54
5.2.3	Droga .....	54
5.2.4	Avaliação dos efeitos da CCK no consumo alimentar de ratos SL, NL e LL....	54
5.2.5	Avaliação dos efeitos da CCK na ativação neuronal no tronco encefálico e no hipotálamo de animais SL, NL e LL .....	55
5.2.6	Análise estatística .....	58
5.3	RESULTADOS .....	58

5.3.1	Efeito do tamanho da ninhada no peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee .....	58
5.3.2	Efeito da CCK na ingestão alimentar de animais SL, NL e LL .....	60
5.3.3	Efeito da CCK na ativação neuronal em ratos SL, NL e LL .....	62
5.3.4	Análise das correlações .....	68
5.4	DISCUSSÃO .....	69
<b>6</b>	<b>ESTUDO 2 – A PROGRAMAÇÃO PELA SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL REDUZ A RESPOSTA HIPOFÁGICA E A ATIVIDADE NEURONAL NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO E HIPOTÁLAMO INDUZIDAS PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM RATOS ADULTOS. ....</b>	<b>76</b>
6.1	INTRODUÇÃO .....	76
6.2	MÉTODOS.....	79
6.2.1	Animais .....	79
6.2.2	Avaliação do efeito do tamanho da ninhada em parâmetros biométricos e no índice de Lee .....	80
6.2.3	Droga .....	80
6.2.4	Avaliação dos efeitos do LPS no consumo alimentar de ratos SL, NL e LL.....	80
6.2.5	Avaliação dos efeitos do LPS na ativação neuronal no tronco encefálico e no hipotálamo de animais SL, NL e LL .....	81
6.2.6	Análise estatística .....	82
6.3	RESULTADOS .....	83
6.3.1	Efeito do tamanho da ninhada no peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee .....	83
6.3.2	Efeito do LPS na ingestão alimentar de animais SL, NL e LL.....	84
6.3.3	Efeito do LPS na ativação neuronal em ratos SL, NL e LL .....	86
6.3.4	Análise das correlações .....	93
6.4	DISCUSSÃO .....	94
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>

## 1 INTRODUÇÃO

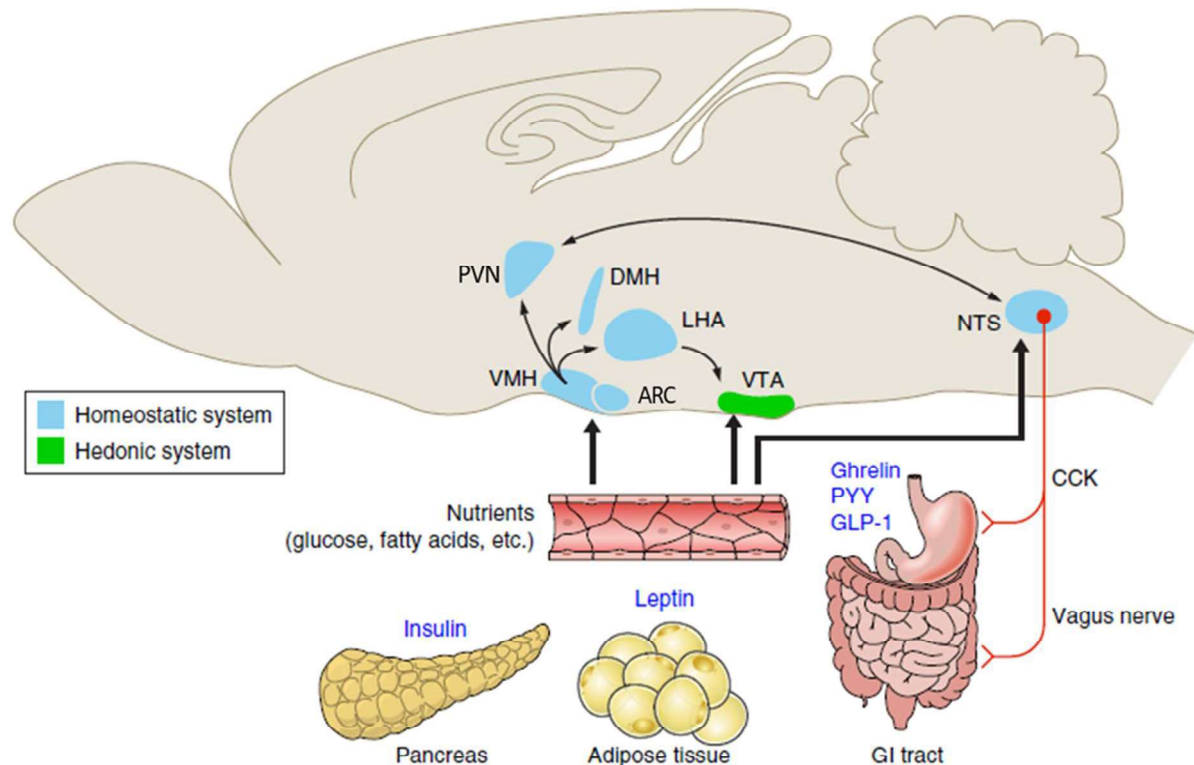
A ciência contemporânea tem investido grande esforço para desvendar padrões fisiológicos e comportamentais vitais aos mamíferos. Isso porque a regulação ideal de parâmetros chave do organismo, como a regulação energética, é crucial para a manutenção da saúde. Adquirir e aperfeiçoar o conhecimento é especialmente pertinente nos dias atuais, tendo em vista que o estilo de vida moderno tem contribuído com o desenvolvimento de várias desordens associadas ao desequilíbrio da homeostase. Por exemplo, a prevalência do Diabetes Mellitus no mundo dobrou nos últimos 20 anos, e esse número continua a subir. E, atualmente, o único tratamento efetivo para o último estágio da doença é o tratamento com insulina, o que mostra a urgente necessidade de compreender como o cérebro modifica a fisiologia a fim de identificar vias terapêuticas alternativas (KHODAI; LUCKMAN, 2021).

Neste contexto, as pesquisas recentes têm se preocupado em desvendar as conexões neurais a fim de facilitar o desenvolvimento dessas novas terapias para as doenças humanas. Uma das áreas em crescimento nos últimos anos é a identificação de vias neuronais que controlam a ingestão alimentar (SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013), visto que as adaptações comportamentais específicas, como a modulação da ingestão alimentar, são imprescindíveis para a homeostase da glicose, do peso corporal, bem como para o desenvolvimento e função do sistema imunológico. Ademais, o comportamento alimentar é de suma importância para a manutenção do equilíbrio individual e coletivo na sociedade (KHODAI; LUCKMAN, 2021). E justamente em virtude desse papel central da alimentação em comunidade e aos principais efeitos sobre a saúde associados aos transtornos alimentares de obesidade e desnutrição, uma atenção considerável tem sido direcionada ao controle da ingestão alimentar (STERNSON; EISELT, 2017). Os circuitos neuronais envolvidos nesse controle são complexos e muitas vezes interligados, o que torna seu estudo difícil, porém necessário (KHODAI; LUCKMAN, 2021).

## 2 DESENVOLVIMENTO

A alimentação é um conjunto inato, porém intrincado, de ações fisiológicas, sensoriais e motoras que culminam no equilíbrio calórico (LI *et al.*, 2019). O controle da ingestão alimentar envolve a regulação a curto e a longo prazo. A primeira determina o início e o término de uma refeição (fome e saciação), bem como o intervalo entre as refeições (saciedade), e a segunda mantém a estabilidade das reservas energéticas e, conseqüentemente, do peso corporal (CUMMINGS; OVERDUIN, 2007; MMI, 2017; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Dentre os sinais envolvidos na regulação a curto prazo da ingestão alimentar estão hormônios produzidos pelo trato gastrointestinal (TGI), sinais de fome ou de saciedade, como a grelina, a colecistocinina (CCK), o peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), entre outros. Os sinais de saciedade são transmitidos primariamente ao Núcleo do Trato Solitário (NTS) do tronco encefálico (Fig. 1) (MMI, 2017), que por sua vez favorecem a ativação de vias hipotalâmicas (CURI; ARAÚJO FILHO, 2009). Os sinais envolvidos na regulação a longo prazo são hormônios que sinalizam ao Sistema Nervoso Central (SNC), mais especificamente ao hipotálamo, o estado da reserva de tecido adiposo branco (TAB) corporal. No hipotálamo, estas informações de curto e longo prazo são integradas e transmitidas para os diversos núcleos (Fig. 1) (SCHWARTZ *et al.*, 2000) a fim de iniciar respostas apropriadas para manter a homeostase energética (BOURET, 2012; GROVE *et al.*, 2005).

**Figura 1 – Principais vias de regulação da alimentação e balanço energético.**



Os esquemas simplificados ilustram as possíveis redes neurais que transmitem sinais metabólicos da periferia para o cérebro. Os efeitos regulatórios dos hormônios e nutrientes periféricos envolvem uma rede neuronal complexa, distribuída e interconectada envolvendo neurônios no prosencéfalo, mesencéfalo e rombencéfalo. ARC, Núcleo Arqueado do Hipotálamo; DMH, Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo; PVN, Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo; LHA, Área Hipotalâmica Lateral; VTA, área Tegmental Ventral; NTS, Núcleo do Trato Solitário; CCK, colecistocinina; PYY, neuropeptídeo YY; GLP-1, peptídeo semelhante ao glucagon 1; GI, gastrointestinal.

Fonte: BOURET; LEVIN; OZANNE, 2015.

## 2.1 SINAIS PERIFÉRICOS

Considerando que a ingestão de energia é ajustada de acordo com as mudanças nas necessidades energéticas, a frequência com que as refeições são feitas, o tamanho das refeições, ou ambos, devem ser regulados por sinais relacionados com as mudanças nos estoques de energia corporal do organismo (BARSH; SCHWARTZ, 2002)

Dentre os sinais periféricos envolvidos na regulação a longo prazo, a leptina é considerada o mais importante. A leptina é um produto do gene *ob* e tanto em humanos quanto em roedores é produzida pelo TAB em proporção ao conteúdo de lipídeos acumulados nesse tecido (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL,

2011). Neste contexto, a expressão gênica e as concentrações plasmáticas de leptina em roedores e em humanos diminuem quando o balanço energético se encontra negativo, a fim de desencadear ações imediatas para restaurar as reservas energéticas. A leptina secretada é transportada ao SNC pela barreira hematoencefálica (BHE) por meio de um sistema de transporte saturável (MMI, 2017) e suas ações são mediadas pelo receptor de leptina (Ob-R), que pertence à família de receptores de citocina tipo 1. Esse receptor é altamente expresso no Núcleo Arqueado do Hipotálamo (ARC) e em outros núcleos hipotalâmicos (MMI, 2017; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). No ARC, a expressão do Ob-R é mais difundida nas populações neuronais que expressam Neuropeptídeo Y (NPY) e Proopiomelanocortina (POMC), conhecidos por participarem na regulação hipotalâmica do balanço energético (SAWCHENKO, 1998). A ativação desses receptores está relacionada aos efeitos centrais da leptina, que incluem diminuição da ingestão alimentar e do ganho de peso corporal e aumento do gasto energético (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011)

Semelhante à leptina, a insulina produzida pelas células  $\beta$  do pâncreas, circula no plasma em concentrações proporcionais ao TAB (BARSH; SCHWARTZ, 2002) e é responsável por controlar a disponibilidade de glicose no sangue. Além da função clássica na regulação do metabolismo da glicose, a insulina também atua como um sinal de curto e longo prazo da ingestão alimentar, sendo liberada após mudanças agudas nos níveis de energia, como no período pós-prandial (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Em contraste com seus efeitos anabólicos sobre tecidos periféricos, a ação da insulina no hipotálamo produz efeitos catabólicos (VAN DE SANDE-LEE; VELLOSO, 2012). Os receptores de insulina (IR) são encontrados no cérebro e a infusão intracerebroventricular (icv) de insulina em roedores e outros mamíferos se mostrou eficaz na redução da ingestão alimentar e no aumento do gasto de energia (BARSH; SCHWARTZ, 2002; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Como os receptores de insulina estão concentrados no ARC, e a insulina administrada via icv bloqueia os aumentos de RNA mensageiro (RNAm) de neuropeptídeos orexígenos induzidos pelo jejum neste núcleo hipotalâmico, acredita-se que tanto a insulina quanto a leptina forneçam informação inibitória para os neurônios orexígenos do ARC em proporção aos estoques de lipídeos no TAB (BARSH; SCHWARTZ, 2002).

Além do sinal de adiposidade fornecido pela leptina e pela insulina, os sinais de longo prazo relacionados ao estoque de TAB devem ser integrados aos sinais de curto prazo relacionados ao TGI para o término da refeição, de forma que o encerramento de uma refeição se dê não apenas porque os estoques de energia corporal foram repostos, mas também porque há sinais que indicam o estado de saciedade (BARSH; SCHWARTZ, 2002). Neste contexto, os sinais periféricos envolvidos na regulação a curto prazo do início e término da refeição são produzidos em diferentes regiões do TGI e possuem papel fundamental na transmissão de informações via fibras aferentes vagais para o tronco cerebral. Tais sinais transmitem informações como distensão gástrica, concentrações de hormônios e nutrientes. Por exemplo, o peptídeo grelina é secretado pelo estômago durante períodos de jejum, aumentando a sensação de fome quando infundido em humanos. Outros peptídeos, incluindo os hormônios CCK, GLP-1, o peptídeo YY (PYY) entre outros, são liberados pelo intestino durante a refeição e auxiliam a diminuir a ingestão alimentar ao agirem como fator de saciedade após a refeição (SILVERTHORN, 2017). A seguir, será explorado o papel da CCK na mediação da saciedade.

### 2.1.1 Colecistocinina

A colecistocinina (CCK) é um hormônio polipeptídico secretado pelas células I enteroendócrinas na presença de ácidos graxos e aminoácidos provenientes da alimentação (BARSH; SCHWARTZ, 2002; CURI; ARAÚJO FILHO, 2009). Por meio de seus receptores acoplados à proteína G quinase, CCK-1R e CCK-2R, distribuídos no estômago, células acinares pancreáticas e vesícula biliar, a CCK inibe o esvaziamento gástrico e estimula a secreção de enzimas pancreáticas e contração biliar (CURI; ARAÚJO FILHO, 2009; DOCKRAY, 2012). Além disso, via receptores expressos no SNC e periférico, ela atua como mediadora da saciedade e reduz a ingestão alimentar ao diminuir o tamanho da refeição em roedores e humanos (GIBBS *et al.*, 1973; KISSILEFF *et al.*, 1981). A CCK secretada pelo TGI atinge a circulação plasmática e sua concentração sérica sobe rapidamente após a refeição, atingindo o pico dentro de 15 minutos (MMI, 2017). A rápida ação da CCK na redução da ingestão alimentar envolve a ativação de receptores CCK-1R nos terminais axonais de neurônios vagais aferentes que terminam no núcleo do trato solitário (NTS) no tronco encefálico (DOCKRAY, 2012; FRASER; DAVISON, 1992), que por sua vez se

conectam com o hipotálamo (Fig. 1) (CURI; ARAÚJO FILHO, 2009). Contudo, a ação da CCK não é limitada ao seu efeito parácrino em fibras aferentes vagais periféricas. Já foi demonstrado em ratos Sprague-Dawley que, mesmo após desaferenciação vagal cirúrgica, a administração periférica de CCK provocou a estimulação do NTS (BAPTISTA; BROWNING; TRAVAGLI, 2007). Sabe-se que neurônios da área postrema (AP), um dos órgãos circunventriculares situado imediatamente dorsal ao NTS, respondem à CCK. Esses resultados indicam, então, que a CCK apresenta dois mecanismos distintos para ativar o NTS: ao mesmo tempo que estimula localmente as fibras aferentes vagais, a CCK livre na corrente sanguínea pode chegar diretamente à AP, e então ao NTS, e assim veicular os sinais de saciedade (AIRES, 2018).

O NTS é uma área importante do tronco encefálico que processa informações relacionadas à saciedade. Sinais humorais relacionados à adiposidade que atuam no ARC podem gerar sinais que são transmitidos por projeções descendentes para áreas do romboencéfalo, como o NTS. Dessa forma, a resposta dos neurônios do NTS aos sinais de saciedade pode ser aumentada ou atenuada de acordo com o estado nutricional do animal (BARSH; SCHWARTZ, 2002). Suporte para essa teoria decorre de descobertas de que a leptina é capaz de determinar a magnitude da estimulação da CCK em neurônios aferentes vagais. Em concordância, já foi demonstrado que animais obesos com resistência vagal à leptina apresentam menor responsividade a CCK acompanhada de menor ativação de neurônios do NTS (DOCKRAY, 2012; STEINERT *et al.*, 2017). Inversamente, a deficiência de leptina induzida por privação alimentar se mostrou capaz de atenuar a habilidade da CCK sistêmica em suprimir o consumo alimentar (MANISCALCO; RINAMAN, 2013).

A ativação de neurônios vagais aferentes induzida pela CCK leva à ativação de neurônios de segunda ordem no NTS que expressam tirona hidroxilase, dopamina beta hidroxilase (DBH), proopiomelanocortina (POMC) e pré-pró-glucagon, que se projetam para uma variedade de locais relacionados ao sistema de recompensa e ingestão, incluindo o hipotálamo (CAWTHON; DE LA SERRE, 2021). Além desses, já foi observado que neurônios noradrenérgicos A2 e os que expressam GLP-1 no NTS apresentam imunorreatividade à proteína c-Fos<sup>1</sup> após altas doses de

---

<sup>1</sup> A proteína c-Fos é um proto-oncogene codificada pelo gene Fos e atua como marcador da resposta imediata envolvida na proliferação e diferenciação celular após estímulos extracelulares. Algumas das propriedades do tecido nervoso incluem a capacidade de perceber mudanças externas, que podem

CCK. Sabe-se que essas duas populações neuronais também se projetam para o hipotálamo, especificamente para a subdivisão medial da região parvocelular (PaMP) do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN) (MANISCALCO; RINAMAN, 2013). Ou seja, a CCK exógena recruta neurônios A2 que inibem a ingestão alimentar via projeções locais no tronco encefálico, enquanto também recruta neurônios A2, além dos DBH, POMC, entre outros, que se projetam para núcleos do hipotálamo para induzir a ativação neuroendócrina. Desta forma, a ativação mediada por CCK dos neurônios do NTS promove anorexia reversível e atenua o impulso homeostático para se alimentar mesmo diante de um balanço energético negativo acentuado, promovendo alívio do desconforto do déficit de energia, mimetizando a fase pós-prandial (CAWTHON; DE LA SERRE, 2021; D'AGOSTINO *et al.*, 2016).

Além das ações gastrointestinais e de saciedade da CCK, já foi observado o aumento nas concentrações plasmáticas de CCK em ratos, camundongos e porcos submetidos a modelos experimentais de endotoxemia e inflamação intestinal (SAIA *et al.*, 2013; WEILAND *et al.*, 2005; YANG; GAAFAR; BOTTOMS, 1990). Neste sentido, Saia *et al.* (2020) mostraram que o tratamento prévio com CCK em dose única foi capaz de modular negativamente a resposta inflamatória da mucosa do cólon intestinal e manteve a integridade do epitélio intestinal frente ao estímulo inflamatório. Ainda, a CCK, via CCK-1R, inibiu a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), estimulada por insulto inflamatório em macrófagos peritoneais, ao modificar as vias de sinalização intracelular (SAIA *et al.*, 2014), sugerindo, então, um papel da CCK em processos imunorregulatórios, como serão abordados mais adiante neste trabalho.

## 2.2 REGULAÇÃO HIPOTALÂMICA

Em vertebrados, o SNC faz a mediação de uma ampla gama de respostas autonômicas, endócrinas e comportamentais que mantém a homeostase, e diversos estudos indicam que o hipotálamo, em particular, desempenha um importante papel na coordenação de tais respostas (SWANSON; SAWCHENKO,

---

modular a função celular por meio da regulação da expressão gênica, que, por sua vez, modificará o fenótipo da célula em questão. O primeiro conjunto de genes ativados por sinais externos são aqueles que não requerem síntese de proteína *de novo*, como o Fos. Assim, o c-Fos é atualmente usado como um marcador de atividade neuronal (HERRERA; ROBERTSON, 1996; KOVÁCS, 1998; VELAZQUEZ; CAPUTTO; BOUSSIN, 2015).

1983). O hipotálamo foi identificado pela primeira vez como uma região distinta do diencéfalo por His, em 1893. No início do século XX, Ranson e Hess demonstraram que lesões ou estímulos elétricos localizados em regiões específicas do hipotálamo tiveram repercussões importantes em comportamentos como ingestão alimentar e hídrica, comportamento reprodutivo, respostas termorreguladoras e outras (STERN, 2011)

O hipotálamo consiste em vários núcleos distintos, como o Núcleo Arqueado (ARC) e os Núcleos Paraventricular (PVN), Ventromedial (VMH) e Dorsomedial (DMH) do hipotálamo e Área Hipotalâmica Lateral (LHA) (Fig. 1). Esses núcleos possuem neurônios que expressam neuropeptídeos específicos que desempenham funções diferentes na manutenção homeostática (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011), podendo ser caracterizados como orexígenos ou anorexígenos ao estimularem ou inibirem o consumo alimentar, respectivamente (CHEE; COLMERS, 2008), como explorado a seguir.

### 2.2.1 Núcleo Arqueado do Hipotálamo

O ARC contém duas populações neuronais que estão fortemente envolvidas na regulação do balanço energético. Essas duas populações de neurônios expressam neuropeptídeos diferentes (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Um subconjunto de neurônios na subdivisão medial do ARC expressa os peptídeos orexígenos NPY e proteína relacionada ao Agouti (AgRP). Já o subconjunto de neurônios localizados no ARC lateral expressa os peptídeos anorexígenos conhecidos como melanocortina, que são codificados pelo gene pré-pró-hormônio proopiomelanocortina (POMC), e o transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART); esses neurônios são chamados de neurônios POMC (CHEE; COLMERS, 2008). Essas duas populações neuronais expressam receptores para sinalizadores periféricos, inclusive os receptores de leptina, insulina e grelina e se projetam amplamente pelo hipotálamo e outras regiões cerebrais (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Desta forma, as populações neuronais que contêm POMC/CART e NPY/AgRP no ARC são considerados neurônios de primeira ordem que iniciam e orquestram as respostas do organismo (BARSH; SCHWARTZ, 2002).

O NPY é o neurotransmissor mais abundante no cérebro. Suas concentrações hipotalâmicas aumentam durante o jejum e diminuem após a refeição

(MMI, 2017). O NPY integra uma ampla família de peptídeos que inclui o peptídeo YY e o polipeptídeo pancreático (PP), cujos efeitos são mediados por receptores nomeados de Y<sub>1</sub> a Y<sub>6</sub> (SUZUKI *et al.*, 2010) e acoplados à proteína Gi, cuja ativação diminui a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013). Os efeitos orexígenos do NPY são mediados pela estimulação dos receptores hipotalâmicos Y<sub>1</sub>R e Y<sub>5</sub>R, combinada com a inibição local de neurônios POMC e CART (MMI, 2017; SUZUKI *et al.*, 2010), induzida tanto por mecanismos pré-sinápticos quanto pós-sinápticos (SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013).

O hormônio estimulante dos alfa-melanócitos ( $\alpha$ -MSH) é um dos vários peptídeos derivados da POMC, assim nomeada porque também dá origem ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e  $\beta$ -endorfina (BARSH; SCHWARTZ, 2002). O  $\alpha$ -MSH e o ACTH, coletivamente conhecidos como melanocortinas, ativam a mesma família de receptores de melanocortina (MC-R) (BARSH; SCHWARTZ, 2002) acoplados à proteína Gs, cuja estimulação leva ao aumento na produção intracelular de AMPc (SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013). Dentre os cinco tipos de MC-R, dois são expressos no cérebro, o MC4-R e o MC3-R (MMI, 2017). A partir da ativação do complexo receptor-proteína G, as melanocortinas ativam neurônios do PVN, promovendo a diminuição do consumo alimentar, e do tronco encefálico, participando no aumento do gasto energético (SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013). Em concordância, Hwa *et al.* (2001) mostraram que a administração central de agonista de MC-R induziu a perda de peso corporal de animais Zucker obesos e seus controles ao estimular o gasto energético e promover a utilização de estoques lipídicos corporais, somados aos efeitos inibitórios sobre a ingestão alimentar.

Curiosamente, a ação do  $\alpha$ -MSH é antagonizada pelo AgRP, o qual foi identificado com base em sua similaridade de sequência com a proteína Agouti (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). A proteína Agouti é uma molécula de sinalização parácrina cujas ações são limitadas à pele, onde se liga ao MC1-R e afeta a pigmentação da pelagem (OLLMANN *et al.*, 1997). No modelo animal de camundongos que carregam uma mutação dominante no gene da cor da pelagem Agouti conhecido como Ay, ocorre a ubiquitinação da proteína Agouti, o que lhe permite sinalizar através do MC4-R (BARSH *et al.*, 1999). Contudo, sendo um agonista inverso<sup>2</sup> dos receptores de  $\alpha$ -MSH (MC4-R e MC3-R) (BARSH *et al.*, 1999; OLLMANN

---

<sup>2</sup> O agonista inverso é definido como um ligante com a capacidade de estabilizar a conformação inativa de um receptor (NIJENHUIS; OOSTEROM; ADAN, 2001).

*et al.*, 1997), o acoplamento da proteína Agouti diminui a concentração intracelular de AMPc. Desta forma, em decorrência da inibição da função dos MC1-R e MC4-R (BARSH; SCHWARTZ, 2002), os animais *Ay* apresentam alteração na cor da pelagem e obesidade severa (OLLMANN *et al.*, 1997), além de hiperinsulinemia e hiperglicemia (HUSZAR *et al.*, 1997). Esse modelo de mutação genética possibilitou outras descobertas relacionadas ao AgRP. Este também é um agonista inverso dos receptores de melanocortina (MC3-R e MC4-R) expresso no hipotálamo e, desta maneira, atua estimulando o consumo alimentar e o ganho de peso corporal (MMI, 2017). Além disso, a administração crônica de AgRP via icv diminuiu o gasto energético e a termogênese do tecido adiposo marrom (TAM) (SMALL *et al.*, 2003). Semelhante ao NPY, os valores de AgRP aumentam durante o jejum e são diminuídos pela ação da leptina (KORNER *et al.*, 2001; TAKAHASHI; CONE, 2005). Além de inibir os receptores de melanocortina, os neurônios AgRP também podem ativar os receptores de NPY, sendo, portanto, unicamente capazes de aumentar o consumo alimentar (BARSH; SCHWARTZ, 2002).

A maioria dos neurônios que expressam POMC, co-expressam RNAm de CART (MMI, 2017). O RNAm do CART foi identificado quando a administração de cocaína ou anfetamina induziu a expressão deste transcrito no SNC (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). A falta de conhecimento sobre os potenciais receptores CART dificulta a compreensão dos seus mecanismos de ação, mas sabe-se que vários núcleos hipotalâmicos (BORGES *et al.*, 2007; FARZI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2000) expressam esse neuropeptídeo. No ARC, a administração de CART desencadeia ações anorexigênicas e catabólicas. Curiosamente, na LHA, os efeitos foram orexigênicos, o que indica que a ação do CART é dependente de sua localização (FARZI *et al.*, 2018). Em concordância, camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica apresentaram diminuição na expressão de RNAm de CART no ARC, mas aumentada na LHA em comparação aos controles (YU *et al.*, 2008). De maneira semelhante, a anorexia causada por processo inflamatório foi associada ao aumento na expressão de RNAm de CART no ARC, ao passo que a da LHA estava diminuída (SERGEYEV; BROBERGER; HOKFELT, 2001). A privação alimentar também diminui a expressão de CART no ARC (KRISTENSEN *et al.*, 1998; MMI, 2017) e a administração icv de CART e de anticorpo de CART diminui (AJA *et al.*, 2001; MMI, 2017; ROHNER-JEANRENAUD *et al.*, 2002) e aumenta (KRISTENSEN *et al.*, 1998) o consumo alimentar de animais, respectivamente.

Ademais, a ativação de neurônios CART do ARC diminui significativamente o gasto energético, a locomoção e a temperatura corporal, além de exercer um efeito inibitório em neurônios orexigênicos deste núcleo (FARZI *et al.*, 2018).

Os neurônios NPY/AgRP e POMC do ARC formam um circuito local em que os primeiros enviam sinais inibitórios aos segundos e a regulação desses sinais inibitórios em neurônios POMC influencia a alimentação e a homeostase energética (SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013). Ainda, o estado energético, se alimentado ou em jejum, contribui com esses fluxos sinápticos dos neurônios POMC e NPY/AgRP. Especificamente, no estado alimentado, a leptina e a insulina inibem os neurônios NPY/AgRP do ARC. A leptina, via receptores Ob-Rb no ARC, aumenta a taxa de disparo de neurônios POMC, e ao mesmo tempo, hiperpolariza a membrana celular de neurônios NPY por meio da ativação de canal de potássio sensível à adenosina trifosfato (ATP) por via celular dependente de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Essa ativação inibe os neurônios NPY e, conseqüentemente, diminui a liberação local de NPY e/ou do neurotransmissor inibitório ácido gama-aminobutírico (GABA). A redução do tônus inibitório de NPY e GABA dos neurônios NPY do ARC, desinibe neurônios e vias da POMC, desta forma ativando e aumentando a frequência do potencial de ação desses neurônios (BARSH; SCHWARTZ, 2002; CHEE; COLMERS, 2008; SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013) A mesma população neuronal hiperpolarizada pela leptina também é hiperpolarizada pela insulina (BARSH; SCHWARTZ, 2002).

Por outro lado, o jejum provoca o aumento nos sinais excitatórios para os neurônios NPY/AgRP e, conseqüentemente, nos sinais inibitórios basais para os neurônios POMC. Convenientemente, os neurônios NPY/AgRP exibem um potencial de membrana em repouso mais despolarizado durante o jejum concomitante com o aumento na frequência do potencial de ação. Essa dinâmica está de acordo com a natureza orexígena e anorexígena nos neurônios NPY/AgRP e das melanocortinas, respectivamente (SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013), e permite que os neurônios do ARC ajam como o sensor neuronal primário para as alterações nas reservas de energia, usando informações de ambos os sinais humorais e aferências neuronais para fornecer uma medição integrada de déficits ou excessos de energia (BARSH; SCHWARTZ, 2002) para outras áreas hipotalâmicas envolvidas no controle da ingestão alimentar, incluindo o PVN, VMH e DMH (SUZUKI *et al.*, 2010)

## 2.2.2 Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

O PVN consiste em um núcleo de neurônios magnocelulares que se projetam para o lobo posterior da hipófise (neuro-hipófise), circundado por uma região parvocelular, cujas populações celulares distintas formam projeções que se destinam à eminência mediana, ou para o tronco encefálico e medula espinal. (SWANSON; KUYPERS, 1980; SWANSON; SAWCHENKO, 1980). Os neurônios neuroendócrinos parvocelulares estão localizados predominantemente nos subnúcleos anterior (PaAP) e medial (PaMP), e a maior parte dos neurônios pré-autonômicos do PVN se localizam nos subnúcleos ventromedial (PaV), posterior (PaPo) e dorsal (PaDC) do PVN (LI *et al.*, 2019; STERN, 2011; SWANSON; KUYPERS, 1980). Essa distribuição de neurônios possibilita a participação do PVN na coordenação das respostas neuroendócrinas e autonômicas envolvidas no balanço energético (LI *et al.*, 2019; SAWCHENKO, 1998). O PVN é inervado por fibras adrenérgicas e noradrenérgicas oriundas do tronco encefálico e do complexo vagal dorsal (SWANSON; SAWCHENKO, 1980) e seu entorno imediato é uma área densamente povoada por interneurônios GABAérgicos (HERMAN *et al.*, 2002).

O PVN contém várias populações neuronais que secretam mediadores anorexígenos, como o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) e a ocitocina, que atuam diminuindo a ingestão alimentar e/ou aumentando a taxa metabólica basal (MMI, 2017). O CRH é mais conhecido por seu papel no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e na resposta ao estresse, mas ele também está envolvido na regulação do balanço energético (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). No cérebro, o CRH exerce suas ações via dois receptores, o tipo 1 (CRH1-R) e o tipo 2 alfa (CRH2 $\alpha$ -R), e, juntamente com a urocortina, forma uma rede de vias neuronais capaz de interagir com outros circuitos que controlam a ingestão alimentar (MMI, 2017). Já foi demonstrado que a expressão de CRH no PVN está diminuída em quadros de privação alimentar e aumentada por estímulo da leptina,  $\alpha$ -MSH e CART (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

O TRH é conhecido por seu papel no eixo hipotálamo-hipófise-tiroide, no qual estimula a secreção de hormônio tireoestimulante (TSH) pela hipófise. Pela estimulação na tiroide e secreção de hormônio tireoidiano, o TRH atua na diminuição do consumo alimentar e no aumento da temperatura corporal (CHOI *et al.*, 2002). Além

disso, os neurônios TRH não hipofisiotrópicos da subdivisão parvocelular do PVN são densamente inervados por terminações provenientes do ARC (FEKETE; LECHAN, 2014). Segundo Fekete *et al.* (2000), há numerosas varicosidades axonais imunorreativas ao AgRP e NPY que formam uma comunicação justaposta com praticamente todos os neurônios TRH do PVN e estabelecem uma associação sináptica simétrica com essas células, indicando uma função inibitória (FEKETE *et al.*, 2000). Os neurônios anorexigênicos do ARC também inervam os neurônios TRH do PVN, porém eles estabelecem menos sinapse do que o observado para os neurônios AgRP e NPY (FEKETE; LECHAN, 2014). Por meio dessa comunicação, a expressão de TRH é modulada para baixo em resposta ao jejum, NPY e AgRP, e para cima mediante estímulo da leptina,  $\alpha$ -MSH e CART (FEKETE *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2000; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

A ocitocina também participa na regulação do comportamento alimentar, diminuindo o consumo de alimentos em animais e humanos, aumentando o gasto energético e diminuindo a glicemia. De acordo com Herisson *et al.* (2016), em roedores, a ocitocina liberada pelo PVN age via receptor de ocitocina no núcleo acumbens provocando a diminuição da ingestão alimentar impulsionada pela fome e pelo sistema de recompensa (MMI, 2017).

Como mencionado, os neurônios do PVN expressam receptores para os neurotransmissores do ARC, formando a comunicação entre os dois núcleos (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). O NPY inibe diretamente a atividade de neurônios que expressam o MC4-R no PVN (SOHN; ELMQUIST; WILLIAMS, 2013) e também modula a atividade neuronal do PVN indiretamente ao inibir interneurônios GABAérgicos que fazem sinapse com um grupo de neurônios parvocelulares do PVN (BOUDABA; SZABÓ; TASKER, 1996; LI *et al.*, 2005), com um perfil de resposta muito semelhante ao da estimulação do apetite (PRONCHUK; BECK-SICKINGER; COLMERS, 2002). Em concordância, Davidowa, Li e Plagemann (2002a) observaram que a administração de NPY *in vitro* no PVN de animais controle estimulou os neurônios da subdivisão PaMP do PVN. Curiosamente, essa sinalização do NPY estava reduzida no PaMP de animais com obesidade induzida geneticamente (PRONCHUK; COLMERS, 2004) ou por superalimentação precoce, em comparação aos seus controles (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002a), em virtude de uma regulação para baixo de receptores NPY ou de uma diminuição no acoplamento entre receptor e efetor. Isso leva à diminuição da eficácia da transmissão sináptica do NPY

em animais obesos que é consistente com a redução de sua ação orexigênica no PVN desses animais (CHEE; COLMERS, 2008). Em contraste aos efeitos do NPY, as melanocortinas potencializam o sinal GABAérgico no PaMP em cortes cerebrais de animais controle (PRONCHUK; BECK-SICKINGER; COLMERS, 2002). Ainda, a administração de CART intra-PVN em ratos diminuiu a ingestão alimentar induzida pelo NPY e aumentou a expressão do gene de proteínas desacopladoras UCP em tecidos periféricos (WANG *et al.*, 2000).

Em resposta a todos esses sinais aferentes que transportam informações sobre o estado do ambiente interno, o PVN é capaz de gerar respostas neuroendócrinas e autonômicas. As projeções eferentes do PVN incluem axônios que se projetam para a neuro-hipófise, que secretam os neuro-hormônios ocitocina e vasopressina; axônios que se projetam para a eminência mediana, onde secretam uma variedade de hormônios hipofisotróficos que participam no controle dos eixos hipotalâmicos-hipofisários (STERN, 2011); e projeções longas e descendentes para estruturas relacionadas ao sistema autônomo no tronco cerebral e na medula espinhal, incluindo neurônios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos (SWANSON; SAWCHENKO, 1983). Essas projeções desempenham um papel no aumento do gasto energético mediado pela leptina por meio da estimulação da termogênese pelo TAM (SAWCHENKO, 1998).

### 2.2.3 Núcleo Ventromedial do Hipotálamo

O VMH é um núcleo hipotalâmico localizado diretamente acima do ARC (SUN *et al.*, 2021) e participa na regulação de vários aspectos fisiológicos e comportamentais (KHODAI; LUCKMAN, 2021), incluindo a regulação energética via modulação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) simpático (LINDBERG; CHEN; LI, 2013; SUN *et al.*, 2021). Sua ativação está relacionada à diminuição do consumo alimentar e a ativação contínua pode exercer um tônus anorexigênico (CHEE; COLMERS, 2008). Deveras, os primeiros estudos com lesões eletrolíticas específicas no VMH em roedores mostraram rápido desenvolvimento da obesidade, devido ao aumento da ingestão alimentar e redução do fluxo simpático (KHODAI; LUCKMAN, 2021).

O VMH é formado por uma grande variedade de tipos celulares diferenciados pelos seus marcadores, como o peptídeo ativador de adenilato-ciclase

(PACAP), óxido nítrico sintase 1 (NOS1), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), receptor de estrogênio alfa ( $ER\alpha$ ) e de leptina (Ob-R), e o fator esteroideogênico 1 (SF1) (KHODAI; LUCKMAN, 2021). Este último é considerado um marcador exclusivo para o VMH, crucial para o desenvolvimento das glândulas adrenais, gonadais, hipofisária e do próprio VMH. Neste sentido, modelos animais *knockout* de SF1 apresentaram anormalidades estruturais e funcionais dos neurônios VMH e exibiram obesidade relativamente grave em consequência da diminuição do gasto energético (MAJDIC *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado também que os neurônios SF1 do VMH são importantes para fazer a mediação dos efeitos anti-obesogênicos da leptina (DHILLON *et al.*, 2006), por meio da despolarização e do aumento da taxa de disparo dos neurônios SF1 do VMH (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000; DHILLON *et al.*, 2006). Desta forma, a perda da sinalização da leptina em neurônios SF1 resulta em aumento da adiposidade (DHILLON *et al.*, 2006), a qual é exacerbada frente à dieta hiperlipídica. Segundo Dhillon *et al.* (2006), durante a alimentação com alto teor de lipídeos, o aumento nas concentrações de leptina agiria em *feedback* negativo nos neurônios SF1, suprimindo o apetite e estimulando a termogênese induzida pela dieta para aumentar o gasto de energia, restringindo assim o ganho de peso. Curiosamente, no modelo de deleção de leptina em neurônios SF1, os animais deixam de apresentar essas respostas compensatórias à dieta hiperlipídica.

A termogênese induzida pela dieta é resultado da ativação simpática no TAM e o VMH foi o primeiro núcleo hipotalâmico identificado na regulação desse processo (PERKINS *et al.*, 1981). A função moduladora do VMH no SNA se deve em parte por projeções neuronais de neurônios SF1 para outros centros autonômicos cerebrais, como o ARC e o PVN, e o NTS no tronco encefálico (LINDBERG; CHEN; LI, 2013). Essas projeções permitem, então, que o VMH module diretamente a atividade e o fluxo simpático (LINDBERG; CHEN; LI, 2013). Além disso, o hormônio tireoidiano influencia vários aspectos do metabolismo energético via VMH, como a indução da lipogênese (via SNA parassimpático) e da termogênese do TAM (via SNA simpático) e o *knockout* de receptor tireoidiano no VMH induz a hiperfagia e diminui o gasto energético ao reduzir a atividade locomotora (HAMEED *et al.*, 2017).

Os neurônios BDNF também são altamente expressos no VMH. Foi demonstrado que a infusão central de BDNF diminui o consumo alimentar em ratos (MMI, 2017). Além disso, acredita-se que neurônios POMC do ARC ativam neurônios

BDNF do VMH para diminuir o consumo alimentar (MMI, 2017), ao passo que, a ativação de receptores  $Y_1$  (altamente expresso no VMH) inibe a atividade dos neurônios do VMH (CHEE; COLMERS, 2008). De fato, em animais controle, a estimulação para o comportamento alimentar é parcialmente atribuída às ações inibitórias do NPY no VMH e, curiosamente, esta sinalização está exacerbada em animais obesos (HEIDEL; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 1999).

#### 2.2.4 Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo

O DMH é um núcleo cujo papel na regulação do apetite também já está bem estabelecido, sendo considerado um núcleo orexigênico (OTGON-UUL *et al.*, 2016). Lesões eletrolíticas precisas no DMH resultam em hipofagia, hipodipsia e diminuição do peso corporal (BELLINGER; BERNARDIS, 2002; BERNARDIS, 1970). O DMH expressa vários neurotransmissores e proteínas sinalizadoras que participam da regulação da alimentação, incluindo neurônios GABAérgicos sensíveis à leptina, BDNF, NPY, CART, peptídeo liberador de prolactina (PrRP), e vários receptores para sinalizadores de curto e longo prazo da regulação alimentar, como o Ob-R, MC3-R e MC4-R,  $Y_1$  e  $Y_5$ , CCK-R, entre outros (OTGON-UUL *et al.*, 2016).

Estudos demonstraram que o jejum noturno aumentou a excitabilidade de neurônios colinérgicos do DMH, o que condiz com o fato de que esses neurônios têm a habilidade de responder à disponibilidade de nutrientes (GROESSL *et al.*, 2013). Esses neurônios colinérgicos do DMH inervam neurônios POMC do ARC e, via receptores muscarínicos em terminais GABAérgicos, controlam o tônus inibitório dos neurônios POMC (JEONG; LEE; JO, 2017). Desta forma, a ativação de neurônios colinérgicos do DMH mediada pelo jejum noturno promove o consumo alimentar (JEONG; LEE; JO, 2017) ao diminuir o tônus inibitório GABAérgico, evidenciando que circuitos colinérgicos, e a ativação de componentes mediados por seus receptores, desempenham importantes funções na regulação do comportamento alimentar (GROESSL *et al.*, 2013). Além disso, os neurônios GABAérgicos do DMH são hiperpolarizados pela leptina e despolarizados pela hipoglicemia, e a ativação optogenética dos terminais axonais desses neurônios induz a transmissão pós-sináptica inibitória para o PVN, promovendo a ingestão de alimentos (OTGON-UUL *et al.*, 2016).

Os neurônios adrenérgicos do NTS ativados pela CCK também agem no DMH, o que sugere que a CCK pode exercer sua ação anorexigênica em parte mediante a ativação da via NTS-DMH-noradrenérgica (KOBELT *et al.*, 2006). De acordo com Rust e Crosby (2021), a administração de CCK intra-DMH inibe a ação dos neurônios orexígenos desse núcleo, induzindo a diminuição do apetite por uma via que requer a ativação do receptor CCK-2R e subsequente síntese de óxido nítrico. Este, por sua vez, age de maneira retrógrada para aumentar a liberação de GABA dos terminais axonais dos neurônios GABAérgicos do DMH. Essa via poderia, portanto, inibir neurônios orexigênicos do DMH (RUST; CROSBY, 2021).

Com base no levantamento teórico feito até aqui, percebe-se que o hipotálamo desempenha um papel fundamental no processo de controle da ingestão alimentar e gasto de energia, atuando como sensor, integrador e mediador de sinais hormonais, neurais e nutricionais. Sob condições fisiológicas, o funcionamento adequado de todos os componentes desse complexo sistema garante a estabilidade da massa corporal e, portanto, condições físicas ideais para sobreviver (ENGEL; VELLOSO, 2022). No entanto, em situações patológicas e/ou de alterações nutricionais, o hipotálamo sofre alterações funcionais e até estruturais que afetam as conexões neurais e, conseqüentemente, a homeostase energética sistêmica, como explorado nas sessões seguintes.

### 2.3 RESPOSTA IMUNOLÓGICA

O sistema imunológico, também chamado de sistema imune, é tradicionalmente dividido em inato e adaptativo, cada qual desempenhando funções e papéis diferentes na defesa do organismo contra agentes externos, como vírus e bactérias (ZUANY-AMORIM; HASTEWELL; WALKER, 2002). O sistema imune inato detecta a presença e a natureza de um patógeno, providencia a primeira linha de defesa e controla o início e a determinação da classe efetora da resposta imune adaptativa (MEDZHITOV, 2001). A resposta imune adaptativa, por sua vez, depende da geração de um repertório aleatório e altamente diversificado de receptores – os receptores de células T e B – seguido de seleção clonal e expansão de receptores com especificidades relevantes. Esse mecanismo é responsável pela geração da memória imunológica, que fornece uma capacidade adaptativa importante para os animais vertebrados (MEDZHITOV, 2001).

O sistema imune inato possui uma série de receptores, conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos específicos. Esses receptores são expressos na membrana extracelular, em compartimentos intracelulares ou secretados na corrente sanguínea e fluidos teciduais, o que permite que o sistema inato distinga moléculas próprias de estruturas não próprias associadas a patógenos e inicie a resposta de defesa do hospedeiro (MEDZHITOV, 2001; ZUANY-AMORIM; HASTEWELL; WALKER, 2002). Um avanço importante para a compreensão dos eventos iniciais no reconhecimento microbiano e subsequente desenvolvimento de respostas imunes foi a identificação de receptores Toll-like (TLR) como RRP-chave do sistema imune inato (ZUANY-AMORIM; HASTEWELL; WALKER, 2002).

A família de receptores TLR tem um papel vital no reconhecimento microbiano, participando na indução de genes antimicrobianos e no controle das respostas imunes adaptativas (MEDZHITOV, 2001). Em mamíferos, a família dos receptores TLR consiste em 13 membros (CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021), e cada um parece ter uma função distinta no reconhecimento imune inato (MEDZHITOV, 2001). Eles podem ser divididos em dois grupos de acordo com a localização subcelular. O primeiro grupo (TLR 1, 2, 4, 5 e 6) está presente na membrana plasmática, de modo que os receptores contêm domínios intracelular, devido à presença de proteínas do tipo TIR (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM) e extracelular (repetições ricas em leucina - LRR), enquanto que os receptores do segundo grupo (TLR 3, 7-13) estão localizados intracelularmente, nos endossomos, e não possuem domínio extracelular (FITZGERALD; KAGAN, 2020; KAGAN; MEDZHITOV, 2006). O TLR4 é o receptor mais bem caracterizado da família de TLR e em associação com o fator de diferenciação mieloide 2 (MD-2) é o responsável pelo reconhecimento fisiológico do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de bactérias gram-negativas (PARK *et al.*, 2009). A subsequente interação do domínio TIR de TLR4 e MyD88 desencadeia uma cascata de sinalização que leva à ativação da via do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), que então ativa a transcrição de muitos genes pró-inflamatórios que codificam moléculas pró-inflamatórias, incluindo citocinas, quimiocinas e outros efetores da resposta imune inata (SHI *et al.*, 2006), descritos a seguir.

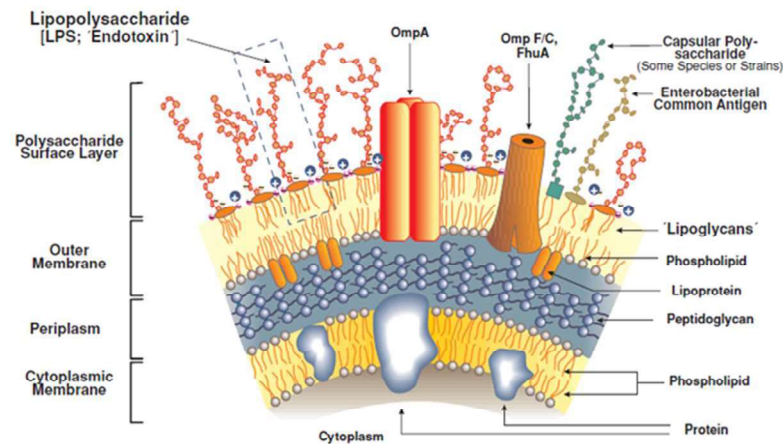
### 2.3.1 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) é um glicolípido localizado na superfície externa da membrana de várias bactérias Gram-negativas (Fig. 2A). O LPS consiste predominantemente em um composto lipofílico, o lipídeo A, ligado covalentemente a uma região hidrofílica polissacarídica ou oligossacarídica. O lipídeo A representa o padrão molecular conservado do LPS e é o principal indutor de respostas imunológicas ao LPS, determinando a endotoxicidade em espécies de mamíferos (ALEXANDER; RIETSCHER, 2001; PARK *et al.*, 2009).

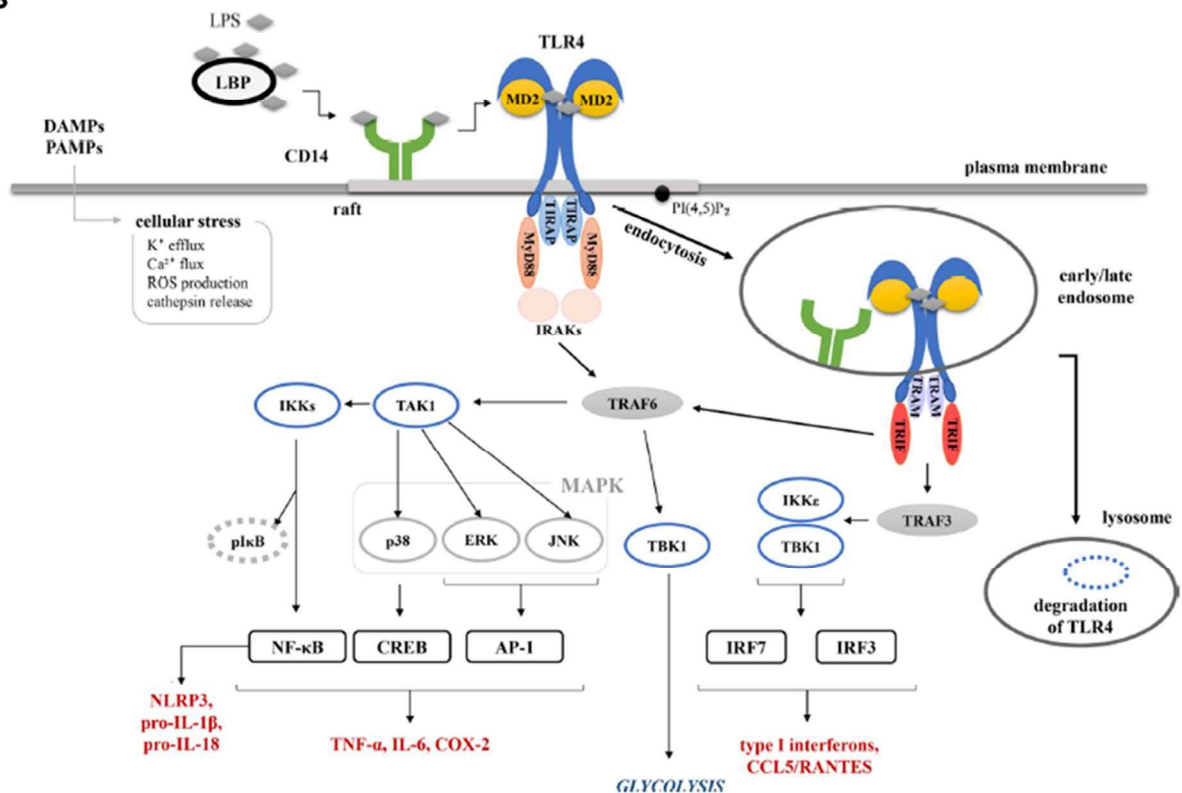
Nos últimos anos, preparações altamente purificadas de LPS de um grande número de espécies de bactérias Gram-negativas foram caracterizadas quimicamente, fisicamente e biologicamente. Dentro do escopo desses estudos, o LPS se mostrou uma das classes mais poderosas de imuno-estimuladores (ALEXANDER; RIETSCHER, 2001). Neste contexto, injeções periféricas de LPS são conhecidas por desencadear várias das respostas de fase aguda observadas nas infecções, porém sem causar infecção ao hospedeiro. Ou seja, o LPS é reconhecido pelo sistema imune como um patógeno e é capaz de mimetizar quadros de inflamação (BURRELL, 1994).

**Figura 2 – Arquitetura da parede celular de bactérias Gram-negativas e as vias de sinalização pró-inflamatórias do TLR4.**

**A**



**B**



(A) O lipopolissacarídeo (LPS) é um glicolípido localizado na superfície externa da membrana de várias bactérias Gram-negativas. A parede celular das bactérias Gram-negativas é caracterizada basicamente pela presença de duas bicamadas lipídicas, a externa e a interna, que são separadas pelo espaço periplasmático contendo a rede tridimensional de peptidoglicano. (B) O reconhecimento do LPS pelo receptor toll like (TLR4) é mediado pela proteína ligante de LPS, o LBP. O TLR4 ativa a via de sinalização do MyD88 na membrana plasmática e, após endocitose dependente de CD14, inicia a cascata dependente de TRIF. Mais detalhes no texto.

Fonte: (A) ALEXANDER; RIETSCHEL, 2001; (B) CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021.

O reconhecimento do LPS é mediado pela proteína ligante de LPS (LBP – do inglês, *Lipopolysaccharide binding protein*) (CRUZ-MACHADO, 2010) no sangue ou no fluido extracelular (Fig. 2B), e esse complexo serve para facilitar a distribuição do LPS à superfície da célula respondedora. Além do LBP, o TLR4 se liga ao LPS com a ajuda das proteínas CD-14 (do inglês, *cluster of differentiation 14*) e MD-2, que está associada de maneira estável ao fragmento extracelular do receptor (CIESIELSKA; MATYJEK; KWIATKOWSKA, 2021). O CD14 é um receptor de alta afinidade ao LPS expresso na maioria das células (exceto nas células endoteliais), na forma de uma proteína solúvel ou como uma proteína de membrana ancorada ao glicofosfatidilinositol (GPI) (ABBAS, 2019; MEDZHITOV, 2001). A transferência do LPS para o CD14 aumenta a sensibilidade do TLR4/MD-2 ao LPS nas células imunes inatas, incluindo macrófagos e monócitos (TSUKAMOTO *et al.*, 2018). Após a ligação do LPS via MD-2, o TLR4 induz a sinalização dependente do fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) da superfície celular. A MyD88 recruta as quinases associadas ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1 e IRAK-4) para ativar o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6). Este ativa o fator de crescimento  $\beta$  associado à quinase 1 (TAK1), que, por sua vez, promove a ativação do complexo I $\kappa$ B (I-kapa B quinase) formado por duas subunidades catalíticas (I $\kappa$ B $\alpha$  e I $\kappa$ B $\beta$ ) (FERRAZ *et al.*, 2011). Este complexo promove a fosforilação do I $\kappa$ B (conhecida ainda como NFKBIA) e sua degradação resulta na ativação do NF- $\kappa$ B, que será translocado ao núcleo para induzir a expressão das citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1 e IL-6), enzimas como a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), Ciclo-oxigenase-2 (COX-2), receptores como os de bradicinina, entre outros (Fig. 2B) (CRUZ-MACHADO, 2010; FERRAZ *et al.*, 2011). Além dessa via, a estimulação do LPS em células CD14 positivas induz a internalização do TLR4 em endossomos, onde ele se dissocia do MyD88 e inicia a segunda via de sinalização mediada pela proteína TRIF (do inglês, *TIR domain-containing adapter inducing interferon-beta*) (TSUKAMOTO *et al.*, 2018; ZANONI *et al.*, 2011). A TRIF faz a mediação da ativação do fator regulador de interferon 3 (IRF-3), que por sua vez, é translocado para o interior do núcleo e induz a expressão de genes para a produção de interferons do tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ; Fig. 2B) (FERRAZ *et al.*, 2011; ZANONI *et al.*, 2011). Os INF produzidos induzem a maturação das células dendríticas, aumentam a atividade humoral dos linfócitos B, induzem a diferenciação dos linfócitos T CD8+, inibem a replicação viral e evitam a disseminação do processo infeccioso, a partir do

recrutamento de linfócitos e monócitos (FERRAZ *et al.*, 2011). O TLR4 é o único receptor que ativa vias de sinalização dependentes de MyD88 e/ou TRIF, o que lhe permite promover uma sinalização variada para outras células do organismo e garantir o controle da resposta frente ao LPS (CRUZ-MACHADO, 2010).

A produção e liberação de citocinas mediada pelo LPS pode ocorrer tanto pelas células imune da periferia quanto diretamente por neurônios e células da glia no SNC. Quando produzidas pelas células da periferia, as citocinas também podem agir no cérebro por vias neurais e humorais (ALEXANDER; RIETSCHER, 2001). A via neuronal envolve primariamente o nervo vago e o complexo dorso-vagal (CDV). De acordo com Konsman, Parnet e Dantzer (2002), células imunes da bainha perineural do nervo vago são capazes de produzir IL-1 em resposta ao LPS e, além disso, neurônios sensoriais do nervo vago expressam receptores de IL-1, que, quando ativados aumentam a atividade sensorial deste nervo. A via humoral, por outro lado, envolve as citocinas circulantes na corrente sanguínea que podem (a) se ligar aos seus receptores específicos na membrana das células endoteliais; (b) alcançar o SNC via órgãos circunventriculares ou; (c) alcançar o SNC diretamente em virtude do aumento da permeabilidade da BHE induzida pelo próprio quadro inflamatório. Além disso, pode haver também a ocorrência de infiltrado de células imunológicas no SNC e ativação da micróglia no parênquima cerebral (LE THUC *et al.*, 2017). O LPS também pode agir diretamente no SNC promovendo a regulação da expressão gênica (CRUZ-MACHADO, 2010). Já foi demonstrado que os órgãos circunventriculares expressam os receptores TLR4 e CD14 (LAFLAMME; RIVEST, 2001), sendo eles necessários para o que LPS desencadeie os eventos de transdução de sinal pró-inflamatório nessas regiões alcançadas pela circulação sistêmica, enquanto a ativação microglial subsequente no parênquima cerebral é dependente de TNF (LAFLAMME; RIVEST, 2001). Em concordância, foi demonstrado que a administração periférica de LPS induziu a expressão de RNAm de IL-1, IL-6, TNF e NF- $\kappa$ B no hipotálamo de ratos (JANG *et al.*, 2010) e camundongos (LAYÉ *et al.*, 2000).

A ativação direta ou indireta do SNC via LPS ou citocinas, respectivamente, recruta neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados ao controle da homeostase energética (BORGES *et al.*, 2007; RORATO *et al.*, 2009). Neste contexto, sabe-se que a redução do apetite ou a anorexia é um sintoma comum em um grande número de doenças crônicas transmissíveis e não transmissíveis (LIU *et al.*, 2016). Essa anorexia faz parte de um mecanismo de defesa clássico do organismo contra

processos inflamatórios e infecciosos, conhecido como comportamento doentio (“*sickness behaviour*”). O comportamento doentio engloba várias mudanças comportamentais, que afetam principalmente o humor e o balanço energético, que se desenvolvem em paralelo à infecção ou outra patologia (LE THUC *et al.*, 2017). Estas alterações são consideradas respostas adaptativas do organismo, visando combater a infecção e propiciando, desta forma, um ambiente apropriado ao estabelecimento de uma resposta imune eficaz e desfavorável ao patógeno. Tal como outras estratégias adotadas pelo organismo para promover a reocupação do bem estar geral, a anorexia deve ser temporária e benéfica (LE THUC *et al.*, 2017).

Em concordância, estudos com roedores mostraram que a administração exógena de LPS diminuiu o consumo alimentar e aumentou a expressão de CART no PVN e de TNF- $\alpha$  (BORGES *et al.*, 2007), bem como de POMC, mediada por prostaglandina, no ARC durante a endotoxemia moderada (RORATO *et al.*, 2009). Além disso, Jang *et al.* (2010) mostraram que a ativação de NF- $\kappa$ B hipotalâmico induzida pelo LPS também aumentou a produção de citocinas anorexigênicas e de POMC no hipotálamo. Em particular, a ativação de NF- $\kappa$ B em neurônios POMC hipotalâmicos é um mecanismo molecular importante para a resposta anorexigênica, considerando-se que a inibição específica de NF- $\kappa$ B nesses neurônios reduziu significativamente a anorexia induzida pelo LPS. Neste sentido, foi demonstrado que o sistema de melanocortina é um possível alvo do NF- $\kappa$ B e, via MCR-4, é um potencial mediador da anorexia induzida pelo LPS. Utilizando a metodologia de eletrofisiologia com *patch-clamp* e imuno-histoquímica, Reis *et al.* (2015) observaram que a exposição aguda ao LPS evocou respostas excitatórias em neurônios POMC e respostas inibitórias nos neurônios AgRP/NPY do ARC em ratos e camundongos. Curiosamente, os resultados desse grupo sugeriram, ainda, que a anorexia induzida pela leptina também depende da via NF- $\kappa$ B no sistema de melanocortina hipotalâmico.

Neste contexto, sabe-se que a leptina participa da resposta anorexigênica durante a endotoxemia induzida pelo LPS (BORGES *et al.*, 2011; SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004). E estudos com animais com obesidade induzida por dieta hiperlipídica e resistentes à leptina não apresentaram a resposta anorexigênica induzida pelo LPS e tal efeito foi associado à alteração nas vias de sinalização hipotalâmicas (BORGES *et al.*, 2014). Por outro lado, no contexto nutricional oposto, foi reportado que a desnutrição altera o desenvolvimento do

sistema imunológico (CHANDRA, 2002), aumentando o risco de sepse e da atividade do sistema imune em roedores (IWASA *et al.*, 2015). Essas alterações tornam os indivíduos com deficiências nutricionais susceptíveis à hospitalização e infecções oportunistas (CHANDRA, 2002) e a perda de apetite, consecutiva a esses quadros, pode ter consequências graves, pois pode prejudicar a recuperação ao induzir um déficit de energia (LE THUC *et al.*, 2017).

Com base nesses estudos, percebe-se que a toxicidade do LPS pode ser diretamente dependente de fatores dietéticos. Segundo Candelli *et al.* (2021), alguns alimentos podem conter altos valores de LPS ou podem, ainda, induzir o aumento na produção de LPS. Deveras, já foi demonstrado que a dieta hiperlipídica é capaz de alterar a composição da microbiota intestinal e aumentar a produção de LPS (HE, 2021). Enquanto em condições normais o LPS não atravessa a barreira intestinal, já foi observado que ele pode atingir a corrente sanguínea em condições de permeabilidade intestinal alterada. Aliás, a própria presença de bactérias que produzem LPS no intestino já altera a permeabilidade, resultando em um ciclo vicioso de inflamação autopromovida (CANDELLI *et al.*, 2021; HE, 2021). Curiosamente, Saia *et al.* (2020) demonstraram que a CCK foi capaz de modular a resposta inflamatória da mucosa intestinal e preveniu a disfunção na barreira epitelial do intestino induzida pelo LPS. Além disso, a CCK inibiu a expressão de iNOS em macrófagos peritoneais (SAIA *et al.*, 2014), bem como a síntese e expressão de IL-1 $\beta$  e a expressão de CD-14 na membrana de macrófagos intersticiais pulmonares induzidas pelo LPS (LI *et al.*, 2002, 2007). De acordo com Saia *et al.* (2014) e Rorato *et al.* (2011), o papel imunorregulatório da CCK ocorre pela ativação de CCK-1R, o qual estava regulado para cima em macrófagos peritoneais e com a expressão de mRNA aumentada em neurônios do NTS e PVN após a administração de LPS. A ativação de neurônios do NTS mediada pela CCK parece ter participação importante na diminuição do consumo alimentar durante a endotoxemia induzida pelo LPS (RORATO *et al.*, 2011).

#### 2.4 MODELO EXPERIMENTAL: MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA EM ROEDORES

Condições de desenvolvimento desfavoráveis durante o período pré-natal e no início na vida podem influenciar (programar) o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta (PLAGEMANN *et al.*, 2012). O termo “programar” tem sido utilizado para descrever o processo pelo qual a exposição

a estímulos ou insultos ambientais específicos no início da vida pode desencadear adaptações que resultam em mudanças permanentes na fisiologia do organismo (SOOKOIAN *et al.*, 2013). Um mecanismo pelo qual a programação acontece e influencia o metabolismo e o sistema imunológico de um indivíduo é por meio de alterações no epigenoma (SPENCER, 2013a), visto que este é exclusivamente sensível ao seu ambiente e, desta forma, afetado por sinais ambientais específicos (AGARWAL *et al.*, 2018). Neste contexto, a epigenética tem ganhado destaque nos últimos anos ao estudar as modificações estáveis e hereditárias induzidas pelo ambiente na expressão gênica, sem alterar a sequência do DNA. Existem duas modificações epigenéticas principais: a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais das proteínas histonas, que incluem metilação, sumoilação, fosforilação e acetilação. As modificações epigenéticas do DNA e das histonas afetam a transcrição do gene, aumentando ou diminuindo o acesso ao DNA pela maquinaria transcricional, regulando, assim, o grau de expressão de um determinado gene e o tempo de sua expressão. Essas modificações epigenéticas podem ser passadas por meiose e mitose para células-filhas, apoiando a hipótese de que os mecanismos epigenéticos atuam como sensores ambientais para adaptações de longo prazo e potencialmente hereditárias (AGARWAL *et al.*, 2018; SPENCER, 2013a). Neste contexto, Hardikar *et al.* (2015) mostraram que a desnutrição em 50 gerações animais resultou em diminuição do peso corporal, aumento da adiposidade, peso de órgãos viscerais e musculatura reduzidos e aumento na susceptibilidade de desenvolver Diabetes Mellitus ao longo das gerações, o que estava relacionado a alterações epigenéticas no gene promotor de insulina-2.

Percebe-se, portanto, que as respostas epigenéticas que ocorrem durante as janelas críticas de desenvolvimento do organismo, que pode ser diferente para diferentes órgãos e tecidos, alteram a expressão gênica e resultam no desenvolvimento diferencial de tecidos e órgãos. O impacto dessas pistas ambientais em epigenomas em tecidos metabólicos condicionam sua funcionalidade vitalícia, que podem proteger o organismo ou predispor organismo ao desenvolvimento de doenças crônicas (AGARWAL *et al.*, 2018). Ou seja, em um primeiro momento, essas adaptações são fundamentais, pois garantem a vantagem da sobrevivência imediata (GLUCKMAN; HANSON, 2004); contudo, seu valor adaptativo só é percebido mais tarde na vida, visto que os sinais que levam à adaptação são considerados preditores do ambiente de desenvolvimento (PLAGEMANN *et al.*, 2012). Portanto, se as

previsões estiverem corretas, o organismo em desenvolvimento irá adotar um fenótipo (dentro do limite da carga genética) que melhor se adequa ao esperado pelo ambiente (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011); caso contrário, as adaptações podem levar ao desencadeamento de doenças como resultado de compensações biológicas (GLUCKMAN; HANSON, 2004; PLAGEMANN *et al.*, 2012).

Para programar um sistema ou uma função, o estímulo ambiental deve ocorrer durante um período de desenvolvimento em que tal sistema ou função ainda seja plástico (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Interessantemente, Agarwal *et al.* (2018) relatam que alguns dos mecanismos para a plasticidade do desenvolvimento são justamente de natureza epigenética, e as consequências associadas à doença estão relacionadas à interrupção dos processos epigenéticos no ambiente. Em roedores, o hipotálamo é funcional e estruturalmente imaturo ao nascimento (BOURET, 2012; LESAGE *et al.*, 2006). A anatomia básica do hipotálamo dos ratos é estabelecida no período pré-natal, e os núcleos hipotalâmicos já expressam seus neuropeptídeos nesse período (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Contudo, a maioria das conexões entre o hipotálamo e sistemas aferentes e eferentes, e aquelas entre os núcleos hipotalâmicos, como é o caso da circuitaria hipotalâmica proveniente do ARC para o PVN (REMMERS *et al.*, 2008b), se desenvolvem apenas no decorrer de três semanas durante o período pós-natal e de lactação (BOURET, 2012; LESAGE *et al.*, 2006; REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Neste contexto, Melnick *et al.* (2007) mostraram detalhadamente que durante as primeiras semanas de desenvolvimento pós-natal, os neurônios neuroendócrinos e pré-autonômicos do PVN apresentam sensibilidade precoce ao NPY proveniente do ARC, o que sugere que a ação desse neurotransmissor é essencial em animais jovens para criar o impulso orexígeno necessário para sustentar o crescimento e o desenvolvimento. Interessantemente, conforme o animal amadurece, os neurônios pré-autonômicos, mas não os neuroendócrinos, diminuem sua sensibilidade ao NPY. Em contraste, a resposta dos neurônios neuroendócrinos, mas não a dos pré-autonômicos, à  $\alpha$ -MSH aumenta, o que pode ser necessário para a transição da sucção para o comportamento alimentar independente.

Percebe-se, então, que ao alterar a sensibilidade desse sistema neste período crítico de desenvolvimento, em que há gênese, migração e diferenciação celular (OLIVEIRA *et al.*, 2011), pode-se alterar a fisiologia e o metabolismo de um organismo (SOOKOIAN *et al.*, 2013), o que torna este período uma janela de

oportunidade para insultos ou intervenções. Embasado nisso, o estudo da programação metabólica em relação aos processos de doença avançou nos últimos anos com o desenvolvimento de modelos animais que utilizaram tanto a supernutrição, ou superalimentação, quanto a subnutrição, ou subalimentação, nos períodos pré e pós-natal (LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010). Esses estudos apoiam a hipótese da programação nutricional e fornecem ferramentas para examinar os mecanismos epigenéticos pelos quais a programação pode ocorrer, além de demonstrar a plausibilidade biológica das associações observadas em populações humanas, fornecendo evidências para o conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD, do inglês *Developmental Origins of Health and Disease*) (LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010).

A nutrição afeta vários, se não todos, processos fisiológicos de um organismo, incluindo os que regulam o desenvolvimento e a função do sistema imunológico (COLLINS; BELKAID, 2022). A importância dos aspectos nutricionais no começo da vida foi inicialmente demonstrada pela manipulação do tamanho da ninhada em ratos, em que o tamanho e o peso corporal de um filhote no desmame variava inversamente ao número de irmãos em competição pelo suprimento (AUBERT; SUQUET; LEMONNIER, 1980; MCCANCE, 1962). À luz desses resultados, a manipulação do tamanho da ninhada, isto é, a alteração manual do número de filhotes por ninhada durante o período de lactação, se tornou um modelo apropriado e estabelecido para estudar as consequências a longo prazo de um tipo de programação nutricional pós-natal que atinge diretamente os filhotes (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Nesse modelo, animais são alocados após o nascimento em ninhadas menores (com apenas 3 ou 4 filhotes; SL – do inglês, *small litter*) (SPENCER, 2013b) ou maiores (com 14 a 24 filhotes; LL – do inglês, *large litter*) (CODO; CARLIN, 1971) do que o habitual (controle – NL, do inglês, *normal litter*), que tem de dez a 12 filhotes (CHERNOFF *et al.*, 2009). Desta forma, tanto a supernutrição (ninhada reduzida) quanto a subnutrição (ninhada expandida) podem ser alcançadas (PATEL; SRINIVASAN, 2011). Segundo Fiorotto *et al.* (1991), existe a tendência de que as matrizes de ninhadas expandidas produzam leite com menor volume lipídico do que as de ninhadas normais, o que reflete um fenômeno de diluição, ou seja, um aumento proporcionalmente maior no volume de leite do que nos lipídeos do leite. Como resultado, os filhotes experenciam um aumento progressivo de déficits de energia não proteica. Por outro lado, o menor volume de leite produzido por matrizes

de ninhadas reduzidas é explicado pela menor intensidade de sucção por parte dos filhotes. Além disso, o leite dessas matrizes tem menor concentração de proteína, consistente com a síntese reduzida de proteína do leite associada à menor secreção de prolactina (FIOROTTO *et al.*, 1991), e maior teor calórico e de lipídeos do que de matrizes de ninhada normal (XAVIER *et al.*, 2019).

Essa exposição precoce ao desbalanço nutricional tanto quantitativo quanto qualitativamente está relacionada com a resposta adaptativa de neurônios hipotalâmicos que modulam a ingestão alimentar e o gasto energético a partir de mudanças nas atividades hormonais (SOOKOIAN *et al.*, 2013). Em animais de ninhadas SL, o processo regulatório em conexão com sinais peptidérgicos parece estar alterado (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002b). De acordo com Ribeiro *et al.* (2017), a supernutrição precoce programa a resistência hipotalâmica à leptina e diminui a atividade termogênica do TAM, o que predispõe ao acúmulo de tecido adiposo em virtude da falta de gasto energético induzido pelo SNA simpático. Em concordância, foi observada a redução no conteúdo de RNAm de Ob-Rb no hipotálamo de animais SL (LÓPEZ *et al.*, 2005) e que a taxa de disparo de neurônios do ARC não se alterou com a administração de leptina. A diminuição da função inibitória da leptina em neurônios do ARC de animais SL indica uma resistência hipotalâmica adquirida à leptina que contribui com o sobrepeso desses animais (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000). Além disso, a resistência à leptina se mostrou específica no ARC medial, onde estão localizados os neurônios NPY/AgRP, mas não no ARC lateral, localização dos neurônios POMC, indicando um padrão específico de região do núcleo (CRIPPS *et al.*, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2005).

De encontro a esses resultados, animais SL também apresentaram alterações na resposta neuronal do PVN a peptídeos orexígenos e anorexígenos, exibindo predominância na inibição de neurônios do PVN por neuropeptídeos orexígenos (AgRP e NPY, que agem em favor da diminuição do gasto energético), acompanhada de menor ativação por parte dos neuropeptídeos anorexígenos, CART e  $\alpha$ -MSH. Tem-se, então, que os efeitos bimodais normais dos neuropeptídeos se moldaram de forma unidirecional para uma predominância de inibição dos neurônios do PVN de animais SL (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2003). Além disso, foi também reportado o aumento na porcentagem de neurônios que expressam NPY no ARC e ausência da regulação negativa de NPY, o que sugere um tipo de resistência da via hipotalâmica ARC-PVN em animais SL às concentrações elevadas de leptina e/ou

insulina. A insulina, que normalmente inibe a expressão de RNAm do NPY, provocou a ativação de neurônios NPY no ARC de animais SL jovens e adultos (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2007), indicando que, em animais obesos, a ação da insulina em neurônios NPY do ARC também contribui para o estado de energia positiva observada (CHEE; COLMERS, 2008).

A redução do tamanho da ninhada também provoca alterações na estrutura e função de outras áreas hipotalâmicas, além do ARC e PVN, como a baixa resposta a estímulos anorexigênicos no VMH (RINALDI *et al.*, 2012). O VMH é conhecido por regular a homeostase energética através da modulação, via NTS, da atividade do SNA simpático (LINDBERG; CHEN; LI, 2013; SUN *et al.*, 2021). Neste sentido, foi demonstrado que a obesidade está relacionada com a diminuição na atividade simpática (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Ademais, há evidências de alteração na resposta ao NPY no VMH em animais obesos SL, com maior prevalência da sinalização via receptor  $Y_1$  do que em animais controle, possibilitando uma maior inibição em neurônios do VMH desses animais (HEIDEL; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 1999). Tal inibição indica maior responsividade e sensibilidade dos neurônios do VMH ao NPY. Cooperando ainda mais para esse quadro, Davidowa e Plagemann (2000) demonstraram alteração na resposta da leptina no VMH de animais SL, em que ela passa a exercer uma resposta inibitória neste núcleo.

No outro aspecto nutricional, há clara correlação negativa entre o tamanho da ninhada e a massa corporal do filhote ao desmame (RÖDEL *et al.*, 2010). Ratos *Wistar* LL apresentam menor massa adiposa total e porcentagem de tecido adiposo branco do que animais controle, enquanto a porcentagem de massa magra se mostra aumentada, indicando uma falha no desenvolvimento adequado do tecido adiposo (ENGELBREGT *et al.*, 2004), visualizado na diminuição do tamanho dos adipócitos de ratos submetidos à desnutrição indireta durante o período gestacional e de lactação (RODRÍGUEZ-RIVERA *et al.*, 2021). Além disso, já está estabelecido que os animais criados em ninhadas expandidas são menores, mais leves e mais magros na infância e na vida adulta, podendo ou não apresentar *catch-up* de crescimento (REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008).

Interessantemente, durante o crescimento, na infância e fase jovem adulta, animais LL apresentam um aumento transitório na expressão hipotalâmica de neuropeptídeos orexigênicos, visto como uma tentativa de maximizar a ingestão de leite e, assim, aumentar a energia disponível para o crescimento (REMMERS *et al.*,

2008b). Na vida adulta, a expressão hipotalâmica de RNAm de neuropeptídeos regulatórios se mantém alterada. Segundo evidências, animais de diferentes modelos de desnutrição dos filhotes, seja direta ou indireta, apresentam maior conteúdo de NPY e AgRP no ARC e no PVN (LÓPEZ *et al.*, 2005; PLAGEMANN, A *et al.*, 1999; STOCKER *et al.*, 2012) e menor conteúdo de POMC e CART no ARC (LÓPEZ *et al.*, 2005; STOCKER *et al.*, 2012), o que é apropriado e condizente com o quadro de hipoleptinemia (CRIPPS *et al.*, 2009; PLAGEMANN, A *et al.*, 1999; REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008; VELKOSKA *et al.*, 2008) e hipoinsulinemia (PLAGEMANN, A *et al.*, 1999) apresentada por esses animais, em relação aos controles (CRIPPS *et al.*, 2009; LÓPEZ *et al.*, 2005). Essas alterações na expressão hipotalâmica dos neuropeptídeos orexígenos e anorexígenos revelam que os animais submetidos à subnutrição precoce registram o balanço energético negativo em que se encontram, contudo, a ausência de efeito obesogênico indica que a resposta fisiológica antecipada a esses sinais, chamada compensação energética e comportamental, não se desenvolve apropriadamente, sugerindo que esses animais desnutridos têm uma falha na cascata da sinalização da leptina (CRIPPS *et al.*, 2009; STOCKER *et al.*, 2012).

Além das alterações no desenvolvimento da regulação da ingestão alimentar, a composição e a quantidade de leite alterada no início da vida pode impactar a resposta imunológica ao modificar a composição e a função da microbiota intestinal (COLLINS; BELKAID, 2022). De acordo com He (2021), existem quatro principais filos que colonizam o TGI: *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, representando 98% da microbiota intestinal, dos quais as *Bacteroidetes* são consideradas bactérias benéficas. Neste sentido, foi demonstrado que a suplementação de *Bacteroidetes fragilis* durante 6 meses reduziu a expressão de TLR4 e atenuou a resposta pró-inflamatória ao estímulo com LPS em recém-nascidos saudáveis (GRONLUND *et al.*, 2000; SPENCER, 2013a). Por outro lado, alterações perinatais na proporção entre *Bacteroidetes* e *Firmicutes* foram associadas a modificações epigenéticas que alteram o metabolismo lipídico e aumentam o risco de desenvolvimento de obesidade e sobrepeso (GÓMEZ-GALLEGO *et al.*, 2019). De acordo, Ley *et al.* (2005) demonstraram que camundongos com obesidade induzida pela dieta hiperlipídica apresentam menor abundância de *Bacteroidetes* e um aumento proporcional do filo *Firmicutes*, além de diminuição da diversidade bacteriana intestinal em comparação aos animais controle. Tal disbiose (*Bacteroidetes* diminuído

e *Firmicutes* aumentado) também foi observada em animais de modelo de obesidade induzida pela redução do tamanho da ninhada e poderia levar a inflamação sistêmica de baixo grau (RODRIGUES *et al.*, 2022). Contudo, de acordo com Spencer (2013a), animais SL não apresentam perfil de inflamação basal, visto que as concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias não diferiu entre animais SL e controle (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012).

Em modelos de desnutrição durante as fases iniciais de desenvolvimento, também há perda da abundância e diversidade na comunidade microbiana, bem como alterações nas vias metabólicas microbianas que resultam em menor eficiência na extração de energia de componentes dietéticos não digeríveis (prebióticos) (PREIDIS *et al.*, 2015). Porém, diferente do que foi reportado para animais SL, Desai *et al.* (2009) demonstraram que a desnutrição materna pré e pós-natal resultou em aumento da inflamação basal nos filhotes ao longo da vida adulta. Esses estudos ainda são iniciais e mais pesquisas acerca da participação da microbiota nas alterações epigenéticas e perfil inflamatório de animais do modelo de redução e expansão do tamanho da ninhada se fazem necessárias. Sabe-se que esse modelo de manipulação do tamanho da ninhada é um modelo de distúrbios nutricionais precoce, devido à alteração na disponibilidade de leite para os filhotes (HABBOUT *et al.*, 2012), cujas adaptações metabólicas são observadas desde a infância até a vida adulta, evidenciando que o estado fisiológico do organismo no período que antecede essa fase é extremamente relevante para o desenvolvimento e homeostase no organismo.

### 3 JUSTIFICATIVA

Considerando os grandes efeitos à saúde associados com as desordens de desnutrição e/ou ao excesso do consumo alimentar, grande atenção tem sido direcionada ao controle do apetite e sobrepeso (STERNSON; EISELT, 2017). Sabe-se que o estado metabólico dos animais é comunicado ao SNC, mais especificamente aos núcleos hipotalâmicos, que contêm vários neurônios relacionados à regulação metabólica que respondem diretamente a hormônios periféricos e sinais nutricionais a fim de iniciar respostas apropriadas para manter a homeostase energética (BOURET, 2012; GROVE *et al.*, 2005). Dentre esses hormônios periféricos e sinalizadores, a CCK tem sido amplamente estudada por atuar como mediador da saciedade e por reduzir a ingestão alimentar ao diminuir o tamanho da refeição em roedores e humanos (GIBBS *et al.*, 1973; KISSILEFF *et al.*, 1981). Esse efeito anorexígeno da CCK é mediado via nervo vago e pela circulação, com conseguinte ativação da AP e NTS (FRASER; DAVISON, 1992), que por sua vez se conectam com o hipotálamo (CURI; ARAÚJO FILHO, 2009).

Além da CCK, substâncias envolvidas em processos patológicos também afetam as conexões neurais e, conseqüentemente, a homeostase energética sistêmica. Sabe-se que o LPS, endotoxina da parede celular de bactérias Gram-negativas, induz processos inflamatórios e recrutam receptores de CCK (RORATO *et al.*, 2011) bem como neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados ao controle da homeostase energética (BORGES *et al.*, 2007; RORATO *et al.*, 2009). A anorexia faz parte de um mecanismo de defesa clássico do organismo contra processos inflamatórios e infecciosos, contudo, em alguns casos, ela pode ter conseqüências graves, pois pode prejudicar a recuperação ao induzir um déficit de energia (LE THUC *et al.*, 2017).

A obesidade e a má-nutrição desafiam os processos regulatórios envolvidos no controle alimentar e, em função disto, a investigação da programação fetal ou perinatal tem despertado grande interesse no meio científico nos últimos anos, evidenciando que experiências nutricionais no início da vida podem contribuir com as desordens metabólicas na vida adulta (LIU *et al.*, 2013; PLAGEMANN, 2006). Neste contexto, o uso de modelos experimentais de animais tem contribuído muito para o entendimento da fisiopatologia da obesidade (RINALDI *et al.*, 2012) e, dentre eles, ratos de redução e de expansão de ninhada têm se mostrado modelos apropriados

para estudar as consequências da supernutrição e desnutrição pós-natal, respectivamente (PLAGEMANN, 2006; PLAGEMANN *et al.*, 2012).

No entanto, ainda são poucos os estudos sobre os mecanismos envolvidos na responsividade alterada à CCK e ao LPS em animais com obesidade por redução de ninhada. E, embora estudos mostrem que a desnutrição pré-natal aumente a resposta febril ao LPS em animais adultos (IWASA *et al.*, 2015), pouco se sabe também sobre a relação entre a má-nutrição pós-natal por expansão do tamanho da ninhada sobre os efeitos do LPS e da CCK na ingestão alimentar.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos da CCK e do LPS na ingestão alimentar e na ativação neuronal de ratos adultos *Wistar* submetidos à supernutrição ou desnutrição no período pós-natal por redução ou expansão do tamanho da ninhada, respectivamente.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada nos parâmetros biométricos (peso corporal, comprimento e índice de Lee) de ratos *Wistar* no dia do desmame (DPN 21) e no início da vida adulta (DPN 60).

Avaliar os efeitos da CCK em ratos adultos de 60 dias de ninhadas SL, NL e LL nos seguintes parâmetros:

- a) Ingestão alimentar;
- b) Ativação neuronal no tronco encefálico: Área Postrema e Núcleo do Trato Solitário;
- c) Ativação neuronal em núcleos hipotalâmicos: Núcleo Arqueado e Núcleos Paraventricular, Ventromedial e Dorsomedial do Hipotálamo.

Avaliar os efeitos do LPS em ratos adultos de 60 dias de ninhadas SL, NL e LL nos seguintes parâmetros:

- a) Ingestão alimentar;
- b) Ativação neuronal no tronco encefálico: Área Postrema e Núcleo do Trato Solitário;
- c) Ativação neuronal em núcleos hipotalâmicos: Núcleo Arqueado e Núcleos Paraventricular, Ventromedial e Dorsomedial do Hipotálamo.

Esta tese foi dividida em 2 estudos que serão descritos na forma de artigo científico.

Estudo 1: A supernutrição neonatal, mas não a subnutrição neonatal, reduz a hipofagia e a ativação neuronal no Núcleo do Trato Solitário e no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo induzidas pela colecistocinina em ratos *Wistar*.

Estudo 2: A programação pela supernutrição neonatal reduz a resposta hipofágica e a atividade neuronal no Núcleo do Trato Solitário e Hipotálamo induzidas pelo lipopolissacarídeo em ratos adultos.

## **5 ESTUDO 1 – A SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL, MAS NÃO A SUBNUTRIÇÃO NEONATAL, REDUZ A HIPOFAGIA E A ATIVAÇÃO NEURONAL NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO E NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO INDUZIDAS PELA COLECISTOCININA EM RATOS *WISTAR***

Os resultados deste estudo estão publicados no artigo intitulado **“Neonatal overnutrition, but not neonatal undernutrition, disrupts CCK-induced hypophagia and neuron activation of the Nucleus of the Solitary Tract and Paraventricular Nucleus of hypothalamus of male *Wistar* rats”** na revista *Brain Research Bulletin*, ISSN: 0361-9230, 2023, disponível no Anexo B.

### 5.1 INTRODUÇÃO

O conceito da programação metabólica propõe que o fornecimento nutricional inadequado no início da vida pós-natal pode ser um fator determinante no estado metabólico e impactar a saúde a longo prazo (MARANGON *et al.*, 2020; WATERLAND; GARZA, 1999). Nesse contexto, estudos têm mostrado que a nutrição em excesso ou em falta durante o período perinatal está associado ao aumento no risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis ao longo da vida (RIBEIRO *et al.*, 2017; SPENCER; TILBROOK, 2009). Modelos experimentais animais para a programação metabólica já foram conduzidos em várias espécies, incluindo primatas, ovelhas, porquinhos-da-índia e roedores. Em ratos, as manipulações nutricionais pré-natais e pós-natais já foram usadas para induzir a programação do desenvolvimento do balanço energético, incluindo a ligadura das artérias uterinas, dietas maternas com conteúdo alterado de proteína, lipídios e carboidratos e também manipulações do tamanho da ninhada (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

A manipulação do tamanho da ninhada é um modelo baseado na modificação no ambiente nutricional no período pós-natal, isto é, alteração no número de filhotes por ninhada durante a lactação. Desta forma, esse modelo induz a supernutrição ou desnutrição precoce em animais e permite o estudo das consequências a longo prazo desses fenômenos. Esse modelo se justifica no fato de que em roedores o período de crescimento cerebral tem início no período pré-natal, durante a gestação, e atinge o pico do desenvolvimento durante as três primeiras

semanas após o nascimento, que coincide com o período de lactação desses animais. Durante esse período, alterações nutricionais podem ter efeitos permanentes em inúmeros eventos do desenvolvimento cerebral (LESAGE *et al.*, 2006; VIEAU *et al.*, 2007). Neste contexto, estudos recentes de Branquinho *et al.* (2017) e Stopa *et al.* (2021) mostraram que animais que cresceram em ninhadas reduzidas durante a lactação desenvolveram sobrepeso ou obesidade na vida adulta. Por outro lado, animais de ninhadas expandidas exibiram menor peso corporal no desmame, mas apresentaram hiperfagia e crescimento corporal acelerado no início da vida adulta, consistente com o aumento das vias hipotalâmicas orexigênicas (JUAN DE SOLIS *et al.*, 2016; MARANGON *et al.*, 2020; SPENCER; TILBROOK, 2009).

Além disso, já foi demonstrado que a colecistocinina (CCK) pode estar envolvida na manutenção no balanço energético (ENES-MARQUES *et al.*, 2020). A CCK, um membro da família de hormônios peptídicos do cérebro e do trato gastrointestinal, é secretada pelos neurônios do sistema nervoso periférico e central (SNC) e pelas células enteroendócrinas I do intestino delgado (DAFALLA *et al.*, 2019). A CCK desempenha papel no controle da ingestão de alimentos, contribuindo para o término da refeição, e a CCK exógena reduz a ingestão de alimentos, ao reduzir o tamanho da refeição (BI; MORAN, 2016). Estudos em pacientes com distúrbios alimentares, como aqueles com bulimia nervosa, manifestaram uma resposta prejudicada à CCK durante o consumo de alimentos, que se correlaciona com a diminuição da saciedade à refeição (KAMILARIS *et al.*, 1992). Em roedores, a obesidade no modelo *knockout* do receptor CCK-1 (CCK-1R) Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) é atribuível à sua hiperfagia, sugerindo que a perda de sinalização através do CCK-1R atenua os sinais inibitórios que normalmente limitam o ganho de peso (BI; MORAN, 2016). Centralmente, a redução na expressão de neurônios CCK-8S no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) de ratos submetidos à supernutrição neonatal, bem como nos núcleos arqueado (ARC), ventromedial (VMH) e dorsomedial (DMH) do hipotálamo de ratos desnutridos no período perinatal indicam distúrbios específicos de diferenciação e maturação hipotalâmica durante o período perinatal crítico de organização cerebral (PLAGEMANN *et al.*, 1999; PLAGEMANN *et al.*, 1998).

Sabe-se que a redução na ingestão alimentar e saciedade induzidas pela CCK são mediadas por sua ação na área postrema (AP) (SUGETA *et al.*, 2015) e no núcleo do trato solitário (NTS) que ativam vias ascendentes para o hipotálamo

(DALY *et al.*, 2011; MANISCALCO; RINAMAN, 2013; RINAMAN, 2010). No entanto, a programação metabólica induzida pela manipulação do tamanho da ninhada pode desafiar alguns desses processos regulatórios, comprometendo o efeito hipofágico da CCK. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar os efeitos do CCK na ingestão alimentar e na atividade neuronal de ratos *Wistar* adultos submetidos à super ou subnutrição neonatal pelo método de manipulação do tamanho da ninhada.

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Animais

Os protocolos experimentais foram realizados com ratos da linhagem *Wistar* obtidos por meio do acasalamento entre matrizes provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). A presença de espermatozoides no esfregaço vaginal das fêmeas na manhã seguinte ao acasalamento determinou o primeiro dia gestacional. A partir de então, as fêmeas prenhas foram mantidas em gaiolas individuais até o nascimento dos filhotes.

Nas primeiras 24 horas do dia do nascimento, denominado dia pós-natal (DPN) 0, o tamanho da ninhada foi ajustado para três filhotes (2 machos e 1 fêmea; ninhada reduzida – SL, do inglês *small litter*), para induzir a supernutrição pós-natal. Na ninhada controle, o tamanho da ninhada foi ajustado para dez filhotes (proporção entre machos e fêmeas 1:1; ninhada normal – NL, do inglês *normal litter*). Para induzir a desnutrição neonatal, o tamanho da ninhada foi expandido para 16 filhotes (proporção entre machos e fêmeas 1:1; ninhada expandida – LL, do inglês *large litter*). Quando necessário, filhotes nascidos no mesmo dia foram transferidos de uma ninhada para outra a fim de atingir o número de filhotes necessários em cada ninhada e para manter a proporção entre filhotes machos e fêmeas. Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. Foram utilizados, para cada protocolo experimental, um total de cinco ninhadas NL, cinco ninhadas LL e 12 ninhadas SL, de forma que em cada protocolo experimental houvesse animais de pelo menos cinco ninhadas experimentais diferentes.

Após o desmame, no DPN 21, os filhotes foram mantidos em gaiolas coletivas em grupos de quatro a cinco animais da mesma ninhada experimental. As

matrizes foram submetidas à eutanásia por decapitação. Apenas os filhotes machos foram utilizados neste estudo. Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL com condições controladas e adequadas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), com acesso livre à água corrente e ração peletizada (Nuvilab CR1, Nuvital®), salvo quando especificado o contrário. Todos os protocolos experimentais foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL, tendo início às 08h do DPN 60. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação (CEUA/UEL), com o número de protocolo 18310.2019.03 (Anexo A).

#### 5.2.2 Avaliação do efeito do tamanho da ninhada em parâmetros biométricos e índice de Lee

O peso corporal dos animais foi aferido no nascimento e nos DPN 3, 7, 10, 14, 17 e 21. Após o desmame, os animais foram pesados a cada cinco dias até o DPN 60. O peso corporal foi expresso em gramas (g). O índice de Lee, expresso em  $\text{g}^{1/3}/\text{cm}$ , foi avaliado no dia do desmame (DPN 21) e no término dos protocolos experimentais, no DPN 60. Ele foi calculado considerando-se a raiz cúbica do peso corporal em gramas em razão do comprimento naso-anal em centímetros (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

#### 5.2.3 Droga

A colecistocinina (CCK; Bachem H-2080, Califórnia, EUA;  $10 \mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal) foi administrada em dose única por via intraperitoneal (IP) e teve como veículo de diluição salina estéril 0,9% (NaCl 0.9%, 0,2 mL/100 g de peso corporal). A dose utilizada foi selecionada com base em doses previamente utilizadas em outros estudos da literatura (VOITS *et al.*, 1996).

#### 5.2.4 Avaliação dos efeitos da CCK no consumo alimentar de ratos SL, NL e LL

Para avaliar a resposta anorexigênica da CCK, os animais foram transferidos para gaiolas metabólicas, onde permaneceram por dois dias para

aclimatação. No DPN 60, após 16 horas de jejum noturno, os animais de ninhadas SL, NL e LL receberam uma injeção IP de CCK (10 µg/Kg) ou salina (NaCl 0,9%; 0,2 mL/100 g de peso corporal). Após 15 minutos, os animais tiveram acesso à ração peletizada (100g) e a ingestão alimentar foi quantificada (g/100 g de peso corporal) no período de 1, 2 e 24 horas. Ao final do protocolo experimental, todos os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação.

#### 5.2.5 Avaliação dos efeitos da CCK na ativação neuronal no tronco encefálico e no hipotálamo de animais SL, NL e LL

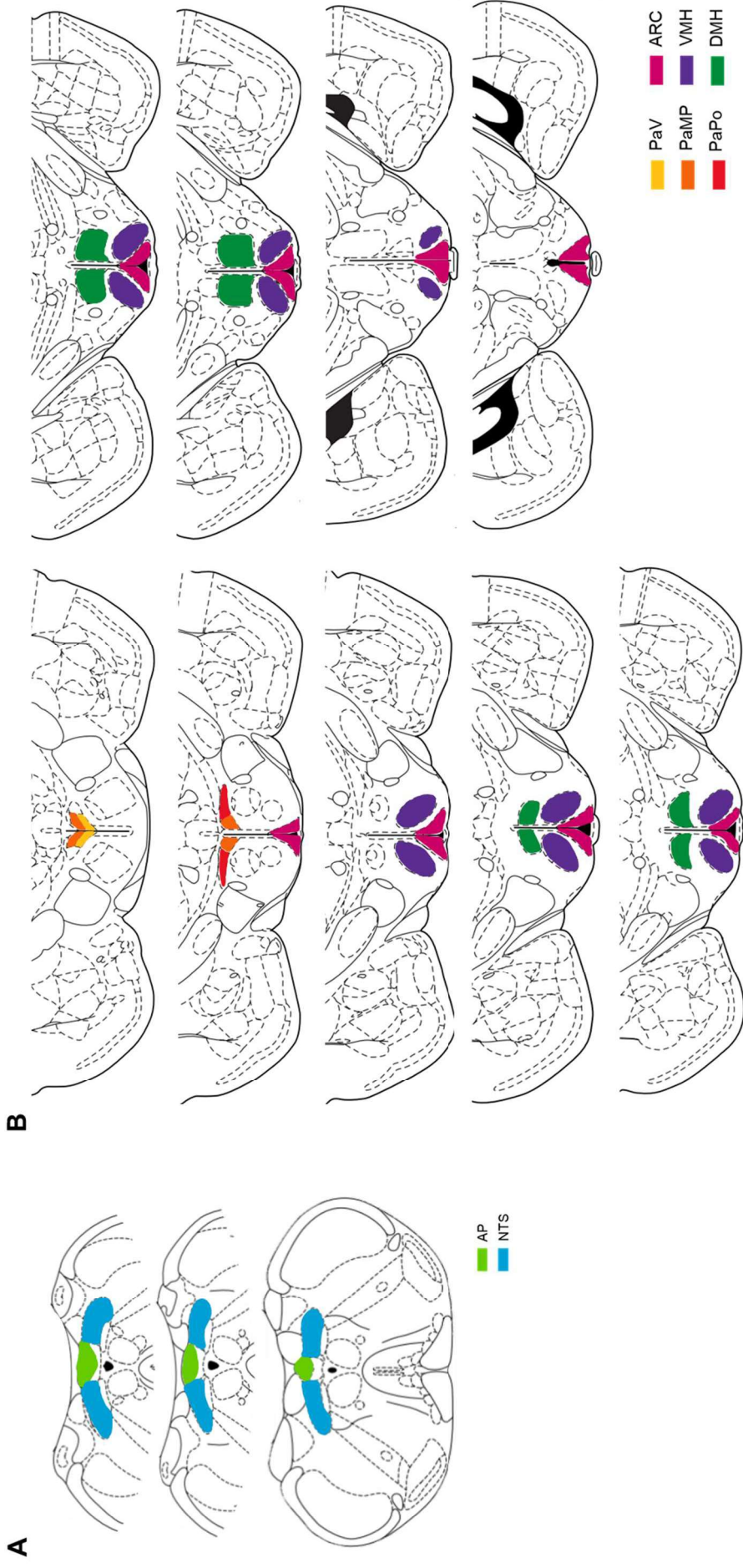
No DPN 60, após 16 horas de jejum noturno, animais SL, NL e LL receberam injeção IP de CCK (10 µg/Kg) ou salina (NaCl 0,9%; 0,2 mL/100 g de peso corporal). Decorridos 90 minutos, os animais foram anestesiados com injeção IP contendo ketamina (100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/Kg) e submetidos à perfusão cerebral transcardíaca, iniciada com a infusão de 200 mL de solução salina isotônica gelada [0,15 molar (M)] contendo heparina (diluição 1:80), seguida pela infusão de 400 mL de paraformaldeído 4% em tampão fosfato (TF, pH 7,4), com auxílio de uma bomba peristáltica com velocidade de infusão de 10 mL/minuto. Ao final, os cérebros foram removidos, pós-fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora e estocados em solução contendo sacarose 30% a 4 °C.

No criostato (Leica), os cérebros foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura e mantidos em solução crio-protetora à 20 °C. Para o protocolo de imuno-histoquímica, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,3%) e Triton (0,3%), e das ligações inespecíficas utilizando-se soro normal de cabra. Posteriormente, os cortes foram processados para imunorreatividade ao c-Fos por meio de incubação por 48 horas a 4 °C com anticorpo anti-c-Fos (ab-5, Oncogene Science, Manhasset, Nova York, EUA) diluído (1:20 000) em TF 0,1 M contendo 1,5% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton. Em seguida, os cortes foram lavados com TF 0,01 M e encubados com imunoglobulina *anti-rabbit* marcada com biotina de cabra (Vector Inc., Burlingame, Califórnia, EUA, diluição 1:200 em TF 0,1 M contendo 1,5% de soro normal de cabra) por um período de 1 hora em temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain, 1:200 em TF), empregando cloridrato de diaminobenzidina (DAB, Sigma CO., Califórnia, EUA, 0,01%) e 1% de sulfato de níquel amônio como

cromógenos, cuja reação confere ao núcleo das células uma coloração de violeta escuro a preto. Finalmente, os cortes foram montados em lâminas histológicas gelatinizadas, secos ao ar durante a noite, desidratados com xilol e colocados sob uma lamínula com *Entellan* (Nova Jersey, EUA).

Os núcleos do tronco encefálico e do hipotálamo foram identificados com base no atlas de cérebro de rato de Paxinos e Watson (2006). A AP e o NTS foram considerados em -13,68 a -14,08 mm do bregma (Fig. 3A). As subdivisões parvocelular medial (PaMP) e ventral (PaV) do PVN foram consideradas em -1.72 a -1.92 mm, e a subdivisão parvocelular posterior (PaPo) do PVN foi considerada em -2,04 mm do bregma (Fig. 3B). Os núcleos ARC e VMH foram considerados em -2,16 a -3,36 mm e o DMH foi considerado em -2,92 a -3,36 mm do bregma (Fig. 3B). A contagem de cada área foi realizada bilateralmente em 7 cortes para AP e NTS, 5 cortes para PaV e PaMP, 2 cortes para PaPo, 15 cortes para ARC, 12 cortes para VMH e 5 cortes para DMH de cada animal e realizada em oito a dez animais de cada grupo experimental. Os neurônios imunorreativos ao c-Fos foram quantificados manualmente com o auxílio de um sistema de imagem acoplado ao microscópio. O limiar para coloração positiva foi estabelecido individualmente de maneira cega às condições experimentais.

**Figura 3 – Esquema representativo de núcleos do (A) tronco encefálico e (B) do hipotálamo.**



AP, Área Postrema; NTS, Núcleo do Trato Solitário; PaV, subdivisão ventral do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaMP, subdivisão medial do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaPo, subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; ARC, Núcleo Arqueado do Hipotálamo; VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo; e DMH, Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo. Adaptado de Paxinos e Watson (1997).

### 5.2.6 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Levene. Considerando que o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da super e subnutrição nos parâmetros avaliados com um grupo controle (tamanho normal da ninhada), e não comparar os modelos de tamanho de ninhada divergentes entre si (SL vs LL), todas as comparações foram realizadas com o grupo NL (SL vs NL e LL vs NL). Para análise dos dados de peso corporal e de ingestão alimentar, foi utilizado o teste ANOVA para medidas repetidas (RM ANOVA), seguido pelos pós-testes para medidas repetidas de Sidak. A análise estatística dos dados de ganho de peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee foi realizado pelo teste t de *Student*. O teste *two-way* ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey, foi realizado para avaliar a interação entre a variável grupo (tamanho da ninhada) e tratamento (salina ou CCK) na atividade neuronal. O coeficiente de correlação de Spearman ou Pearson foi calculado para análise de correlação entre os dados de ganho de peso corporal e ativação neuronal. Os dados foram analisados com auxílio dos programas estatísticos GraphPad Prism 7.00 e Sigma Plot 11.0 (para as análises de *two-way* ANOVA) e IBM SPSS Statistics 22 (para as análises de *three-way* ANOVA). Os resultados obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

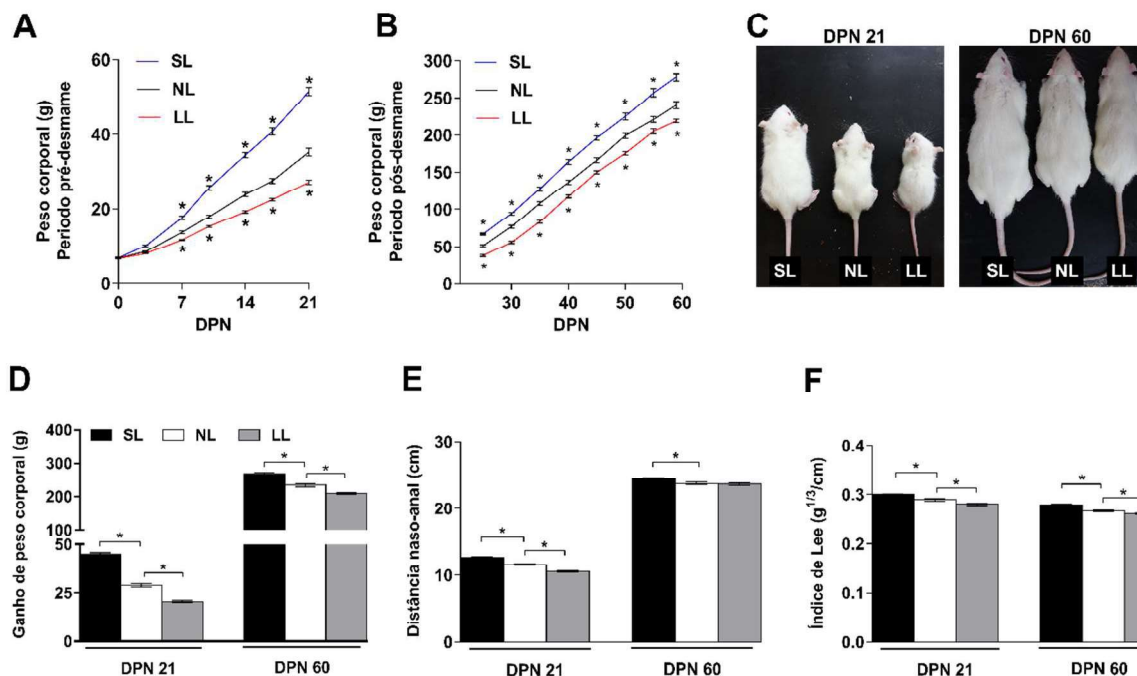
## 5.3 RESULTADOS

### 5.3.1 Efeito do tamanho da ninhada no peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee

A Figura 4 apresenta os efeitos do tamanho da ninhada nos parâmetros biométricos de animais SL, NL e LL. No DPN 60, uma parte desses animais foi designada para o protocolo de avaliação da ingestão alimentar e outra parte para os experimentos de avaliação da atividade neuronal (exibidos nas Figuras 5 e de 6 a 9, respectivamente). O teste de ANOVA para medidas repetidas utilizado para análise peso corporal mostrou que a supernutrição neonatal resultou em

aumento do peso corporal desde o período lactacional, no DPN 7, até o início da idade adulta, no DPN 60, como exibido na Fig. 4A e B, e na imagem representativa na Fig. 4C (período lactacional – fator idade:  $F_{6, 432} = 2\ 214$ ,  $p < 0,0001$ ; fator tamanho da ninhada:  $F_{1, 72} = 123,7$ ,  $p < 0,0001$ ; interação:  $F_{6, 432} = 114,9$ ,  $p < 0,0001$ ; período pós-desmame - fator idade:  $F_{2,393, 170,6} = 2\ 304$ ,  $p < 0,0001$ ; fator tamanho da ninhada:  $F_{1, 72} = 40,73$ ,  $p < 0,0001$ ; interação:  $F_{7, 499} = 7,342$ ,  $p < 0,0001$ ). Em comparação aos animais NL, animais SL apresentaram maior ganho de peso corporal (Fig. 4D), comprimento naso-anal (Fig. 4E) e índice de Lee (Fig. 4F) no desmame [ganho de peso corporal:  $t(78) = 11,92$ ,  $p < 0,0001$ ; distância naso-anal:  $t(78) = 7,589$ ,  $p < 0,0001$ ; índice de Lee:  $t(27) = 11,42$ ,  $p < 0,0001$ ] e no DPN 60 [ganho de peso corporal:  $t(53) = 7\ 891$ ,  $p < 0,0001$ ; distância naso-anal:  $t(33) = 3\ 138$ ,  $p = 0,0036$ ; índice de Lee:  $t(78) = 2,966$ ,  $p = 0,004$ ]. A subnutrição neonatal, por outro lado, resultou em diminuição do peso corporal desde o período lactacional, no DPN 7, até o início da vida adulta, no DPN 60, em comparação aos animais NL (período lactacional - fator idade:  $F_{1,775, 134,9} = 1\ 459$ ,  $p < 0,0001$ ; fator tamanho da ninhada:  $F_{1, 76} = 47,03$ ,  $p < 0,0001$ ; interação:  $F_{6, 456} = 35,93$ ,  $p < 0,0001$ ; período pós-desmame - fator idade:  $F_{2,979, 224,3} = 4\ 094$ ,  $p < 0,0001$ ; fator tamanho da ninhada:  $F_{1, 76} = 33,24$ ,  $p < 0,0001$ ; interação:  $F_{7, 527} = 3,508$ ,  $p = 0,0011$ ; Fig. 4A, B e C). Os animais LL apresentaram ganho de peso corporal [ $t(78) = 7,37$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 4D], distância naso-anal [ $t(78) = 7,369$ ,  $p < 0,0001$ ; Fig. 4E] e índice de Lee [ $t(78) = 2,568$ ,  $p = 0,012$ ; Fig. 4F] reduzidos no dia do desmame, em relação aos animais controle. No DPN 60, animais LL continuaram a apresentar ganho de peso [ $t(78) = 4,24$ ,  $p < 0,0001$ ] e índice de Lee [ $t(78) = 2,874$ ,  $p = 0,0052$ ] reduzidos, em comparação aos animais NL (Fig. 4D e F), mas a distância naso-anal não diferenciou entre os grupos [ $t(78) = 0,339$ ,  $p = 0,735$ , Fig. 4E].

**Figura 4 – Efeito do tamanho da ninhada no peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee de ratos *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



Curva de peso corporal (g) durante o período pré-desmame (A) e pós-desmame (B) das ninhadas. D. Ganho de peso corporal (g). E. Distância naso-anal (cm). F. Índice de Lee ( $g^{1/3}/cm$ ). Dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para análise de ANOVA para medidas repetidas (curva de peso corporal) e teste t de *Student* (ganho de peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee). \* $p < 0.05$  versus NL (n = 40 animais/grupo). C. Imagem representativa de um animal de cada ninhada no DPN 21 e 60.

### 5.3.2 Efeito da CCK na ingestão alimentar de animais SL, NL e LL

A interpretação estatística da análise do efeito da injeção IP de CCK na ingestão alimentar de animais SL, NL e LL está apresentado na Tabela 1 e demonstrado na Fig. 5. A análise de *three-way* ANOVA para medidas repetidas mostrou que o consumo alimentar de animais SL não foi alterado pelo tratamento com a CCK nem pelo tamanho da ninhada em nenhum dos tempos avaliados no estudo (1 h:  $p = 0,13$ ; 2 h:  $p = 0,559$ ; 24 h:  $p = 0,694$ ). O tratamento com a CCK diminuiu a ingestão alimentar de animais NL ( $p = 0,002$ ) e LL ( $p = 0,002$ ) 1 hora após o tratamento, sem efeito da CCK após 2 horas em nenhum desses grupos (NL:  $p = 0,07$ ; LL:  $p = 0,074$ ). Duas horas após o tratamento, a ingestão alimentar cumulativa estava aumentando para os animais LL em comparação aos animais NL, independente do tratamento [ $p$  (grupo salina) = 0,006;  $p$  (grupo CCK) = 0,004]. Não houve efeito do

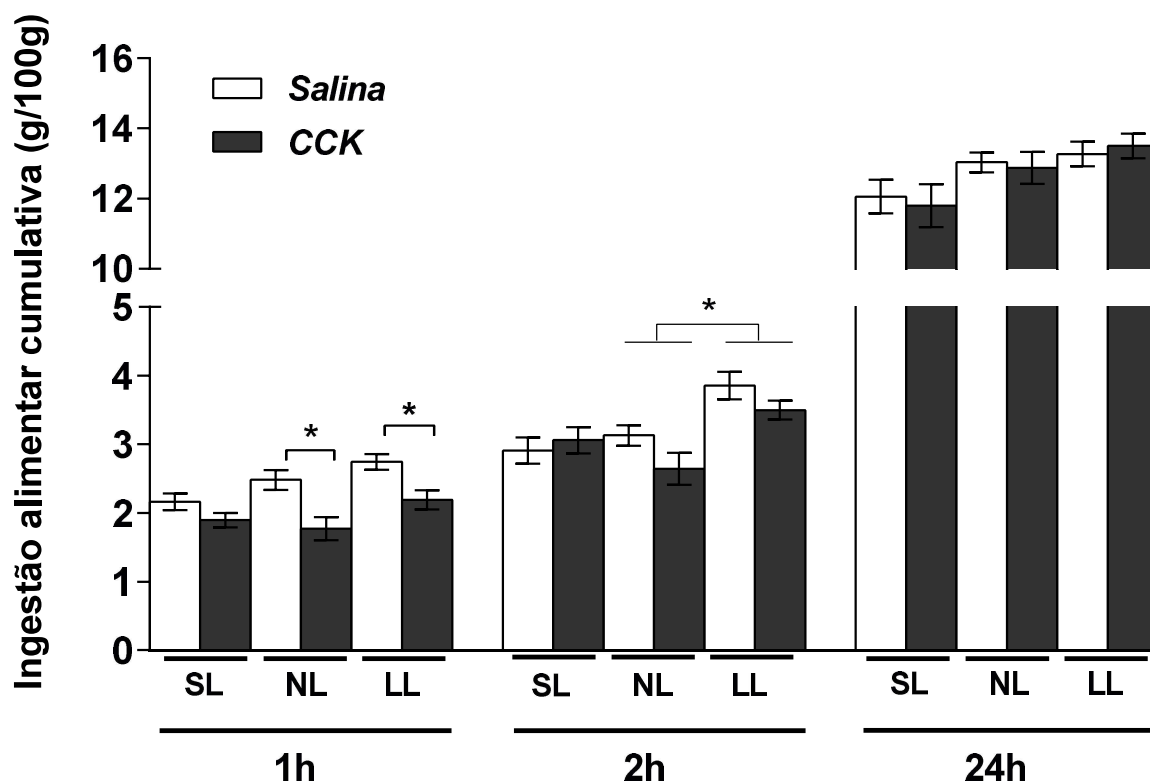
tratamento nem do tamanho da ninhada no consumo alimentar de nenhum grupo 24 horas pós-tratamento.

**Tabela 1** – Efeito dos fatores tempo, tamanho da ninhada e tratamento com colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) e interação entre fatores na análise de ingestão alimentar de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzida (SL), normal (NL) e expandida (LL).

Fator tempo		Fator tamanho da ninhada		Fator tratamento		Interação tempo x tamanho da ninhada x tratamento	
SL/NL	<i>p</i>	<i>F</i> <sub>1,37</sub> =	<i>p</i>	<i>F</i> <sub>1,37</sub> =	<i>p</i>	<i>F</i> <sub>2,74</sub> =	<i>p</i>
<i>F</i> <sub>2,36</sub> = 1012,72	<0,0001	2,23	0,144	1,59	0,215	0,52	0,596
LL/NL	<i>p</i>	<i>F</i> <sub>1,36</sub> =	<i>p</i>	<i>F</i> <sub>1,36</sub> =	<i>p</i>	<i>F</i> <sub>2,72</sub> =	<i>p</i>
<i>F</i> <sub>2,35</sub> = 1657,01	<0,0001	7,86	0,008	4,66	0,038	0,11	0,900

Análise *three-way* ANOVA de medidas repetidas, seguida de pós teste de Sidak. Os efeitos foram calculados em comparação aos animais da ninhada normal (NL).

**Figura 5** – Efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na ingestão alimentar (g/100g peso corporal) de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).

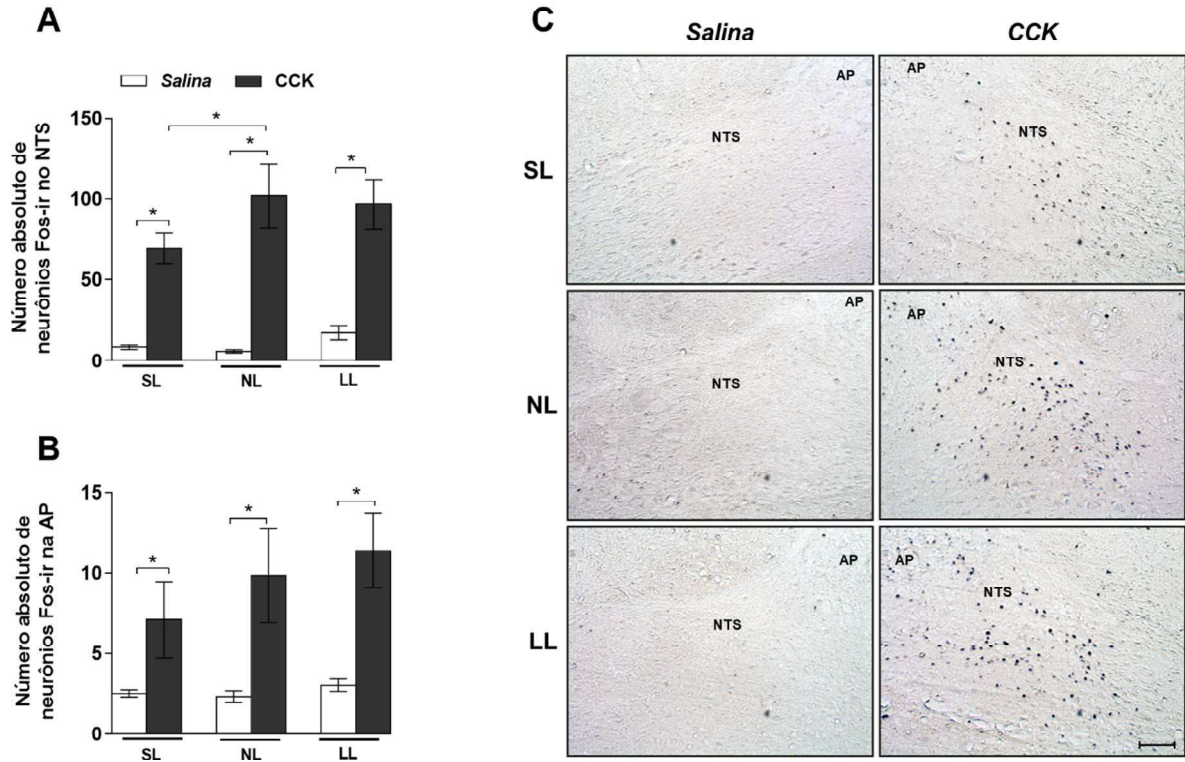


Dados estão expressos como média ± E.P.M. para *Three-way* ANOVA de medidas repetidas. \**p*<0.05 (n=8-12 animais/grupo).

### 5.3.3 Efeito da CCK na ativação neuronal em ratos SL, NL e LL

A interpretação da análise estatística do efeito da CCK na ativação neuronal está apresentada na Tabela 2, e as fotomicrografias representativas nas figuras 6, 7 e 9. Foi observado efeito do tratamento – observado pelo aumento no número de neurônios c-Fos-ir após a injeção IP de CCK – no NTS, AP e subdivisões PaV e PaMP do PVN (Fig. 6A e B, Fig. 7A e B, respectivamente) em animais SL, NL e LL, em comparação aos seus respectivos grupos salina. A supernutrição precoce resultou em menor ativação neuronal mediada pela CCK no NTS (Fig. 6A) em comparação ao grupo NL, indicando interação entre tratamento (salina ou CCK) e tamanho da ninhada (SL e NL) nessa região (Tabela 2). O efeito do tamanho da ninhada foi observado nas subdivisões PaMP e PaPo (Fig. 7B e C), bem como no VMH e DMH (Fig. 8B e C), nos quais o grupo SL apresentou menor ativação neuronal, em relação ao grupo NL, tanto nos animais tratados com CCK quanto com salina (Tabela 2). Não houve efeito do tratamento nem da redução da ninhada (NL x SL) no ARC. Contrariamente, o efeito do tamanho da ninhada em termos de subnutrição foi observado pelo aumento da imunorreatividade ao c-Fos na subdivisão PaPo (Fig. 7C) em comparação ao grupo NL, para ambos os tratamentos. Não houve efeito do tratamento nem da expansão da ninhada (NL x LL) no ARC, VMH ou DMH (Fig. 8A, B, C, respectivamente, e Tabela 2).

**Figura 6 – Efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal ao c-Fos no tronco encefálico de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



Número de neurônios imunorreativos ao c-Fos no (A) NTS e (B) AP. (C) Fotomicrografias representativas (objetiva de 10x) de cortes coronais, apresentando a imunorreatividade na AP e no NTS. Barra de escala: 100 µm. Dados estão expressos como média ± E.P.M. para *two-way* ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-10$  animais/grupo).

AP, Área Postrema; NTS, Núcleo do Trato Solitário.

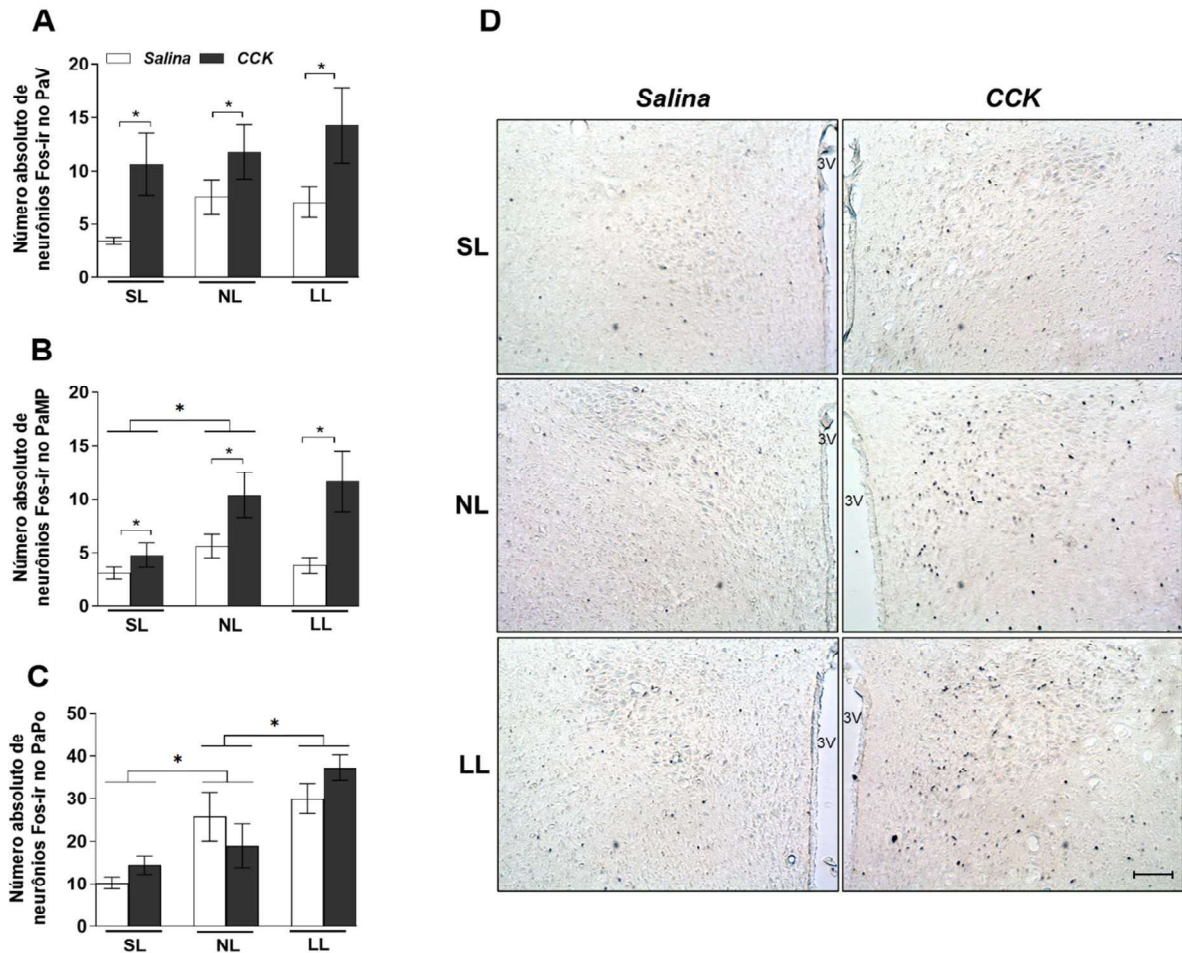
**Tabela 2** – Efeito dos fatores tamanho da ninhada, tratamento com colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) e interação entre os fatores na imunorreatividade de neurônios em núcleos cerebrais de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzida (SL), normal (NL) e expandida (LL).

	Fator tamanho da ninhada		Fator tratamento		Interação	
	$F_{1,24}$	$p$	$F_{1,24}$	$p$	tamanho da ninhada x tratamento	$p$
<b>SL/NL</b>						
AP	$F_{1,24} = 0,24$	0,628	$F_{1,24} = 8,19$	0,009	$F_{1,24} = 1,03$	0,321
NTS	$F_{1,29} = 0,75$	0,394	$F_{1,29} = 153,62$	<0,001	$F_{1,29} = 6,64$	0,015
PVN						
PaV	$F_{1,34} = 1,42$	0,242	$F_{1,34} = 6,70$	0,014	$F_{1,34} = 0,43$	0,516
PaMP	$F_{1,30} = 7,43$	0,011	$F_{1,30} = 4,64$	0,039	$F_{1,30} = 1,05$	0,314
PaPo	$F_{1,34} = 6,06$	0,019	$F_{1,34} = 0,10$	0,748	$F_{1,34} = 1,82$	0,187
ARC	$F_{1,25} = 1,73$	0,200	$F_{1,25} = 0,34$	0,564	$F_{1,25} = 0,99$	0,329
VMH	$F_{1,26} = 5,77$	0,024	$F_{1,26} = 0,026$	0,873	$F_{1,26} = 1,55$	0,224
DMH	$F_{1,24} = 8,01$	0,009	$F_{1,24} = 0,30$	0,587	$F_{1,24} = 0,039$	0,538
<b>LL/NL</b>						
AP	$F_{1,23} = 2,02$	0,169	$F_{1,23} = 25,09$	<0,001	$F_{1,23} = 0,00096$	0,975
NTS	$F_{1,25} = 0,76$	0,391	$F_{1,25} = 190,25$	<0,001	$F_{1,25} = 2,16$	0,154
PVN						
PaV	$F_{1,34} = 0,17$	0,682	$F_{1,34} = 5,70$	0,023	$F_{1,34} = 0,38$	0,542
PaMP	$F_{1,34} = 0,02$	0,884	$F_{1,34} = 11,39$	0,002	$F_{1,34} = 0,70$	0,41
PaPo	$F_{1,31} = 5,59$	0,025	$F_{1,31} = 0,002$	0,962	$F_{1,31} = 2,19$	0,149
ARC	$F_{1,26} = 0,013$	0,911	$F_{1,26} = 1,58$	0,219	$F_{1,26} = 0,75$	0,393
VMH	$F_{1,26} = 0,07$	0,799	$F_{1,26} = 0,43$	0,515	$F_{1,26} = 2,099$	0,159
DMH	$F_{1,24} = 0,25$	0,620	$F_{1,24} = 0,21$	0,650	$F_{1,24} = 0,045$	0,834

Análise Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Os efeitos foram calculados em comparação aos animais da ninhada normal (NL).

AP, Área Postrema; NTS, Núcleo do Trato Solitário; PVN, Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaV, subdivisão ventral do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaMP, subdivisão medial do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaPo, subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; ARC, Núcleo Arqueado do Hipotálamo; VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo; e DMH, Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo.

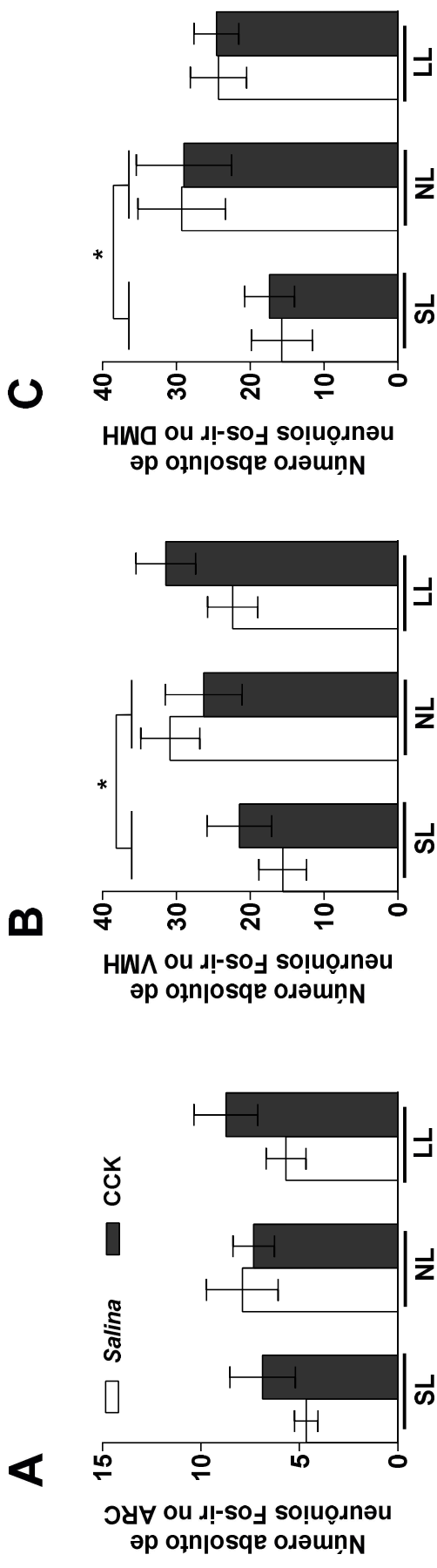
**Figura 7 – Efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal ao c-Fos nas subdivisões do PVN de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



Número de neurônios imunorreativos ao c-Fos nas subdivisões (A) PaV, (B) PaMP e (C) PaPo do PVN. (D) Fotomicrografias representativas (objetiva de 10x) de cortes coronais, apresentando a imunorreatividade no PVN. Barra de escala: 100 µm. Dados estão expressos como média ± E.P.M. para *two-way* ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-10$  animais/grupo).

PaV, subdivisão ventral do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaMP, subdivisão parvocelular medial do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaPo, subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; 3V, terceiro ventrículo.

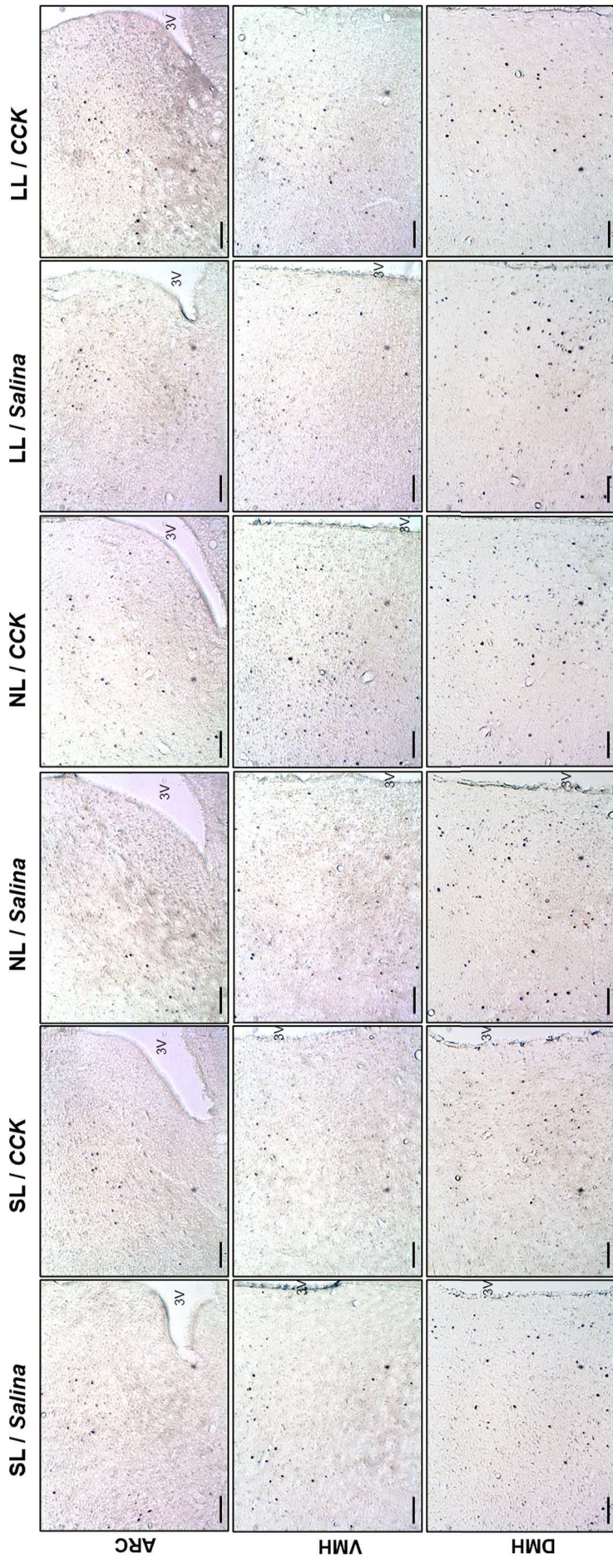
**Figura 8 – Efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal ao c-Fos em núcleos hipotalâmicos de ratos adultos da linhagem *Wistar* reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



Número de neurônios imunorreativos ao c-Fos no (A) ARC, (B) VMH e (C) DMH. Dados estão expressos como média ± E.P.M. para two-way ANOVA. \*p<0.05 (n=8-10 animais/grupo).

ARC, Núcleo Arqueado do Hipotálamo; VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo; e DMH, Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo.

**Figura 9 – Fotomicrografias representativas (objetiva de 10x) de cortes coronais, apresentando o efeito da colecistocinina (CCK; 10 µg/Kg) na imunorreatividade ao c-Fos nos núcleos Arqueado do hipotálamo (ARC), Ventromedial do hipotálamo (VMH) e Dorsomedial do hipotálamo (DMH) de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**

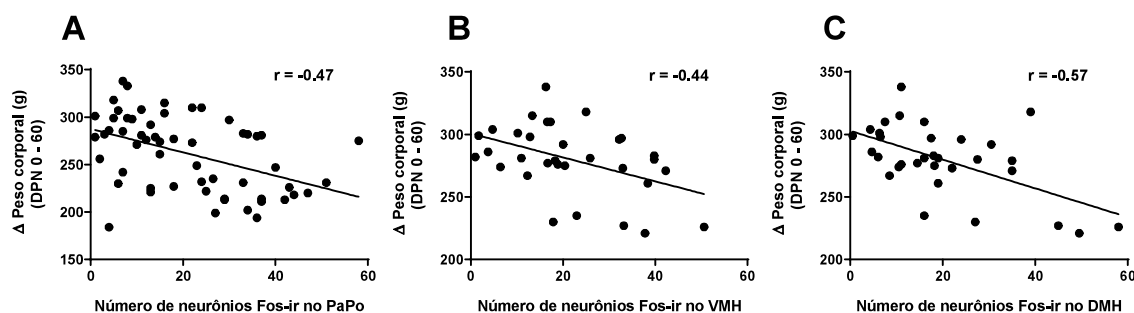


Barra de escala: 100 µm. 3V, terceiro ventrículo.

### 5.3.4 Análise das correlações

Considerando que os resultados do ganho de peso corporal dos animais SL, NL e LL (Fig. 4D) foram inversamente proporcionais à ativação neuronal na subdivisão PaPo do PVN (Fig. 7C), e que não houve efeito do tratamento (salina vs CCK) nessa região, o coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para todos os animais dos grupos SL, NL e LL. A análise revelou correlação negativa ( $r = -0,47$ ,  $p = 0,0002$ ; Fig. 10A) entre os resultados, em que a menor ativação neuronal no PaPo foi associada ao ganho de peso corporal aumentado em animais SL, e a maior ativação neuronal no PaPo foi associada ao ganho de peso corporal diminuído nos animais LL. Em relação ao VMH e DMH, houve efeito do tamanho da ninhada na ativação neuronal nesses núcleos na análise entre os grupos NL e SL, mas não para a comparação entre NL e LL, o que sugeriu que a ativação neuronal no VMH e DMH de animais NL e SL (Fig. 8B e C) também era inversamente proporcional ao ganho de peso corporal desses animais (Fig. 4D). Desta forma, o coeficiente de correlação de Pearson foi calculado para a análise entre ganho de peso corporal e atividade neuronal no VMH e DMH dos animais NL e SL, tanto salina quanto CCK, visto que não houve efeito de tratamento nesses núcleos. A análise também revelou correlação negativa entre os dados (VMH:  $r = -0,44$ ,  $p = 0,0115$ , Fig. 10B; DMH:  $r = -0,57$ ,  $p = 0,0006$ , Fig. 10C), indicando diminuição da ativação neuronal nestas áreas hipotalâmicas associada ao ganho de peso corporal aumentado observado nos animais SL.

**Figura 10 – Gráficos de dispersão demonstrando a relação entre o ganho de peso corporal (g) desde o nascimento até o DPN 60 de ratos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL) e imunorreatividade ao c-Fos em núcleos hipotalâmicos.**



Atividade neuronal na subdivisão PaPo do PVN de animais SL, NL e LL (A) e atividade neuronal no VMH (B) e no DMH (C) de animais SL e NL. PaPo, subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN); VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo; e DMH, Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo.

## 5.4 DISCUSSÃO

O período de lactação de roedores é considerado uma fase crucial para o desenvolvimento cerebral e a oferta nutricional durante esse período de vida pós-natal é um fator determinante para o estado metabólico na vida adulta. O presente estudo mostrou que a supernutrição neonatal, mas não a subnutrição, diminuiu o efeito hipofágico induzido pela CCK, bem como a ativação de neurônios do NTS e do PVN nos animais deste grupo.

Os resultados obtidos neste estudo indicaram que a supernutrição durante a lactação resultou em aumento do peso corporal em animais SL desde o período lactacional (DPN 7) até o início da vida adulta (DPN 60). Por outro lado, animais subnutridos apresentaram redução do peso corporal neste mesmo período, desde o DPN 7 até o DPN 60, em comparação aos animais controle. O fenótipo maior e mais pesado apresentado pelos animais SL é consistente com o encontrado em estudos prévios (DEBARBA *et al.*, 2020; ENES-MARQUES *et al.*, 2020; HALAH *et al.*, 2018; MARANGON *et al.*, 2020; SPENCER; TILBROOK, 2009). De acordo com revisão realizada por Remmers e Delemarre-van der Waal (2011) e Parra-Vargas *et al.* (2020), os efeitos a longo prazo induzidos pelos supernutrição são bem consistentes e estabelecidos entre os estudos, em que praticamente todos os animais criados em ninhada reduzida desenvolvem distúrbios metabólicos na vida adulta, sobrepeso/obesidade e aumento da adiposidade.

No caso da desnutrição, parece que o momento perinatal exato combinado com o grau de desnutrição desempenha um papel importante no fenótipo observado na vida adulta (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). A expansão do tamanho da ninhada no DPN 3, por exemplo, resultou na restrição reversível do crescimento acompanhado de *catch-up* completo (DEBARBA *et al.*, 2020; HALAH *et al.*, 2018), ao passo que a manipulação do tamanho da ninhada nos dois primeiros dias de vida mostrou que, apesar do *catch-up* incompleto após o desmame, o peso corporal e o índice de massa corporal animal permaneceram reduzidos ao longo da vida (REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008; VELKOSKA *et al.*, 2008). Tem-se, então, que quando há *catch-up* completo (ou até exacerbado) do peso corporal, a composição corporal dos animais é perturbada e deslocada para um fenótipo mais obeso. No entanto, se a recuperação for limitada, a composição corporal permanecerá reduzida ou semelhante ao normal. Ou seja,

parece provável que a capacidade de crescimento real dos órgãos e outros tecidos magros seja restringida pela restrição de crescimento inicial e, se houver recuperação além de um certo ponto, qualquer “crescimento” adicional será apenas em tecido adiposo (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Em resumo, insultos em diferentes fases do SNC podem provocar programações metabólicas diferentes ao interferir em conexões neurais específicas (OLIVEIRA *et al.*, 2011) e parece que a manipulação do tamanho da ninhada imediatamente após o nascimento resulta em um insulto mais pronunciado no reajuste da homeostase fisiológica, acarretando, assim, nos efeitos de programação reportados neste estudo.

Interessantemente, o ganho de peso corporal aumentado e reduzido após a super e a subnutrição, respectivamente, estava inversamente correlacionado com a ativação de neurônios da subdivisão posterior da região parvocelular do PVN. Essa área é conhecida por enviar projeções neurais ao tronco encefálico e neurônios espinais envolvidos na regulação autonômica (PALKOVITS, 1999). Desta forma, os dados obtidos sugerem que a programação nutricional neonatal altera a ativação de neurônios do PVN que enviam projeções descendentes para neurônios simpáticos pré-ganglionares na coluna intermediolateral, que modula o gasto energético, e pode contribuir, desta maneira, com as alterações no peso corporal observadas após a manipulação do tamanho da ninhada. Neste contexto, já foi descrito que a desnutrição teve efeito inibitório na atividade eferente do nervo vago em filhotes de desnutrição indireta (OLIVEIRA *et al.*, 2011), e aumentou a eficiência alimentar de animais LL (REMMERS *et al.*, 2008a) e o gasto energético de indivíduos com magreza constitucional, conseqüente ao aumento na atividade termogênica não relacionada ao exercício (BOSSU *et al.*, 2007). Portanto, essas adaptações nos sistemas de controle metabólico podem contribuir com o fenótipo dos animais de ninhadas expandidas visto neste estudo.

Além disso, em relação ao grupo SL, foi observada associação entre os dados de peso corporal aumentado e ativação neuronal diminuída no VMH e no DMH. O VMH também é conhecido por seu papel na homeostase energética (SUN *et al.*, 2021) via atividade simpática (LINDBERG; CHEN; LI, 2013). Portanto, a diminuição na atividade do VMH em animais SL poderia resultar em fluxo simpático reduzido. Essa hipótese está em acordo com a associação observada entre o fenótipo de sobrepeso apresentado por animais supernutridos durante o período neonatal e o aumento da atividade do nervo vago parassimpático (RODRIGUES *et al.*, 2022),

diminuição da atividade simpática no tecido adiposo marrom (TAM), bem como hipoatividade do mesmo (DE ALMEIDA *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2007) e gasto energético reduzido durante a infância (STEFANIDIS; SPENCER, 2012). Estudos prévios também descreveram o papel do DMH no controle do peso corporal. Dentre a gama de neuropeptídeos produzidos por este núcleo hipotalâmico, sabe-se que os neurônios do DMH que expressam acetilcolina (ACh), NPY, PrRP e os que expressam receptor de leptina também contribuem para a termogênese do tecido adiposo marrom (JEONG; LEE; JO, 2017). Assim, com base nessas evidências e os resultados apresentados neste estudo, tem-se que a supernutrição precoce está associada com a ativação reduzida de neurônios hipotalâmicos (PLAGEMANN, 2006), especificamente no PaPo, VMH e DMH, e com o aumento persistente no peso corporal, possivelmente como consequência de desajustes em conexões entre o SNC e sistema autonômico induzidos pelas alterações nutricionais no início da vida.

Sabe-se que a ativação de neurônios de núcleos hipotalâmicos induzida pela administração de CCK periférica é mediada por neurônios do NTS (KOBELT *et al.*, 2006; MANISCALCO; RINAMAN, 2013; SABATIER; LENG; MENZIES, 2013) via neurônios aferentes do nervo vago (RINAMAN, 2003). Curiosamente, ratos submetidos à desafereciação vagal cirúrgica apresentaram aumento na expressão de c-Fos no NTS após administração periférica de CCK, o que indica o envolvimento de outras vias, que não a vagal, na ativação do NTS mediada por CCK (BAPTISTA; BROWNING; TRAVAGLI, 2007), como a via mediada pela AP (MICHEL *et al.*, 2007). Em concordância com a literatura, o presente estudo demonstrou que a injeção IP de CCK aumentou o número de neurônios imunorreativos ao c-Fos tanto na AP quanto no NTS de animais das três ninhadas avaliadas. Considerando-se o envolvimento da AP na indução de náusea e vômito (SHINPO *et al.*, 2012), a ativação desta região levanta a possibilidade de que a redução da ingestão alimentar observada em animais NL e LL seja resultado, pelo menos em parte, de um mal-estar induzido pela CCK.

Animais de ninhada expandida apresentaram resposta preservada à administração periférica de CCK, observada pelo aumento da imunorreatividade ao c-Fos no NTS, bem como nas regiões PaV e PaMP do PVN, e pela redução do consumo alimentar 1 hora após a injeção de CCK, resultados estes semelhantes ao grupo NL. Em oposição aos dados observados, Lira *et al.* (2014) demonstraram que o estímulo alimentar provocou o aumento na ativação neuronal no NTS de animais com

desnutrição perinatal induzida pela restrição proteica, o que indica que diferentes paradigmas de desnutrição podem explicar a programação divergente das vias de saciedade e/ou que múltiplos sinais de saciedade além da CCK, incluindo uma combinação de sinais sensoriais orais e/ou de distensão gástrica (HAVEEL, 2001), podem exibir diferentes respostas em animais desnutridos. Curiosamente, animais LL, tanto tratados com salina quanto com CCK, apresentaram aumento do consumo alimentar acumulativo 2 horas após a administração de CCK, o que sugere que animais LL apresentam hiperfagia pós-jejum. Neste contexto, foi demonstrado que, quando em jejum, animais desnutridos jovens apresentam aumento na via de sinalização orexigênica em comparação aos animais NL, com aumento no conteúdo de neuropeptídeo Y (NPY) no ARC e no PVN (PLAGEMANN, A *et al.*, 1999), aumento na expressão de RNAm de NPY e da proteína relacionada ao Agouti (AgRP) no ARC (LÓPEZ *et al.*, 2005), e de pró-hormônio concentrador da melanina no hipotálamo lateral (LH) (REMMERS *et al.*, 2008b). Ainda, Ndjim *et al.* (2017) relatou que animais adultos submetidos à desnutrição perinatal apresentam um índice de saciedade da primeira refeição reduzida, bem como redução do intervalo entre a primeira e a segunda refeição, associado com alta liberação de CCK pós-prandial, o que indica que a alta concentração plasmática de CCK não foi eficiente em diminuir o consumo alimentar. Esse levantamento poderia explicar o aumento da ingestão alimentar cumulativa observada em animais LL do presente estudo nas duas primeiras horas de avaliação e, ainda, é consistente com evidências da literatura de que a desnutrição precoce atrasa o ponto de saciedade de animais (LIRA *et al.*, 2014). Até onde se sabe, este estudo é o primeiro a mostrar que o modelo de desnutrição neonatal induzida pelo aumento do tamanho da ninhada não afeta a hipofagia induzida pela CCK nem a ativação neuronal da AP, NTS e PVN.

Embora animais SL tenham apresentado resposta normal na AP em resposta à administração periférica de CCK, eles apresentaram diminuição da resposta hipofágica e da ativação neuronal do NTS e do PVN, mais especificamente, do PaMP, o que é semelhante aos resultados encontrados por Enes-Marques *et al.* (2020). Em conjunto, esses resultados descartam a possibilidade de que a redução da ativação do NTS mediada pela CCK pudesse ser devido à diminuição da resposta na AP. De encontro, a ausência de hipofagia e a menor ativação de neurônios do NTS induzida pela CCK no grupo SL sugerem que a supernutrição neonatal é responsável pela diminuição da responsividade à saciedade induzida pela CCK, mediada pelo

NTS, e não pela diminuição da responsividade ao mal-estar induzido pela CCK mediado pela AP. Além disso, estudos anteriores também mostraram que doses altas (10 µg/Kg, VOITS et al., 1996) e baixas de CCK (0,05 µg/Kg, ENES-MARQUES et al., 2020) reduziram a ingestão alimentar em condições normais, mas não em ratos SL, o que reforça os presentes resultados de que o sobrepeso induzido pela supernutrição durante a lactação prejudica as respostas relacionadas à saciedade induzidas por CCK.

Alterações na composição da microbiota intestinal (filo *Bacteroidetes* diminuído e *Firmicutes* aumentado) (LEY et al., 2005) têm sido investigadas como um potencial mecanismo pelo qual há perda da sinalização da CCK em modelos animais com obesidade induzida pela dieta, visto que a composição da microbiota e a diminuição das concentrações de ácidos graxos de cadeia curta no lúmen intestinal controlam o número de células I enteroendócrinas, bem como a expressão gênica de CCK e a permeabilidade intestinal. (CAWTHON; DE LA SERRE, 2021). Assim, considerando-se que animais SL também apresentam menor abundância de *Bacteroidetes* e um aumento proporcional do filo *Firmicutes* (RODRIGUES et al., 2022), é possível que a alteração da microbiota intestinal induzida pela supernutrição no período pós-natal possa estar contribuindo para a diminuição da sinalização da CCK na indução da saciedade.

Além disso, estudos recentes mostraram que o aumento da ingestão calórica em animais com obesidade induzida pela ninhada estava associado a uma menor expressão de c-Fos induzida pela CCK em neurônios do NTS (WALL; OLIVOS; RINAMAN, 2020), o que é compatível com a diminuição da estimulação pela CCK por neurônios aferentes vagais (DOCKRAY, 2012; STEINERT et al., 2017). De fato, a falta de resposta dos neurônios aferentes vagais já foi observada na obesidade induzida por dieta (AL HELAILI; PARK; BEYAK, 2020; DE LARTIGUE et al., 2011, 2012). Além disso, sabe-se que o modelo de obesidade neonatal induzida pela supernutrição leva à resistência à leptina, e que a leptina pode determinar a magnitude dos efeitos do CCK (DOCKRAY, 2012; WILLIAMS, 2019). Em concordância, de Lartigue et al. (2012) demonstraram que a resistência à leptina em neurônios aferentes vagais inibe a sinalização da CCK e saciedade em ratos com obesidade induzida pela dieta e Marangon et al. (2020) relataram que ratos SL apresentaram ausência de efeitos anorexígenos quando desafiados com leptina exógena. Assim, é provável que a redução na ativação vagal ascendente e as ações prejudicadas de outros sinais

relacionados à alimentação possam contribuir para a redução observada no número de neurônios imunorreativos no NTS e, conseqüentemente, na resposta do PVN à CCK no grupo SL. Em conjunto, esses dados sugerem que o sobrepeso induzido pela mudança no tamanho da ninhada pode diminuir a resposta hipofágica da CCK ao reduzir a ativação do NTS e sub-regiões do PVN.

Os sinais integrados no NTS projetam-se diretamente para o hipotálamo (LO *et al.*, 2014) e a expressão de receptores já CCK foi detectada em vários núcleos hipotalâmicos. No entanto, não foi observada alterações na imunorreatividade ao c-Fos no VMH, DMH e ARC em animais SL, NL ou LL em resposta à injeção de CCK no presente estudo. De maneira semelhante, Enes-Marques *et al.* (2020) também relataram a ausência de ativação neuronal no VMH em resposta à CCK nos grupos NL e SL, mas, ao contrário das presentes observações, houve o aumento no número de neurônios imunorreativos ao c-Fos no ARC e DMH de animais NL após o tratamento com CCK. De acordo com Pirnik *et al.* (2010), a CCK administrada sozinha não afeta a atividade neuronal no ARC e VMH. Em concordância, Kobelt *et al.* (2006) e Noetzel *et al.* (2009) constataram que não houve influência da CCK no VMH e ARC de ratos Sprague Dawley. Além disso, a CCK administrada isoladamente via intracerebroventricular não alterou o número de neurônios responsivos ao c-Fos no ARC de ratos Long-Evans que foram mantidos com ração ou alimentados com dieta tanto com baixo quanto alto teor de gordura (LO *et al.*, 2014). Com base nisso, o presente estudo sugere que, nas condições testadas, o VMH, DMH e ARC não foram os principais núcleos hipotalâmicos de atuação da CCK para promover a saciedade. Assim, este estudo fornece evidências de que a CCK afetou o tronco encefálico e o hipotálamo de forma diferenciada, dependendo dos núcleos avaliados, e que os sinais de saciedade induzidos pela CCK ocorreram preferencialmente via NTS e PVN.

Em resumo, os presentes dados demonstraram que o desequilíbrio na disponibilidade de alimentos no período neonatal, induzido pela alteração do tamanho da ninhada, pode alterar as dimensões corporais, como peso corporal e índice de Lee, e induzir ajustes adaptativos em núcleos hipotalâmicos. Além disso, mudanças na nutrição neonatal podem alterar a capacidade de resposta da prole à CCK na homeostase energética na vida adulta. Em especial, animais supernutridos não apresentaram resposta hipofágica e tiveram menor ativação neuronal nos neurônios do NTS e PVN em resposta à CCK. Desta forma, sugere-se que o excesso

de nutrientes durante o desenvolvimento neonatal, mas não a falta de nutrientes, pode levar à interrupção da sinalização da CCK. Além disso, os efeitos preservados da CCK em animais desnutridos sugerem que os mecanismos subjacentes às respostas de saciedade induzidas pela CCK podem ser perturbados de maneira diferente, dependendo do desequilíbrio nutricional neonatal.

## 6 ESTUDO 2 – A PROGRAMAÇÃO PELA SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL REDUZ A RESPOSTA HIPOFÁGICA E A ATIVIDADE NEURONAL NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO E HIPOTÁLAMO INDUZIDAS PELO LIPOPOLISSACARÍDEO EM RATOS ADULTOS.

Parte dos resultados deste estudo serão submetidos no artigo intitulado “**Neonatal overnutritional programming impairs the hypophagic effects and neuron activation of the Nucleus of the Solitary Tract and hypothalamus to acute LPS in adult male rats**” para a revista *Nutritional Neuroscience*, ISSN: 1476-8305 (web), disponível no Anexo C.

### 6.1 INTRODUÇÃO

O fenótipo de um indivíduo ou animal pode ser moldado pelas condições ambientais existentes em fases críticas do desenvolvimento, incluindo os períodos peri concepcionais, pré-natais e pós-natal (SÁNCHEZ-GARRIDO; GARCÍA-GALIANO; TENA-SEMPERE, 2022). Após o nascimento, os metabolismos fetal e materno estão ligados exclusivamente via aleitamento, de forma que experiências nutricionais neste período do início da vida têm consequências importantes para o crescimento e desenvolvimento corporal e também para a saúde da prole (XAVIER *et al.*, 2019), protegendo-a contra algumas patologias, especialmente as endócrinas e metabólicas (FRANCISCO *et al.*, 2018). Neste contexto, as Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD) propõem que insultos ambientais durante o início da vida alteram o desenvolvimento normal e o estado metabólico e da saúde de um animal a longo prazo (PARRA-VARGAS *et al.*, 2020; PLAGEMANN *et al.*, 2012; SÁNCHEZ-GARRIDO; GARCÍA-GALIANO; TENA-SEMPERE, 2022).

O estágio de desenvolvimento correspondente ao período de lactação na vida de um rato é considerado um momento crítico para a gênese, migração e diferenciação de células do Sistema Nervoso Central (SNC) (LESAGE *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2011; VIEAU *et al.*, 2007). Nesse contexto, a manipulação do tamanho da ninhada tem sido utilizada para estudar os efeitos de curto e longo prazo da nutrição neonatal, a chamada programação metabólica. Sabe-se que o tamanho reduzido da ninhada durante o período de amamentação leva à supernutrição devido

à redução da competição pelo leite e ao aumento da ingestão calórica (RIBEIRO *et al.*, 2017). Portanto, animais criados em ninhada deste tamanho apresentam aumento de peso corporal ao desmame (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012; PLAGEMANN, A *et al.*, 1999) e na idade adulta (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2022). Por outro lado, a restrição alimentar neonatal, por meio do aumento do tamanho da ninhada, aumenta a competição pelo leite e reduz o total de calorias disponíveis para cada filhote (PATEL; SRINIVASAN, 2011). Assim, ratos mantidos em ninhadas expandidas durante a lactação permanecem pequenos e magros até a vida adulta (REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008; VELKOSKA *et al.*, 2008). Já foi demonstrado que os neurônios hipotalâmicos são altamente vulneráveis a distúrbios hormonais e metabólicos durante os períodos críticos de diferenciação e maturação perinatal (PLAGEMANN *et al.*, 1998) e que fatores ambientais, como a quantidade de leite disponível para cada filhote, podem alterar os processos neuroinflamatórios (RADLER; HALE; KENT, 2014). Debarba *et al.* (2020) demonstraram que animais de ninhadas reduzidas e expandidas exibiram aumento na expressão de genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) no desmame e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) na vida adulta. Além disso, foi reportado que a obesidade tanto prejudica a capacidade do sistema imunológico de responder adequadamente à infecção bacteriana (KRISTENSEN *et al.*, 1998) quanto regula positivamente a cascata inflamatória frente a um desafio imunológico (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012). Por outro lado, a desnutrição pré-natal está associada ao prejuízo das funções imunológicas, aumento do risco de sepse induzida por infecção e aumento da atividade do sistema imunológico inato em humanos e em modelos de roedores (CHANDRA, 2002).

A administração do lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, é utilizada para mimetizar processos inflamatórios (RORATO *et al.*, 2009). Esta endotoxina estimula as vias de sinalização intracelular através do reconhecimento pelos receptores Toll-Like 4 (TLR-4) (CRUZ-MACHADO, 2010) e ativa o fator nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B) a fim de induzir a resposta inflamatória (DESAI *et al.*, 2009) mediada por citocinas pró-inflamatórias, particularmente a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e o TNF (GAVRILOV; PEREKREST; NOVIKOVA, 2008; SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004). Essas citocinas podem atuar em receptores cerebrais para ativar o comportamento doentio (GAVRILOV; PEREKREST; NOVIKOVA, 2008; SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004),

caracterizado por balanço energético negativo, aumento da termogênese e anorexia (SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004). Evidências observadas por Borges *et al.* (2011) e Gautron *et al.* (2005) revelaram que o LPS diminui o apetite de roedores e que esse efeito envolve alterações neuroquímicas centrais. Corroborando esses estudos, foi demonstrado que a inflamação sistêmica desencadeada pela injeção de LPS envolveu a ativação coordenada de áreas encefálicas, como o tronco cerebral (BORGES *et al.*, 2014; KLOSS *et al.*, 2001) e os núcleos arqueado (ARC), dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH) (BORGES *et al.*, 2014; GAUTRON *et al.*, 2005; GAVRILOV; PEREKREST; NOVIKOVA, 2008) e paraventricular do hipotálamo (PVN) (BORGES *et al.*, 2014; CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012; GAUTRON *et al.*, 2005; GAVRILOV; PEREKREST; NOVIKOVA, 2008).

Sabe-se que a manipulação do tamanho da ninhada causa alterações na estrutura e na função de áreas hipotalâmicas que podem afetar a resposta a estímulos anorexígenos (PLAGEMANN, A *et al.*, 1999). No quadro da supernutrição neonatal, Ziko *et al.* (2014) observaram que a resposta ao LPS de animais adultos superalimentados no período neonatal estava comprometida, o que foi constatado pelo aumento na expressão gênica hipotalâmica de TLR-4 e TNF- $\alpha$  duas horas após a administração de uma dose baixa de LPS, diferente da cinética exibida por animais com nutrição normal. Com relação ao comportamento alimentar, uma baixa dose de LPS reduziu a ingestão de alimentos em grau semelhante entre fêmeas SL e controle, mas mais intensamente em machos SL (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012). Por outro lado, ratos desnutridos no período pré-natal exibiram uma resposta febril mais intensa (IWASA *et al.*, 2015) e também maior expressão de RNAm hipotalâmico de TNF- $\alpha$  em resposta ao LPS do que ratos controles (IWASA *et al.*, 2016). No entanto, até onde se sabe, nenhum efeito do LPS na ingestão de alimentos de ratos submetidos à subnutrição pós-natal foi relatado. Assim, o presente estudo explorou a hipótese de que a exposição a um ambiente de super ou subnutrição durante a lactação, por meio da manipulação do tamanho da ninhada, poderia modular a resposta hipofágica e a atividade neuronal do SNC a uma dose moderada de LPS na prole masculina adulta.

## 6.2 MÉTODOS

### 6.2.1 Animais

Ratos machos e fêmeas foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL. Após o período de aclimação e acasalamento, as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais, com acesso livre à água de torneira e ração peletizada (Nuvilab CR1, Nuvital®). A partir do 20º dia gestacional, a presença de filhotes foi verificada diariamente e o primeiro dia de vida dos filhotes foi designado dia pós-natal (DPN) 0. Nas primeiras 24h após o nascimento, filhotes machos e fêmeas foram alocados em ninhadas reduzidas (SL, do inglês *small litter* – 3 filhotes por matriz, 2 machos e 1 fêmea), normais (NL, do inglês *normal litter* – 10 filhotes por matriz, 5 machos e 5 fêmeas) ou expandidas (LL, do inglês *large litter* – 16 filhotes por matriz, 8 machos e 8 fêmeas). Quando necessário, filhotes nascidos no mesmo dia foram transferidos de uma ninhada para outra a fim de atingir o número de filhotes necessário em cada ninhada e manter a proporção entre machos e fêmeas. Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. Foram utilizados, para cada protocolo experimental, um total de 10 ninhadas NL, 8 LL e 26 SL, de forma que em cada protocolo experimental houvesse animais de pelo menos cinco ninhadas diferentes. Apenas os filhotes machos foram avaliados neste estudo; as fêmeas utilizadas para atingir a proporção entre machos e fêmeas nas ninhadas foram submetidas à eutanásia no dia do desmame.

Os animais foram separados da matriz no DPN 21 (desmame) e, a partir de então, foram mantidos em gaiolas coletivas em grupos de quatro a cinco animais da mesma ninhada experimental até o DPN 60. Eles foram mantidos em condições controladas e adequadas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), com acesso livre à água de torneira e ração peletizada (Nuvilab CR1, Nuvital®), salvo quando especificado o contrário. Todos os protocolos experimentais foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas da UEL, tendo início às 08h do DPN 60. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação (CEUA/UEL), com o número de protocolo 18310.2019.03 (Anexo A).

### 6.2.2 Avaliação do efeito do tamanho da ninhada em parâmetros biométricos e no índice de Lee

O peso corporal dos filhotes foi monitorado no nascimento e nos DPN 3, 7, 10, 14, 17 e 21. Após o desmame, o peso corporal foi aferido a cada 5 dias até o DPN 60. O peso corporal foi expresso em gramas (g). A distância naso-anal dos animais foi mensurada no dia do desmame e no DPN 60. O índice de Lee, expresso em  $g^{1/3}/cm$ , também foi avaliado nos DPN 21 e 60. Ele foi calculado considerando-se a raiz cúbica do peso corporal em gramas em razão do comprimento naso-anal em centímetros (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

### 6.2.3 Droga

No DPN 60, os animais foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS, extraído de *Escherichia coli*; Sigma, Sorotipo 026:B6; 500  $\mu g/Kg$  de peso corporal) em dose única via intraperitoneal (IP), tendo como veículo de diluição salina estéril 0,9% (NaCl 0.9%, 0,2 mL/100 g de peso corporal). A dose utilizada foi selecionada com base em doses previamente utilizada em estudos anteriores (IWASA *et al.*, 2016; RORATO *et al.*, 2009).

### 6.2.4 Avaliação dos efeitos do LPS no consumo alimentar de ratos SL, NL e LL

Para avaliar a resposta anorexigênica do LPS, no DPN 58, os animais de ninhadas SL, NL e LL foram transferidos para gaiolas individuais para aclimação. No DPN 60, após 16h de jejum noturno, eles receberam uma injeção via IP de LPS (500  $\mu g/Kg$ ) ou salina estéril (NaCl 0.9%; 0,2 mL/100 g de peso corporal). A ração peletizada foi reapresentada aos animais 15 minutos após o tratamento. A ingestão alimentar foi, então, quantificada (g/100 g de peso corporal) após 1h, 2h e 24h. Ao final do protocolo experimental, todos os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação.

### 6.2.5 Avaliação dos efeitos do LPS na ativação neuronal no tronco encefálico e no hipotálamo de animais SL, NL e LL

No DPN 60, após 16h de jejum noturno, os animais SL, NL e LL foram tratados via IP com LPS (500 µg/Kg) ou salina estéril (NaCl 0.9%; 0,2 mL/100 g de peso corporal). Após 90 minutos, os animais foram anestesiados com ketamina (IP, 100 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/Kg) e submetidos à cirurgia de transfusão cerebral transcárdica. Foram perfundidos inicialmente 200 mL de solução salina isotônica gelada [0,15 molar (M)] contendo heparina (diluição 1:80), seguidos de 400 mL de solução paraformaldeído 4% em tampão fosfato (TF, pH 7,4), a uma taxa de fluxo de 10 mL por minuto em um sistema de perfusão aberto e sem recirculação. No final, os cérebros coletados foram pós-fixados em paraformaldeído 4% durante 1 hora e depois estocados em solução TF contendo 30% de sacarose a 4 °C. Com o auxílio do criostato Leica, os cérebros foram cortados em seções coronais de 30 µm e os cortes foram preservados em solução crioprotetora a -20 °C.

Para a análise de imunorreatividade ao c-Fos, os cortes foram primeiramente lavados com TF 0,01 M. Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução TF 0,1 M contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%) e Triton (0,3%), e das ligações inespecíficas soro normal de cabra. Na sequência, foi aplicada a solução de anticorpo primário diluído (anticorpo anti-c-Fos; Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, EUA; 1:15.000 em solução TF 0,1 M contendo 1,5% de soro normal de cabra e 0,3% de Triton) por 48 horas a 4 °C. Depois de três lavagens em TF 0,01 M, os cortes foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente com imunoglobulina *anti-rabbit* marcada com biotina de cabra (Invitrogen, Rockford, IL, EUA; 1:200 em solução TF 0,1 M contendo 1,5% de soro normal de cabra). Posteriormente, os cortes foram incubados por 1 hora em temperatura ambiente com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain 1:200 em TF, Vector Laboratories), empregando cloridrato de diaminobenzidina (DAB, Sigma CO., Ca, EUA, 0,01%) intensificado com sulfato de níquel amônio a 1% como cromógeno. Por fim, os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos ao ar durante a noite, desidratados em xilol e colocados sob lamínula com *Entellan* (Nova Jersey, EUA).

Os núcleos do tronco encefálico e do hipotálamo foram identificados com base no atlas de cérebro de rato de Paxinos e Watson (2006) e a contagem de cada área foi realizada bilateralmente em 7 cortes para AP e NTS, 5 cortes para PaV

e PaMP, 2 cortes para PaPo, 15 cortes para ARC, 12 cortes para VMH e 5 cortes para DMH e realizada em oito a dez animais de cada grupo experimental. A AP e o NTS foram considerados em -13,68 a -14,08 mm do bregma (Fig. 3A). As subdivisões parvocelular medial (PaMP) e ventral (PaV) do PVN foram consideradas em -1.72 a -1.92 mm, e a subdivisão parvocelular posterior (PaPo) do PVN foi considerada em -2,04 mm do bregma (Fig. 3B). Os núcleos ARC e VMH foram considerados em -2,16 a -3,36 mm e o DMH foi considerado em -2,92 a -3,36 mm do bregma (Fig. 3B). Os neurônios imunorreativos ao c-Fos foram quantificados manualmente com o auxílio de um sistema de imagem acoplado ao microscópio. O limiar para coloração positiva foi estabelecido individualmente de maneira cega às condições experimentais.

#### 6.2.6 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e de homogeneidade de Levene. Considerando que o objetivo deste estudo foi comparar os efeitos da super e subnutrição nos parâmetros avaliados com um grupo controle (tamanho normal da ninhada), e não comparar os modelos de tamanho de ninhada divergentes entre si (SL vs LL), todas as comparações foram realizadas com o grupo NL (SL vs NL e LL vs NL). Diferenças significativas para os dados de peso corporal e de ingestão alimentar entre os grupos foram avaliadas pelo teste de ANOVA de medidas repetidas (ANOVA MR), seguido pelo pós-teste de Sidak para medidas repetidas. O teste t de *Student* foi utilizado para análise do ganho de peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee. Para avaliar a interação entre a variável grupo (tamanho da ninhada) e tratamento (LPS ou solução salina) na atividade neuronal, foi realizada a análise por ANOVA de duas vias, seguida do teste post hoc de Tukey. Os dados foram analisados usando GraphPad Prism 7.00, Sigma Plot 11.0 (para *two-way* ANOVA) e IBM SPSS Statistic 22 (para *three-way* ANOVA). Os resultados obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## 6.3 RESULTADOS

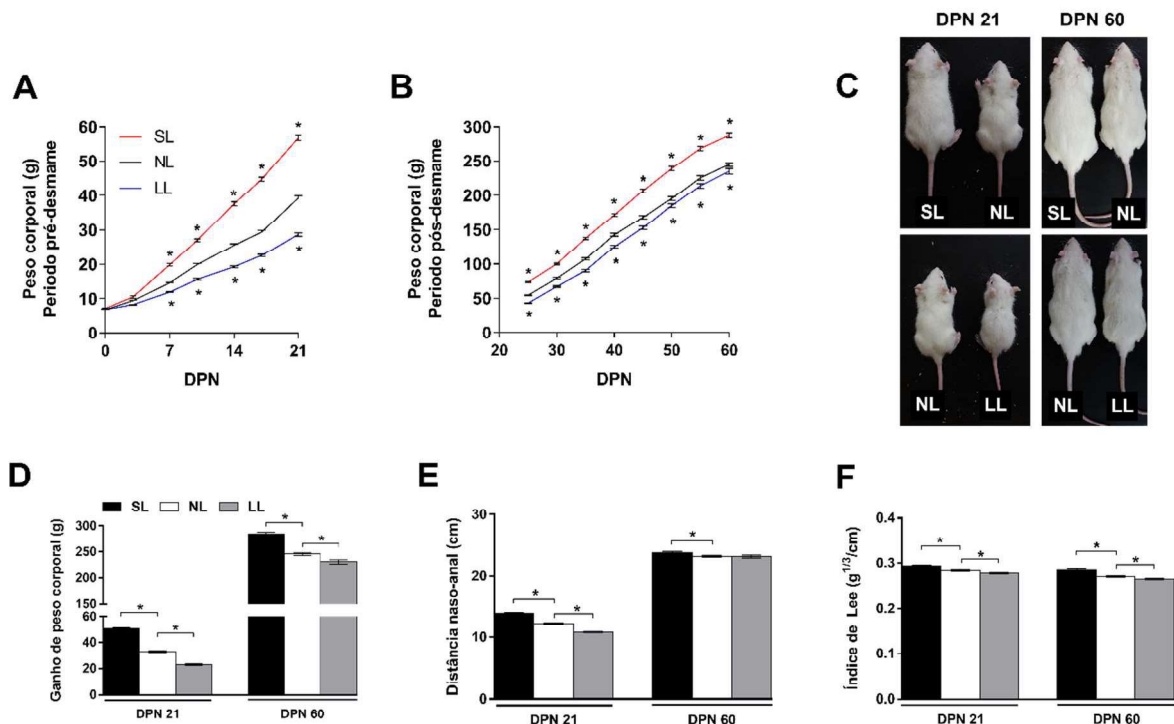
### 6.3.1 Efeito do tamanho da ninhada no peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee

Os efeitos do tamanho da ninhada nos parâmetros biométricos de animais SL, NL e LL estão apresentados na Figura 11. No DPN 60, uma parte desses animais foi designada para o protocolo de avaliação da ingestão alimentar e a outra parte para os experimentos de avaliação da atividade neuronal (exibidos nas Fig. 12 e de 13 a 16, respectivamente). Como observado na Fig. 11A e B e na imagem representativa em 8C, os animais submetidos à supernutrição neonatal apresentaram maior peso corporal do que os animais de ninhada NL desde o período lactacional, no DPN 7, até o início da vida adulta, no DPN 60 (ANOVA MR; período lactacional: fator idade:  $F_{6, 468} = 3 868$ ,  $p < 0,0001$ ; fator tamanho da ninhada:  $F_{1, 78} = 326,7$ ,  $p < 0,0001$ ; interação:  $F_{6, 468} = 198,3$ ,  $p < 0,0001$ ; período pós-desmame: fator idade:  $F_{7, 546} = 4 466$ ,  $p < 0,0001$ ; fator tamanho da ninhada:  $F_{1, 78} = 148,6$ ,  $p < 0,0001$ ; interação:  $F_{7, 546} = 21,24$ ,  $p < 0,0001$ ). A subnutrição neonatal, por outro lado, resultou em menor peso corporal dos animais LL desde o período lactacional, no DPN 7, até o início da vida adulta, no DPN 60, em comparação aos animais NL (Fig. 11A, B e C; ANOVA MR; período lactacional: fator idade:  $F_{6, 450} = 2 385$ ,  $p < 0,0001$ ; fator tamanho da ninhada:  $F_{1, 75} = 194,8$ ,  $p < 0,0001$ ; interação:  $F_{6, 450} = 83,46$ ,  $p < 0,0001$ ; período pós-desmame: fator idade:  $F_{7, 525} = 3 887$ ,  $p < 0,0001$ ; fator tamanho da ninhada:  $F_{1, 75} = 23,48$ ,  $p < 0,0001$ ; interação:  $F_{7, 525} = 1,804$ ,  $p = 0,084$ ).

No desmame, os animais SL apresentaram aumento do ganho de peso corporal [ $t(78) = 15,88$ ,  $p < 0,0001$ , Fig. 11D], do comprimento naso-anal [ $t(78) = 7,511$ ,  $p < 0,0001$ , Fig. 11E] e do índice de Lee [ $t(78) = 2,684$ ,  $p = 0,0089$ , Fig. 11F], enquanto os animais LL apresentaram diminuição dos valores desses parâmetros [ganho de peso corporal:  $t(78) = 12,98$ ,  $p < 0,0001$ , Fig. 11D, distância naso-anal:  $t(78) = 8,081$ ,  $p < 0,0001$ , Fig. 11E; índice de Lee:  $t(78) = 2,199$ ,  $p = 0,0308$ , Fig. 11F], em comparação ao grupo NL. No DPN 60, os animais SL permaneceram com o ganho de peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee aumentados [ganho de peso corporal:  $t(78) = 8$ ,  $p < 0,0001$ , Fig. 11D; distância naso-anal:  $t(78) = 2,608$ ,  $p = 0,0109$ , Fig. 11E; índice de Lee:  $t(78) = 4,778$ ,  $p < 0,0001$ , Fig. 11F] em relação aos controles

NL. E os animais LL aos 60 dias de vida continuaram a apresentar ganho de peso corporal [t(78) = 2,807,  $p = 0,0063$ ; Fig. 11D] e índice de Lee reduzidos [t(78) = 3,187,  $p = 0,0021$ ; Fig. 11F] em comparação ao grupo NL, mas não houve mais diferença significativa entre o comprimento naso-anal dos animais LL e NL [t(78) = 0,172,  $p = 0,864$ ; Fig. 11E].

**Figura 11 – Efeito do tamanho da ninhada no peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee de ratos *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



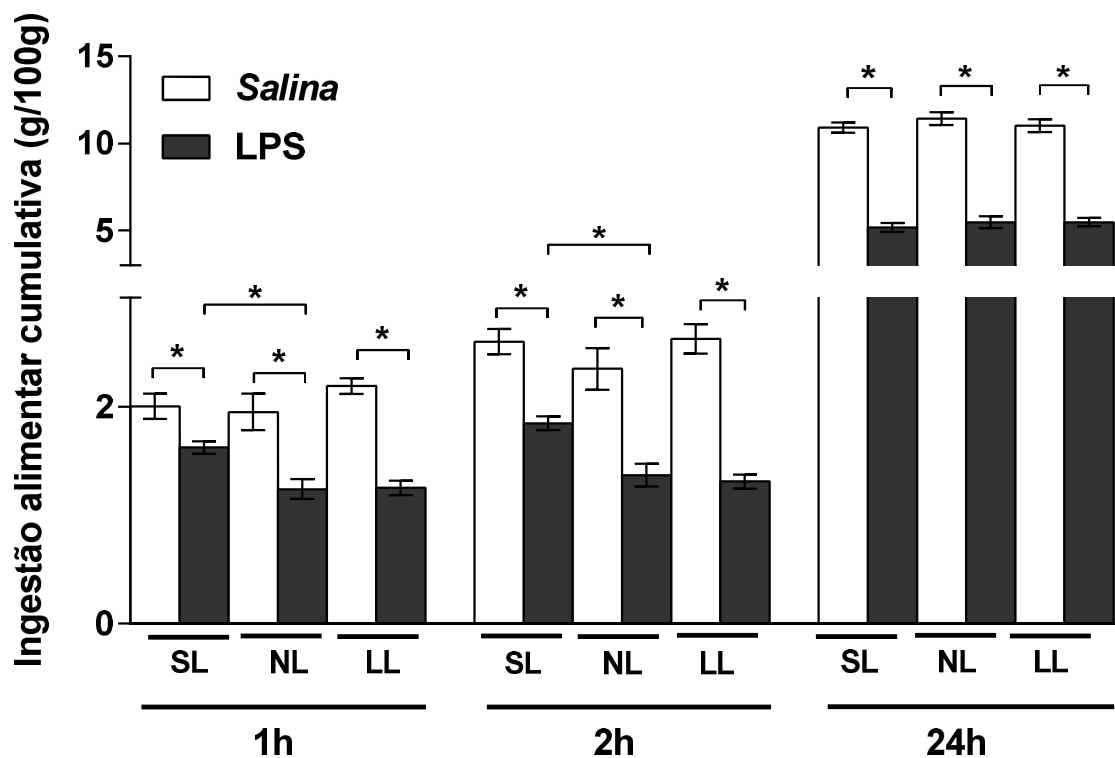
Curva de peso corporal (g) durante o período pré-desmame (A) e pós-desmame (B) das ninhadas. D. Ganho de peso corporal (g). E. Distância naso-anal (cm). F. Índice de Lee ( $g^{1/3}/cm$ ). Dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para análise de ANOVA para medidas repetidas (curva de peso corporal) e teste t de *Student* (ganho de peso corporal, distância naso-anal e índice de Lee). \* $p < 0.05$  versus NL (n = 40 animais/grupo). C. Imagem representativa de um animal de cada ninhada no DPN 21 e 60.

### 6.3.2 Efeito do LPS na ingestão alimentar de animais SL, NL e LL

O efeito na injeção IP de LPS no consumo alimentar de animais SL, NL e LL está apresentado na Figura 12 e a interpretação estatística na Tabela 3. A análise de *three-way* ANOVA para medidas repetidas revelou que o tratamento com LPS reduziu significativamente o consumo alimentar de animais SL (1 h:  $p = 0,022$ ; 2 e 24 h:  $p < 0,0001$ ), NL (1, 2 e 24 h:  $p < 0,0001$ ) e LL (1, 2 e 24 h:  $p < 0,0001$ ) nos três

momentos avaliados. Uma e duas horas após o tratamento, os animais SL tratados com LPS apresentaram maior ingestão alimentar do que os animais NL tratados com LPS (1 h:  $p = 0,029$ ; 2 h:  $p = 0,013$ ). A ingestão alimentar dos animais LL não foi alterada pelo fator tamanho da ninhada em nenhum dos momentos avaliados no estudo.

**Figura 12 – Efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) na ingestão alimentar (g/100g peso corporal) de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



Dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para RM *Three-way* ANOVA. \* $p < 0.05$  (n=8-12 animais/grupo).

**Tabela 3** – Efeito dos fatores tempo, tamanho da ninhada e tratamento com lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) e interação entre fatores na análise de ingestão alimentar de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzida (SL), normal (NL) e expandida (LL).

Fator tempo		Fator tamanho da ninhada		Fator tratamento		Interação tempo x tamanho da ninhada x tratamento	
<b>SL/NL</b>	<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>		<i>p</i>
F <sub>2,48</sub> = 1056,29	<0,0001	F <sub>1,49</sub> = 0,124	0,726	F <sub>1,49</sub> = 233,95	<0,0001	F <sub>2,98</sub> = 0,039	0,961
<b>LL/NL</b>							
F <sub>2,40</sub> = 850,558	<0,0001	F <sub>1,41</sub> = 0,003	0,953	F <sub>1,41</sub> = 266,38	<0,0001	F <sub>2,82</sub> = 1,14	0,325

Análise *three-way* ANOVA de medidas repetidas, seguida de pós teste de Sidak. Os efeitos foram calculados em comparação aos animais da ninhada normal (NL).

### 6.3.3 Efeito do LPS na ativação neuronal em ratos SL, NL e LL

A interpretação da análise estatística do efeito do LPS na ativação neuronal de animais SL, NL e LL está apresentada na Tabela 4, e as fotomicrográficas representativas nas Figuras 13, 14 e 16. A análise por *two-way* ANOVA revelou efeito do tratamento (LPS ou salina), observado pelo aumento no número de neurônios c-Fos-ir, na AP, no NTS, nas subdivisões PaV e PaMP do PVN, e no ARC (Fig. 13A e B, Fig. 14A e B e Fig. 15A, respectivamente) em animais SL, NL e LL após a administração periférica de LPS, em comparação ao tratamento com salina. Também houve efeito do tratamento (LPS ou salina) no DMH de animais NL e LL, observado pela diminuição no número de neurônios marcados com c-Fos mediada pelo LPS neste núcleo (Fig. 15C e Tabela 4), em comparação aos respectivos grupos salina. Animais SL tratados com salina apresentaram menor ativação neuronal no DMH quando comparados aos animais NL salina, indicativo de interação entre tratamento (LPS ou salina) e tamanho da ninhada (SL e NL), sem efeito do tamanho da ninhada ou do tratamento neste núcleo (Fig. 15C e Tabela 4). Houve efeito do tamanho da ninhada (SL e NL) e tratamento (LPS ou salina), sem interação (Tabela 4), no NTS e na subdivisão PaMP de animais SL tratados com salina ou LPS (Fig. 13B e 11B, respectivamente), observado pela diminuição da atividade neuronal nesses núcleos em comparação aos animais NL. Animais SL tratados com salina ou LPS também

apresentaram menor ativação neuronal no VMH (Fig. 15B), em relação ao grupo NL, o que indica efeito do tamanho da ninhada neste núcleo (Tabela 4). O tamanho da ninhada também alterou a imunorreatividade ao c-Fos na subdivisão PaPo do PVN, tanto em animais SL quanto LL (Fig. 14C). Os animais SL apresentaram menor ativação neuronal nessa região, enquanto animais LL apresentaram maior ativação neuronal, em comparação aos animais NL. Não houve efeito do tratamento (LPS ou salina) nessa região (Tabela 4).

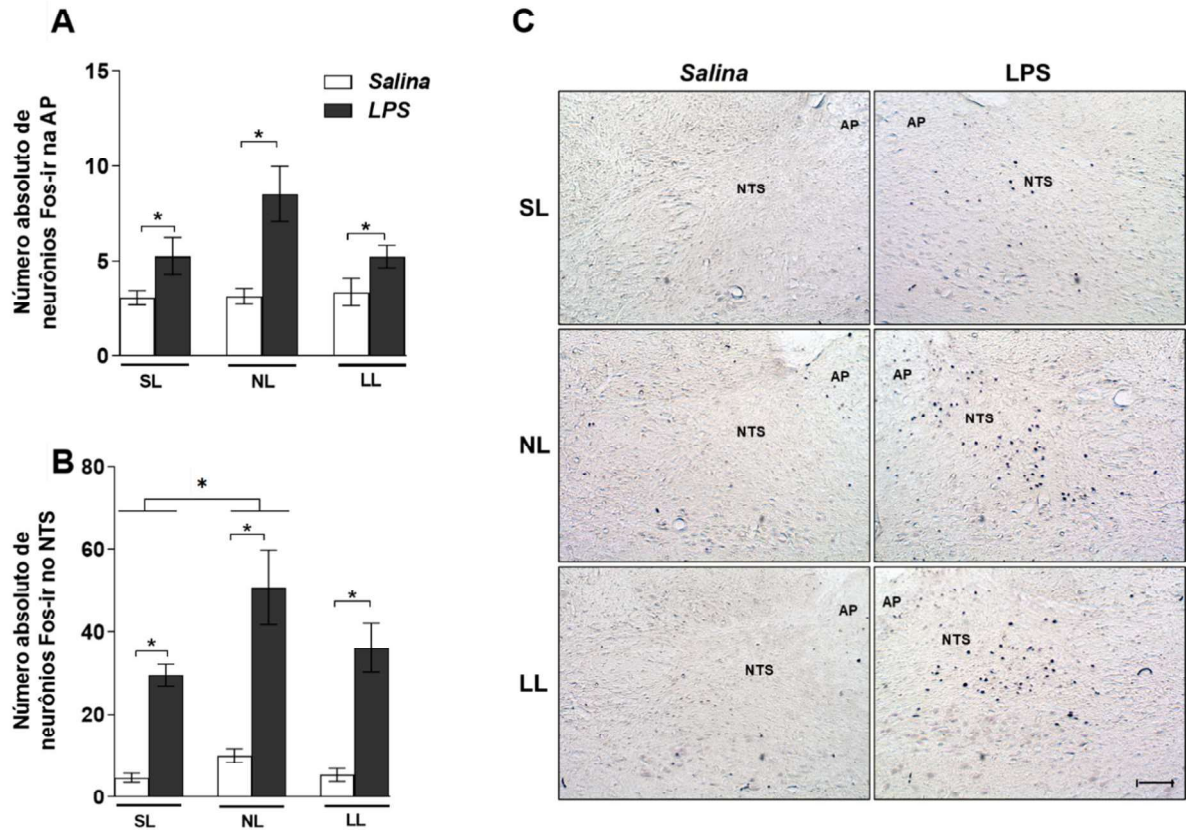
**Tabela 4** – Efeito dos fatores tamanho da ninhada, tratamento com lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) e interação entre os fatores na imunorreatividade de neurônios em núcleos cerebrais de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzida (SL), normal (NL) e expandida (LL).

	Fator tamanho da ninhada		Fator tratamento		Interação	
	$F_{1,24}$	$p$	$F_{1,24}$	$p$	tamanho da ninhada x tratamento	$p$
SL/NL						
AP	$F_{1,24} = 3,45$	0,076	$F_{1,24} = 21,74$	< 0,001	$F_{1,24} = 2,07$	0,163
NTS	$F_{1,30} = 8,42$	0,007	$F_{1,30} = 94,60$	< 0,001	$F_{1,30} = 0,48$	0,493
PVN						
PaV	$F_{1,31} = 0,004$	0,949	$F_{1,31} = 11,96$	0,002	$F_{1,31} = 0,20$	0,660
PaMP	$F_{1,28} = 5,46$	0,027	$F_{1,28} = 29,41$	< 0,001	$F_{1,28} = 3,73$	0,064
PaPo	$F_{1,26} = 4,84$	0,037	$F_{1,26} = 0,14$	0,715	$F_{1,26} = 0,07$	0,793
ARC	$F_{1,29} = 0,53$	0,471	$F_{1,29} = 34,68$	< 0,001	$F_{1,29} = 0,05$	0,818
VMH	$F_{1,32} = 4,95$	0,033	$F_{1,32} = 3,28$	0,080	$F_{1,32} = 0,49$	0,488
DMH	$F_{1,27} = 0,73$	0,400	$F_{1,27} = 0,53$	0,472	$F_{1,27} = 4,71$	0,039
LL/NL						
AP	$F_{1,27} = 3,10$	0,090	$F_{1,27} = 17,47$	< 0,001	$F_{1,27} = 4,07$	0,054
NTS	$F_{1,30} = 3,89$	0,058	$F_{1,30} = 72,51$	< 0,001	$F_{1,30} = 0,18$	0,670
PVN						
PaV	$F_{1,30} = 0,18$	0,677	$F_{1,30} = 7,98$	0,008	$F_{1,30} = 1,20$	0,282
PaMP	$F_{1,29} = 1,23$	0,277	$F_{1,29} = 37,68$	< 0,001	$F_{1,29} = 2,38$	0,134
PaPo	$F_{1,27} = 4,57$	0,042	$F_{1,27} = 0,47$	0,496	$F_{1,27} = 0,05$	0,818
ARC	$F_{1,31} = 1,36$	0,253	$F_{1,31} = 41,53$	< 0,001	$F_{1,31} = 0,00009$	0,992
VMH	$F_{1,31} = 3,70$	0,064	$F_{1,31} = 1,45$	0,237	$F_{1,31} = 0,23$	0,635
DMH	$F_{1,27} = 0,025$	0,876	$F_{1,27} = 8,67$	0,007	$F_{1,27} = 0,40$	0,531

Análise Two-way ANOVA seguida de pós-teste de Tukey. Os efeitos foram calculados em comparação aos animais da ninhada normal (NL).

AP, Área Postrema; NTS, Núcleo do Trato Solitário; PVN, Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaV, subdivisão ventral do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaMP, subdivisão medial do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaPo, subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; ARC, Núcleo Arqueado do Hipotálamo; VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo; e DMH, Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo.

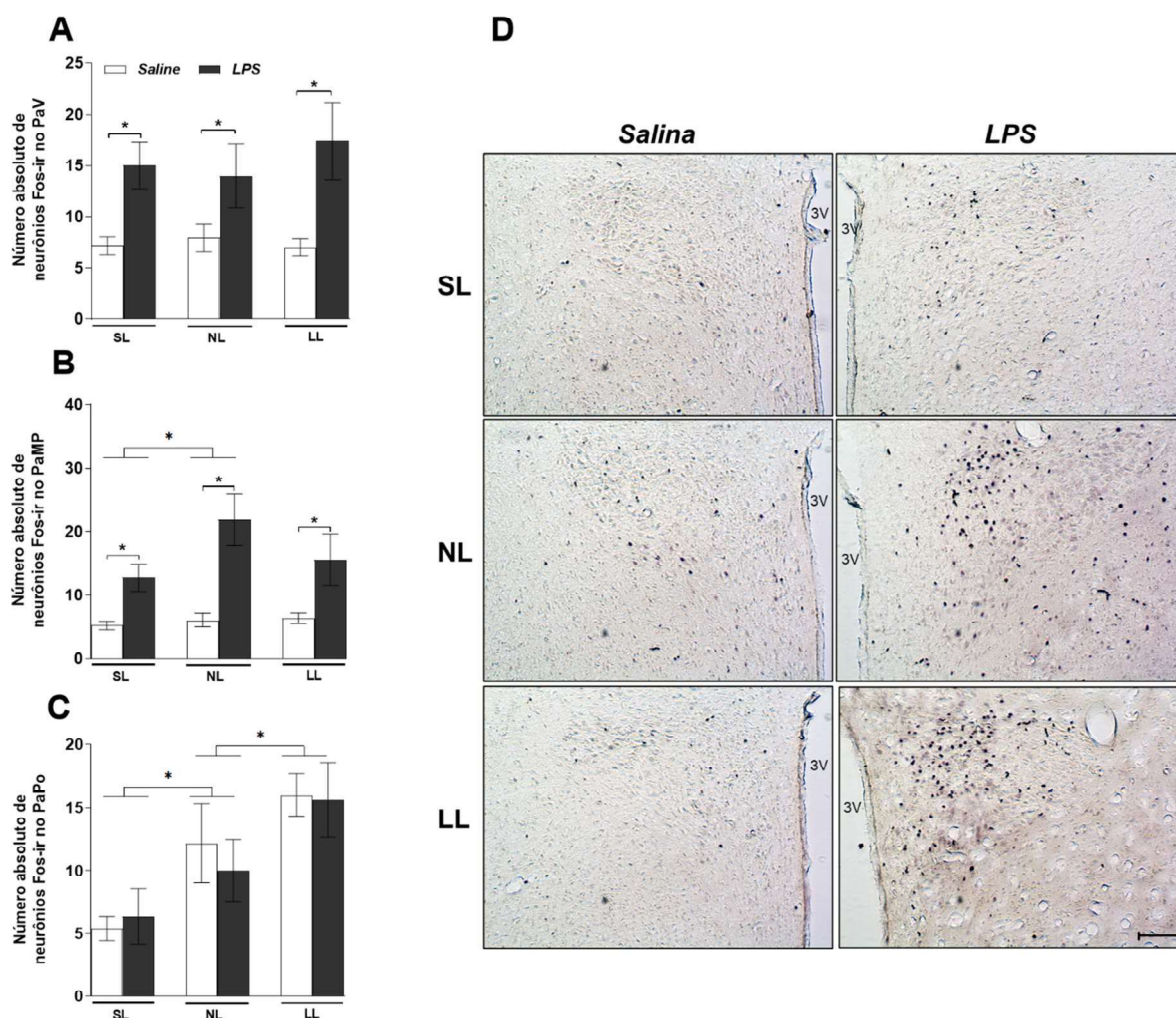
**Figura 13 – Efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal do tronco encefálico de ratos adultos da linhagem Wistar de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



Número de neurônios imunorreativos c-Fos no (A) NTS e na (B) AP. (C) Fotomicrografias representativas (objetiva de 10x) de cortes coronais, apresentando a imunorreatividade na AP e no NTS. Barra de escala: 100 µm. Dados estão expressos como média ± E.P.M. para *two-way* ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-10$  animais/grupo).

AP, Área Postrema; NTS, Núcleo do Trato Solitário.

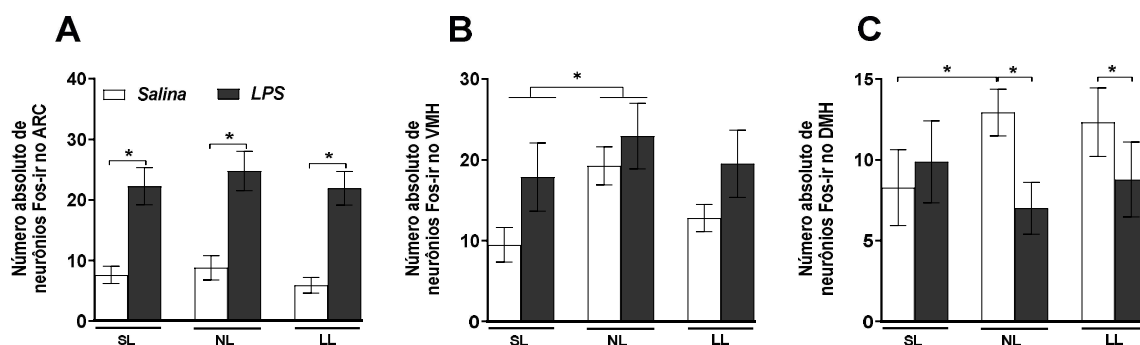
**Figura 14 – Efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal das subdivisões do PVN de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



Número de neurônios imunorreativos ao c-Fos nas subdivisões (A) PaV, (B) PaMP e (C) PaPo do PVN. (D) Fotomicrografias representativas (objetiva de 10x) de cortes coronais, apresentando a imunorreatividade no PVN. Barra de escala: 100 µm. Dados estão expressos como média ± E.P.M. para *two-way* ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-10$  animais/grupo).

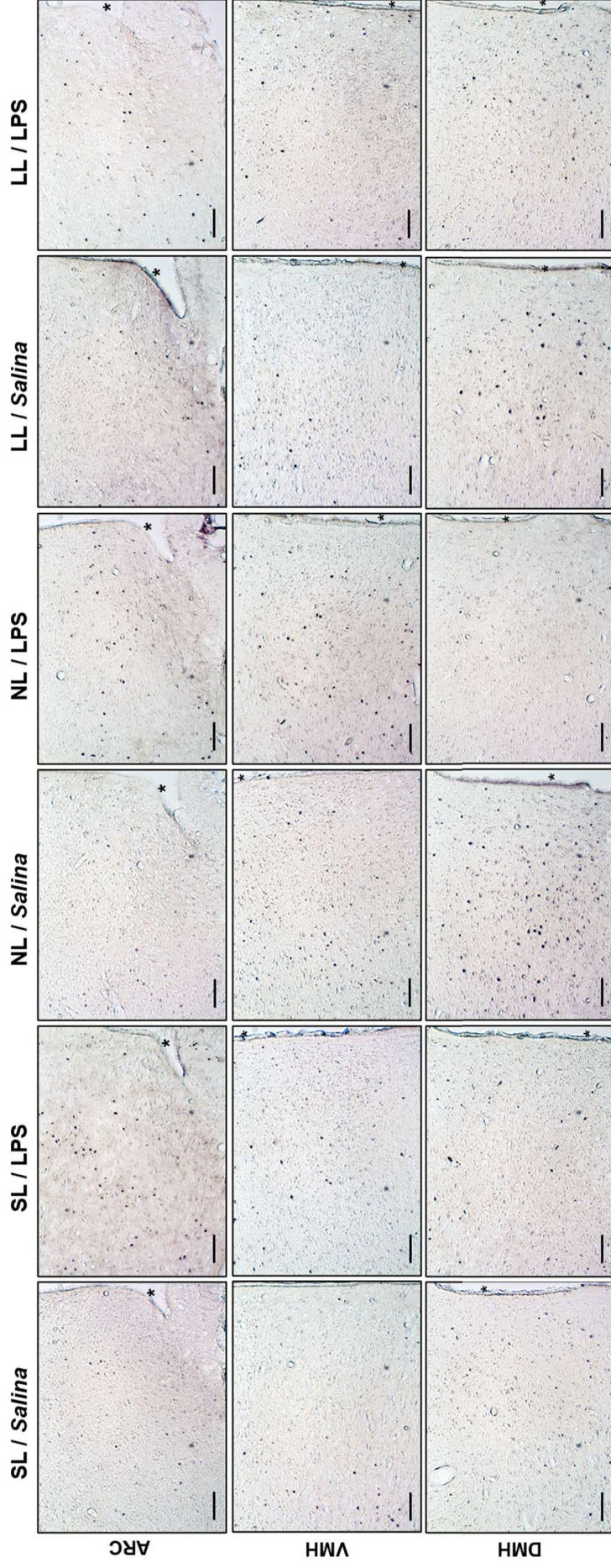
PaV, subdivisão ventral do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaMP, subdivisão parvocelular medial do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; PaPo, subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; 3V, terceiro ventrículo.

**Figura 15 – Efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na imunorreatividade neuronal em núcleos hipotalâmicos de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**



Número absoluto de neurônios imunorreativos ao c-Fos no (A) ARC, (B) VMH e (C) DMH. Dados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. para *two-way* ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-10$  animais/grupo). ARC, Núcleo Arqueado do Hipotálamo; VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo; e DMH, Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo.

**Figura 16 – Fotomicrografias representativas (objetiva de 10x) de cortes coronais, apresentando o efeito do lipopolissacarídeo (LPS; 500 µg/Kg) na imunorreatividade ao c-Fos nos núcleos Arqueado do hipotálamo (ARC), Ventromedial do hipotálamo (VMH) e Dorsomedial do hipotálamo (DMH) de ratos adultos da linhagem *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL).**

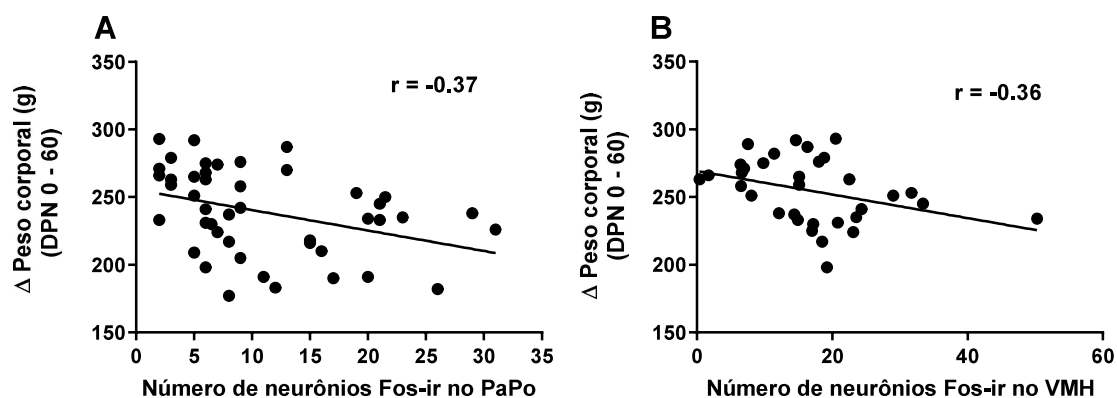


Barra de escala: 100 µm. (\*) terceiro ventrículo.

### 6.3.4 Análise das correlações

Considerando que os resultados de ganho de peso corporal de animais SL, NL e LL (Fig. 11D) estavam inversamente proporcionais à atividade neuronal na subdivisão PaPo do PVN (Fig. 14C), e considerando que não houve efeito de tratamento (LPS ou salina) nesta área, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman para todos os animais SL, NL e LL. A análise revelou correlação negativa ( $r = -0,37$ ,  $p = 0,0125$ , Fig. 17A) entre os dados, ou seja, os animais SL apresentaram maior ganho de peso corporal associado à menor ativação neuronal no PaPo, enquanto os animais LL apresentaram menor ganho de peso corporal associado à maior ativação neuronal nesta área hipotalâmica. Além disso, considerando o papel do VMH na modulação do balanço e gasto energético, que os animais SL apresentaram menor atividade neuronal neste núcleo (efeito do tamanho da ninhada; Fig. 15B) e que não houve efeito do tratamento (LPS ou salina), o coeficiente de correlação de Spearman também foi calculado para verificar a correlação entre o ganho de peso corporal e a atividade neuronal no VMH de animais SL e NL. A análise revelou correlação negativa entre os dados ( $r = -0,36$ ,  $p = 0,0378$ , Fig. 17B), indicando correlação entre a menor atividade neuronal no VMH e o maior ganho de peso corporal de animais SL.

**Figura 17 – Gráficos de dispersão demonstrando a relação entre o ganho de peso corporal (g) desde o nascimento até o DPN 60 de ratos *Wistar* de ninhadas reduzidas (SL), normais (NL) e expandidas (LL) e a imunorreatividade ao c-Fos.**



Atividade neuronal na subdivisão PaPo do PVN de animais SL, NL e LL (A) e atividade neuronal no VMH (B) de animais SL e NL.

PaPo, subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN); VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo.

## 6.4 DISCUSSÃO

O tamanho da ninhada é um forte determinante independente da taxa de crescimento no início da vida (PARRA-VARGAS *et al.*, 2020). De acordo com McCance (1962), o crescimento de um animal lactente depende da quantidade de leite que a mãe pode fornecer e os filhotes se adaptam a essa quantidade de suprimento de nutrientes alterando sua fisiologia e metabolismo (SOOKOIAN *et al.*, 2013). Corroborando essa informação, o presente estudo demonstrou que ratos mantidos em ninhadas reduzidas apresentaram rápido ganho de peso durante a lactação e permaneceram com o fenótipo de sobrepeso, sendo maiores (comprimento) e mais gordos (índice de Lee) do que dos animais controle no início da vida infantil e adulta, conforme já estabelecido na literatura (DE SOUZA *et al.*, 2022; LÓPEZ *et al.*, 2005; PLAGEMANN *et al.*, 1999; PLAGEMANN *et al.*, 2012). Além disso, em concordância com estudos anteriores (ENGELBREGT *et al.*, 2004; LÓPEZ *et al.*, 2005; PLAGEMANN, A *et al.*, 1999; REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008), a criação de filhotes em ninhadas expandidas induziu o efeito oposto ao observado em animais SL, visto que os animais LL apresentaram taxa de crescimento mais lenta durante a lactação e recuperação incompleta no início da idade adulta, permanecendo mais magros (índice de Lee) e com menor peso corporal aos 60 dias de idade. Assim, considerando que animais SL e LL experienciam super e subnutrição, respectivamente, em termos tanto de qualidade quanto de quantidade de nutrientes, no início da vida, durante a lactação (FIOROTTO *et al.*, 1991; PLAGEMANN *et al.*, 2012), os presentes resultados indicam que o tamanho da ninhada influencia o ganho de peso e crescimento corporal e o faz, pelo menos em parte, por meio da disponibilidade de nutrientes durante a lactação (PARRA-VARGAS *et al.*, 2020). Além disso, um estudo conduzido por Kappeler *et al.* (2009) destacou que o fenótipo maior e menor de animais super e subnutridos, respectivamente, também está relacionado com a plasticidade funcional do eixo somatotrópico no início da vida. Consistente com a hipótese da resposta adaptativa preditiva, essa plasticidade pode ser um mecanismo pelo qual os indivíduos adaptam seu crescimento aos recursos nutricionais previstos de seu ambiente. Neste sentido, animais subnutridos apresentaram perda da sinalização do hormônio do crescimento (GH) enquanto animais supernutridos apresentaram aumento de GH (KAPPELER *et al.*, 2009).

Percebe-se, então, que a modificação do estado energético pela manipulação do tamanho da ninhada no período neonatal pode alterar o funcionamento de áreas do tronco cerebral e dos núcleos hipotalâmicos (BRETON *et al.*, 2009), que são críticas para o crescimento e manutenção da homeostase energética e do peso corporal na vida adulta (ZHANG *et al.*, 2020). Foi demonstrado que animais desnutridos jovens apresentam alteração na expressão gênica orexígena e anorexígena, com maior sinalização orexígena, na tentativa de aumentar a disponibilidade de energia para o crescimento (REMMERS *et al.*, 2008b), o que deveria sinalizar que eles estão em um estado de balanço energético negativo. No entanto, a resposta fisiológica antecipada a esses sinais não se desenvolve (CRIPPS *et al.*, 2009) e, semelhante aos resultados deste estudo, os ratos permaneceram magros ao longo da vida (CRIPPS *et al.*, 2009; REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008; STOCKER *et al.*, 2012). A persistência do peso corporal reduzido durante a vida adulta também pode ser atribuída a mecanismos adicionais, como modificações na atividade motora espontânea e na termogênese do tecido adiposo e/ou muscular, que aumentariam o gasto energético (BRETON *et al.*, 2009). De fato, já foi relatado o aumento da eficiência alimentar em animais LL (REMMERS *et al.*, 2008a) e o gasto total de energia em indivíduos com magreza constitucional, deduzidos a um aumento na termogênese em repouso (BOSSU *et al.*, 2007). Essas evidências concordam com a correlação negativa entre ganho de peso corporal e ativação da PaPo do presente estudo e com relatos da inibição da atividade do nervo vago na prole de matrizes submetidas à restrição alimentar (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Nesse mesmo raciocínio, no modelo oposto de nutrição, o excesso de peso dos animais SL foi acompanhado por hipoativação de neurônios do NTS, das subdivisões parvocelulares medial e posterior do PVN, bem como no VMH e no DMH (de animais salina), porém apenas no PaPo e no VMH os dados foram inversamente correlacionados. Em concordância com esses resultados, análises da expressão gênica identificaram alterações no transcriptoma relacionadas ao fenótipo obesogênico no NTS e no DMH, sugerindo um papel fundamental dessas regiões cerebrais na regulação do peso corporal (ZHANG *et al.*, 2020). Vários outros estudos mostraram que animais SL superalimentados apresentam gasto energético reduzido, induzido por uma potente inibição do neuropeptídeo Y (NPY) nos neurônios do PaMP e do VMH (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002a, 2003; HEIDEL; PLAGEMANN; DAVIDOWA, 1999). Sabe-se que as projeções do VMH para o NTS contribuem para

as funções autonômicas e simpáticas e que a lesão do VMH é conhecida por resultar em redução da atividade em vários tecidos, incluindo os tecidos adiposos branco (LINDBERG; CHEN; LI, 2013) e marrom (XIAO *et al.*, 2007). Desta forma, com base nessas evidências, acredita-se que o balanço energético de animais supernutridos é alterado para um nível de peso corporal mais alto (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2002b). Além disso, os neurônios pré-autonômicos do PaPo também se projetam para alvos autônomos relacionados ao sistema parassimpático e simpático nas áreas da medula espinhal e do tronco cerebral (STERN, 2011), o qual modula o gasto de energia em animais SL por meio do aumento da atividade parassimpática do nervo vago (RINALDI *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2022) e comprometimento da atividade simpática (RINALDI *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2021), reduzindo assim o gasto energético desses animais na fase juvenil (STEFANIDIS; SPENCER, 2012). Assim, coletivamente, esses dados demonstram que a disponibilidade de nutrientes durante a lactação, seja para mais ou para menos, no modelo de manipulação do tamanho de ninhada programa rearranjos de conexões hipotalâmicas e autonômicas, com diferentes padrões de ativação de núcleos hipotalâmicos. Nesse sentido, os resultados deste estudo mostraram uma predominância de inibição do NTS e dos centros hipotalâmicos envolvidos na regulação do balanço energético no grupo SL, o que pode contribuir para o sobrepeso persistente ao longo da vida. Além disso, os resultados mostraram que a supernutrição precoce teve maior efeito sobre os núcleos hipotalâmicos do que a subnutrição, o que pode sugerir que as conexões hipotalâmicas são mais suscetíveis ao excesso de nutrientes durante o desenvolvimento neonatal do que à deficiência deles.

Em relação à resposta ao LPS, os animais LL apresentaram diminuição da ingestão alimentar induzida pelo LPS nos três momentos avaliados neste estudo, semelhante à resposta hipofágica dos animais NL. Corroborando com esse resultado, Iwasa *et al.* (2015) mostraram que houve uma tendência para o aumento da resposta anorexigênica ao LPS em animais desnutridos, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada. Sabe-se que o LPS aumenta a expressão de RNAm do TNF- $\alpha$  hipotalâmico 1 hora após sua administração periférica, enquanto a IL-1 $\beta$  tem um pico de resposta mais tardio (6h) (DESAI *et al.*, 2009), e que essas citocinas atuam no cérebro e fazem a mediação das respostas febril e anorexigênica induzidas pelo LPS (LAYÉ *et al.*, 2000). Essas evidências são consistentes com a resposta hipofágica ao LPS observada em animais LL e NL no presente estudo. De

acordo com Collins e Belkaid (2022), em casos de insultos imunológicos, em contexto de desnutrição, os recursos energéticos devem ser direcionados para a elaboração de uma resposta imunológica que é energeticamente dispendiosa, o que ocorre às custas da homeotermia e da atividade locomotora. O presente estudo não avaliou tais variáveis, porém Iwasa *et al.* (2016) reportaram que animais submetidos à desnutrição pré-natal apresentaram resposta febril aumentada ao LPS, em comparação aos animais controle. A resposta anorexígena ao LPS em animais desnutridos ainda é escassa e, desta forma, este é o primeiro estudo a sugerir que a subnutrição pós-natal induzida pelo aumento do tamanho da ninhada não altera a resposta hipofágica do LPS. A hipofagia induzida pelo LPS em animais LL foi acompanhada pelo aumento da ativação de c-Fos na AP, no NTS, nas subdivisões PaV e PaMP do PVN e no ARC, sem diferir dos animais NL.

O LPS também aumentou a imunorreatividade ao c-Fos no tronco cerebral, nas subdivisões PaV e PaMP do PVN e no ARC de animais SL. No entanto, a expressão de c-Fos mediada pelo LPS no NTS e no PaMP desses animais foi significativamente menor do que a dos animais NL. Além disso, a resposta hipofágica ao LPS em animais SL foi menor em comparação aos animais NL nas duas primeiras horas após o tratamento. Esses resultados contrastam com um estudo anterior, no qual o LPS reduziu a ingestão alimentar de maneira semelhante em ratos SL e controles e evocou uma resposta exacerbada no PVN dos animais supernutridos (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012). Diferenças no estado alimentar dos animais (em jejum no presente estudo *versus ad libitum* no estudo de CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012), podem ser responsáveis pela diferença entre os resultados. Essa hipótese é baseada em um estudo no qual a expressão de c-Fos induzida pelo LPS foi mais fraca do PVN de animais em jejum do que naqueles que estavam alimentados *ad libitum* (GAUTRON *et al.*, 2005). Além disso, os ratos SL tiveram menor ingestão alimentar 12 horas após a injeção de LPS (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012), um tempo que não foi avaliado neste estudo. Além disso, diferentes doses de LPS (500 µg/Kg no presente estudo *versus* 100 µg/Kg no estudo de CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2012) também podem ter desencadeado diferentes respostas, visto que doses baixas de LPS (< 100 µg/Kg) e altas provocaram respostas opostas na variação de temperatura (ROMANOVSKY *et al.*, 1996) e, portanto, poderiam também evocar um efeito hipofágico divergente. No entanto, os resultados do presente estudo sugerem que, na condição de jejum e na

dose utilizada, a resposta anorética ao LPS foi reduzida pela supernutrição precoce, e esse resultado foi acompanhado pelo comprometimento da ativação neuronal induzida pelo LPS no NTS e PVN desses animais.

De maneira geral, ratos SL apresentam alterações na resposta neuronal a sinais orexígenos e anorexígenos no PVN, com predominância de inibição dos neurônios do PVN (DAVIDOWA; LI; PLAGEMANN, 2003). Recentemente, um estudo relatou que o efeito hipofágico induzido pelo LPS foi abolido pela obesidade em animais alimentados com dieta hiperlipídica e esse resultado foi associado, em parte, à redução da fosforilação de STAT3 no PVN e no NTS (BORGES *et al.*, 2014). Além disso, os autores do referido estudo apontaram a importância da neuroativação no PVN, uma vez que a ativação de STAT3 apenas no ARC não foi suficiente para induzir a hipofagia mediada pelo LPS em animais com obesidade induzida pela dieta (BORGES *et al.*, 2014). Da mesma forma, os resultados do presente estudo mostraram comprometimento da hipofagia induzida pelo LPS em ratos SL como consequência da redução da ativação mediada pelo LPS no PVN, uma vez que a resposta ao LPS no ARC estava preservada. Essa observação levanta a hipótese de que as projeções do ARC para o PVN podem estar prejudicadas no modelo de obesidade por redução do tamanho da ninhada e está de acordo com evidências de que as conexões hipotalâmicas se desenvolvem durante o período de lactação dos roedores (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011), as quais podem ter sido comprometidas pela supernutrição. Sugere-se, também, em conjunto com a literatura (BORGES *et al.*, 2014), que a obesidade no modelo animal de supernutrição lactacional (SL) altera a resposta hipofágica ao LPS de forma sítio-específica.

Liu *et al.* (2016) relataram que o LPS pode reduzir o apetite ao ativar áreas cerebrais normalmente inibidos pelo AgRP, visto que o LPS induziu a expressão de c-Fos em regiões inervadas por neurônios AgRP, especialmente o PVN, como já discutido, mas induziu uma menor expressão de c-Fos no DMH. Em concordância, mas diferente do que já foi mostrado em outros estudos (GAUTRON *et al.*, 2005), o tratamento com LPS no presente estudo provocou a redução no número de neurônios marcados com c-Fos no DMH de animais NL e LL. O DMH é um núcleo chave na regulação do apetite (BELLINGER; BERNARDIS, 2002), contudo a subpopulação de neurônios no DMH que regula a alimentação está menos esclarecida, em contraste com o ARC, por exemplo, em que os neurônios orexígenos NPY/AgRP e anorexígenos POMC/CART já estão bem estabelecidos (OTGON-UUL *et al.*, 2016).

Sabe-se que o DMH recebe projeções de diferentes regiões cerebrais (KOBELT *et al.*, 2006) e expressa vários receptores, incluindo o receptor de leptina, melanocortina, NPY e CCK (OTGON-UUL *et al.*, 2016). Dentre os neuropeptídeos reguladores da alimentação conhecidos do DMH, inclui-se o NPY, cujos neurônios co-expressam CART (LEE *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2009), o PrRP, o GABA (OTGON-UUL *et al.*, 2016), o CRH e a ACh (GROESSL *et al.*, 2013). Segundo Jeong, Lee e Jo (2017), os neurônios colinérgicos do DMH respondem a mudanças no estado nutricional e sua ativação optogenética estimula a ingestão de alimentos em camundongos de maneira dependente da frequência empregada (JEONG; LEE; JO, 2017). Além disso, os neurônios NPY do DMH são GABAérgicos e são hiperpolarizados pela leptina, o que está associado à diminuição da ingestão alimentar (OTGON-UUL *et al.*, 2016). Neste contexto, sabe-se que a subunidade p100 $\beta$  do receptor de leptina e subsequente ativação das vias do fosfatidil-inositol 3- kinase (PI3K) e do transdutor de sinal e ativação da transcrição 3 (STAT3) são necessárias para a hipofagia endotoxêmica aguda induzida pelo LPS (BORGES *et al.*, 2016, 2014). Desta forma, com base nos resultados atuais, especula-se que o LPS, via STAT3, tenha inibido os neurônios orexígenos do DMH, sugerindo assim um potencial mecanismo pelo qual o LPS suprimiria o apetite em animais normais e subnutridos de 60 dias de idade. Curiosamente, o LPS não alterou a imunorreatividade ao c-Fos no DMH dos animais SL, associado ao aumento do consumo alimentar nas primeiras 2 horas após a injeção IP. Lee *et al.* (2013) demonstraram que animais com obesidade induzida pela dieta apresentam aumento na expressão de neurônios NPY no DMH, e a ativação optogenética desses neurônios induziu a transmissão sináptica inibitória para o PVN, promovendo a ingestão alimentar (OTGON-UUL *et al.*, 2016). Ou seja, embora a população neuronal do DMH ainda não esteja completamente esclarecida, bem como a ação do LPS neste núcleo hipotalâmico, é plausível que o sobrepeso induzido pela supernutrição reduza o efeito anorexigênico do LPS como resultado da falta de um sinal inibitório mediado pelo LPS no DMH. Por meio da comunicação DMH-PVN, a falta do sinal inibitório no DMH mediado pelo LPS poderia contribuir para a menor ativação neuronal observada no PaMP e consequente menor resposta hipofágica em animais SL. Torna-se importante, portanto, futuras investigações sobre os mecanismos de ação, sinalização e comunicação neuronal a partir do DMH que comprovem essa hipótese.

Em conclusão, as mudanças nutricionais durante o desenvolvimento pós-natal resultaram em parâmetros biométricos mais altos e mais baixos após a super e a subnutrição, respectivamente. Além dos efeitos biométricos, a super e a subnutrição neonatal resultaram em efeitos diferentes na resposta anorexígena ao LPS no início da idade adulta. Em especial, os animais LL apresentaram respostas hipofágicas e hipotalâmicas ao LPS semelhantes ao grupo controle, enquanto os ratos SL apresentaram menor resposta hipofágica e menor ativação neuronal no NTS e no PVN ao LPS. Além disso, o LPS diminuiu a ativação neuronal no DMH de ratos LL e controles, mas não teve efeito nos SL. Esse resultado sugere um mecanismo pelo qual o LPS poderia atuar para mediar a anorexia observada no comportamento doente, e que também está prejudicado nos animais SL.

## 7 CONCLUSÃO

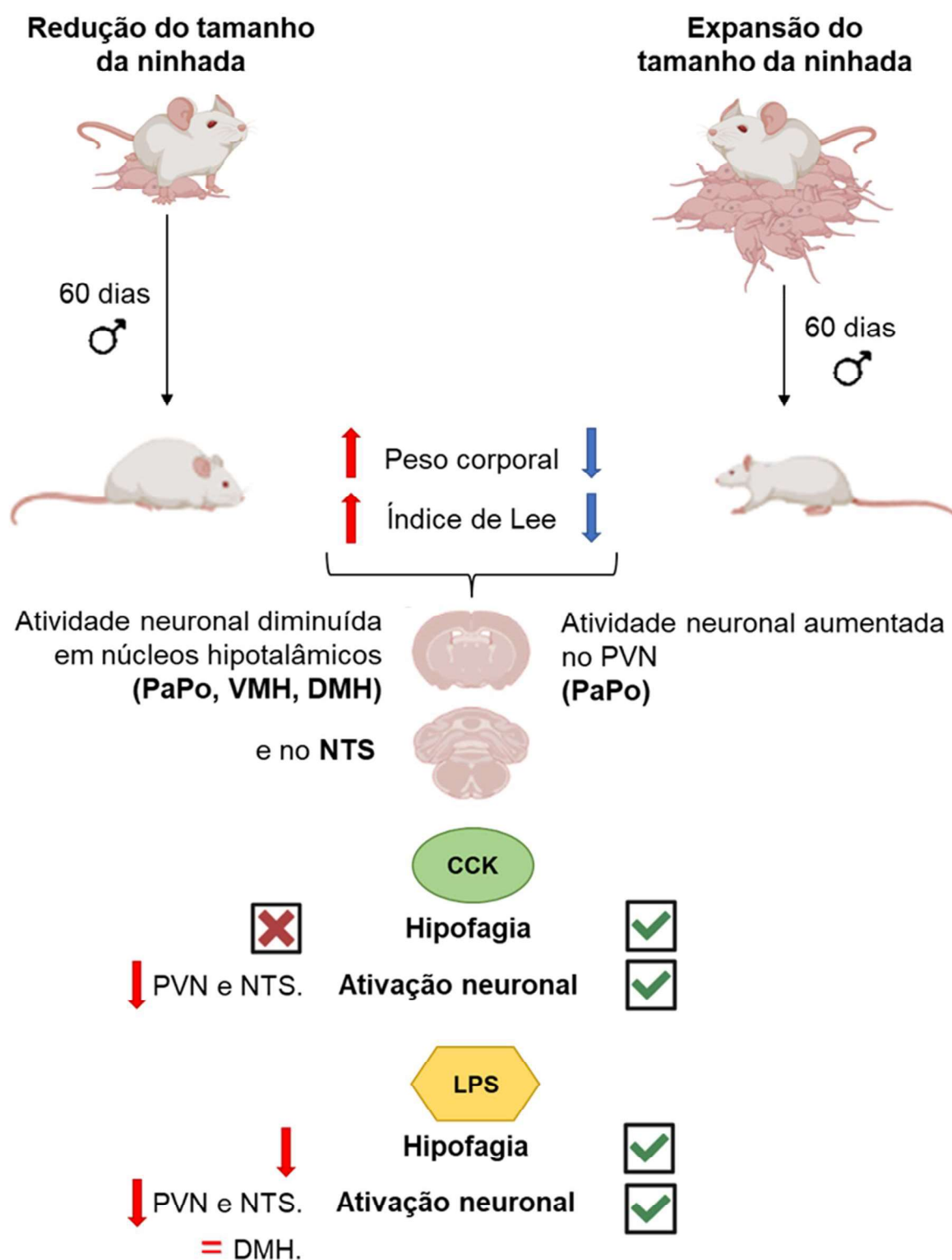
Há muitos anos, o consumo alimentar tem sido o centro de eventos sociais, seja em momentos de celebração quando em momentos de tristeza. Esse papel desempenhado pelo alimento faz a ciência voltar os olhos com mais atenção ao processo de ingestão de alimentos e procurar entender os mecanismos envolvidos nesse processo regulatório. Frente ao crescente número de indivíduos com obesidade/sobrepeso no mundo, em paralelo à desnutrição presente em tantas comunidades, se torna imprescindível compreender os mecanismos por trás desses dois aspectos nutricionais que tanto afetam a saúde.

Os resultados do presente estudo (esquematizados na Fig. 18) revelam que animais supernutridos durante o período de lactação desenvolvem e permanecem com um fenótipo de sobrepeso ao longo de toda a vida, até o início da vida adulta. Por outro lado, a subnutrição neste mesmo período exerce o efeito oposto, e os animais apresentaram parâmetros biométricos reduzidos ao longo dos 60 dias de vida. Essas alterações de fenótipos em relação aos animais controles foram associadas a ajustes adaptativos em núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação da homeostase energética, sendo que a supernutrição teve uma maior extensão de seus efeitos, ou seja, provocou o ajuste adaptativo em mais núcleos hipotalâmicos do que a subnutrição. Neste mesmo sentido, a subnutrição não alterou a resposta hipofágica, nem a ativação neuronal, mediada tanto pela CCK quanto pelo LPS. Esse resultado indica que a deficiência de nutrientes, na extensão em que foi aplicada, não prejudicou a sinalização de saciedade e nem a anorexia provocada por estímulos inflamatórios. Neste caso, pode ser que ou a subnutrição não foi suficiente para induzir respostas adaptativas preditivas, ou foi muito severa a ponto de abolir qualquer resposta adaptativa pela interrupção dos processos de desenvolvimento nos filhotes. Estudos futuros que avaliem o grau de severidade da subnutrição neonatal poderão esclarecer essas hipóteses. Outra possibilidade, ainda, é a de que os animais LL foram criados em um ambiente de menor oferta nutricional ( ninhada expandida) e, poderiam, portanto, estar melhor adaptados ao estado energético do jejum em que os protocolos experimentais foram conduzidos.

Por outro lado, a supernutrição neonatal levou ao comprometimento da resposta hipofágica à CCK e ao LPS. Levando em consideração que os animais SL não apresentaram a hipofagia induzida pela CCK e que a literatura aponta que o

CCK-1R participa na resposta hipofágica mediada pelo LPS, a semelhança entre os resultados obtidos nos dois estudos é bem vinda e destaca o comprometimento da via de sinalização da CCK neste modelo experimental. Ainda, a ausência da resposta hipofágica à CCK e a diminuição desta resposta frente ao LPS, destaca a participação de outras vias, além da via do CCK-1R, na indução do comportamento doentio, em particular, a anorexia, mediada pelo LPS. Os animais SL também apresentaram menor ativação neuronal no NTS e PVN, em resposta a ambos os estímulos. Isso revela que animais SL apresentam uma predominância de inibição no NTS e no PVN, prejudicando a cascata de sinalização de mediadores periféricos. É importante destacar que, embora a diminuição da hipofagia em animais SL possa ser benéfica ao organismo, pois previne o déficit de energia durante processos inflamatórios, ela também pode estar associada à habilidade prejudicada do sistema em responder adequadamente à endotoxemia. Ainda, foi destacado que o DMH pode ser um núcleo hipotalâmico alvo na mediação da resposta anorexigênica induzida pelo LPS e essa via também está comprometida na supernutrição neonatal. Finalmente, os resultados obtidos mostraram a função de importantes núcleos reguladores da alimentação em modelos nutricionais opostos e podem fornecer uma nova visão sobre a fisiopatologia e alvos terapêuticos para obesidade e desnutrição e outros tratamentos de transtornos alimentares, bem como contribuem para o entendimento na anorexia aguda induzida por processos inflamatórios.

Figura 18 – Esquema representativo dos principais resultados obtidos nos estudos.



CCK, colecistocinina; DMH, Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo; LPS, Lipopolissacarídeo; NTS, Núcleo do Trato Solitário; PaPo, subdivisão posterior do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo; e VMH, Núcleo Ventromedial do Hipotálamo.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K. **Imunologia celular e molecular**. 9ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.
- AGARWAL, Prasoon *et al.* Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 55, n. 2, p. 71–101, 2018.
- AIRES, Margarida de Mello. **Fisiologia**. 5ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- AJA, Susan *et al.* Intracerebroventricular CART peptide reduces food intake and alters motor behavior at a hindbrain site. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 281, p. R1862–R1867, 2001.
- AL HELAILI, Alaa; PARK, Sung Jin; BEYAK, Michael J. Chronic high fat diet impairs glucagon like peptide-1 sensitivity in vagal afferents. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 533, n. 1, p. 110–117, 2020.
- ALEXANDER, Christian; RIETSCHER, Ernst Th. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **Journal of Endotoxin Research**, v. 7, n. 3, p. 167–202, 2001.
- AUBERT, Roberte; SUQUET, Jean-Pierre; LEMONNIER, Anddaniel. Long-Term Morphological and Metabolic Effects of Early Under- and Over-Nutrition in Mice. **J. Nutr**, v. 110, p. 649–661, 1980.
- BAPTISTA, V; BROWNING, K N; TRAVAGLI, R A. Effects of cholecystokinin-8s in the nucleus tractus solitarius of vagally deafferented rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, p. R1092–R1100, 2007.
- BARSH, Gregory S *et al.* Molecular Pharmacology of Agouti Protein in Vitro and in Vivo. **Ann N Y Acad Sci**, v. 20, p. 143–152, 1999.
- BARSH, Gregory S.; SCHWARTZ, Michael W. Genetic approaches to studying energy balance: Perception and integration. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 8, p. 589–600, 2002.
- BELLINGER, Larry L.; BERNARDIS, Lee L. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: Lessons learned from lesioning studies. **Physiology and Behavior**, v. 76, n. 3, p. 431–442, 2002.
- BERNARDIS, Lee L. Participation of the Dorsomedial Hypothalamic Nucleus in the “Feeding Center” and Water Intake Circuitry of the Weanling Rat\*. **Journal of Neuro-Visceral Relations**, v. 81, p. 887–898, 1970.
- BERNARDIS, L L; PATTERSON, B D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weaning and adult female rats with hypothalamic lesion. **Journal of Endocrinology**, v. 40, p. 527–528, 1968.
- BI, Sheng; MORAN, Timothy H. Obesity in the Otsuka Long Evans Tokushima Fatty Rat: Mechanisms and Discoveries. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, n. 21, 2016.
- BORGES, B. C. *et al.* Expression of hypothalamic neuropeptides and the desensitization of pituitary-adrenal axis and hypophagia in the endotoxin tolerance. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 4, p. 508–519, 2007.
- BORGES, Beatriz de Carvalho *et al.* High-fat diet induces site-specific unresponsiveness to LPS-stimulated STAT3 activation in the hypothalamus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 306, p. 34–44, 2014.
- BORGES, Beatriz C. *et al.* Leptin resistance and desensitization of hypophagia during prolonged inflammatory challenge. **American Journal of Physiology -**

- Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 5, p. E858–E869, 2011.
- BORGES, Beatriz C. *et al.* PI3K p110 $\beta$  subunit in leptin receptor expressing cells is required for the acute hypophagia induced by endotoxemia. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 6, p. 379–391, 2016.
- BOSSU, Cécile *et al.* Energy expenditure adjusted for body composition differentiates constitutional thinness from both normal subjects and anorexia nervosa. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 292, n. 1, p. E132–E137, 2007.
- BOUDABA, Cherif; SZABÓ, Kriszta; TASKER, Jeffrey G. Physiological Mapping of Local Inhibitory Inputs to the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 22, p. 7151–7160, 1996.
- BOURET, S G. Nutritional programming of hypothalamic development: critical periods and windows of opportunity. **International Journal of Obesity Supplements**, v. 2, n. S2, p. S19–S24, 2012.
- BOURET, S; LEVIN, B E; OZANNE, S E. Gene-Environment Interactions Controlling Energy and Glucose Homeostasis and the Developmental Origins of Obesity. **Physiol Rev**, v. 95, p. 47–82, 2015.
- BRANQUINHO, Nayra Thais D. *et al.* Early-onset obesity and food restriction alter hepatocyte metabolism in adult Wistar rats. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 123, n. 5, p. 297–305, 2017.
- BRETON, Christophe *et al.* Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. **American journal of physiology, endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 3, p. E462–E472, 2009.
- BURRELL, Robert. Human responses to bacterial endotoxin. **Circulatory Shock**, v. 43, n. 3, p. 137–153, 1994.
- CANDELLI, Marcello *et al.* Interaction between lipopolysaccharide and gut microbiota in inflammatory bowel diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, 2021.
- CAWTHON, Carolina R.; DE LA SERRE, Claire B. The critical role of CCK in the regulation of food intake and diet-induced obesity. **Peptides**, v. 138, 2021.
- CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system from birth to old age. **European journal of clinical nutrition**, v. 56 Suppl 3, p. S73–S76, 2002.
- CHEE, Melissa J.S.; COLMERS, William F. Y eat?. **Nutrition**, v. 24, n. 9, p. 869–877, 2008.
- CHERNOFF, N. *et al.* Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: Age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 489–494, 2009.
- CHOI, Yang-Ho *et al.* Brief communication TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. **Physiology & Behaviour**, v. 77, p. 1–4, 2002.
- CIESIELSKA, Anna; MATYJEK, Marta; KWIATKOWSKA, Katarzyna. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 4, p. 1233–1261, 2021.
- CLARKE, M. A.; STEFANIDIS, A.; SPENCER, S. J. Postnatal Overfeeding Leads to Obesity and Exacerbated Febrile Responses to Lipopolysaccharide Throughout Life. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 24, n. 3, p. 511–524, 2012.
- CODO, W; CARLIN, E A. Postnatal Undernutrition in Rats: Attempts to Develop Alternative Methods to Food Deprive Pups Without Maternal Behavioral Alteration. **These Developmental Psychobiology**, v. 12, n. 5, p. 475484, 1971.

- COLLINS, Nicholas; BELKAID, Yasmine. Control of immunity via nutritional interventions. **Immunity**, v. 55, n. 2, p. 210–223, 2022.
- CRIPPS, Roselle L. *et al.* Programming of hypothalamic neuropeptide gene expression in rats by maternal dietary protein content during pregnancy and lactation. **Clinical Science**, v. 117, n. 2, p. 85–93, 2009.
- CRUZ-MACHADO, Sanseray da Silveira. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. **Revista da Biologia**, v. 4, n. 1, p. 40–43, 2010.
- CUMMINGS, David E.; OVERDUIN, Joost. Gastrointestinal regulation of food intake. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 13–23, 2007.
- CURI, Rui; ARAÚJO FILHO, Joaquim Procópio de. **Fisiologia Básica**. 1ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- DAFALLA, Amged I. *et al.* Non-sulfated cholecystokinin-8 increases enteric and hindbrain Fos-like immunoreactivity in male Sprague Dawley rats. **Brain Research**, v. 1708, p. 200–206, 2019.
- D'AGOSTINO, Giuseppe *et al.* Appetite controlled by a cholecystokinin nucleus of the solitary tract to hypothalamus neurocircuit. **eLife**, v. 5, n. e12225, 2016.
- DALY, Donna M. *et al.* Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse. **Journal of Physiology**, v. 589, n. 11, p. 2857–2870, 2011.
- DAVIDOWA, Helga; LI, Yuzhen; PLAGEMANN, Andreas. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic ( $\alpha$ -MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 613–621, 2003.
- DAVIDOWA, Helga; LI, Yuzhen; PLAGEMANN, Andreas. Differential response to NPY of PVH and dopamine-responsive VMH neurons in overweight rats. **Neuroreport**, v. 13, n. 12, p. 1523–1527, 2002a.
- DAVIDOWA, Helga; LI, Yuzhen; PLAGEMANN, Andreas. Hypothalamic ventromedial and arcuate neurons of normal and postnatally overnourished rats differ in their responses to melanin-concentrating hormone. **Regulatory Peptides**, v. 108, p. 103–111, 2002b.
- DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. **Neuroreport**, v. 11, n. 12, p. 2795–2798, 2000.
- DAVIDOWA, Helga; PLAGEMANN, Andreas. Different responses of ventromedial hypothalamic neurons to leptin in normal and early postnatally overfed rats. **Neuroscience letters**, v. 293, n. 1, p. 21–24, 2000.
- DAVIDOWA, Helga; PLAGEMANN, Andreas. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. **Neuroreport**, v. 18, n. 5, p. 521–524, 2007.
- DE ALMEIDA, Douglas L. *et al.* Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1621–1630, 2013.
- DE LARTIGUE, Guillaume *et al.* Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 301, n. 1, p. E187–E195, 2011.
- DE LARTIGUE, Guillaume *et al.* Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and satiation in diet induced obese rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32967, 2012.
- DE SOUZA, Camila F. *et al.* Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of

- exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. **Life Sciences**, v. 304, n. 120721, 2022.
- DEBARBA, Lucas Kniess *et al.* Neonatal nutritional programming induces gliosis and alters the expression of T-cell protein tyrosine phosphatase and connexins in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 120, p. 104690, 2020.
- DESAI, Mina *et al.* Early undernutrition attenuates the inflammatory response in adult rat offspring. **The journal of maternal-fetal & neonatal medicine**, v. 22, n. 7, p. 571–575, 2009.
- DHILLON, Harveen *et al.* Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. **Neuron**, v. 49, n. 2, p. 191–203, 2006.
- DOCKRAY, Graham J. Cholecystokinin. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**, v. 19, n. 1, p. 8–12, 2012.
- ENES-MARQUES, Silvia *et al.* Neonatal overnutrition programming impairs cholecystokinin effects in adult male rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 86, p. 108494, 2020.
- ENGEL, Daiane F.; VELLOSO, Licio A. The timeline of neuronal and glial alterations in experimental obesity. **Neuropharmacology**, v. 208, n. 108983, 2022.
- ENGELBREGT, Mia J.T. *et al.* Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: Comparison with puberty. **Bone**, v. 34, n. 1, p. 180–186, 2004.
- FARZI, Aitak *et al.* Arcuate nucleus and lateral hypothalamic CART neurons in the mouse brain exert opposing effects on energy expenditure. **eLife**, v. 7, n. e36494, 2018.
- FEKETE, Csaba *et al.* Melanocyte-Stimulating Hormone Is Contained in Nerve Terminals Innervating Thyrotropin-Releasing Hormone-Synthesizing Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus and Prevents Fasting-Induced Suppression of Prothyrotropin-Releasing Hormone Gene Expression. **The Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 1550–1558, 2000.
- FEKETE, Csaba; LECHAN, Ronald M. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. **Endocrine Reviews**, v. 35, n. 2, p. 159–194, 2014.
- FERRAZ, Eduardo Gomes *et al.* Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 59, n. 3, p. 483–490, 2011.
- FIOROTTO, M. L. *et al.* Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. **The American journal of physiology**, v. 260, n. 6 Pt 2, p. R1104–R1113, 1991.
- FITZGERALD, Katherine A.; KAGAN, Jonathan C. Toll-like Receptors and the Control of Immunity. **Cell**, v. 180, n. 6, p. 1044–1066, 2020.
- FRANCISCO, Flávio Andrade *et al.* Methylglyoxal treatment in lactating mothers leads to type 2 diabetes phenotype in male rat offspring at adulthood. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 477–486, 2018.
- FRASER, KA; DAVISON, JS. Cholecystokinin-induced c-fos expression in the rat brain stem is influenced by vagal nerve integrity. **Experimental Physiology**, v. 77, n. 1, p. 225–228, 1992.
- GAUTRON, L. *et al.* Influence of feeding status on neuronal activity in the hypothalamus during lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 933–946, 2005.
- GAVRILOV, Yu v.; PEREKREST, S. v.; NOVIKOVA, N. S. Intracellular expression of c-Fos protein in various structures of the hypothalamus in electrical pain stimulation

- and administration of antigens. **Neuroscience and behavioral physiology**, v. 38, n. 1, p. 87–92, 2008.
- GIBBS, James *et al.* CHOLECYSTOKININ DECREASES FOOD INTAKE IN RATS 1. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 84, n. 3, p. 488–495, 1973.
- GLUCKMAN, Peter D.; HANSON, Mark A. The developmental origins of the metabolic syndrome. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 15, n. 4, p. 183–187, 2004.
- GÓMEZ-GALLEGO, Carlos *et al.* Annual Review of Nutrition The Microbiota and Malnutrition: Impact of Nutritional Status During Early Life. **Annual Review of Nutrition**, v. 39, p. 267–290, 2019.
- GROESSL, Florian *et al.* Overnight Fasting Regulates Inhibitory Tone to Cholinergic Neurons of the Dorsomedial Nucleus of the Hypothalamus. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.
- GRONLUND, M. M. *et al.* Importance of intestinal colonisation in the maturation of humoral immunity in early infancy: A prospective follow up study of healthy infants aged 0–6 months. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, v. 83, n. 3, 2000.
- GROVE, Kevin L. *et al.* Development of metabolic systems. **Physiology & Behavior**, v. 86, n. 5, p. 646–660, 2005.
- HABBOU, Ahmed *et al.* Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. **Biochimie**, v. 94, n. 1, p. 117–124, 2012.
- HALAH, Mariana Peduti *et al.* Neonatal nutritional programming impairs adiponectin effects on energy homeostasis in adult life of male rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 315, p. 29–37, 2018.
- HAMEED, Saira *et al.* Thyroid Hormone Receptor Beta in the Ventromedial Hypothalamus Is Essential for the Physiological Regulation of Food Intake and Body Weight. **Cell Reports**, v. 19, n. 11, p. 2202–2209, 2017.
- HARDIKAR, Anandwardhan A. *et al.* Multigenerational Undernutrition Increases Susceptibility to Obesity and Diabetes that Is Not Reversed after Dietary Recuperation. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 2, p. 312–319, 2015.
- HAVEL, Peter J. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: Short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 11, p. 963–977, 2001.
- HE, Ling. Alterations of gut microbiota by overnutrition impact gluconeogenic gene expression and insulin signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 4, p. 1–12, 2021.
- HEIDEL, Einar; PLAGEMANN, Andreas; DAVIDOWA, Helga. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. **Neuroreport**, v. 10, n. 9, p. 1827–1831, 1999.
- HERISSON, F. M. *et al.* Oxytocin Acting in the Nucleus Accumbens Core Decreases Food Intake. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 28, n. 4, 2016.
- HERMAN, James P. *et al.* Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. **European Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 3, p. 381–385, 2002.
- HERRERA, Daniel G; ROBERTSON-F, Harold A. ACTIVATION OF c-fos IN THE BRAIN. **Progress in Neurobiology**, v. 50, p. 83, 1996.
- HUSZAR, Dennis *et al.* Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. **Cell**, v. 88, n. 1, p. 131–141, 1997.
- HWA, Joyce J *et al.* Central melanocortin system modulates energy intake and

- expenditure of obese and lean Zucker rats. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**, v. 281, p. R444–R451, 2001.
- IWASA, Takeshi *et al.* Prenatal undernutrition increases the febrile response to lipopolysaccharides in adulthood in male rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 44, n. 1, p. 1–5, 2015.
- IWASA, Takeshi *et al.* Prenatal undernutrition results in greater lipopolysaccharide-induced changes in hypothalamic TNF- $\alpha$  expression, but does not affect the equivalent changes in the serum levels of luteinizing hormone and testosterone, in adult male rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 48, p. 80–83, 2016.
- JANG, Pil Geum *et al.* NF- $\kappa$ B activation in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons is essential in illness- and leptin-induced anorexia. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 13, p. 9706–9715, 2010.
- JEONG, Jae Hoon; LEE, Dong Kun; JO, Young Hwan. Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate food intake. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 3, p. 306–312, 2017.
- JUAN DE SOLIS, Alain *et al.* Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 3, p. 198–209, 2016.
- KAGAN, Jonathan C.; MEDZHITOV, Ruslan. Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. **Cell**, v. 125, n. 5, p. 943–955, 2006.
- KAMILARIS, Themis C *et al.* Cholecystokinin-Octapeptide Stimulates Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Function in Rats: Role of Corticotropin-Releasing Hormone\*. **Endocrinology**, v. 130, n. 4, p. 1764–1774, 1992.
- KAPPELER, Laurent *et al.* Early postnatal nutrition determines somatotrophic function in mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 314–323, 2009.
- KHODAI, Tansi; LUCKMAN, Simon M. Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus Neurons under the Magnifying Glass. **Endocrinology (United States)**, v. 162, n. 10, 2021.
- KIM, M. S. *et al.* The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. **J. Clin. Invest.**, v. 105, p. 1005–1011, 2000.
- KISSILEFF, Harry R *et al.* C-terminal octapeptide of cholecystokinin decreases food intake in man. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, p. 154–160, 1981.
- KLOSS, Christian U.A. *et al.* Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. **Experimental neurology**, v. 168, n. 1, p. 32–46, 2001.
- KOBELT, Peter *et al.* Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. **Brain Research**, v. 1117, n. 1, p. 109–117, 2006.
- KONSMAN, Jan Pieter; PARNET, Patricia; DANTZER, Robert. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends in neurosciences**, v. 25, n. 3, p. 154–159, 2002.
- KORNER, J *et al.* Leptin Regulation of *Agrp* and *Npy* mRNA in the Rat Hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 13, p. 959–966, 2001.
- KOVÁCS, Krisztina J. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 287–297, 1998.
- KRISTENSEN, Peter *et al.* Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v. 393, n. 6680, p. 72–76, 1998.
- LAFLAMME, NATHALIE; RIVEST, SERGE. Toll-like receptor 4: the missing link of the

- cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 1, p. 155–163, 2001.
- LANGLEY-EVANS, Simon C.; MCMULLEN, Sarah. Developmental origins of adult disease. **Medical Principles and Practice**, v. 19, n. 2, p. 87–98, 2010.
- LAYÉ, Sophie *et al.* Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 279, n. 1, p. R93–R98, 2000.
- LE THUC, Ophélie *et al.* Hypothalamic inflammation and energy balance disruptions: Spotlight on chemokines. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 197, 2017.
- LEE, Shin J. *et al.* Leptin stimulates neuropeptide Y and cocaine amphetamine-regulated transcript coexpressing neuronal activity in the dorsomedial hypothalamus in diet-induced obese mice. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 38, p. 15306–15317, 2013.
- LESAGE, Jean *et al.* Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Stress**, v. 9, n. 4, p. 183–198, 2006.
- LEY, Ruth E *et al.* Obesity alters gut microbial ecology. **PNAS**, v. 102, n. 31, 2005.
- LI, Shujin *et al.* CCK-8 inhibits LPS-induced IL-1 $\beta$  production in pulmonary interstitial macrophages by modulating PKA, p38, and NF- $\kappa$ B pathway. **Shock**, v. 27, n. 6, p. 678–686, 2007.
- LI, Shujin *et al.* Cholecystokinin octapeptide inhibits the in vitro expression of CD14 in rat pulmonary interstitial macrophages induced by lipopolysaccharide. **Chinese Medical Journal**, v. 11, n. 2, p. 276–279, 2002.
- LI, Chia *et al.* Defined Paraventricular Hypothalamic Populations Exhibit Differential Responses to Food Contingent on Caloric State. **Cell Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 681–694.e5, 2019.
- LI, De Pei *et al.* Regulation of synaptic inputs to paraventricular-spinal output neurons by  $\alpha$ 2 adrenergic receptors. **Journal of Neurophysiology**, v. 93, n. 1, p. 393–402, 2005.
- LINDBERG, Daniel; CHEN, Peilin; LI, Chien. Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the hypothalamus and hindbrain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 521, n. 14, p. 3167–3190, 2013.
- LIRA, Livia A. *et al.* Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 38, p. 23–29, 2014.
- LIU, Hung Wen *et al.* Adult-onset obesity induced by early life overnutrition could be reversed by moderate caloric restriction. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 305, n. 7, 2013.
- LIU, Yang *et al.* Lipopolysaccharide Rapidly and Completely Suppresses AgRP Neuron-Mediated Food Intake in Male Mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 6, p. 2380–2392, 2016.
- LO, Chunmin C *et al.* Intraperitoneal CCK and Fourth-Intraventricular Apo AIV Require Both Peripheral and NTS CCK1R to Reduce Food Intake in Male Rats. **Endocrinology**, v. 155, n. 5, p. 1700–1707, 2014.
- LÓPEZ, M. *et al.* A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. **Diabetologia**, v. 48, n. 1, p. 140–148, 2005.
- MAJDIC, Gregor *et al.* Knockout Mice Lacking Steroidogenic Factor 1 Are a Novel Genetic Model of Hypothalamic Obesity. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 607–614, 2002.

- MANISCALCO, James W.; RINAMAN, Linda. Overnight food deprivation markedly attenuates hindbrain noradrenergic, glucagon-like peptide-1, and hypothalamic neural responses to exogenous cholecystokinin in male rats. **Physiology and Behavior**, v. 121, p. 35–42, 2013.
- MARANGON, Paula B. *et al.* Perinatal over- and underfeeding affect hypothalamic leptin and ghrelin neuroendocrine response in adult rats. **Physiology and Behavior**, v. 215, p. 112793, 2020.
- MCCANCE, R. A. FOOD, GROWTH, AND TIME. **The Lancet**, v. 280, n. 7258, p. 671–676, 1962.
- MEDZHITOV, Ruslan. TOLL-LIKE RECEPTORS AND INNATE IMMUNITY. **Nature Reviews**, v. 1, p. 135–145, 2001.
- MELNICK, Igor *et al.* Developmental Switch in Neuropeptide Y and Melanocortin Effects in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. **Neuron**, v. 56, n. 6, p. 1103–1115, 2007.
- MICHEL, Signe *et al.* Diet-Derived Nutrients Modulate the Effects of Amylin on c-Fos Expression in the Area Postrema and on Food Intake. **Neuroendocrinology**, v. 86, n. 2, p. 124–135, 2007.
- MMI, Abdalla. Central and peripheral control of food intake. **Endocrine Regulations**, v. 51, n. 1, p. 52–70, 2017.
- NDJIM, Marième *et al.* Loss of vagal sensitivity to cholecystokinin in rats born with intrauterine growth retardation and consequence on food intake. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 65, 2017.
- NIJENHUIS, Wouter A. J.; OOSTEROM, Julia; ADAN, Roger A. H. AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 15, n. 1, p. 164–171, 2001.
- NOETZEL, Steffen *et al.* CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. **Regulatory Peptides**, v. 157, n. 1–3, p. 84–91, 2009.
- OLIVEIRA, J.C. de *et al.* Metabolic Imprinting by Maternal Protein Malnourishment Impairs Vagal Activity in Adult Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 23, n. 2, p. 148–157, 2011.
- OLLMANN, Michael M *et al.* Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein. **Science**, v. 278, n. 5335, p. 135–138, 1997.
- OTGON-UUL, Zesemdorj *et al.* Optogenetic activation of leptin- and glucose-regulated GABAergic neurons in dorsomedial hypothalamus promotes food intake via inhibitory synaptic transmission to paraventricular nucleus of hypothalamus. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 8, p. 709–715, 2016.
- PALKOVITS, Miklós. Interconnections between the Neuroendocrine Hypothalamus and the Central Autonomic System. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, p. 270–295, 1999.
- PARK, Beom Seok *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1191–1195, 2009.
- PARRA-VARGAS, Marcela *et al.* Size Does Matter: Litter Size Strongly Determines Adult Metabolism in Rodents. **Cell Metabolism**, v. 32, n. 3, p. 334–340, 2020.
- PATEL, Mulchand S.; SRINIVASAN, Malathi. Metabolic programming in the immediate postnatal life. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 58, n. SUPPL. 2, p. 18–28, 2011.
- PAXINOS, George; WATSON, Charles. **The rat brain, in stereotaxic coordinates**. [S. l.]: Academic Press, 1997.

- PAXINOS, George; WATSON, Charles. **The Rat Brain in stereotaxic coordinates**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2006.
- PERKINS, Martin N *et al.* Activation of brown adipose tissue thermogenesis by the ventromedial hypothalamus. **Nature**, v. 289, p. 401–402, 1981.
- PIRNIK, Zdeno *et al.* Effect of anorexigenic peptides, cholecystokinin (CCK) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide, on the activity of neurons in hypothalamic structures of C57Bl/6 mice involved in the food intake regulation. **Peptides**, v. 31, n. 1, p. 139–144, 2010.
- PLAGEMANN, Andreas *et al.* Cholecystokinin-8S levels in discrete hypothalamic nuclei of weanling rats exposed to maternal protein malnutrition. **Regulatory Peptides**, v. 85, p. 109–113, 1999.
- PLAGEMANN, Andreas *et al.* Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 641–653, 2012.
- PLAGEMANN, A *et al.* Observations on the Orexigenic Hypothalamic Neuropeptide Y-System in Neonatally Overfed Weanling Rats. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 11, n. 7, p. 541–546, 1999.
- PLAGEMANN, A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. **Hormone Research**, v. 65, n. SUPPL. 3, p. 83–89, 2006.
- PLAGEMANN, Andreas *et al.* Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. **Neuroscience Letters**, v. 258, p. 13–16, 1998.
- PREIDIS, Geoffrey A. *et al.* Composition and function of the undernourished neonatal mouse intestinal microbiome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 10, p. 1050–1057, 2015.
- PRONCHUK, Nina; BECK-SICKINGER, Annette G; COLMERS, William F. Multiple NPY Receptors Inhibit GABA A Synaptic Responses of Rat Medial Parvocellular Effector Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 535–543, 2002.
- PRONCHUK, Nina; COLMERS, William F. NPY presynaptic actions are reduced in the hypothalamic mpPVN of obese (fa/fa), but not lean, Zucker rats in vitro. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 6, p. 1032–1036, 2004.
- RADLER, Morgan E.; HALE, Matthew W.; KENT, Stephen. Calorie restriction attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation in discrete regions of the hypothalamus and the subfornical organ. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 38, p. 13–24, 2014.
- REIS, Wagner Luis *et al.* Brain innate immunity regulates hypothalamic arcuate neuronal activity and feeding behavior. **Endocrinology**, v. 156, n. 4, p. 1303–1315, 2015.
- REMMERS, Floor *et al.* Energy intake and resting energy expenditure in adult male rats after early postnatal food restriction. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 5, p. 1149–1156, 2008a.
- REMMERS, Floor *et al.* Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3617–3625, 2008b.
- REMMERS, Floor; DELEMARRE-VAN DE WAAL, Henriette A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 2, p. 272–311, 2011.
- REMMERS, Floor; FODOR, Mariann; DELEMARRE-VAN DE WAAL, Henriette A. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake.

- Physiology and Behavior**, v. 95, n. 1–2, p. 208–215, 2008.
- RIBEIRO, Tatiane Aparecida *et al.* Maternal low intensity physical exercise prevents obesity in offspring rats exposed to early overnutrition. **Scientific Reports**, v. 7, n. 7634, 2017.
- RINALDI, Wilson *et al.* Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos Wistar. **Revista de Nutrição**, v. 25, n. 3, p. 321–330, 2012.
- RINAMAN, Linda. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. **Brain Research**, v. 1350, p. 18–34, 2010.
- RINAMAN, Linda. Behavioral/Systems/Cognitive Hindbrain Noradrenergic Lesions Attenuate Anorexia and Alter Central cFos Expression in Rats after Gastric Viscerosensory Stimulation. **J. Neurosci**, v. 23, n. 31, p. 10084–10092, 2003.
- RÖDEL, Heiko G. *et al.* Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats. **Physiology and Behavior**, v. 99, n. 5, p. 644–650, 2010.
- RODRIGUES, Vanessa S T *et al.* The model of litter size reduction induces long-term disruption of the gut-brain axis: An explanation for the hyperphagia of Wistar rats of both sexes. **Physiological Reports**, v. 10, p. e15191, 2022.
- RODRÍGUEZ-RIVERA, Carmen *et al.* Undernutrition induces major alterations in the lipid droplets of white and brown adipose tissues in wistar rats. **Tissue and Cell**, v. 71, 2021.
- ROHNER-JEANRENAUD, F *et al.* Chronic central infusion of cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART 55-102): effects on body weight homeostasis in lean and high-fat-fed obese rats. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. 143–149, 2002.
- ROMANOVSKY, Andrej A. *et al.* First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? **The American journal of physiology**, v. 271, n. 1 Pt 2, p. R244–R253, 1996.
- RORATO, Rodrigo *et al.* Cholecystokinin and hypothalamic corticotrophin-releasing factor participate in endotoxin-induced hypophagia. **Experimental Physiology**, v. 96, n. 4, p. 439–450, 2011.
- RORATO, Rodrigo *et al.* Prostaglandin mediates endotoxaemia-induced hypophagia by activation of pro-opiomelanocortin and corticotrophin-releasing factor neurons in rats. **Experimental Physiology**, v. 94, n. 3, p. 371–379, 2009.
- RUST, Victoria A.; CROSBY, Karen M. CCK acts in the DMH of young male rats to suppress appetite in a nitric oxide-dependent manner. **Neuroscience Letters**, v. 764, n. 136295, 2021.
- SABATIER, Nancy; LENG, Gareth; MENZIES, John. Oxytocin, feeding, and satiety. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, n. 35, 2013.
- SACHOT, Christelle; POOLE, Stephen; LUHESHI, Giamal N. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. **Journal of Physiology**, v. 561, n. 1, p. 263–272, 2004.
- SAIA, Rafael Simone *et al.* Cardiovascular and inflammatory response to cholecystokinin during endotoxemic shock. **Shock**, v. 39, n. 1, p. 104–112, 2013.
- SAIA, Rafael Simone *et al.* Cholecystokinin Inhibits Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Lipopolysaccharide-Stimulated Peritoneal Macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 2014, n. 896029, 2014.
- SAIA, Rafael Simone; RIBEIRO, Aline Barbosa; GIUSTI, Humberto. Cholecystokinin Modulates the Mucosal Inflammatory Response and Prevents the Lipopolysaccharide-Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction. **Shock**, v. 53, n. 2, p. 242–251, 2020.

- SÁNCHEZ-GARRIDO, Miguel Angel; GARCÍA-GALIANO, David; TENA-SEMPERE, Manuel. Early programming of reproductive health and fertility: novel neuroendocrine mechanisms and implications in reproductive medicine. **Human reproduction update**, v. 28, n. 3, p. 346–375, 2022.
- SAWCHENKO, P. E. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: The anatomists weigh in. **Journal of Comparative Neurology**, v. 402, n. 4, p. 435–441, 1998.
- SCHWARTZ, Michael W. *et al.* Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661–671, 2000.
- SERGEYEV, Valeriy; BROBERGER, Christian; HOKFELT, Tomas. Effect of LPS administration on the expression of POMC, NPY, galanin, CART and MCH mRNAs in the rat hypothalamus. **Molecular Brain Research**, v. 90, p. 93–100, 2001.
- SHI, Hang *et al.* TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 11, p. 3015–3025, 2006.
- SHINPO, Keisuke *et al.* The role of area postrema neurons expressing H-channels in the induction mechanism of nausea and vomiting. **Physiology and Behavior**, v. 107, n. 1, p. 98–103, 2012.
- SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia Humana: Uma abordagem integrada**. 7ªed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SMALL, C. J. *et al.* Chronic CNS administration of Agouti-related protein (Agrp) reduces energy expenditure. **International Journal of Obesity**, v. 27, n. 4, p. 530–533, 2003.
- SOHN, Jong Woo; ELMQUIST, Joel K.; WILLIAMS, Kevin W. Neuronal circuits that regulate feeding behavior and metabolism. **Trends in Neurosciences**, v. 36, n. 9, p. 504–512, 2013.
- SOOKOIAN, Silvia *et al.* Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: A systems biology approach. **Pediatric Research**, v. 73, n. 4–2, p. 531–542, 2013.
- SPENCER, Sarah J. Perinatal nutrition programs neuroimmune function long-term: Mechanisms and implications. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 144, 2013a.
- SPENCER, Sarah J. Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 109, 2013b.
- SPENCER, Sarah J.; TILBROOK, Alan. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, n. 8, p. 1133–1143, 2009.
- STEFANIDIS, Aneta; SPENCER, Sarah J. Effects of Neonatal Overfeeding on Juvenile and Adult Feeding and Energy Expenditure in the Rat. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52130, 2012.
- STEINERT, Robert E *et al.* Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. **Physiol Rev**, v. 97, p. 411–463, 2017.
- STERN, Javier E. Autonomic and Neuroendocrine Roles of the Paraventricular Nucleus. *Em*: LLEWELLYN-SMITH, Ida J.; VERBERNE, Anthony J. M. (org.). **Central Regulation of Autonomic Functions**. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2011. p. 62–77.
- STERNSON, Scott M.; EISELT, Anne Kathrin. Three Pillars for the Neural Control of Appetite. **Annual Review of Physiology**, v. 79, p. 401–423, 2017.
- STOCKER, C. J. *et al.* Leanness in postnatally nutritionally programmed rats is associated with increased sensitivity to leptin and a melanocortin receptor agonist and decreased sensitivity to neuropeptide y. **International Journal of Obesity**, v. 36, n.

8, p. 1040–1046, 2012.

STOPA, Larissa Rugila S. *et al.* Neonatal overfeeding reduces estradiol plasma levels and disrupts noradrenergic-kisspeptin-GnRH pathway and fertility in adult female rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 524, p. 111147, 2021.

SUGETA, Shingo *et al.* Presynaptically mediated effects of cholecystokinin-8 on the excitability of area postrema neurons in rat brain slices. **Brain Research**, v. 1618, p. 83–90, 2015.

SUN, Ji Su *et al.* Ventromedial hypothalamic primary cilia control energy and skeletal homeostasis. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 1, p. e138107, 2021.

SUZUKI, Keisuke *et al.* The role of gut hormones and the hypothalamus in appetite regulation. **Endocrine Journal**, v. 57, n. 5, p. 359–372, 2010.

SWANSON, L W; KUYPERS, H G J M. The Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus: Cytoarchitectonic Subdivisions and Organization of Projections to the Pituitary, Dorsal Vagal Complex, and Spinal Cord as Demonstrated by Retrograde Fluorescence Double-Labeling Methods. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 194, p. 555–570, 1980.

SWANSON, L W; SAWCHENKO, P E. HYPOTHALAMIC INTEGRATION: Organization of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 6, p. 269–324, 1983.

SWANSON, L. W.; SAWCHENKO, P. E. Paraventricular Nucleus: A Site for the Integration of Neuroendocrine and Autonomic Mechanisms. **Neuroendocrinology**, v. 31, p. 410–417, 1980.

TAKAHASHI, Kanji A.; CONE, Roger D. Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1043–1047, 2005.

TSUKAMOTO, Hiroki *et al.* Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK $\alpha$ -IRF3 axis activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 26, p. 10186–10201, 2018.

VAN DE SANDE-LEE, Simone; VELLOSO, Licio A. Disfunção hipotalâmica na obesidade Hypothalamic dysfunction in obesity. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 56, n. 6, 2012.

VELAZQUEZ, Fabiola N.; CAPUTTO, Beatriz L.; BOUSSIN, François D. c-Fos importance for brain development. **Aging**, v. 7, n. 12, 2015.

VELKOSKA, Elena *et al.* Early Undernutrition Leads to Long-Lasting Reductions in Body Weight and Adiposity Whereas Increased Intake Increases Cardiac Fibrosis in Male Rats. **J. Nutr**, v. 138, p. 1622–1627, 2008.

VIEAU, Didier *et al.* HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, n. SUPPL 1, p. S16–S20, 2007.

VOITS, Mechthild *et al.* Obesity induced by unspecific early postnatal overfeeding in male and female rats: hypophagic effect of CCK-8S. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 354, n. 3, p. 374–378, 1996.

WALL, Kaylee D.; OLIVOS, Diana R.; RINAMAN, Linda. High Fat Diet Attenuates Cholecystokinin-Induced cFos Activation of Prolactin-Releasing Peptide-Expressing A2 Noradrenergic Neurons in the Caudal Nucleus of the Solitary Tract. **Neuroscience**, v. 447, p. 113–121, 2020.

WANG, ChuanFeng *et al.* Effect of CART in the hypothalamic paraventricular nucleus on feeding and uncoupling protein gene expression. **NeuroReport**, v. 11, n. 14, p. 959–965, 2000.

WATERLAND, Robert A; GARZA, Cutberto. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, n. 2, p. 179–197, 1999.

WEILAND, Tracey J. *et al.* The effect of lipopolysaccharide on cholecystokinin in murine plasma and tissue. **Peptides**, v. 26, n. 3, p. 447–455, 2005.

WILLIAMS, John A. Cholecystokinin (CCK) regulation of pancreatic acinar cells: Physiological actions and signal transduction mechanisms. **Comprehensive Physiology**, v. 9, n. 2, p. 535–564, 2019.

XAVIER, João Lucas P. *et al.* Litter size reduction induces metabolic and histological adjustments in dams throughout lactation with early effects on offspring. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 1, 2019.

XIAO, Xiao Qiu *et al.* Excess Weight Gain during the Early Postnatal Period Is Associated with Permanent Reprogramming of Brown Adipose Tissue Adaptive Thermogenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4150–4159, 2007.

YANG, Liang *et al.* Role of dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y in modulating food intake and energy balance. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 179–190, 2009.

YANG, S.; GAAFAR, S. M.; BOTTOMS, G. D. Effects of multiple dose infections with *Ascaris suum* on blood gastrointestinal hormone levels in pigs. **Veterinary Parasitology**, v. 37, n. 1, p. 31–44, 1990.

YU, Yinghua *et al.* Differential expression of hypothalamic CART mRNA in response to body weight change following different dietary interventions. **Neurochemistry International**, v. 52, n. 8, p. 1422–1430, 2008.

ZANONI, Ivan *et al.* CD14 controls the LPS-induced endocytosis of toll-like receptor 4. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 868–880, 2011.

ZHANG, Chen *et al.* The dorsomedial hypothalamus and nucleus of the solitary tract as key regulators in a rat model of chronic obesity. **Brain Research**, v. 1727, p. 146538, 2020.

ZIKO, Ilvana *et al.* Neonatal overfeeding alters hypothalamic microglial profiles and central responses to immune challenge long-term. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 41, n. 1, p. 32–43, 2014.

ZUANY-AMORIM, Claudia; HASTEWELL, John; WALKER, Christoph. Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 10, p. 797–807, 2002.

**ANEXOS**

## ANEXO A - Cópia do parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação da UEL



### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 164/2019

Londrina, 25 de novembro de 2019.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Alterações nutricionais pós-natais por manipulação do tamanho da ninhada em ratos: efeitos da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na homeostase energética em machos e avaliação de parâmetros metabólicos e reprodutivos em fêmeas e suas proles." protocolo CEUA n° 18310.2019.03 sob a responsabilidade de Ermene Torres Uchôa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia 25/11/2019.

Este projeto tem por objetivo investigar o papel da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na homeostase energética de ratos machos Wistar submetidos a alterações nutricionais no período pós-natal por redução ou por expansão da ninhada, bem como avaliar os efeitos da expansão da ninhada no desenvolvimento sexual, metabólico e reprodutivo de fêmeas. **Gravidade Invasividade: 3.**

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/01/2020 a 31/12/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico
N° de animais	1732, sendo 876 Machos e 856 Fêmeas
Peso/ Idade	Mãezes: 146 Machos e 126 Fêmeas (Biotério Central) Prole estimada: 750 Machos e 750 Fêmeas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, cérebro, testículos, ovários, glândulas adrenais e tecido adiposo

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL, anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão, conforme vigência expressa neste ofício, encaminhar relatório da descrição de uso de animais para [ceua@uel.br](mailto:ceua@uel.br), conforme modelo disponível no site da CEUA/UEL (<http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>).

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Prof. Dr.ª Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
 Coordenadora da CEUA/UEL

**Prof.ª Dr.ª Maria Fernanda  
 Rodrigues Graciano**  
 Coordenadora do Comitê de  
 Ética no Uso de Animais  
 Universidade Estadual de Londrina  
 (51) 3371-3424

Hmo.(a) Sr.(a)  
**Prof. (a) Dr. (a). Ermene Torres Uchôa**  
**Responsável pelo projeto**  
 C/C para a Chefe Departamento Ciências Fisiológicas/CCB  
 C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB  
 C/C para o Biotério Central do CCB

# ANEXO B - Artigo referente ao Estudo 1: “Neonatal overnutrition, but not neonatal undernutrition, disrupts CCK-induced hypophagia and neuron activation of the nucleus of the solitary tract and paraventricular nucleus of hypothalamus of male *Wistar* rats” publicado na revista *Brain Research Bulletin*

Brain Research Bulletin 195 (2023) 109–119



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Research Bulletin

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/brainresbull](http://www.elsevier.com/locate/brainresbull)

Research report

## Neonatal overnutrition, but not neonatal undernutrition, disrupts CCK-induced hypophagia and neuron activation of the nucleus of the solitary tract and paraventricular nucleus of hypothalamus of male *Wistar* rats



Ana Luiza Machado Wunderlich<sup>a</sup>, Andressa Buseti Martins<sup>b</sup>, Camila Franciele de Souza<sup>b</sup>, Larissa Rugila S. Stopa<sup>a</sup>, Érica Cristina A.M. Monteiro<sup>c</sup>, Danielly D. Aguiar<sup>a</sup>, Rhauany P. Guergolette<sup>a</sup>, Cássia Thaís B.V. Zaia<sup>a,b,c</sup>, Ernane Torres Uchôa<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil<sup>b</sup> Multicenter Postgraduate Program in Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil<sup>c</sup> Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Food Intake  
Hypothalamus  
Brainstem  
Nutritional Programming  
Satiation

## ABSTRACT

Metabolic programming may be induced by reduction or enhancement of litter size, which lead to neonatal over or undernutrition, respectively. Changes in neonatal nutrition can challenge some regulatory processes in adulthood, such as the hypophagic effect of cholecystokinin (CCK). In order to investigate the effects of nutritional programming on the anorexigenic function of CCK in adulthood, pups were raised in small (SL, 3 pups per dam), normal (NL, 10 pups per dam), or large litters (LL, 16 pups per dam), and on postnatal day 60, male rats were treated with vehicle or CCK (10 µg/Kg) for the evaluation of food intake and *c-Fos* expression in the area postrema (AP), nucleus of solitary tract (NTS), and paraventricular (PVN), arcuate (ARC), ventromedial (VMH), and dorsomedial (DMH) nuclei of the hypothalamus. Overnourished rats showed increased body weight gain that was inversely correlated with neuronal activation of PaPo, VMH, and DMH neurons, whereas undernourished rats had lower body weight gain, inversely correlated with increased neuronal activation of PaPo only. SL rats showed no anorexigenic response and lower neuron activation in the NTS and PVN induced by CCK. LL exhibited preserved hypophagia and neuron activation in the AP, NTS, and PVN in response to CCK. CCK showed no effect in *c-Fos* immunoreactivity in the ARC, VMH, and DMH in any litter. These results indicate that anorexigenic actions, associated with neuron activation in the NTS and PVN, induced by CCK were impaired by neonatal overnutrition. However, these responses were not disrupted by neonatal undernutrition. Thus, data suggest that an excess or poor supply of nutrients during lactation display divergent effects on programming CCK satiation signaling in male adult rats.

## 1. Introduction

The metabolic programming concept proposes that a deleterious nutritional supply during early postnatal life may be a determinant factor for basal metabolic status and could impact long-term health (Marangon et al., 2020; Waterland and Garza, 1999). In this context, studies have shown that poor or overnutrition during perinatal life is associated with an increased risk of chronic diseases later in life (Ribeiro et al., 2017; Spencer and Tilbrook, 2009).

Manipulation of litter size has been used as a model of metabolic programming, based on modification of the postnatal nutritional environment (i.e., change in the number of pups per litter during lactation). In this model, animals are subjected to either over- or undernutrition, allowing the study of the long-term consequences. In rodents, the brain growth period begins prenatally and peaks during the first three weeks after birth; during this period, nutritional changes are permanent and can perturb numerous brain developmental events (Lesage et al., 2006; Vieau et al., 2007). Thus, recent works (Branquinho et al., 2017; Stopa

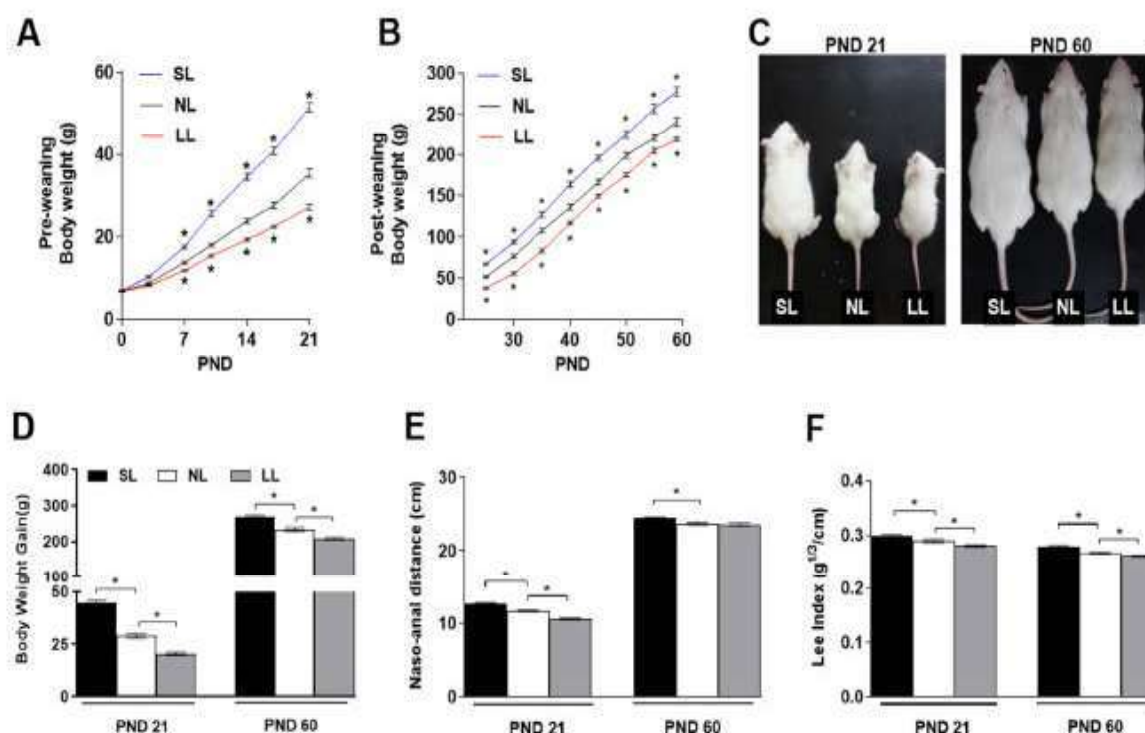
\* Correspondence to: Campus Universitário, 86051-990 Londrina, PR, Brazil.  
E-mail address: [euchoa@uel.br](mailto:euchoa@uel.br) (E.T. Uchôa).

<https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2023.02.012>

Received 12 September 2022; Received in revised form 16 February 2023; Accepted 18 February 2023

Available online 20 February 2023

0361-9230/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**Fig. 1.** Effect of litter size on body weight, naso-anal distance, and Lee index of male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL), and large litters (LL). Body weight curve (g) during pre-weaning (A) and post-weaning (B) periods. D. Body weight gain (g). E. Naso-anal distance (cm). F. Lee index ( $g^{1/3}/cm$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for RM ANOVA (for body weight curve) and Student's *t*-test (body weight gain, naso-anal distance, and Lee index). \**p* < 0.05 versus NL (*n* = 40 animals/group). G. Representative image of one animal from each litter on PNDs 21 and 60.

**Table 1**

Effect of time factor, litter size factor, treatment with cholecystokinin (CCK; 10  $\mu$ g/Kg) factor and interaction on food intake of adult male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL) and large litters (LL).

Time factor SL/NL		Litter size factor		Treatment factor		Interaction time x litter x treatment	
	<i>p</i> value		<i>p</i> value		<i>p</i> value		<i>p</i> value
$F_{1,37} = 120.107$	< 0.0001	$F_{1,37} < 0.0001$	0.999	$F_{1,37} = 5.042$	0.031	$F_{1,37} = 0.399$	0.532
LL/NL							
$F_{1,36} = 168.688$	< 0.0001	$F_{1,36} = 14.241$	0.001	$F_{1,36} = 16.096$	< 0.0001	$F_{1,36} = 0.016$	0.901

Repeated-measure three-way ANOVA followed by Sidak for multiple measures posttest. Effects were calculated in comparison with animals raised in normal litters (NL).

et al., 2021) have shown that adult rats raised in small litters become overweight or obese and hypophagic, whereas rats raised in large litters, despite the reduced body weight at weaning, become hyperphagic and display catch-up growth in early adult life, consistent with an increase in orexigenic pathways (Juan De Solis et al., 2016; Marangon et al., 2020; Spencer and Tilbrook, 2009), underlining the consequences of manipulation of litter size on long-term maintenance of body weight.

In addition to this, it was shown that cholecystokinin (CCK) may be involved in the maintenance of energy balance (Enes-Marques et al., 2020). CCK, a member of the gut brain family of peptide hormones, is secreted by the enteroendocrine I cells of the small intestine and neurons of the peripheral and central nervous system (CNS) (Dafalla et al., 2019). CCK plays a role in the control of food intake by contributing to meal termination, and exogenously administered CCK reduces food intake by reducing meal size (Bi and Moran, 2016). Studies in patients with abnormal eating behaviors, such as those with bulimia nervosa, have been shown to manifest a deficient CCK response during food consumption, that correlates with decreased meal-related satiety (Kamilaris et al., 1992). In rodents, obesity in the CCK-1 receptor (CCK-1R) knockout model Otsuka Long Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat is

attributable to their hyperphagia, suggesting that loss of signaling through CCK-1R attenuates inhibitory signals that normally limit weight gain (Bi and Moran, 2016). Centrally, the reduction in the expression of CCK-8S-neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) of neonatally overfed rats, as well in the arcuate (ARC), ventromedial (VMH), and dorsomedial (DMH) nuclei of the hypothalamus of perinatal malnourished weaning rats indicate specific disturbances of hypothalamic differentiation and maturation during the critical perinatal period of hormone-dependent brain organization (Plagemann et al., 1998; Plagemann et al., 1999b).

CCK-induced reductions in food intake and satiation are known to be mediated by its action in the area postrema (AP) (Sugeta et al., 2015) and in the nucleus of the solitary tract (NTS) which activate ascending pathways to the hypothalamic nucleus (Daly et al., 2011; Maniscalco and Rinaman, 2013; Rinaman, 2010). However, metabolic programming induced by manipulation of litter size may challenge some of these regulatory processes, compromising the hypophagic effect of CCK. Thus, the purpose of the present study was to investigate the effects of CCK on food intake and neuronal activity of adult male *Wistar* rats neonatally submitted to over or undernutrition by litter size manipulation.

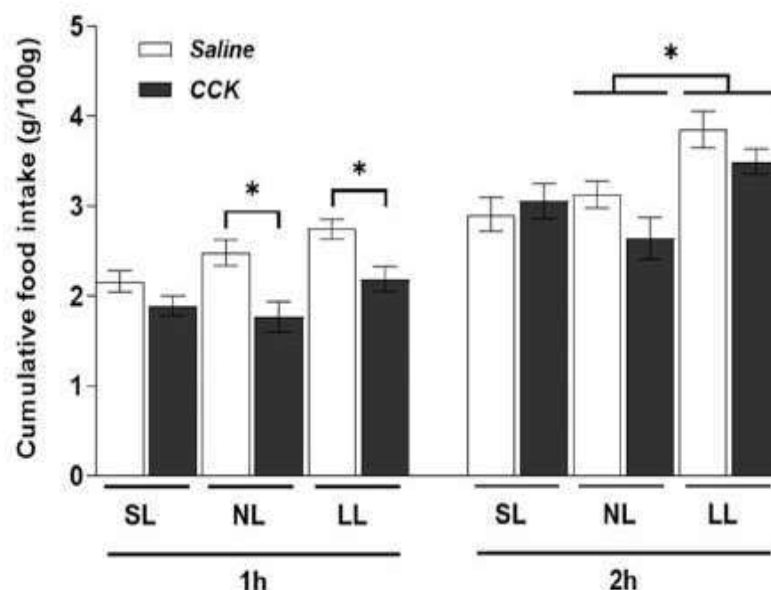


Fig. 2. Effect of cholecystokinin (CCK; 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) on food intake (g/100 g body weight) of adult male Wistar rats reared in small (SL), normal (NL), and large litters (LL). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for RM Three-way ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8$ –12 animals/group).

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals

Male Wistar rats were obtained from the mating of female with male rats from the Central Animal Facility of the State University of Londrina (UEL). The presence of sperm on the vaginal smear of the female on the morning following mating designated day 0 of pregnancy. Pregnant female rats were placed in individual cages.

Within the first 24 h of birth, on postnatal day (PND) 0, litter size was adjusted to three pups (two males and one female; *small litter* – SL), for postnatal overnutrition. In the control litter, litter size was adjusted to 10 pups (male to female ratio 1:1; *normal litter* – NL). To induce neonatal undernutrition, litter size was expanded to 16 pups (male to female ratio 1:1; *large litter* – LL). When necessary, pups born on the same day were randomly cross-fostered from one litter to another to reach the total number of pups in the litter and the proportion of males and females. The surplus pups were euthanized by decapitation. A total of 10 NL, 8 LL, and 24 SL litters were used in the study and each experimental group contained pups from at least five different litters. The body weight of male offspring was monitored on PND 3, 7, 10, 14, 17, and 21.

Animals were weaned on PND 21 and housed in groups of four to five rats of the same experimental litter in each cage. They were kept under controlled and adequate conditions of light (12 h light/dark cycle) and temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), with free access to tap water and pelleted rat chow (Nuvilab CR1, Nuvital®) unless otherwise specified. Animals were weighed every five days until PND 60.

All experiments were performed at the Department of Physiological Sciences/UEL and started at 08:00 a.m. on PND 60. The experimental procedures were approved by the Ethics Committee of Animal Use for experimentation (CEUA/UEL) under protocol number 18310.2019.03.

### 2.2. Lee index

The Lee index, expressed as  $\text{g}^{1/3}/\text{cm}$ , was evaluated at weaning and on PND 60, calculated considering body weight and naso-anal distance; the cubic root of body weight in grams was divided by naso-anal length in centimeters (Bernardis and Patterson, 1968).

### 2.3. Drug

Cholecystokinin (Bachem H-2080, CA, USA; 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) was intraperitoneally (IP) administered in a single dose and sterile saline 0.9% (NaCl 0.9%) was injected as vehicle. The dose was selected based on doses previously used in the literature (Voicz et al., 1996).

### 2.4. Assessment of CCK effects on food intake in SL, NL and LL rats

To evaluate the anorexigenic responsiveness to IP injections of CCK, animals were transferred to metabolic cages, where they remained for two days. On PND 60, after 16 h of overnight fasting, animals of SL, NL, and LL litters received an IP injection of CCK (10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) or saline (NaCl 0.9%; 0.2 mL/100 g body weight). After 15 min, all animals had access to pelleted rat chow (100 g) and food intake was quantified (g/100 g body weight) after 1 and 2 h. At the end of the experimental protocol, all animals were euthanized by decapitation.

### 2.5. Assessment of CCK effects on neuronal activation in the brainstem and hypothalamus of SL, NL and LL rats

On PND 60, after 16 h of overnight fasting, SL, NL, and LL animals received an IP injection of CCK (10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) or saline (NaCl 0.9%; 0.2 mL/100 g body weight). Then, 90 min after the injection, animals were anesthetized with an IP injection of ketamine (100 mg/Kg) and xylazine hydrochloride (20 mg/Kg), and were transcardially perfused with 200 mL of cold isotonic saline (0.15 M) containing heparin (1:80), followed by 400 mL of cold 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4), using a peristaltic pump with a speed of 10 mL per minute. Finally, the brain was removed, fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, and stored at  $4^\circ\text{C}$  in PB containing 30% sucrose.

Coronal slices of 30  $\mu\text{m}$  were obtained in a cryostat (Leica), collected in PB and stored in cryoprotectant solution at  $-20^\circ$ . For immunohistochemistry, the slices were washed with 0.01 M PB and then incubated in 0.1 M PB solution containing 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  and 0.3% Triton for 30 min to block the endogenous peroxidase. After another washing cycle, the slices were incubated with 1.5% normal goat serum and 0.3% Triton for 1 h at room temperature to block nonspecific binding. Subsequently, the slices were processed for c-Fos immunoreactivity by incubating for 48 h at  $4^\circ\text{C}$  with an anti-c-Fos antibody (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY,

**Table 2**  
Effect of litter size factor, treatment with cholecystokinin (CCK; 10 µg/Kg) factor and interaction on immunoreactive neurons in brain areas of adult male Wistar rats reared in small (SL), normal (NL) and large litters (LL).

Litter size factor		Treatment factor		Interaction litter x treatment		
SL/NL		p value	p value		p value	
AP	F <sub>1,24</sub> = 0.24	0.628	F <sub>1,24</sub> = 8.192	0.009	F <sub>1,24</sub> = 1.027	0.321
NTS	F <sub>1,29</sub> = 0.748	0.394	F <sub>1,29</sub> = 153.623	< 0.001	F <sub>1,29</sub> = 6.636	0.015
PVN						
PaV	F <sub>1,24</sub> = 1.42	0.242	F <sub>1,24</sub> = 6.70	0.014	F <sub>1,24</sub> = 0.43	0.516
PaMP	F <sub>1,20</sub> = 7.43	0.011	F <sub>1,20</sub> = 4.64	0.039	F <sub>1,20</sub> = 1.05	0.314
PaPo	F <sub>1,24</sub> = 6.06	0.019	F <sub>1,24</sub> = 0.10	0.748	F <sub>1,24</sub> = 1.82	0.187
ARC	F <sub>1,25</sub> = 1.734	0.200	F <sub>1,25</sub> = 0.342	0.564	F <sub>1,25</sub> = 0.993	0.329
VMH	F <sub>1,26</sub> = 5.774	0.024	F <sub>1,26</sub> = 0.0262	0.873	F <sub>1,26</sub> = 1.555	0.224
DMH	F <sub>1,24</sub> = 8.006	0.009	F <sub>1,24</sub> = 0.304	0.587	F <sub>1,24</sub> = 0.091	0.538
LL/NL		p value	p value		p value	
AP	F <sub>1,23</sub> = 2.018	0.169	F <sub>1,23</sub> = 25.089	< 0.001	F <sub>1,23</sub> = 0.00096	0.975
NTS	F <sub>1,25</sub> = 0.763	0.391	F <sub>1,25</sub> = 190.247	< 0.001	F <sub>1,25</sub> = 2.164	0.154
PVN						
PaV	F <sub>1,24</sub> = 0.17	0.682	F <sub>1,24</sub> = 5.70	0.023	F <sub>1,24</sub> = 0.38	0.542
PaMP	F <sub>1,24</sub> = 0.022	0.884	F <sub>1,24</sub> = 11.39	0.002	F <sub>1,24</sub> = 0.70	0.41
PaPo	F <sub>1,21</sub> = 5.59	0.025	F <sub>1,21</sub> = 0.002	0.962	F <sub>1,21</sub> = 2.19	0.149
ARC	F <sub>1,26</sub> = 0.0126	0.911	F <sub>1,26</sub> = 1.584	0.219	F <sub>1,26</sub> = 0.753	0.393
VMH	F <sub>1,26</sub> = 0.066	0.799	F <sub>1,26</sub> = 0.435	0.515	F <sub>1,26</sub> = 2.099	0.159
DMH	F <sub>1,24</sub> = 0.252	0.620	F <sub>1,24</sub> = 0.212	0.650	F <sub>1,24</sub> = 0.0451	0.834

Two-way ANOVA analysis followed by Tukey post hoc test. Effects were calculated in comparison with animals raised in normal litters (NL).

AP, Area Postrema; NTS, Nucleus of the Solitary Tract; PVN, Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; PaV, ventral subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; PaMP, medial parvocellular subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; PaPo, posterior subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; ARC, Arcuate Nucleus of Hypothalamus; VMH, Ventromedial Nucleus of Hypothalamus; and DMH, Dorsomedial Nucleus of Hypothalamus.

USA) diluted 1:20,000 in 0.1 PB containing 1.5% normal goat serum and 0.3% Triton. Free-floating slices were then washed with 0.01 PB and incubated first with goat biotin-labeled anti-rabbit immunoglobulin (Vector Inc., Burlingame, CA, USA, 1:200 dilution in 1.5% normal goat serum - 0.1 PB) and then with avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain, 1:200 in PB) for 1 h at room temperature. c-Fos labelling was detected using diaminobenzidine hydrochloride (DAB, Sigma CO., Ca, USA, 0.01%) intensified with 1% nickel ammonium sulfate. Thereafter, slices were mounted on gelatinized slides, air-dried overnight, dehydrated in xylene, and placed under a cover slip with Entellan (New Jersey, USA).

The brainstem and hypothalamic nucleus were identified according to the Paxinos and Watson (2006) brain rat atlas. AP and NTS were considered at - 13.68 to - 14.08 mm from bregma, medial (PaMP) and ventral parvocellular (PaV) subdivisions of the PVN were considered at - 1.72 to - 1.92 mm, and posterior parvocellular (PaPo) subdivision of the PVN was considered at - 2.04 mm from bregma, ARC and VMH were

considered at - 2.16 to - 3.36 mm, and DMH was considered at - 2.92 to - 3.36 mm from bregma. Bilateral counting of immunolabelled cells was carried out in 7 slices for AP and NTS, 5 slices for PaV and PaMP, 2 slices for PaPo, 15 slices for ARC, 12 slices for VMH and 5 slices for DMH per animal. The visual counting of neurons was performed in eight to ten animals in each group. c-Fos immunoreactive neurons were quantified manually with the aid of an image system attached to a microscope. The threshold for positive staining was individually established in a manner blinded to the experimental conditions.

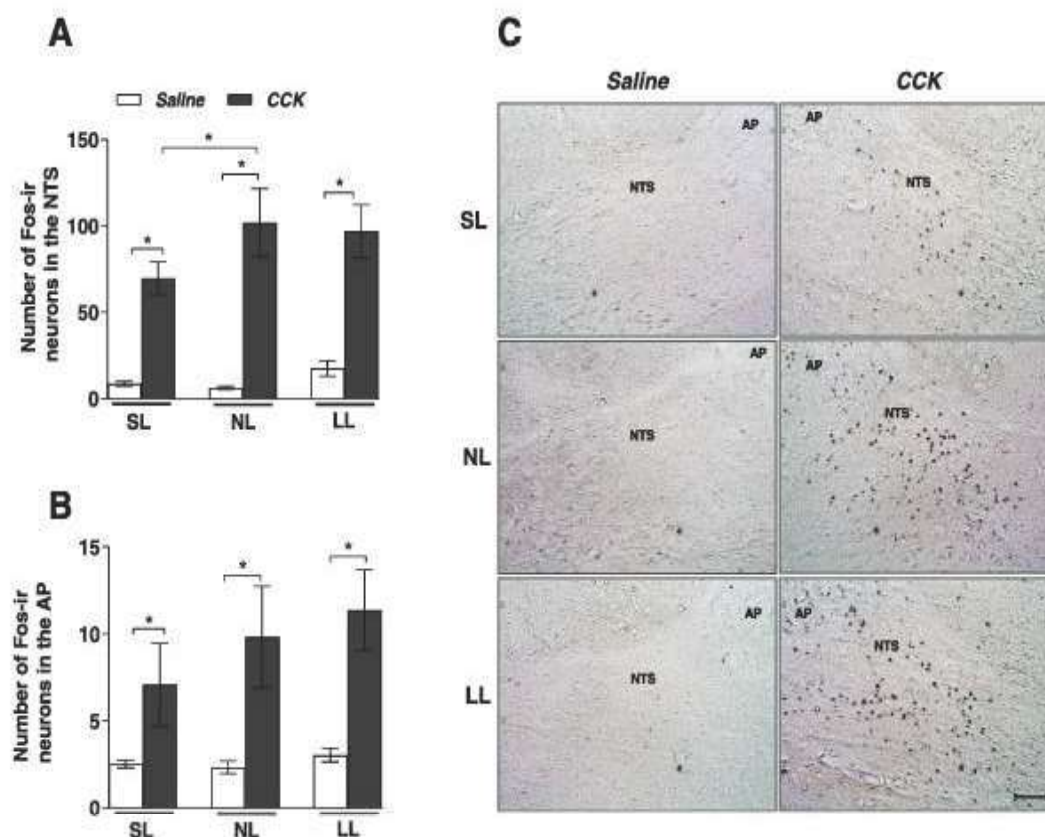
## 2.6. Statistical analysis

The collected data were submitted to the Shapiro-Wilk test, to verify normality, and Levene's test, to verify the homogeneity of variance. Considering that the goal of this study was to compare the effects of over and undernutrition on the evaluated parameters with a control group (normal litter size), not to compare the divergent litter size models one each other (SL vs LL), all the comparisons were performed with the NL group (SL vs NL and LL vs NL). Repeated measures ANOVA (RM ANOVA), followed by Sidak for multiple measures posttest, was performed to evaluate body weight and food intake. Student's *t*-test was used for the analysis of body weight gain, naso-anal distance, and the Lee index. Two-way ANOVA, followed by Tukey post hoc test, was performed to evaluate the interaction between the variables group (litter size) and treatment (CCK or saline) on neuron activity. Spearman's correlation coefficient was calculated for analysis of correlation between body weight gain and neuron activation. Data were analyzed using GraphPad Prism 7.00, Sigma Plot 11.0 (for Two-way ANOVA) and IBM SPSS Statistics 22 (for Three-way ANOVA). Results are expressed as mean ± standard error of mean (S.E.M). Differences were considered significant at *P* < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Effect of litter size on body weight, naso-anal distance and Lee index

Fig. 1 represents the effect of litter size on biometric parameters of SL, NL and LL animals. On PND 60, a subset of these animals was assigned for food intake protocol and the other subset allocated to the neuronal activity experiment (exhibited in Figs. 2 and 3–5). Mixed and repeated-measure factorial ANOVA of body weight showed that neonatal overnutrition resulted in increased body weight from the pre-weaning period, on PND 7, until adulthood, on PND 60, as shown in Fig. 1A, B and representative image Fig. 1C (pre-weaning period - age factor:  $F_{6, 452} = 2214$ ,  $p < 0.0001$ ; litter size factor:  $F_{1, 72} = 123.7$ ,  $p < 0.0001$ ; interaction:  $F_{6, 452} = 114.9$ ,  $p < 0.0001$ ; post-weaning period - age factor:  $F_{2, 993, 170.6} = 2304$ ,  $p < 0.0001$ ; litter size factor:  $F_{1, 72} = 40.73$ ,  $p < 0.0001$ ; interaction:  $F_{7, 499} = 7.342$ ,  $p < 0.0001$ ). SL rats exhibited increased body weight gain (Fig. 1D), length (Fig. 1E), and Lee index (Fig. 1F) at weaning [body weight gain:  $t(78) = 11.92$ ,  $p < 0.0001$ ; naso-anal distance:  $t(78) = 7.589$ ,  $p < 0.0001$ ; Lee index:  $t(78) = 2.966$ ,  $p = 0.004$ ] and on PND 60 [body weight gain:  $t(78) = 4.8$ ,  $p < 0.0001$ ; naso-anal distance:  $t(78) = 3.201$ ,  $p = 0.002$ ; Lee index:  $t(78) = 4.579$ ,  $p < 0.0001$ ], which was higher than the NL group. Neonatal undernutrition, on the other hand, resulted in lower body weight from pre-weaning period, on PND 7, until early adult life, on PND 60, in comparison to NL animals (pre-weaning period - age factor:  $F_{1, 775, 134.9} = 1459$ ,  $p < 0.0001$ ; litter size factor:  $F_{1, 76} = 47.03$ ,  $p < 0.0001$ ; interaction:  $F_{6, 456} = 35.93$ ,  $p < 0.0001$ ; post-weaning period - age factor:  $F_{2, 979, 224.3} = 4094$ ,  $p < 0.0001$ ; litter size factor:  $F_{1, 76} = 33.24$ ,  $p < 0.0001$ ; interaction:  $F_{7, 527} = 3.508$ ,  $p = 0.0011$ ; Fig. 1A, B, C). LL rats exhibited decreased body weight gain [ $t(78) = 7.37$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 1D], naso-anal distance [ $t(78) = 7.369$ ,  $p < 0.0001$ ; Fig. 1E] and Lee index [ $t(78) = 2.568$ ,  $p = 0.012$ ; Fig. 1F] on PND 21. On PND 60, early undernourished animals continued to present reduced body weight gain [ $t(78) = 4.24$ ,  $p < 0.0001$ ] and Lee index [ $t(78) = 2.874$ ,  $p = 0.0052$ ] in



**Fig. 3.** Effect of cholecystokinin (CCK; 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on immunoreactive neurons in the brainstem of adult male Wistar rats reared in small (SL), normal (NL), and large litters (LL). Number of c-Fos-labeled neurons in the (A) NTS and (B) AP. (C) Representative photomicrographs (10 $\times$  magnification) of coronal slices, showing immunoreactivity in the AP and NTS. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for two-way ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8$ –10 animals/group). AP, Area Postrema; NTS, Nucleus of the Solitary Tract. CC, central canal.

comparison to the NL group (Fig. 1D, F), with similar naso-anal distance to NL animals [ $t(78) = 0.339$ ,  $p = 0.735$ , Fig. 1E].

### 3.2. Effect of CCK on food intake in SL, NL and LL rats

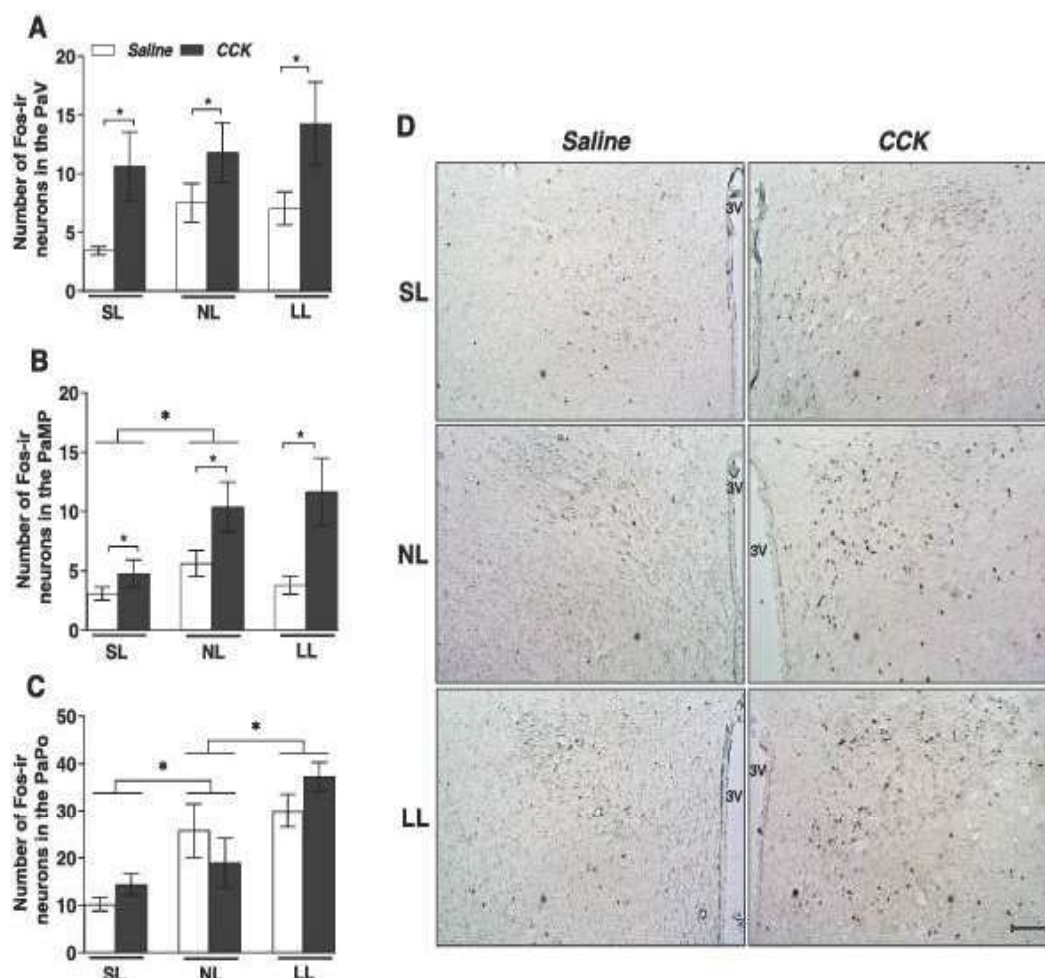
The interpretation of the statistical analysis of the effect of CCK on food intake is presented in Table 1, and the IP effect of CCK on food intake in SL, NL, and LL animals is shown in Fig. 2. Repeated-measure three-way ANOVA analysis showed that food intake of SL animals was not altered by CCK treatment (1 h:  $p = 0.133$ ; 2 h:  $p = 0.559$ ) or by litter size (1 h:  $p = 0.473$ ; 2 h:  $p = 0.62$ ) at any time point evaluated in the study. CCK treatment decreased food intake of NL ( $p = 0.002$ ) and LL ( $p = 0.002$ ) animals 1 h after its administration, without effects of CCK after 2 h in any group (NL:  $p = 0.07$ ; LL:  $p = 0.074$ ). The cumulative food intake was increased in the LL group compared to the NL group after 2 h, regardless of treatment [ $p$  (saline groups) = 0.006;  $p$  (CCK groups) = 0.004].

### 3.3. Effects of CCK on neuron activation in SL, NL and LL rats

The interpretation of the statistical analysis of the effect of CCK on neuronal activation is presented in Table 2, and representative photomicrographs in Figs. 3 and 4. There was an effect of treatment – observed by the increase in the number of c-Fos-ir neurons after IP injection of CCK – in the NTS, AP, PaV, and PaMP subdivisions of PVN (Fig. 3A and B, Fig. 4A and B, respectively) in SL, NL, and LL animals, compared to the respective saline groups. Early overnutrition resulted in lower neuron activation mediated by CCK in the NTS (Fig. 3A) than the NL group, indicating an interaction between treatment (saline or CCK) and

litter (SL and NL) in this area (Table 2). A litter size effect was observed in the PaMP and PaPo subdivisions (Fig. 4B, C), as well as in the VMH and DMH (Fig. 5B, C), in which the SL group showed reduced neuron activation in these nuclei compared to the NL group, both in CCK- and saline-treated animals (Table 2). Contrarily, the litter size effect for neonatal undernutrition was seen by the increased c-Fos immunoreactivity in the PaPo subdivision (Fig. 4C) compared to the NL group, with higher neuron activation in this nucleus than in the NL group, in both treatments. There was no effect of treatment or litter size (NL  $\times$  LL) in the ARC, VMH, and DMH (Fig. 5A, B, C, respectively, and Table 2).

Considering the results of body weight gain of SL, NL, and LL animals (Fig. 1D), which was inversely proportional to neuron activation in the PaPo subdivision (Fig. 4C), Spearman's correlation coefficient was calculated for all animals of SL, NL, and LL groups. The analysis showed a negative correlation (saline:  $r = -0.56$ ,  $p = 0.002$ , Fig. 6A; CCK:  $r = -0.57$ ,  $p = 0.0019$ , Fig. 6D) between data, where lower neuron activation in the PaPo was associated with increased body weight gain, as in SL animals, and higher neuron activation in the PaPo was associated with decreased body weight gain, as in the LL group. Concerning VMH and DMH, there was a litter size effect in neuron activation in the VMH and DMH, only for the comparison of NL vs SL, but not for NL vs LL (5B and 5C), which showed that neuron activation in the VMH and DMH of NL and SL groups was inversely proportional to the body weight gain of these groups (Fig. 1D). Thus, Pearson's correlation coefficient was also calculated for analysis between body weight gain and neuron activation in the VMH and DMH of NL and SL groups. The analysis revealed a negative correlation between data, by means of decreased neuron activation in the VMH of animals treated with CCK ( $r = -0.56$ ,  $p = 0.03$ , Fig. 6E) and in the DMH of both saline and CCK-treated



**Fig. 4.** Effect of cholecystokinin (CCK; 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) on immunoreactive neurons in the PVN subdivisions of adult male Wistar rats reared in small (SL), normal (NL), and large litters (LL). Number of c-Fos-labeled neurons in the (A) PaV, (B) PaMP, and (C) PaPo subdivisions of the PVN. (D) Representative photomicrographs (10 $\times$  magnification) of coronal slices, showing immunoreactivity in the PVN. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for two-way ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8$ –10 animals/group). PaV, ventral subdivision of Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus; PaMP, medial parvocellular subdivision of Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus; PaPo, posterior subdivision of Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus; 3 V, third ventricle.

animals (saline:  $r = -0.52$ ,  $p = 0.046$ , Fig. 6C; CCK:  $r = -0.62$ ;  $p = 0.018$ , Fig. 6F), associated with increased body weight gain, as in SL animals.

#### 4. Discussion

Rodent lactation has been considered a crucial phase for brain development, and nutritional supply during this early postnatal period of life may be a determinant factor for basal metabolism status in adulthood. The present study demonstrated that lactational overnutrition, but not neonatal undernutrition, reduced CCK-induced hypophagic effects and activation of NTS and PVN neurons.

The current data indicated that lactational overnutrition led to higher body weight from the pre-weaning period (PND 7) until early adult life (PND 60), whereas undernourished rats presented persistently lower body weight from childhood (PND 7) until early adulthood (PND 60) than normal nourished animals. The heavier and larger phenotype of SL animals is consistent with reports from previous studies (Debarba et al., 2020; Enes-Marques et al., 2020; Halah et al., 2018; Marangon et al., 2020; Spencer and Tilbrook, 2009). Interestingly, increasing the litter size on PND 3 was shown to induce reversible growth restriction with complete catch-up (Debarba et al., 2020; Halah et al., 2018), while

manipulation on the first two days of life showed that, despite incomplete catch-up after weaning, the body weight and body mass index of animals remained reduced throughout life (Velkoska et al., 2008; Remmen et al., 2008a). Thus, it seems that different and divergent metabolic programming may be obtained using different phases of the CNS development to interfere with neural connections (Oliveira et al., 2011) and that immediate manipulation of litter size may have a more pronounced insult in the re-setting of this physiological system, and therefore, result in the reported programming effects.

Curiously, higher and lower body weight gain after early over and undernutrition, respectively, were inversely correlated with activation of PaPo neurons of both vehicle- and CCK-treated animals, without treatment effect. This area is known to project to brainstem and spinal neurons involved in autonomic regulation (Palkovits, 1999). Thus, these data suggest that neonatal nutritional programming changes the activation of PVN neurons with descending projections to sympathetic preganglionic neurons of the intermediolateral column, which modulates energy expenditure, and might contribute to changes seen in the body weight of animals following litter size manipulation. Regarding malnutrition, undernourishment was shown to inhibit efferent activity of the vagus nerve in the offspring of food-restricted dams during lactation (Oliveira et al., 2011), and increase feed efficiency in LL

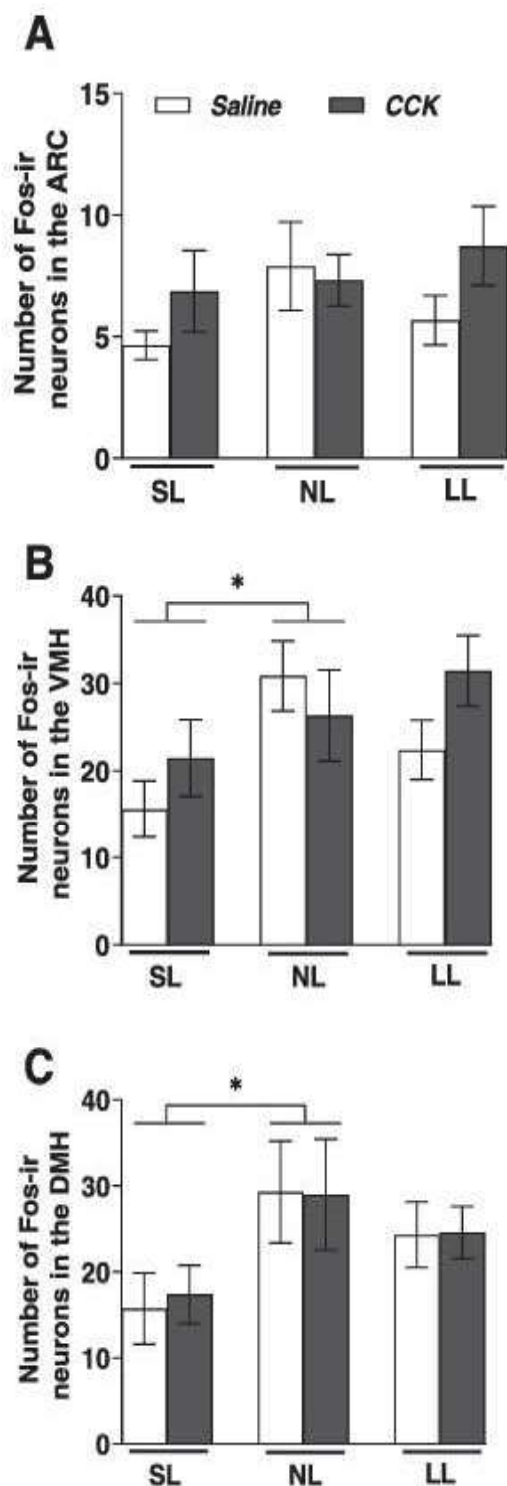


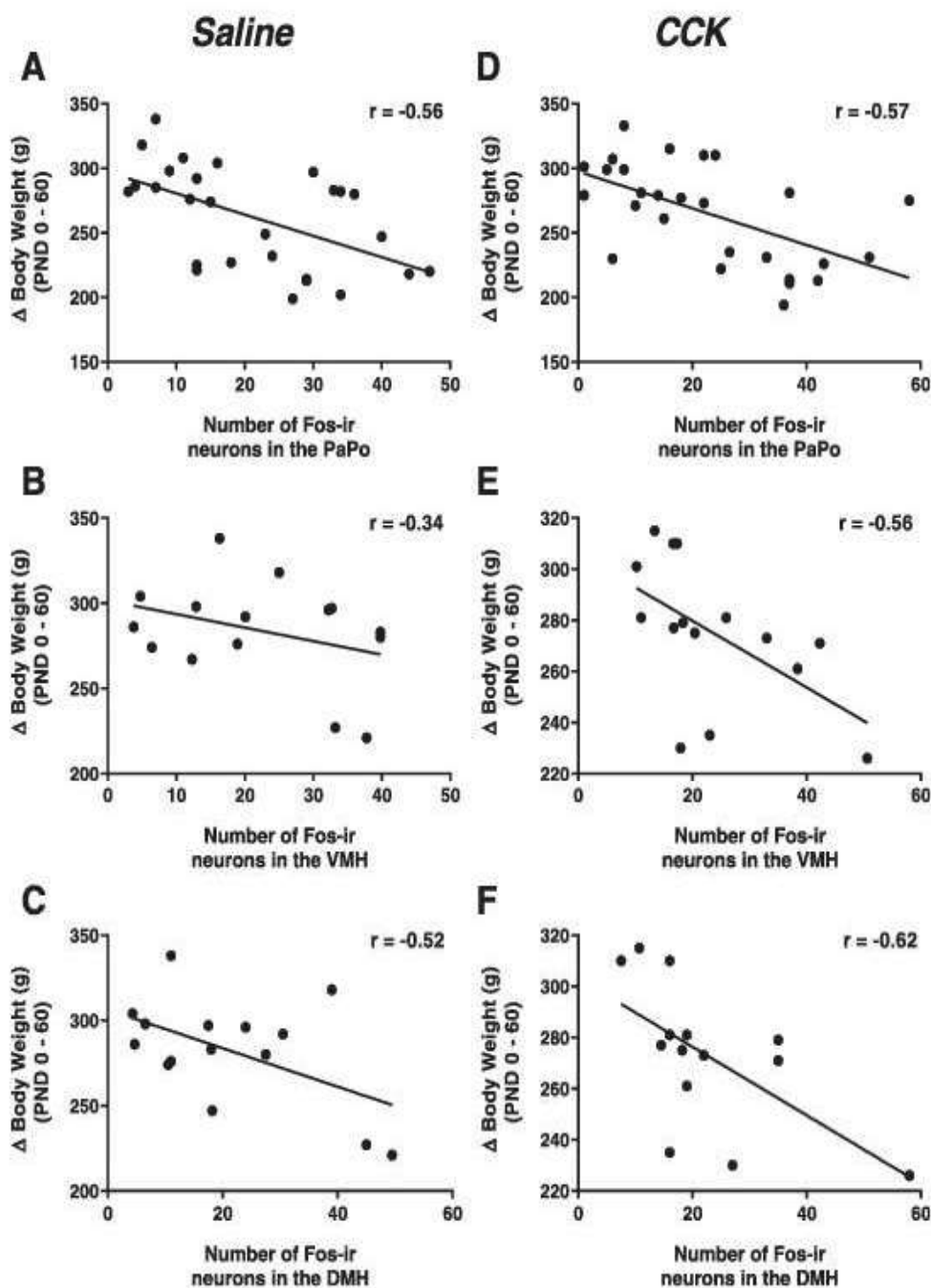
Fig. 5. Effect of cholecystokinin (CCK; 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) on immunoreactive neurons in hypothalamic nuclei of adult male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL), and large litters (LL). Absolute number of c-Fos-labeled neurons in the (A) ARC, (B) VMH, and (C) DMH. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for two-way ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8$ –10 animals/group). ARC, Arcuate Nucleus of the Hypothalamus; VMH, Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus; and DMH, Dorsomedial Nucleus of the Hypothalamus.

animals (Remmers et al., 2008a) and total energy expenditure in constitutional thinness individuals, owing to an increase in non-exercise activity thermogenesis (Bossu et al., 2007). Thus, these adaptations in metabolic control systems seem to contribute to the permanent thin phenotype in animals raised in large litters, as seen in the present study.

Additionally, for the SL group, an association between body weight and lower neuron activation in the VMH of CCK-treated animals and in the DMH of vehicle- and CCK-treated rats was observed. Interestingly, no effect of treatment was noticed in these nuclei. The VMH is also known to regulate energy homeostasis (Sun et al., 2021) through sympathetic nerve activity (Lindberg et al., 2013). Therefore, decreased VMH activity in SL animals (litter size effect) could also result in lower sympathetic outflow. In accordance with this, persistent overweight phenotype in neonatally overfed rats has been associated with increased parasympathetic vagus nerve activity (Rodrigues et al., 2022), impairment of sympathetic activity in brown adipose tissue (BAT) and its hypoactivity (de Almeida et al., 2013; Xiao et al., 2007), as well as reduced energy expenditure in the juvenile phase (Stefanidis and Spencer, 2012). Thus, based on the literature and along with the present results, early overnutrition is associated with hypoactivation of hypothalamic neurons (Plagemann, 2006), specifically the PaPo, VMH, and DMH, and a permanent increase in body weight, possibly as a consequence of disrupted CNS and autonomic connections induced by nutritional changes early in postnatal development.

Peripheral CCK-induced activation of neurons in hypothalamic nuclei is mediated by NTS neurons (Kobelt et al., 2006; Maniscalco and Rinaman, 2013; Sabatier et al., 2013) through vagal afferent neurons (Rinaman, 2003) or else via the AP (Michel et al., 2007). Accordingly, the increased c-Fos expression in the NTS following IP administration of CCK in rats that underwent surgical vagal deafferentation indicates the involvement of other routes of NTS neuronal activation by the CCK (Baptista et al., 2007). In agreement, the current report demonstrated that IP injection of CCK increased c-Fos labeled neurons in the AP and NTS in all three litters. The involvement of the AP in the induction of nausea and/or emesis (Shimpo et al., 2012) raises the possibility of a CCK-induced malaise effect. Indeed, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  is a high CCK dose that can cause malaise or nausea, mediated by activation of AP neurons (van der Kooy, 1984), which was observed in the three experimental groups. In addition, an observational study conducted by Verbaeys et al. (2009) showed that doses up to 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of PEGylated-CCK9 resulted in changes in eating parameters and behavioral profiles such as earlier cessation of eating behavior, followed by resting behavior, in accordance with those observed after administration of known anorectic agents or pre-feeding, suggesting that these may be a result of the natural process of satiation, rather than due to aversiveness. The aversiveness effect of CCK was evident with increasing doses up to the highest dose tested (16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), when the basic behavioral structure associated with natural satiety was not preserved, and the anorectic response was indicative of a non-physiological effect. In addition, abdominal cramps were observed after administration of this 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dose, suggesting malaise-induced anorexia. Unfortunately, the 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dose was not tested, but it is much closer to the 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  than the 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dose. Indeed, cramps were not observed in any CCK-treated animals of the present study, indicating that despite 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  being a high CCK dose, it did not cause malaise or nausea. However, as a quantitative study of cramps was not conducted in the current work, it cannot be discarded that CCK might have induced lower food intake in NL and LL animals, at least in part, by inducing nausea, observed by increased activation of AP neurons.

LL animals showed increased CCK-induced c-Fos immunoreactivity in the NTS, but no litter effect was noticed. The preserved response to CCK in LL animals was also observed in the PaV and PaMP, accompanied by decreased food intake 1 h after CCK injection, similar to the NL group. On the other hand, perinatal undernutrition induced by a low protein diet increased neuronal activation of the NTS in response to feeding stimulation in adult rats (Lira et al., 2014), indicating that different undernutrition paradigms may account for divergent



**Fig. 6.** Scatter plots illustrating the relationship between body weight gain (g) from birth until PND 60 of male Wistar rats reared in small (SL), normal (NL), and large litters (LL) and c-Fos immunoreactivity for saline (left column) or Cholecystokinin (CCK; right column). Correlations are shown using data for neuron activity of SL, NL, and LL animals in the (A, D) PaPo subdivision of the PVN, and neuron activity of SL and NL animals in the (B, E) VMH, and (C, F) DMH. PaPo, posterior subdivision of Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus (PVN); VMH, Ventromedial Nucleus of the Hypothalamus; and DMH, Dorsomedial Nucleus of the Hypothalamus.

programming of satiation pathways, and/or that multiple satiation signals besides CCK, including a combination of oral sensory and/or gastric distension signals (Havel, 2001) may display different responses in neonatal underfed animals. Curiously, LL rats, both CCK-treated and saline, ate more than NL groups 2 h following IP injection. In this context, in the fasting state, juvenile undernourished animals exhibit an increase in the orexigenic signaling compared to control animals, observed by elevated neuropeptide Y (NPY) content in the ARC and PVN (Plagemann et al., 1999a), increased mRNA levels of NPY and

Agouti-related protein (AgRP) in the ARC (López et al., 2005), and melanin-concentrating hormone (MCH) in the lateral hypothalamus (LH) (Remmers et al., 2003b). Accordingly, Ndjim et al. (2017) reported that adult perinatally undernourished rats have a reduced first meal satiety ratio, as the inter-meal interval preceding the second meal was reduced, associated with a higher postprandial plasmatic CCK release, pointing out that the higher amount of plasma CCK was inefficient to reduce food intake. This could elucidate the increased cumulative food intake observed in LL rats two hours post-treatment in the present work

and is consistent with existing evidence in the literature that early undernourished animals display a delay in the satiety point (Lira et al., 2014). To our knowledge, the current study is pioneer in showing that the neonatal model of undernutrition induced by expansion of litter size does not disrupt CCK-induced hypophagia associated with neuronal activation in the AP, NTS, and PVN.

Interestingly, although SL animals showed a normal response to CCK in the AP, they presented decreased CCK-mediated hypophagia and neuron activation in the NTS and PVN, specifically PaMP, similar to recent findings from Enes-Marques et al. (2020). Taken together, these results rule out the hypothesis that the reduction in NTS activation by CCK could be a consequence of an impaired AP response after CCK treatment. Accordingly, the lack of hypophagia and reduced NTS neuron activation induced by CCK in the SL group suggest that neonatal overnutrition accounts for decreased responsiveness to CCK-induced satiation, mediated by NTS, and not to decreased responsiveness to CCK-induced malaise, mediated by AP. In addition, previous studies have also shown that high (10 µg/Kg, Voits et al., 1996) and low doses (0.05 µg/Kg, Enes-Marques et al., 2020) of CCK reduced food intake in normal, but not in SL rats, which reinforces the current results that lactation overnutrition-induced obesity impairs satiation-related responses induced by CCK.

Furthermore, recent studies showed that higher caloric intake was associated with less CCK-induced expression of c-Fos in NTS neurons (Wall et al., 2020), which is compatible with decreased stimulation by vagal afferent neurons (Dockray, 2012; Steinert et al., 2017). Indeed, unresponsiveness of vagal afferent neurons has been observed in diet-induced obesity (al Helaili et al., 2020; de Lartigue et al., 2012, 2011). Additionally, the neonatal overnourished model of obesity is known to lead to leptin resistance, and leptin can determine the magnitude of CCK effects (Dockray, 2012; Williams, 2019). In agreement with this, de Lartigue et al. (2012) demonstrated that leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits CCK signaling and satiation in diet-induced obesity in rats and Marangon et al. (2020) reported that SL rats presented a lack of anorexigenic effects when challenged with exogenous leptin. Thus, it is likely that a reduction in ascending vagal activation and the disrupted actions of other feeding-related signals might contribute to the observed reduction in the number of immunoreactive neurons in the NTS and consequently in the PVN response to CCK in the SL group. Taken together, these data suggest that obesity induced by changing the litter size can alter CCK hypophagic response by reducing the activation of the NTS and subregions of the PVN.

The integrated signals from the NTS directly project to the hypothalamus (Lo et al., 2014) and the expression of CCK receptors was detected in several hypothalamic nuclei. However, there was no c-Fos immunoreactivity in the VMH, DMH, and ARC in SL, NL, or LL animals in response to CCK injection in the current study. Enes-Marques et al. (2020) also reported the absence of VMH neurons responding to CCK in NL and SL groups, but, contrarily to the present study, an increase in the number of c-Fos labeled neurons in the ARC and DMH of NL animals after CCK treatment. According to Pirmik et al. (2010), CCK alone does not influence neuronal activity in the ARC and VMH. In agreement, Kobelt et al. (2006) and Noetzel et al. (2009) found that there was no influence of CCK in the VMH and ARC of Sprague Dawley rats. Furthermore, intracerebroventricular CCK, given alone, did not alter the number of c-Fos cells in the ARC of Long-Evans rats maintained on chow or fed a low- or high-fat-diet (Lo et al., 2014). Based on this, the present study suggests that, in the tested conditions, the VMH, DMH, and ARC were not the main hypothalamic nuclei where CCK acted to increase satiation. Thus, this study provides evidence that CCK affected the brainstem and the hypothalamus differentially, depending on the nuclei evaluated, and that satiation signals induced by CCK preferentially occurred via the NTS and PVN.

## 5. Conclusion

In summary, the present data demonstrated that the imbalance in food availability in the neonatal period, induced by altering the litter size in which the animals were raised, can alter body dimensions, such as body weight and the Lee index, and induce adaptive adjustments in hypothalamic nuclei. In addition, changes in perinatal nutrition can alter responsiveness of the offspring to CCK on energy homeostasis in adult life. Specially, overnourished animals displayed impaired hypophagia and lower neuron activation in the NTS and PVN neurons induced by CCK. Thus, it is likely that excess nutrients during neonatal development, rather than lack of nutrients, may lead to disruption in CCK signaling. Furthermore, the preserved CCK effects on undernourished animals suggest that the mechanisms underlying CCK-induced satiating responses may be differently disturbed, depending on the neonatal nutritional imbalance. Finally, the current results showed the function of important controls on eating in opposing nutritional models and may provide new insight into the pathophysiology and therapeutic targets for obesity and other eating disorder treatments.

## Funding source

This work received financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES- Finance Code 001), Brazil.

## Credit authorship contribution statement

A.L.M.W. participated in study concept and design, performed experiments, analysis and interpretation of data, and drafting of the manuscript. A.B.M., C.F.S., L.R.S.S., E.C.A.M.M., D.D.A. and R.P.G. participated in acquisition of data. C.T.B.V.Z and E.T.U. participated in study concept and design and administrative, technical, and material support. E.T.U. conceived and designed research, participated in acquisition of data, analysis, and interpretation of data, drafting and critical revision of the manuscript, and study supervision.

## Conflict of Interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

## Data Availability

Data will be made available on request.

## References

- de Almeida, D.L., Fabrício, G.S., Trombini, A.B., Pavanello, A., Tófolo, L.P., da Silva Ribeiro, T.A., de Freitas Mathias, P.C., Palma-Rigo, K., 2013. Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. *Cell. Physiol. Biochem.* 32, 1621–1630. <https://doi.org/10.1159/000356598>.
- Baptista, V., Browning, K.N., Travagli, R.A., 2007. Effects of cholecystokinin-8s in the nucleus tractus solitarius of vagally deafferented rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, R1092–R1100. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00517.2006>.
- Bernardis, L.L., Patterson, B.D., 1968. Correlation between "Lee index" and carcass fat content in weaning and adult female rats with hypothalamic lesion. *J. Endocrinol.* 40, 527–528. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0400527>.
- Bi, S., Moran, T.H., 2016. Obesity in the otsuka long evans tokushima fatty rat: mechanisms and discoveries. *Front Nutr.* 3. <https://doi.org/10.3389/fnut.2016.00021>.
- Boone, C., Galunza, B., Normand, S., Germain, N., Collet, P., Frere, D., Lang, F., Laville, M., Batour, B., 2007. Energy expenditure adjusted for body composition differentiates constitutional thinness from both normal subjects and anorexia nervosa. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 292, E132–E137. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.0041.2006>.
- Branquinho, N.T.D., Cruz, G.H.P., Borrasca, C.L., Alves, L., de, P.S., Gomes, C.R., de, G., Godoi, V.A.F., de, Pedrosa, M.M.D., 2017. Early-onset obesity and food restriction alter hepatocyte metabolism in adult Wistar rats. *Arch. Physiol. Biochem* 123, 297–305. <https://doi.org/10.1080/13813455.2017.1326942>.
- Dafalla, A.I., Mhalhal, T.R., Hiscock, K., Heath, J., Sayegh, A.I., 2019. Non-sulfated cholecystokinin-8 increases enteric and hindbrain Fos-like immunoreactivity in male

- Sprague Dawley rats. *Brain Res.* 1709, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.019>.
- Daly, D.M., Park, S.J., Valinsky, W.C., Beyak, M.J., 2011. Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse. *J. Physiol.* 589, 2857–2870. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.204594>.
- Debarba, L.K., Marangon, P.B., Borges, B.C., Veida-Silva, H., Venancio, J.C., Almeida-Pereira, G., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L.K., 2020. Neonatal nutritional programming induces gliosis and alters the expression of T-cell protein tyrosine phosphatase and connexins in male rats. *Horm. Behav.* 120, 104690. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2020.104690>.
- van der Kooy, D., 1984. Area postrema: site where cholecystokinin acts to decrease food intake. *Brain Res.* 295, 345–347. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90982-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90982-X).
- Dockray, G.J., 2012. Cholecystokinin. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 19, 8–12. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e32832834eb77d>.
- Énes-Marques, S., Rojas, V.C.T., Batista, T.H., Vitor-Vieira, F., Novais, C.O., Vilela, F.C., Rafacho, A., Giusti-Paiva, A., 2020. Neonatal overnutrition programming impairs cholecystokinin effects in adult male rats. *J. Nutr. Biochem.* 86, 108494. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108494>.
- Halah, M.P., Marangon, P.B., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L.K., 2018. Neonatal nutritional programming impairs adiponectin effects on energy homeostasis in adult life of male rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 315, 29–37. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00358.2017>.
- Havel, P.J., 2001. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp. Biol. Med.* 226, 963–977. <https://doi.org/10.1177/153537020122601102>.
- (a) Helaili, A., Park, S.J., Beyak, M.J., 2020. Chronic high fat diet impairs glucagon like peptide-1 sensitivity in vagal afferents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 533, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.08.045>.
- Juan De Solís, A., Baquero, A.F., Bennett, C.M., Grove, K.L., Zeltser, L.M., 2016. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. *Mol. Metab.* 5, 198–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2016.01.003>.
- Kamilaris, T.C., Johnson, E.O., Calogero, A.E., Kalogeris, K.T., Bernardini, R., Chrousos, G.P., Gold, P.W., 1992. Cholecystokinin-octapeptide stimulates hypothalamic-pituitary-adrenal function in rats: role of corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 130, 1764–1774. <https://doi.org/10.1210/endo.130.4.1312423>.
- Kobelt, P., Paulitsch, S., Goebel, M., Stengel, A., Schmidtman, M., van der Voort, I.R., Tebbe, J.J., Veh, R.W., Klapp, B.F., Wiedenmann, B., Taché, Y., Mönnikes, H., 2006. Peripheral injection of CCK-8S induces Fos expression in the dorsomedial hypothalamic nucleus in rats. *Brain Res.* 1117, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.092>.
- de Lartigue, G., de la Serre, C.B., Espero, E., Lee, J., Raybould, H.E., 2011. Diet-induced obesity leads to the development of leptin resistance in vagal afferent neurons. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E187–E195. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00056.2011>.
- de Lartigue, G., de la Serre, C.B., Barber, E., Espero, C., Lee, E., Raybould, H.E., 2012. Leptin resistance in vagal afferent neurons inhibits cholecystokinin signaling and satiation in diet induced obese rats. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032967>.
- Letage, J., Sebati, N., Leonhardt, M., Dutriez-Casteloot, I., Breton, C., Deloof, S., Vieux, D., 2006. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 9, 183–198. <https://doi.org/10.1080/10253890601056192>.
- Lindberg, D., Chen, P., Li, C., 2013. Conditional viral tracing reveals that steroidogenic factor 1-positive neurons of the dorsomedial subdivision of the ventromedial hypothalamus project to autonomic centers of the hypothalamus and hindbrain. *J. Comp. Neurol.* 521, 3167–3190. <https://doi.org/10.1002/cne.23338>.
- Lira, L.A., Almeida, L.C.A., da Silva, A.A.M., Cavalcante, T.C.F., de Melo, D.D.C.B., de Souza, J.A., Camplina, R.C.F., de Souza, S.L., 2014. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 38, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.07.007>.
- Lo, C.C., Davidson, W.S., Hebbard, S.K., Georgievsky, M., Lee, A., Tso, P., Woods, S.C., 2014. Intra-peritoneal CCK and fourth-intraventricular Apo AIV require both peripheral and NTS CGK1R to reduce food intake in male rats. *Endocrinology* 155, 1700–1707. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1846>.
- López, M., Seoane, L.M., Tovar, S., García, M.C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Señas, R. M., 2005. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia* 48, 140–148. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1596-z>.
- Maniscalco, J.W., Rinaman, L., 2013. Overnight food deprivation markedly attenuates hindbrain noradrenergic, glucagon-like peptide-1, and hypothalamic neural responses to exogenous cholecystokinin in male rats. *Physiol. Behav.* 121, 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.01.012>.
- Marangon, P.B., Mecawi, A.S., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L.L.K., 2020. Perinatal over- and underfeeding affect hypothalamic leptin and ghrelin neuroendocrine response in adult rats. *Physiol. Behav.* 215, 112793. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112793>.
- Michel, S., Bocskei, C., Ergüven, E., Lutz, T.A., Riediger, T., 2007. Diet-derived nutrients modulate the effects of amylin on c-Fos expression in the area postrema and on food intake. *Neuroendocrinology* 86, 124–135. <https://doi.org/10.1159/000107579>.
- Ndjim, M., Poinssignon, C., Parrot, P., le Dréan, G., 2017. Loss of vagal sensitivity to cholecystokinin in rats born with intrauterine growth retardation and consequence on food intake. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00065>.
- Noetzel, S., Stengel, A., Inhoff, T., Goebel, M., Wisser, A.S., Bannert, N., Wiedenmann, B., Klapp, B.F., Taché, Y., Mönnikes, H., Kobelt, P., 2009. CCK-8S activates c-Fos in a dose-dependent manner in nesfatin-1 immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and in the nucleus of the solitary tract of the brainstem. *Regul. Pept.* 157, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.06.009>.
- Oliveira, J.C., de Scopparin, D.X., Andreazzi, A.E., Branco, R.C.S., Martins, A.G., Gravena, C., Gracioli, S., Rinaldi, W., Barbosa, F.B., Mathias, P.C.F., 2011. Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. *J. Neuroendocr.* 23, 148–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02095.x>.
- Palkovits, M., 1999. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. *Front. Neuroendocr.* 20, 270–295. <https://doi.org/10.1006/frns.1999.0186>.
- Paxinos, G., Watson, C., 2006. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, sixth ed. Academic Press, San Diego.
- Pirnik, Z., Maixnerová, J., Matyáková, R., Koutová, D., Železná, B., Maletinská, L., Kiss, A., 2010. Effect of anorexigenic peptides, cholecystokinin (CCK) and cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) peptide, on the activity of neurons in hypothalamic structures of C57Bl/6 mice involved in the food intake regulation. *Pept. (N. Y.)* 31, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.09.035>.
- Plagemann, A., 2006. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm. Res.* 65, 83–89. <https://doi.org/10.1159/000091511>.
- Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Waas, T., Melchior, K., Ziska, T., Rohde, W., Dö, G., 1999a. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J. Neuroendocr.* 11 (7), 541–546. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.1999.00257.x>.
- Plagemann, A., Rake, A., Harder, T., Melchior, K., Rohde, W., Dörner, G., 1998. Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Neurosci. Lett.* 258, 13–16. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(98\)00823-4](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(98)00823-4).
- Plagemann, A., Rittel, F., Waas, T., Harder, T., Rohde, W., 1999b. Cholecystokinin-8S levels in discrete hypothalamic nuclei of weanling rats exposed to maternal protein malnutrition. *Regul. Pept.* 85, 109–113. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(99\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(99)00065-3).
- Remmers, F., Schreuder, M.F., Gemke, R.J.B.J., Delemarre-van de Waal, H.A., 2008a. Energy intake and resting energy expenditure in adult male rats after early postnatal food restriction. *Br. J. Nutr.* 99, 1149–1156. <https://doi.org/10.1017/S0007114507843546>.
- Remmers, F., Verhagen, L.A.W., Adan, R.A.H., Delemarre-van de Waal, H.A., 2008b. Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. *Endocrinology* 149, 3617–3625. <https://doi.org/10.1210/en.2007-1388>.
- Ribeiro, T.A., Tófolo, L.P., Martins, I.P., Pevanello, A., de Oliveira, J.C., Prates, K.V., Miranda, R.A., da Silva Franco, C.C., Gomes, R.M., Francisco, P.A., Alves, V.S., de Almeida, D.L., Moreira, V.M., Palma-Rigo, K., Vieira, E., Fabricio, G.S., da Silva Rodrigues, M.R., Rinaldi, W., Malta, A., de Freitas Mathias, P.C., 2017. Maternal low intensity physical exercise prevents obesity in offspring rats exposed to early overnutrition. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07355-2>.
- Rinaman, L., 2003. Behavioral/systems/cognitive hindbrain noradrenergic lesions attenuate anorexia and alter central c-Fos expression in rats after gastric viscerosensory stimulation. *J. Neurosci.* 23, 10084–10092. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-31-10084.2003>.
- Rinaman, L., 2010. Ascending projections from the caudal visceral nucleus of the solitary tract to brain regions involved in food intake and energy expenditure. *Brain Res.* 1350, 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.03.059>.
- Rodrigues, V.S.T., Moura, E.G., Peixoto, T.C., Soares, P.M., Lopes, B.F., Bertasso, I.M., Silva, B.S., Cabral, S.S., Kluck, G.E.G., Atella, G.C., Trindade, P.L., Daleprane, J.B., Oliveira, E., Lisboa, P.C., 2022. The model of litter size reduction induces long-term disruption of the gut-brain axis: an explanation for the hyperphagia of Wistar rats of both sexes. *Physiol. Rep.* 10, 15191. <https://doi.org/10.14814/phy2.15191>.
- Sabatier, N., Leng, G., Menzies, J., 2013. Oxytocin, feeding, and satiety. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00035>.
- Shinpo, K., Hirai, Y., Maezawa, H., Totuka, Y., Funahashi, M., 2012. The role of area postrema neurons expressing H-channels in the induction mechanism of nausea and vomiting. *Physiol. Behav.* 107, 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.06.002>.
- Spencer, S.J., Tilbrook, A., 2009. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1133–1143. <https://doi.org/10.1016/j.psychneuro.2009.02.013>.
- Stefanidis, A., Spencer, S.J., 2012. Effects of neonatal overfeeding on juvenile and adult feeding and energy expenditure in the rat. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052130>.
- Steinert, R.E., Peimle-Bisset, C., Asarian, L., Horowitz, M., Beglinger, C., Geary, N., 2017. Ghrelin, CCK, GLP-1, and PYY(3-36): secretory controls and physiological roles in eating and glycemia in health, obesity, and after RYGB. *Physiol. Rev.* 97, 411–463. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2014>.
- Stopa, L.R.S., de Souza, C.F., Martins, A.B., Lopes, G.M., Costa, R.O., Gerardin, D.C.C., de Carvalho, G.G., Zaia, D.A.M., Zaia, C.T.B.V., Uchoa, E.T., Leite, C.M., 2021. Neonatal overfeeding reduces estradiol plasma levels and disrupts noradrenergic-kisspeptin-GnRH pathway and fertility in adult female rats. *Mol. Cell Endocrinol.* 524, 111147. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111147>.
- Sugeta, S., Hirai, Y., Maezawa, H., Inoue, N., Yamazaki, Y., Funahashi, M., 2015. Presynaptically mediated effects of cholecystokinin-8 on the excitability of area postrema neurons in rat brain slices. *Brain Res.* 1618, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.05.018>.

- Sun, J.S., Yang, D.J., Kinyun, A.W., Yoon, S.G., Seong, J.K., Kim, J., Moon, S.J., Shin, D. M., Choi, Y.-H., Kim, K.W., 2021. Ventromedial hypothalamic primary cilia control energy and skeletal homeostasis. *J. Clin. Invest.* 131, e138107. <https://doi.org/10.1172/JCI138107>.
- Velkoska, E., Cole, T.J., Dean, R.G., Burrell, L.M., Morris, M.J., 2008. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. *J. Nutr.* 138, 1622–1627. <https://doi.org/10.1093/jn/138.9.1622>.
- Verbaeys, I., León-Tamari, F., de Buyser, K., Buyse, J., Decuypere, E., Pottel, H., Cokelaere, M., 2009. Dose-response effects of PEGylated cholecystokinin on the behavioral satiety sequence. *Physiol. Behav.* 98, 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.05.010>.
- Vieau, D., Sebaai, N., Léonhardt, M., Dutriez-Casteloot, I., Molendi-Coete, O., Laborie, C., Breton, C., Deloof, S., Lesage, J., 2007. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology* 32, 516–520. <https://doi.org/10.1016/j.psycheneu.2007.03.014>.
- Voits, M., Förster, S., Rödel, S., Voigt, J.-P., Plogemann, A., Fink, H., 1996. Obesity induced by unspecific early postnatal overfeeding in male and female rats: hypophagic effect of CCK-8S. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.* 354, 374–378. <https://doi.org/10.1007/BF00171071>.
- Wall, K.D., Olivos, D.R., Rinaman, L., 2020. High fat diet attenuates cholecystokinin-induced cFos activation of prolactin-releasing peptide-expressing A2 noradrenergic neurons in the caudal nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* 447, 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.08.054>.
- Waterland, R.A., Garza, C., 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 179–197. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.2.179>.
- Williams, J.A., 2019. Cholecystokinin (CCK) regulation of pancreatic acinar cells: physiological actions and signal transduction mechanisms. *Compr. Physiol.* 9, 535–564. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180014>.
- Xiao, X.Q., Williams, S.M., Grayson, B.E., Glavas, M.M., Cowley, M.A., Smith, M.S., Grove, K.L., 2007. Excess weight gain during the early postnatal period is associated with permanent reprogramming of brown adipose tissue adaptive thermogenesis. *Endocrinology* 148, 4150–4159. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0373>.

**ANEXO C – Artigo referente ao Estudo 2: “Neonatal overnutritional programming impairs the hypophagic effects and neuron activation of the Nucleus of the Solitary Tract and hypothalamus to acute LPS in adult male rats”, que será submetido para a revista *Nutritional Neuroscience*.**

1

**Neonatal overnutritional programming impairs the hypophagic effect and neuron activation of the Nucleus of the Solitary Tract and hypothalamus to acute LPS in adult male rats**

Ana Luiza M. Wunderlich<sup>a</sup>, Larissa Rugila S. Stopa<sup>a</sup>, Andressa Buseti Martins<sup>b</sup>, Camila Franciele de Souza<sup>b</sup>, Érica Cristina A. M. Monteiro<sup>c</sup>, Daniely D. Aguiar Barbosa<sup>a</sup>, Rhauany P. Guergolette<sup>a</sup>, Polyana K. Shishido<sup>a</sup>, Cássia Thaïs B. V. Zaia<sup>a,b,c</sup> and Ernane Torres Uchôa<sup>a,b,c\*</sup>

<sup>a</sup> *Postgraduate Program in Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil;* <sup>b</sup> *Multicentric Postgraduate Program in Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil;* <sup>c</sup> *Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Brazil.*

**\*Corresponding author:** Ernane Torres Uchôa.

Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, UEL. Campus Universitário 86051-990, Londrina,- PR, Brazil.

Phone: +55 43 33715928 / +55 43 3371 4307

FAX: +55 43 3371 4254

e-mail: [euchoa@uel.br](mailto:euchoa@uel.br)

**Notes on contributors**

Ana Luiza M. Wunderlich is a final-year PhD student in Physiological Science at the Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, State University of Londrina, Londrina, Brazil.

Larissa Rugila S. Stopa is a final-year PhD student in Physiological Science at the Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, State University of Londrina.

Andressa Buseti Martins obtained her PhD in Physiological Science from the State University of Londrina in 2022.

Camila Franciele de Souza is a final-year PhD student in Physiological Science at the Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, State University of Londrina.

Érica Cristina A. M. Monteiro majored in Pharmaceutical Sciences at the State University of Londrina in 2022.

Daniely D. Aguiar Barbosa is a final-year master student in Physiological Science at the Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, State University of Londrina.

Rhauany P. Guergolette is PhD student in Physiological Science at the Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, State University of Londrina.

Polyana K. Shishido is master student in Physiological Science at the Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism, State University of Londrina.

Cássia Thaís B. V. Zaia is professor, working in the Department of Physiological Sciences of the State University of Londrina. She obtained her PhD in Neuroendocrine Physiology from the Federal University of São Paulo in 1991. She then worked at the Laboratory of Neuroendocrinology of the Rockefeller University, as a postdoctoral researcher for 2 years. Since 1985 she works at the Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism as a Professor and researcher. Her work focuses on central control of metabolism.

Ernane Torres Uchôa is professor, working in the Department of Physiological Sciences of the State University of Londrina. He obtained his PhD in Physiology from the Medical School of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 2011. In 2013 and 2014 he obtained his postdoctoral degree from the Medical School of Ribeirão Preto of the University of São Paulo. In 2014 he joined the Laboratory of Neuroendocrine Physiology and Metabolism as a Professor and researcher. His work focuses on neuroendocrine regulation of reproduction and energy homeostasis.

## **Neonatal overnutritional programming impairs the hypophagic effect and neuron activation of the Nucleus of the Solitary Tract and hypothalamus to acute LPS in adult male rats**

Nutritional status during critical windows in early development may challenge metabolic functions and physiological responses to immune stress in adulthood, such as the systemic inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS). The aim of this study was to investigate the long-term effects of postnatal over- and undernutrition on the anorexigenic effect of LPS and its association with neuron activation in brainstem and hypothalamus in male rats. Animals were raised in litters of 3 (small – SL), 10 (normal – NL) or 16 (large – LL) pups per dam. On postnatal day 60, male rats were treated with LPS (500 µg/Kg) or vehicle for the evaluation of food intake and c-Fos expression in the area postrema (AP), nucleus of solitary tract (NTS), and paraventricular (PVN), arcuate (ARC), ventromedial (VMH), and dorsomedial (DMH) nuclei of the hypothalamus. SL, NL and LL animals showed a decrease in food consumption after LPS treatment. In under- and normonourished animals, peripheral LPS induced an increase in neuronal activation in the brainstem, PaV, PaMP, and ARC and a decrease in the number of c-Fos-ir neurons in the DMH. Overnourished rats showed a reduced hypophagic response, lower neuron activation in the NTS and PaMP, and no response in the DMH induced by LPS. These results indicate that early nutritional programming display different responses to LPS, neonatal overnutrition decreasing LPS-mediated anorexigenic effect and neuron activation in NTS and hypothalamic nuclei.

**Keywords:** inflammation; endotoxin; food intake; hypothalamic nuclei; brainstem; overfeeding; undernutrition.

### **Introduction**

An organism's phenotype is shaped by the environmental conditions present in critical periods of development, including the periconceptual, prenatal and early postnatal stages [1]. The Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) proposes that fluctuations taking place during this early life environment alter the normal

development and influence long-term metabolic status and health of the developing organism [1–3]. In this context, the manipulation of litter size has been used to study short- and long-term effects of neonatal nutrition, the so-called metabolic programming. It is known that small litter size during the suckling period leads to overnutrition and that animals raised in this litter size show increased body weight at weaning [4,5] and in adulthood [5,6]. On the other hand, animals submitted to neonatal food restriction, by means of expanded litter size, remain small and lean in adult life [7,8].

It has been shown that environmental factor, such as the amount of milk available to each pup, can alter hypothalamic projections and neuroinflammatory processes [9,10]. Debarba et al. [11] showed that animals raised in small and large litters exhibited enhanced expression of genes encoding proinflammatory cytokines, such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) at weaning, and tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) in adult life. Also, obesity was reported to either impair the ability of the immune system to properly respond to bacterial infection [12] or to up-regulate the inflammatory cascade to an immune challenge when it occurs [5]. Meanwhile, prenatal undernutrition was shown to impair immunological functions, increase the risk of infection-induced sepsis, and increase the activity of the innate immune system in humans and rodent models [13].

Administration of Lipopolysaccharide (LPS), a cell wall component of Gram-negative bacteria, is used to mimic inflammatory processes [14]. This endotoxin stimulates intracellular signalling pathways through recognition by Toll-Like receptors 4 (TLR-4) [15] and activates nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) to induce an inflammatory response [16], which is mediated by proinflammatory cytokines, particularly interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and TNF [17,18]. These cytokines can act on brain receptors to activate sickness-type behaviours [17,18], characterized by

negative energy balance, increased thermogenesis and anorexia [17]. Indeed, depressed appetite has been found to be acutely induced in rodents by bacterial endotoxin [19] and this effect involves central neurochemical changes [20]. In agreement, systemic inflammation triggered by LPS injection was shown to involve a coordinate activation of brain sites such as the brainstem [21,22], the arcuate (ARC), dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH) [18,20,21] and paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) [5,18,20,21].

Interestingly, manipulation in the litter size causes changes in the structure and function of hypothalamic areas that may affect the response to anorexigenic stimuli [4,23]. Neonatal overfeeding was associated with a more sensitive pro-inflammatory response to LPS, seen by an elevated TLR-4 and TNF- $\alpha$  hypothalamic gene expressions two hours after a low dose of LPS, that was different from the kinetic exhibited by normal nourished animals, reflecting a compromised response to LPS in adult neonatally overfed animals [24]. With regards to feeding behaviour, low dose of LPS reduced food intake to a similar degree in female SL and control but more intensely in male SL animals [5]. On the other hand, prenatally undernourished rats exhibited stronger febrile response [25] and higher hypothalamic mRNA expression of TNF- $\alpha$  to LPS than normal nourished rats [26]. However, as far as it is known, no effect of LPS on food intake of postnatally undernourished rats was reported. Thus, the present study explored the hypothesis that exposure to an over- or undernutrition environment during lactation, by manipulating the litter size, could modulate the hypophagic response and neuronal activity to a moderate LPS dose in the adult male offspring.

## Material and methods

### *Animals*

Animal procedures were performed under approval by the Ethics Committee of Animal Use for experimentation of the State University of Londrina (Protocol number 18310.2019.03). Wistar rats were obtained from the Central Animal Facility of the State University of Londrina (UEL). After mating, pregnant females were housed individually in standard rat cages with free access to water and pelleted rat chow (Nuvilab CR1, Nuvital®). In the first 24 h after litter's birth, male and female pups were allocated to either small litter (SL – 3 pups per dam, two males and one female), normal litter (NL – 10 pups per dam, male to female ratio 1:1) or large litter (LL – 16 pups per dam, male to female ratio 1:1). When necessary, pups born on the same day were randomly cross-fostered from one litter to another to reach the total number of pups in the litter and the proportion of males and females. The surplus pups were euthanized by decapitation. A total of 10 NL, 8 LL, and 26 SL litters were used in the study and each experimental group contained pups from at least five different litters. Only male rats were evaluated in the study; female pups that were used to reach male to female ratio in the litter were euthanized at weaning.

Animals were weaned on post-natal day (PND) 21 and were maintained in groups of 4 to 5 of the same experimental litter in each cage until PND 60. They were kept under controlled and adequate conditions of light (12 h light/dark cycle) and temperature ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ), with free access to tap water and pelleted rat chow (Nuvilab CR1, Nuvital®), unless otherwise specified. The body weight of male offspring was monitored at birth and on PND 3, 7, 10, 14, 17, and 21. After weaning, animals were weighted every five days until PND 60. The naso-anal distance of the animals was measured at weaning and on PND 60. Lee index, expressed as  $\text{g}^{1/3}/\text{cm}$ , was evaluated at

weaning and on PND 60. It was calculated by considering body weight and naso-anal distance, whereas the cubic root of body weight in grams was divided by naso-anal length in centimetres [27].

### ***Drug***

Animals were treated with a single intraperitoneal (IP) injection of Lipopolysaccharide (LPS, extracted from *Escherichia coli*; Serotype 026:B6; Sigma, St. Louis, MO, USA; 500 µg/Kg body weight [14,26]). Rats in the control groups were injected with sterile saline 0.9% (NaCl 0.9%; 0,2 mL/100 g body weight).

### ***Food intake assessment***

On PND 58, SL, NL and LL animals were housed in individual metabolic cages for acclimatation. On PND 60, after 16 h of overnight fasting, animals were intraperitoneally treated with LPS (500 µg/Kg) or sterile saline 0.9% (0.9% NaCl). Food was presented after 15 min and food intake (g/100 g body weight) was evaluated 1, 2 and 24 h later. At the end of experimental protocol, all animals were euthanized by decapitation.

### ***Immunohistochemistry***

On PND 60, after 16 h of overnight fasting, SL, NL, and LL animals were intraperitoneally treated with LPS (500 µg/Kg) or saline (0.9% NaCl). After 90 min, rats were deeply anesthetized with ketamine (IP, 100 mg/Kg) and xylazine hydrochloride (20 mg/Kg) and perfused through the heart with 200 mL of cold isotonic saline (0.15 M) containing heparin (1:80). Perfusion was then performed with 400 mL of cold 4% paraformaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) at a flow rate of 10 mL per minute in an open and non-recirculating perfusion system. At the end,

extracted brains were postfixed in 4% paraformaldehyde for 1 h, placed in PB solution containing 30% sucrose, and stored at 4 °C. Using a Leica cryostat, brains were sliced into 30 µm coronal sections and slices were preserved in cryoprotectant solution at -20 °C.

For staining for c-Fos immunoreactivity, sections were first washed with 0.01 M PB and then incubated in a 0.1 M PB solution containing 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.3% Triton for 30 minutes for blockade of endogenous peroxidase. After three washes in 0.01 M PB, floating sections were immersed in blocking buffer (1.5% normal goat serum and 0.3% Triton in a 0.1 M PB solution) for 1 h at room temperature to prevent nonspecific binding. Thereafter, the diluted primary antibody solution (anti-c-Fos antibody; Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA; 1:15.000 in a solution of 0.1 M PB containing 1.5% normal goat serum and 0.3% Triton) was applied for 48 h at 4 °C. After being rinsed three times in 0.01 M PB, sections were incubated for 1 h at room temperature with biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen, Rockford, IL, USA; 1:200 in 1.5% normal goat serum- 0.1 M PB). Subsequently, they were incubated for 1 h at room temperature with the Vectastain avidin-biotin-peroxidase complex pK 6100 (1:200 in PB, Vector Laboratories). c-Fos labelling was detected using diaminobenzidine hydrochloride (DAB, Sigma CO., Ca, USA, 0.01%) intensified with 1% nickel ammonium sulphate. Thereafter, sections were mounted on gelatinized slides, air-dried overnight, dehydrated in xylene and placed under a cover slip with Entellan (New Jersey, USA).

The brainstem and hypothalamic nucleus were identified according to Paxinos and Watson [28] brain rat atlas. AP and NTS were considered at -13.68 to -14.08 mm from bregma. The Medial (PaMP) and Ventral (PaV) subdivisions of the PVN were considered at -1.72 to -1.92 mm, and posterior parvocellular (PaPo) subdivision of the

PVN was considered at  $-2.04$  mm from bregma. ARC and VMH were considered at  $-2.16$  to  $-3.36$  mm and DMH was considered at  $-2.92$  to  $-3.36$  mm from bregma.

Bilateral counting of immunolabelled cells was carried out in 7 slices for AP and NTS, 5 slices for PaV and PaMP, 2 slices for PaPo, 15 slices for ARC, 12 slices for VMH and 5 slices for DMH per animal. The visual counting of neurons was performed in eight to ten animals in each group. c-Fos immunoreactive neurons were quantified manually with the aid of an image system attached to a microscope. The threshold for positive staining was individually established in a manner blinded to the experimental conditions.

#### *Statistical analysis*

All data were tested for normality and homogeneity of variance by Shapiro-Wilk and Levene's tests, respectively. As this study aimed to compare the effects of over and undernutrition on the evaluated parameters with a control group (normal litter size), not to compare the divergent litter size models one each other (SL vs LL), all the comparisons were performed with the NL group (SL vs NL and LL vs NL). Significant differences between groups were evaluated by repeated measures ANOVA (RM ANOVA), followed by Sidak for multiple measures posttest, for body weight and food intake analysis. Student's *t-test* was used for the analysis of body weight gain, naso-anal distance, and Lee index. *Two-way* ANOVA, followed by Tukey post hoc test, was performed to evaluate the interaction between the variable group (litter size) and treatment (LPS or saline) on neuron activity. Data were analysed using GraphPad Prism 7.00, Sigma Plot 11.0 (for *Two-way* ANOVA), and IBM SPSS Statistic 22 (for *Three-way* ANOVA). Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (S.E.M.). Differences were considered significant at  $P < 0,05$ .

## Results

### *Effect of litter size on biometric parameters*

Figure 1 represents the effect of litter size on biometric parameters of SL, NL and LL animals. On PND 60, a subset of these animals was assigned for food intake protocol and the other subset allocated to the neuronal activity experiment (exhibited in Fig. 2 and 3 to 5, respectively). As observed in Fig. 1A and B and representative image in C, neonatal overnourished animals were significantly heavier than NL ones since pre-weaning period, on PND 7, until the end of the study, on PND 60 (RM ANOVA; pre-weaning period: age factor:  $F_{6, 468} = 3868$ ,  $p < 0.0001$ ; litter size factor:  $F_{1, 78} = 326.7$ ,  $p < 0.0001$ ; interaction:  $F_{6, 468} = 198.3$ ,  $p < 0.0001$ ; post-weaning period: age factor:  $F_{7, 546} = 4466$ ,  $p < 0.0001$ ; litter size factor:  $F_{1, 78} = 148.6$ ,  $p < 0.0001$ ; interaction:  $F_{7, 546} = 21.24$ ,  $p < 0.0001$ ). Neonatal undernutrition, in contrast, resulted in lower body weight from pre-weaning period, on PND 7, until early adulthood, on PND 60, in comparison to NL group (Fig. 1A, B and C; RM ANOVA; pre-weaning period: age factor:  $F_{6, 450} = 2385$ ,  $p < 0.0001$ ; litter size factor:  $F_{1, 75} = 194.8$ ,  $p < 0.0001$ ; interaction:  $F_{6, 450} = 83.46$ ,  $p < 0.0001$ ; post-weaning period: age factor:  $F_{7, 525} = 3887$ ,  $p < 0.0001$ ; litter size factor:  $F_{1, 75} = 23.48$ ,  $p < 0.0001$ ; interaction:  $F_{7, 525} = 1.804$ ,  $p = 0.084$ ).

At weaning, SL animals showed increased body weight gain [ $t(78) = 15.88$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 1D], naso-anal length [ $t(78) = 7.511$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 1E] and Lee index [ $t(78) = 2.684$ ,  $p = 0.0089$ , Fig. 1F], whereas LL animals showed decrease in these parameters [body weight gain:  $t(78) = 12.98$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 1D, naso-anal length:  $t(78) = 8.081$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 1E; Lee index:  $t(78) = 2.199$ ,  $p = 0.0308$ , Fig. 1F] compared to NL group. On PND 60, body weight gain, naso-anal length and Lee index of overnourished animals remained increased [body weight gain:  $t(78) = 8$ ,  $p < 0.0001$ , Fig. 1D; naso-anal length:  $t(78) = 2.608$ ,  $p = 0.0109$ , Fig. 1E; Lee index:  $t(78) = 4.778$ ,

$p < 0.0001$ , Fig. 1F] in comparison to control ones. Young adult LL animals continued to present reduced body weight gain [ $t(78) = 2.807$ ,  $p = 0.0063$ ; Fig. 1D] and Lee index [ $t(78) = 3.187$ ,  $p = 0.0021$ ; Fig. 1F] compared to NL group, but presented similar naso-anal length [ $t(78) = 0.172$ ,  $p = 0.864$ ; Fig. 1E] to control animals.

#### *Effect of LPS on food intake in SL, NL, and LL rats*

The IP LPS effect on food intake in SL, NL, and LL animals is shown in Fig. 2 and the interpretation of the statistical analysis of the effect of LPS on food intake is presented in Table 1. Repeated-measure *three-way* ANOVA analysis showed that LPS treatment significantly reduced the amount of food consumed by SL, NL and LL animals in the three time points of evaluation [SL (1 h:  $p = 0.022$ ; 2 and 24 h:  $p < 0.0001$ ), NL (1, 2 and 24 h:  $p < 0.0001$ ) e LL (1, 2 and 24 h:  $p < 0.0001$ )]. In the first 2 hours of evaluation, SL animals treated with LPS exhibited an increased (1 h:  $p = 0.029$ ; 2 h:  $p = 0.013$ ) food intake when compared to the counterpart LPS-treated NL group. The food intake of LL animals was not altered by litter size at any time point evaluated in the study.

#### *Effects of LPS on neuron activation in SL, NL, and LL rats*

The interpretation of the statistical analysis of the effect of LPS on neuronal activation is presented in Table 2, and representative photomicrographs in Figs. 3, 4 and 5. *Two-way* analysis showed an effect of treatment (LPS or saline), observed by the increased number of c-Fos-ir neurons, in the AP, NTS, PaV and PaMP subdivisions of PVN, and ARC (Fig. 3A and B, Fig. 4A and B, and Fig. 5A, respectively) in SL, NL and LL animals after LPS administration, when compared to saline groups. There was also a treatment effect (LPS or saline) in the DMH of NL and LL animals, but, in this nucleus, there was a decrease in the number of c-Fos labelled neurons mediated by LPS (Fig.

5C), relative to their respective saline groups. Interestingly, SL saline-treated rats showed lower neuronal activation in the DMH compared to saline NL group, indicating interaction between treatment (LPS or saline) and litter size (SL and NL)(Fig. 5C and Table 2). There was effect of litter size (SL and NL) and treatment (LPS or saline), without interaction (Table 2), in the NTS and PaMP subdivision (Fig. 3B and 4B, respectively), as SL animals, in both saline and LPS groups, showed decreased neuronal activity in these areas compared to NL ones. SL-saline and -LPS animals also showed reduced neuron activation in VMH (Fig. 5B), compared to NL group, indicating effect of litter size in this nucleus (Table 2). Litter size also changed c-Fos-ir immunoreactivity in the PaPo subdivision of the PVN in both SL and LL animals (Fig. 4C). While SL animals showed lower neuronal activation in this area, LL ones showed increased c-Fos-ir immunoreactivity. No treatment (LPS or saline) effect was observed in this area (Table 2).

## **Discussion**

Litter size is a strong independent determinant of early growth rate [2]. According to McCance [29], the rate at which a suckling animal can grow depends upon the amount of milk that the mother can provide for it and they adapt to this amount supply of nutrients by changing their physiology and metabolism [30]. Echoing this observation, the current study demonstrated that rats reared in small litters showed rapid body weight gain during lactation and remained in an overweighted, bigger (length) and fatter (Lee index) phenotype throughout early adult life, as already established in the literature [3,4,6,31]. Also, in agreement with previous studies [4,7,31,32], rearing pups in large litters induced the opposite effect of the SL size paradigm, as LL animals showed slower growth rate during lactation and an uncomplete catch-up in early adulthood, remaining leaner (Lee index) and with lower body weight at 60d-old.

As for the immune challenge, undernourished animals exhibited decreased food intake induced by LPS in the three time points evaluated in the study, similar to NL rats. Corroborating this result, Iwasa et al. [25] showed that the anorectic response to LPS tended to be increased by prenatal undernutrition, but no significant difference was found. It is described that LPS increases hypothalamic TNF- $\alpha$  mRNA expression 1h after injection, while IL-1 $\beta$  have a more delayed peak response (6h) [17,33] and that these cytokines act in the brain and mediate LPS-induced fever and anorexia [34], which is consistence with hypophagic response to LPS observed in LL and NL animals in the current study. The anorectic response to LPS in undernourished animals is still scarce and major works analyze the febrile and immunologic response to LPS [16,26,35]. Thereby, this is the first report to suggest that post-natal undernutrition induced by expanding litter size does not disrupt hypophagic response of LPS. LPS-induced hypophagia in LL animals was accompanied by increased c-Fos activation in the AP, NTS, PaV and PaMP subdivisions of the PVN and the ARC, that did not differ from NL animals.

LPS also increased c-Fos immunoreactivity in the brainstem, ventral and medial parvocellular subdivisions of the PVN and the ARC nucleus of overnourished animals; however, LPS-induced c-Fos expression in the NTS and PaMP of these animals was significantly lower than that of NL animals. In addition, the anorectic response to LPS was also decreased in overnourished rats in the first two hours after LPS treatment. These findings contrast with an earlier report, in which LPS reduced food intake in a similar degree in both control and obese SL rats and evoked an exacerbated response in the PVN of SL animals [5]. Differences in the food status of the animals (fasted in the present study vs *ad libitum* in the study of Clarke; Stefanidis; Spencer [5]) may be responsible for this discrepancy. Support for this notion was provided by a report in

which LPS-induced c-Fos expression was lower in the PVN of fasted animals than ones fed *ad libitum* [20]. Also, SL rats ate less in the 12h after LPS injection [5], a time point that was not evaluated in the current study. Moreover, different LPS doses (500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  in the present study vs 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  in the study of Clarke; Stefanidis; Spencer [5]) may have also inflicted in different responses, given that low ( $< 100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ) and high doses of LPS were shown to evoke opposite changes in temperature responses [36], and could, thereby, also evoke divergent hypophagic effects. Nevertheless, results from the present study suggest that, in the fasted condition and in the used dose, the anorectic response to LPS was reduced by early overnutrition, and this result was accompanied by decrease of LPS-induced neuronal activation in the NTS and PVN of such animals.

In general, obese SL rats display alterations in the neuronal response to orexigenic and anorexigenic signals in the PVN, with predominance of inhibition of PVN neurons [37]. Recently, a study reported that LPS-induced hypophagic effect was abolished by obesity in high-fat diet animals and that this result was associated, in part, with reduced STAT3 phosphorylation in the PVN and NTS [21]. Also, authors of the mentioned report pointed out the importance of neuronal activation in the PVN, since STAT3 activation only in the ARC was not enough to induce hypophagia after LPS in diet-induced obese animals [21]. Similarly, results from the current study showed impairment of LPS-induced hypophagia in SL rats as a consequence of reduced LPS-mediated activation in the PVN, given that ARC LPS-response was preserved. This observation raises the hypothesis of that the arcuate-paraventricular projections may be impaired in the SL model of obesity and, also, suggests in conjunction with the literature that overweight induced by reducing litter size impairs LPS hypophagic response in rats in a site-specific way.

Liu et al. [38] reported that LPS might suppress appetite by activating brain sites normally downstream and inhibited by AgRP (Agouti-related protein), as LPS induced c-Fos in select AgRP-innervated sites, specially the PVN, as already discussed, but induced a smaller c-Fos response in the DMH. In agreement, but different than what has already been shown in other studies [20], LPS treatment in the present study evoked a reduction in the number of c-Fos labeled neurons in the DMH of NL and also LL animals. The DMH is a key appetite-regulatory nucleus [39] and chemo genetic and optogenetic activation of DMH cholinergic neurons have been found to stimulate food intake in mice [40]. Then, based on current results, LPS might have inhibited orexigenic DMH neurons, thus suggesting a potential mechanism by which LPS would suppress appetite in 60d-old normal and undernourished animals. Curiously, LPS did not alter c-Fos immunoreactivity in the DMH of SL animals, which had an increased food consumption in the first 2h after IP LPS injection. Once again, it is plausible that overweight induced by neonatal overnutrition impairs the appetite-suppressing effect of LPS as a result from the lack of an inhibitory signal mediated by LPS within the DMH.

In conclusion, nutritional changes early in postnatal development resulted in higher and lower biometric parameters after over- and undernutrition, respectively. Other than biometric effects, neonatal over- and undernutrition resulted in different effects on the anorexigenic response to LPS in early adulthood. Specially, LL animals had similar hypophagic, and brainstem and hypothalamic responses to LPS to the control group, whereas SL rats showed impaired hypophagic response and lower neuron activation in the NTS and PVN mediated by LPS. Furthermore, LPS decreased the neuronal activation in the DMH of LL and NL rats, but had no effect in SL ones. This result suggests a potential mechanism by which LPS would act in order to suppress appetite, and that is also impaired in SL animals.

**Disclosure statement**

The authors report there are no competing interests to declare.

**Funding**

This work received financial support from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES- Finance Code 001), Brazil

**Data availability statement**

Data sharing is not applicable to this article as no new data were created or analysed in this study.

**Author contributions**

A.L.M.W. participated in study concept and design, performed experiments, analysis and interpretation of data, and drafting of the manuscript. L.R.S.S., A.B.M., C.F.S.,

E.C.A.M.M., D.D.A.B., R.P.G. and P.K.S. participated in acquisition of data.

C.T.B.V.Z and E.T.U. participated in study concept and design and administrative, technical, and material support. E.T.U. conceived and designed research, participated in acquisition of data, analysis, and interpretation of data, drafting and critical revision of the manuscript, and study supervision.

**References**

- [1] Sánchez-Garrido MA, Garcíá-Galiano D, Tena-Sempere M. Early programming of reproductive health and fertility: novel neuroendocrine mechanisms and implications in reproductive medicine. *Hum Reprod Update.* 2022;28:346–375.

- [2] Parra-Vargas M, Ramon-Krauel M, Lerin C, et al. Size Does Matter: Litter Size Strongly Determines Adult Metabolism in Rodents. *Cell Metab.* 2020;32:334–340.
- [3] Plagemann A, Harder T, Schellong K, et al. Early postnatal life as a critical time window for determination of long-term metabolic health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012;26:641–653.
- [4] Plagemann A, Harder T, Rake A, et al. Observations on the Orexigenic Hypothalamic Neuropeptide Y-System in Neonatally Overfed Weanling Rats. *J Neuroendocrinol.* 1999;11:541–546.
- [5] Clarke MA, Stefanidis A, Spencer SJ. Postnatal Overfeeding Leads to Obesity and Exacerbated Febrile Responses to Lipopolysaccharide Throughout Life. *J Neuroendocrinol.* 2012;24:511–524.
- [6] de Souza CF, Stopa LRS, Martins AB, et al. Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats. *Life Sci.* 2022;304.
- [7] Remmers F, Fodor M, Delemarre-van de Waal HA. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. *Physiol Behav.* 2008;95:208–215.
- [8] Velkoska E, Cole TJ, Dean RG, et al. Early Undernutrition Leads to Long-Lasting Reductions in Body Weight and Adiposity Whereas Increased Intake Increases Cardiac Fibrosis in Male Rats. *J Nutr.* 2008;138:1622–1627.
- [9] Radler ME, Hale MW, Kent S. Calorie restriction attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced microglial activation in discrete regions of the hypothalamus and the subfornical organ. *Brain Behav Immun.* 2014;38:13–24.

- [10] Plagemann A, Rake A, Harder T, et al. Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Neurosci Lett*. 1998;258:13–16.
- [11] Debarba LK, Marangon PB, Borges BC, et al. Neonatal nutritional programming induces gliosis and alters the expression of T-cell protein tyrosine phosphatase and connexins in male rats. *Horm Behav*. 2020;120:104690.
- [12] Kristensen P, Judge ME, Thim L, et al. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature*. 1998;393:72–76.
- [13] Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56 Suppl 3:S73–S76.
- [14] Rorato R, Menezes AM, Giusti-Paiva A, et al. Prostaglandin mediates endotoxaemia-induced hypophagia by activation of pro-opiomelanocortin and corticotrophin-releasing factor neurons in rats. *Exp Physiol*. 2009;94:371–379.
- [15] Cruz-Machado S da S. Lipopolissacarideo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. *Revista da Biologia*. 2010;4:40–43.
- [16] Desai M, Gayle DA, Casillas E, et al. Early undernutrition attenuates the inflammatory response in adult rat offspring. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2009;22:571–575.
- [17] Sachot C, Poole S, Luheshi GN. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. *Journal of Physiology*. 2004;561:263–272.
- [18] Gavrilov Y v., Perekrest S v., Novikova NS. Intracellular expression of c-Fos protein in various structures of the hypothalamus in electrical pain stimulation and administration of antigens. *Neurosci Behav Physiol*. 2008;38:87–92.

- [19] Borges BC, Rorato R, Avraham Y, et al. Leptin resistance and desensitization of hypophagia during prolonged inflammatory challenge. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;300:E858–E869.
- [20] Gautron L, Mingam R, Moranis A, et al. Influence of feeding status on neuronal activity in the hypothalamus during lipopolysaccharide-induced anorexia in rats. *Neuroscience.* 2005;134:933–946.
- [21] Borges B de C, Rorato R, Torres Uchoa E, et al. High-fat diet induces site-specific unresponsiveness to LPS-stimulated STAT3 activation in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014;306:34–44.
- [22] Kloss CUA, Bohatschek M, Kreutzberg GW, et al. Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol.* 2001;168:32–46.
- [23] Heidel E, Plagemann A, Davidowa H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. *Neuroreport.* 1999;10:1827–1831.
- [24] Ziko I, Sominsky L, de Luca SN, et al. Acylated ghrelin suppresses the cytokine response to lipopolysaccharide and does so independently of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Behav Immun.* 2018;74:86–95.
- [25] Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, et al. Prenatal undernutrition increases the febrile response to lipopolysaccharides in adulthood in male rats. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 2015;44:1–5.
- [26] Iwasa T, Matsuzaki T, Tungalagsuvd A, et al. Prenatal undernutrition results in greater lipopolysaccharide-induced changes in hypothalamic TNF- $\alpha$  expression, but does not affect the equivalent changes in the serum levels of luteinizing

- hormone and testosterone, in adult male rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2016;48:80–83.
- [27] Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weaning and adult female rats with hypothalamic lesion. *Journal of Endocrinology*. 1968;40:527–528.
- [28] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. 6th ed. San Diego: Academic Press; 2006.
- [29] Mccance RA. FOOD, GROWTH, AND TIME. *The Lancet*. 1962;280:671–676.
- [30] Sookoian S, Gianotti TF, Burgueño AL, et al. Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: A systems biology approach. *Pediatr Res*. 2013. p. 531–542.
- [31] López M, Seoane LM, Tovar S, et al. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia*. 2005;48:140–148.
- [32] Engelbregt MJT, van Weissenbruch MM, Lips P, et al. Body composition and bone measurements in intra-uterine growth retarded and early postnatally undernourished male and female rats at the age of 6 months: Comparison with puberty. *Bone*. 2004;34:180–186.
- [33] Gayle DA, Beloosesky R, Desai M, et al. Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;286:R1024–R1029.
- [34] Layé S, Gheusi G, Cremona S, et al. Endogenous brain IL-1 mediates LPS-induced anorexia and hypothalamic cytokine expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000;279:R93–R98.

- [35] Chisari AN, Giovambattista A, Perelló M, et al. Maternal undernutrition induces neuroendocrine immune dysfunction in male pups at weaning. *Neuroimmunomodulation*. 2001;9:41–48.
- [36] Romanovsky AA, Kulchitsky VA, Akulich N v., et al. First and second phases of biphasic fever: two sequential stages of the sickness syndrome? *Am J Physiol*. 1996;271:R244–R253.
- [37] Davidowa H, Li Y, Plagemann A. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic ( $\alpha$ -MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *European Journal of Neuroscience*. 2003;18:613–621.
- [38] Liu Y, Huang Y, Liu T, et al. Lipopolysaccharide Rapidly and Completely Suppresses AgRP Neuron-Mediated Food Intake in Male Mice. *Endocrinology*. 2016;157:2380–2392.
- [39] Bellinger LL, Bernardis LL. The dorsomedial hypothalamic nucleus and its role in ingestive behavior and body weight regulation: Lessons learned from lesioning studies. *Physiol Behav*. 2002;76:431–442.
- [40] Jeong JH, Lee DK, Jo YH. Cholinergic neurons in the dorsomedial hypothalamus regulate food intake. *Mol Metab*. 2017;6:306–312.

Table 1. Effect of time factor, litter size factor, treatment with lipopolysaccharide (LPS; 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) factor and interaction on food intake of adult male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL) and large litters (LL).

	Time factor	Litter size factor		Treatment factor		Interaction time x litter x treatment	
	<i>p</i> value	<i>F</i>	<i>p</i> value	<i>F</i>	<i>p</i> value	<i>F</i>	<i>p</i> value
SL/NL							
$F_{1,48} = 1056.29$	<0.0001	$F_{1,16} = 0.124$	0.726	$F_{1,16} = 233.95$	<0.0001	$F_{2,32} = 0.039$	0.961
LL/NL							
$F_{1,48} = 850.558$	<0.0001	$F_{1,16} = 0.003$	0.953	$F_{1,16} = 266.38$	<0.0001	$F_{2,32} = 1.14$	0.325

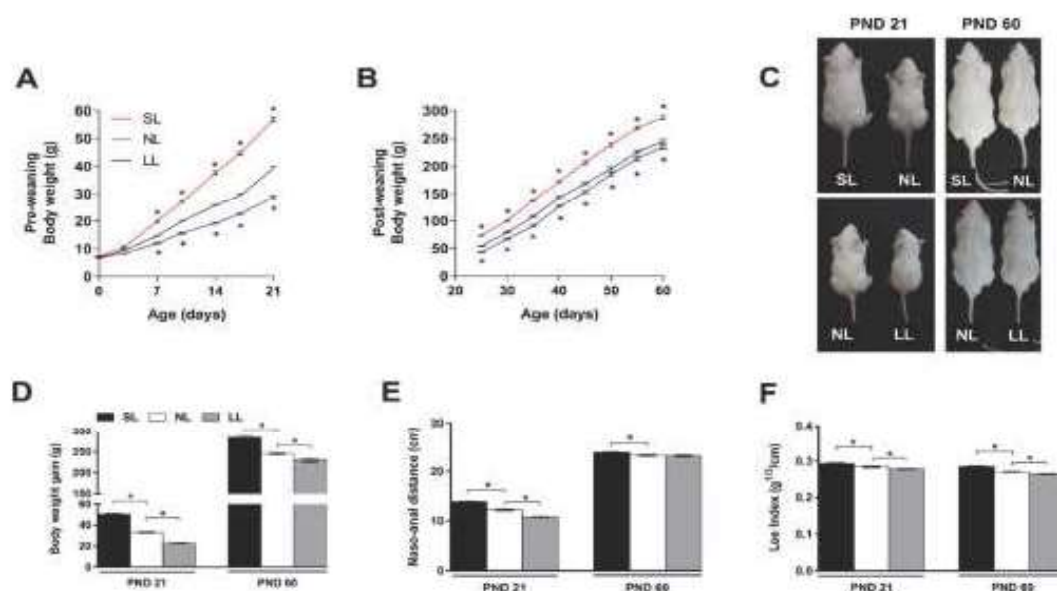
Repeated-measure three-way ANOVA followed by Sidak for multiple measures posttest. Effects were calculated in comparison with animals raised in normal litters (NL).

Table 2. Effect of litter size factor, treatment with lipopolysaccharide (LPS; 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) factor and interaction on immunoreactive neurons in brain areas of adult male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL) and large litters (LL).

	Litter size factor		Treatment factor		Interaction litter x treatment	
	<i>F</i>	<i>p</i> value	<i>F</i>	<i>p</i> value	<i>F</i>	<i>p</i> value
SL/NL						
AP	$F_{1,24} = 3.447$	0.076	$F_{1,24} = 21.736$	< 0.001	$F_{1,24} = 2.075$	0.163
NTS	$F_{1,24} = 8.419$	0.007	$F_{1,24} = 94.598$	< 0.001	$F_{1,24} = 0.483$	0.493
PVN						
PaV	$F_{1,24} = 0.004$	0.949	$F_{1,24} = 11.962$	0.002	$F_{1,24} = 0.197$	0.660
PaMP	$F_{1,24} = 5.461$	0.027	$F_{1,24} = 29.409$	< 0.001	$F_{1,24} = 3.732$	0.064
PaPo	$F_{1,24} = 4.843$	0.037	$F_{1,24} = 0.137$	0.715	$F_{1,24} = 0.070$	0.793
ARC	$F_{1,24} = 0.533$	0.471	$F_{1,24} = 34.680$	< 0.001	$F_{1,24} = 0.054$	0.818
VMH	$F_{1,24} = 4.955$	0.033	$F_{1,24} = 3.279$	0.080	$F_{1,24} = 0.493$	0.488
DMH	$F_{1,24} = 0.731$	0.400	$F_{1,24} = 0.532$	0.472	$F_{1,24} = 4.708$	0.039
LL/NL						
AP	$F_{1,27} = 3.102$	0.090	$F_{1,27} = 17.467$	< 0.001	$F_{1,27} = 4.066$	0.054
NTS	$F_{1,27} = 3.890$	0.058	$F_{1,27} = 72.508$	< 0.001	$F_{1,27} = 0.185$	0.670
PVN						
PaV	$F_{1,27} = 0.177$	0.677	$F_{1,27} = 7.983$	0.008	$F_{1,27} = 1.198$	0.282
PaMP	$F_{1,27} = 1.229$	0.277	$F_{1,27} = 37.682$	< 0.001	$F_{1,27} = 2.381$	0.134
PaPo	$F_{1,27} = 4.575$	0.042	$F_{1,27} = 0.475$	0.496	$F_{1,27} = 0.054$	0.818
ARC	$F_{1,27} = 1.356$	0.253	$F_{1,27} = 41.529$	< 0.001	$F_{1,27} = 0.000094$	0.992
VMH	$F_{1,27} = 3.701$	0.064	$F_{1,27} = 1.455$	0.237	$F_{1,27} = 0.229$	0.635
DMH	$F_{1,27} = 0.0247$	0.876	$F_{1,27} = 8.666$	0.007	$F_{1,27} = 0.404$	0.531

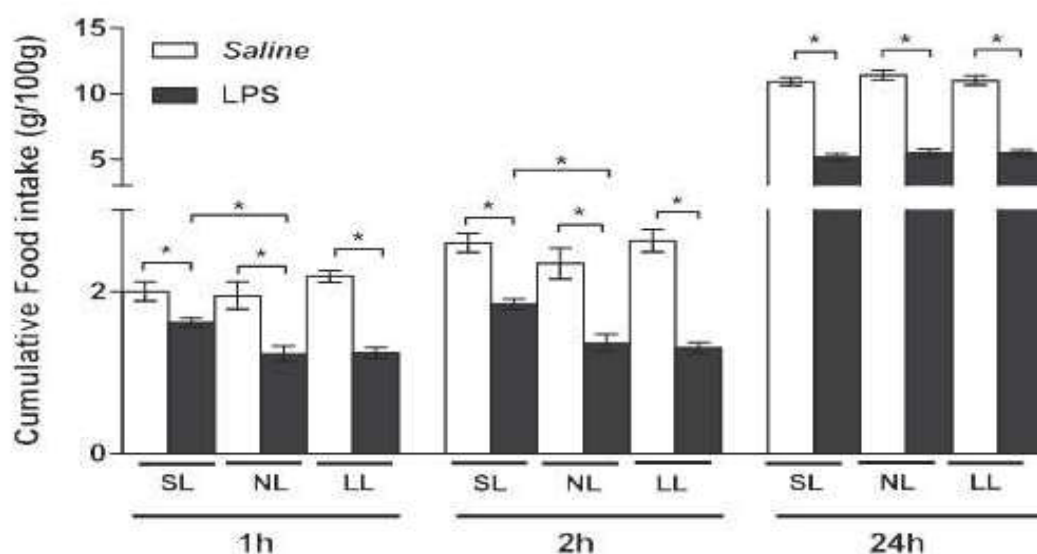
Two-way ANOVA analysis followed by Tukey post hoc test. Effect sizes were calculated in comparison with animals raised in normal litters (NL). AP, Area Postrema; NTS, Nucleus of the Solitary Tract; PVN, Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; PaV, ventral subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; PaMP, medial parvocellular subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; PaPo, posterior subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; ARC, Arcuate Nucleus of Hypothalamus; VMH, Ventromedial Nucleus of Hypothalamus; and DMH, Dorsomedial Nucleus of Hypothalamus.

Figure 1. Effect of litter size on body weight, naso-anal distance, and Lee index of male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL) and large litters (LL).



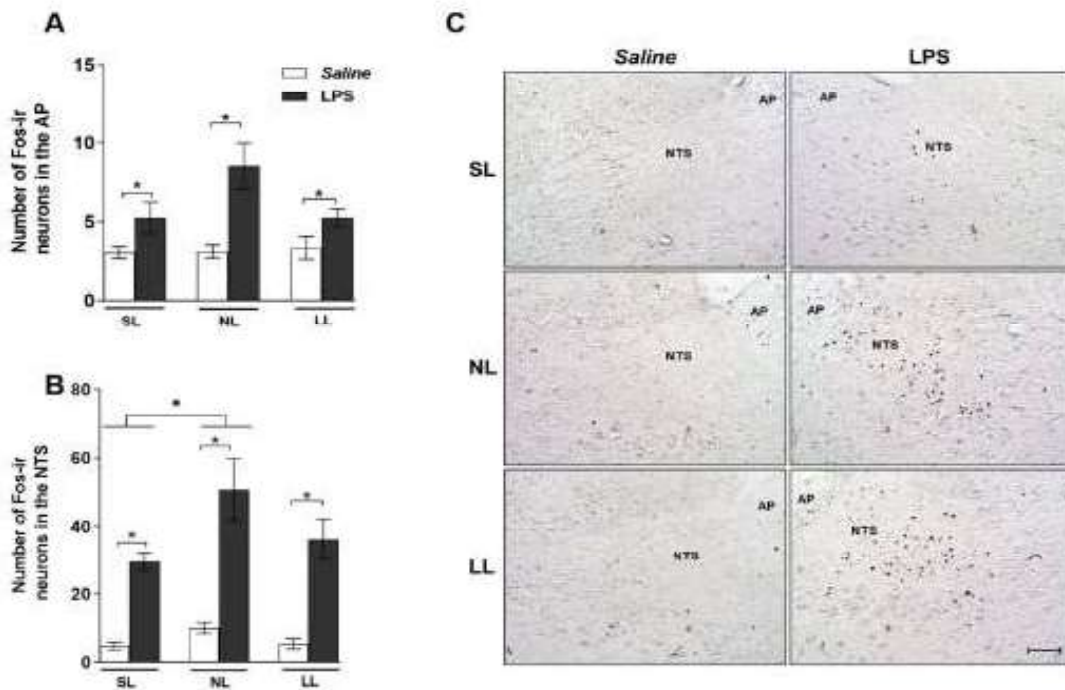
Body weight curve (g) during pre-weaning of litter (A) and post-weaning (B) period. D. Body weight gain (g). E. Naso-anal distance (cm). F. Lee index ( $\text{g}/3/\text{cm}$ ). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for MR ANOVA (for body weight curve) and Student's t-test (body weight gain, naso-anal distance, and Lee index). \* $p < 0.05$  versus NL ( $n = 40$  animals/group). C. Representative image of one animal from each litter on PND 21 and 60.

Figure 2. Effect of lipopolysaccharide (LPS;  $500 \mu\text{g}/\text{Kg}$ ) on food intake ( $\text{g}/100\text{g}$  body weight) of adult male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL) and large litters (LL).



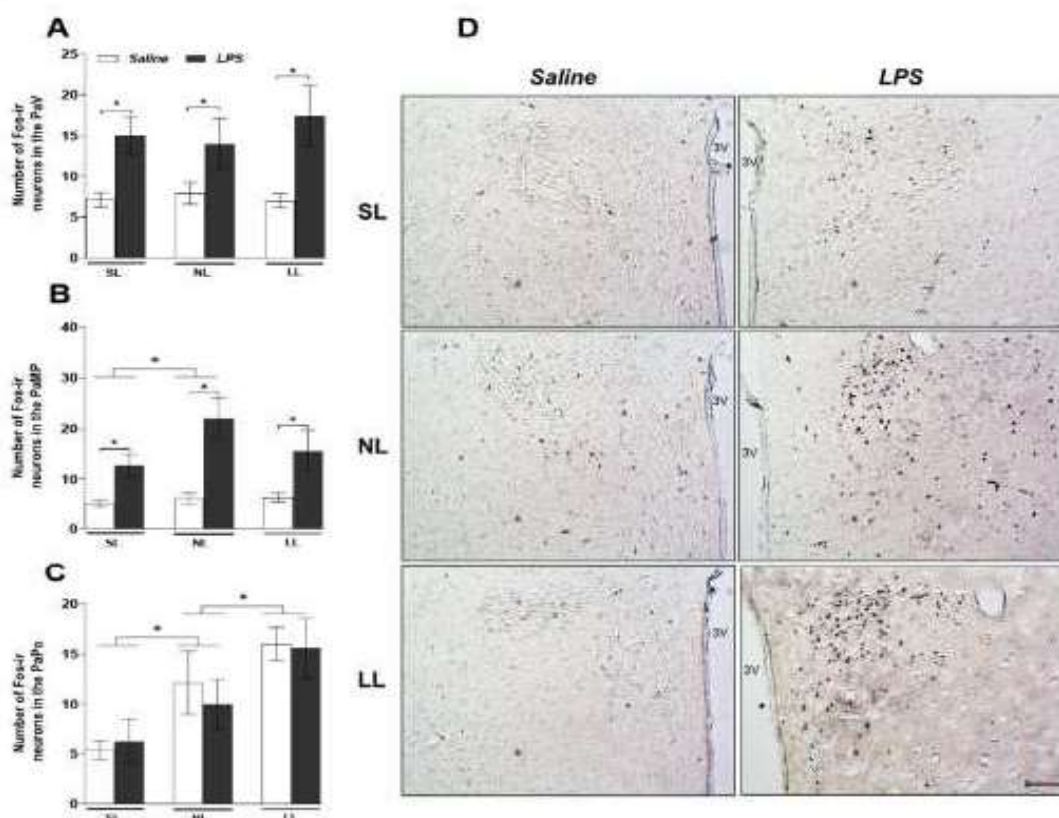
Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for RM three-way ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-12$  animals/group).

Figure 3. Effect of lipopolysaccharide (LPS; 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) on immunoreactive neurons in the (A) NTS and (B) AP of adult male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL), and large litters (LL). (C) Representative photomicrographs (10x magnification) of coronal section, showing immunoreactivity in the AP and NTS.



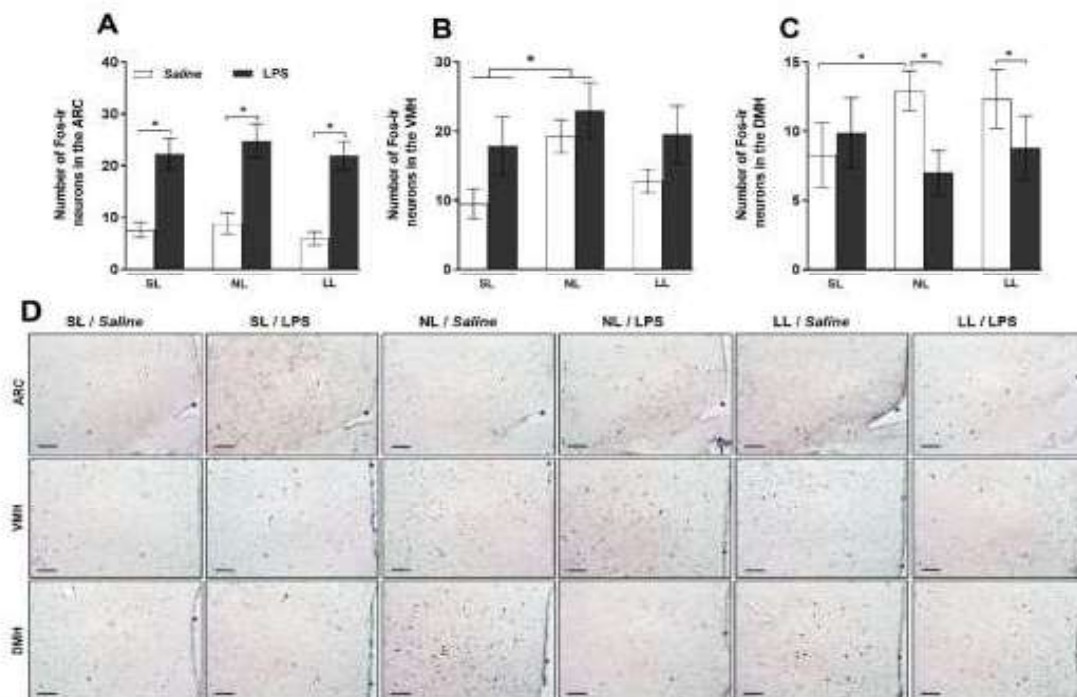
Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for two-way ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-10$  animals/group). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . AP, Area Postrema; NTS, Nucleus of the Solitary Tract.

Figure 4. Effect of lipopolysaccharide (LPS; 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) on immunoreactive neurons in the (A) PaV, (B) PaMP and (C) PaPo subdivisions of the PVN of adult male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL), and large litters (LL). (D) Representative photomicrographs (10x magnification) of coronal section, showing immunoreactivity in the PVN.



Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for two-way ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-10$  animals/group). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . PaV, ventral subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; PaMP, medial parvocellular subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; PaPo, posterior subdivision of Paraventricular Nucleus of Hypothalamus; 3V, third ventricle.

Figure 5. Effect of lipopolysaccharide (LPS; 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) on immunoreactive neurons in the (A) ARC, (B) VMH and (C) DMH of adult male *Wistar* rats reared in small (SL), normal (NL) and large litters (LL). (D) Representative photomicrographs (10x magnification) of coronal section, showing immunoreactivity in the ARC, VMH and DMH.



Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. for two-way ANOVA. \* $p < 0.05$  ( $n = 8-10$  animals/group). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ . (\*) third ventricle. ARC, Arcuate Nucleus of Hypothalamus; VMH, Ventromedial Nucleus of Hypothalamus; and DMH, Dorsomedial Nucleus of Hypothalamus.