



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Vanessa da Silva Tavares Rodrigues

**A redução do tamanho da ninhada e a exposição à nicotina na lactação
programam os marcadores do eixo intestino-cérebro em ratos Wistar
adultos de ambos os sexos**

Rio de Janeiro

2021

Vanessa da Silva Tavares Rodrigues

A redução do tamanho da ninhada e a exposição à nicotina na lactação programam os marcadores do eixo intestino-cérebro em ratos Wistar adultos de ambos os sexos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R696 Rodrigues, Vanessa da Silva Tavares.

A redução do tamanho da ninhada e a exposição à nicotina na lactação programam os marcadores do eixo intestino-cérebro em ratos *Wistar* adultos de ambos os sexos / Vanessa da Silva Tavares Rodrigues – 2021.
94f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva
Coorientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Nicotina - Teses. 2. Lactação - Teses. 3. Eixo Encéfalo-Intestino. 4. Metabolismo - Regulação - Teses. 5. Hiperfagia- Teses. I. Silva, Patrícia Lisboa da. II. Moura, Egberto Gaspar de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 613.287.8

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Vanessa da Silva Tavares Rodrigues

A redução do tamanho da ninhada e a exposição à nicotina na lactação programam os marcadores do eixo intestino-cérebro em ratos Wistar adultos de ambos os sexos

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de julho de 2021.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof. Dra. Adriana Souza Torsoni
Universidade de Campinas

Prof. Dra. Ana Paula Santos da Silva de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Vanessa de Souza Mello
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Luana Lopes de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a Deus, por ter sido fiel e me abençoado em todos os momentos. Ao meu marido Elvis por ter sido muito paciente, amoroso e ter me dado muita força em todos os momentos que precisei. E aos meus pais (Silvio e Maria Jorgina) e irmã (Érica) que sempre estiveram do meu lado me apoiando em tudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar ao meu lado, por ter aberto as portas para novas oportunidades e ter me possibilitado estar onde estou agora.

Depois aos meus orientadores, Patrícia Lisboa, Egberto G. Moura e Elaine de Oliveira. Não tenho palavras para agradecer o quanto vocês contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, para meu crescimento intelectual e como pesquisadora. Vocês me prepararam para ser a melhor professora do mundo!! Muito obrigada, vocês serão eternas referências.

A Luana por revisar o meu trabalho, me aconselhar e passar calma, pois sou ligada no 220 volts!!

Ao meu marido, amor da minha vida, companheiro, que sempre está disposto a encarar todas as minhas idéias, me dá força, cuida da minha alimentação (kkk) e está sempre comigo.

Aos meus pais, que mesmo possuindo educação básica sempre fizeram de tudo para eu estudar e assim alcançar degraus cada vez mais altos.

A minha irmã que mesmo depois de brigas é minha eterna companheira.

A duas meninas maravilhosas que me ensinaram muito sobre a vida: a minha sobrinha Elis, essa me mostrou que independente dos problemas nós temos que lutar, pois a bichinha nasceu, e passou os dois primeiros meses de vida brigando em uma incubadora e mostrou para todo mundo que milagre existe; e a outra é o meu floquinho de neve, Ana Clara, essa passou para me mostrar que devemos levar a vida da forma mais leve possível e ao mesmo tempo temos que vive-la da forma mais intensa que pudermos, pois a vida é um sopro e de uma hora para outra teremos apenas a saudade.

A Thamara, que vem me aguentando desde a graduação, me ajudando e torcendo por todas as minhas conquistas. Obrigada pela amizade de vocês!!!

A Fabiele, essa me ensinou o sentido da palavra força!!

A todas as meninas e menino do lab (Andressa, Bia, Bruna, Camila calviño, Camila Rossetti, Daniel, Fernanda, Fabiele, Iala, Lilian, Luana, Rosiane, Patricia e Thamara) que sempre me ajudaram em tudo o que precisei, sendo amigas, dando força, discutindo na hora do almoço, rindo, chorando, algumas tentando me embriagar - antes da pandemia. E durante a pandemia vocês conseguiram transformá-la em um momento mais leve, mesmo a distância. Como foi ruim ter que ir no laboratório não ter o grupo todo junto. Amo todos vocês. Formamos uma família linda!!!

Também agradeço aos alunos de iniciação científica e os funcionários do departamento que estão sempre dispostos a ajudar.

MUITO OBRIGADA por tudo!!!!

Se alguém te disser que alguma coisa é impossível, isso é reflexo das limitações dela e não suas!!

Autor desconhecido

RESUMO

RODRIGUES, Vanessa da Silva Tavares. *A redução do tamanho da ninhada e a exposição à nicotina na lactação programam os marcadores do eixo intestino-cérebro em ratos Wistar adultos de ambos os sexos*. 2021. 94f. Tese (Doutorado Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

A prevalência de obesidade mais que dobrou nos últimos 30 anos. Hoje sabe-se que a etiologia da obesidade envolve o desequilíbrio do balanço energético, que pode se dever a alterações no padrão alimentar. Diferentes mediadores endógenos como: peptídeos gastrointestinais (GI), como ghrelina, CCK, GLP-1 e PYY, nervo vago, microbiota intestinal e seus metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta, constituem o eixo intestino-cérebro, que exerce um importante papel na regulação da ingestão alimentar a curto prazo. Em nosso laboratório, estudamos a obesidade que se origina devido a diferentes insultos em janelas críticas de desenvolvimento, como por exemplo, a lactação. Nosso grupo evidenciou que a redução do tamanho da ninhada e a exposição a nicotina via leite materno causa alterações endócrino-metabólicas na prole adulta. A supernutrição neonatal precoce causa hiperfagia e obesidade na prole de ambos os sexos. Já a exposição a nicotina durante a lactação afeta a prole de forma distinta; machos são obesos e normofágicos, enquanto as fêmeas são eutroficas e hiperfágicas. Baseado nestes desfechos, a hipótese desta Tese é que tanto a supernutrição por redução de ninhada como a exposição precoce a nicotina são capazes de influenciar o eixo intestino-cérebro, ajudando a compreender o padrão alimentar apresentado pelos animais na vida adulta. **Modelo de supernutrição neonatal:** Três dias após o parto, as ninhadas de ratas Wistar foram divididas em: grupo ninhada reduzida (SL, do inglês *small litter*), mantida com 3 filhotes (ninhada de 3 machos ou ninhada de 3 fêmeas); grupo ninhada normal (NL, do inglês *normal litter*), mantida com 10 filhotes (5 machos e 5 fêmeas). A eutanásia da prole ocorreu no dia pós-natal (PN) 150. **Modelo de exposição materna a nicotina:** Dois dias após o parto, realizamos implante subcutâneo nas ratas lactantes, de minibombas osmóticas que liberam nicotina free base (6mg/Kg/dia) por 14 dias da lactação (grupo MNE, do inglês *maternal nicotine exposure*). As ratas controles (grupo CONT) receberam minibombas que liberam solução salina. As ninhadas MNE e CONT permaneceram com 6 filhotes (3 machos e 3 fêmeas). A eutanásia da prole ocorreu em PN180. Nos dois modelos, os filhotes de cada sexo foram analisados separadamente. As proles adultas dos dois modelos de programação apresentaram disbiose intestinal (aumento de *Firmicutes* e redução de *Bacteroidetes*), enquanto as fêmeas apresentaram redução de acetato fecal. Não observamos alteração nos receptores dos peptídeos GI e do BDNF no intestino delgado. Detectamos hiperatividade vagal na prole SL de ambos os sexos e nos machos MNE, embora o conteúdo de c-Fos no NTS tenha sido normal. No hipotálamo, observamos redução de GLP1R nos machos SL e aumento de CCK-1R nas fêmeas SL. As proles MNE não apresentaram alteração hipotalâmica dos receptores dos peptídeos GI. Em resumo, ambos os modelos de programação causam modificações específicas no eixo intestino-cérebro que impactam no padrão alimentar da vida adulta de modo sexo dependente.

Palavras-chave: Programação metabólica. Redução de ninhada. Supernutrição neonatal. Nicotina. Hiperfagia. Obesidade. Eixo intestino-cerebro. Nervo vago. Microbiota intestinal. Rato.

ABSTRACT

RODRIGUES, Vanessa da Silva Tavares. *Litter size reduction and nicotine exposure during lactation program markers of the gut-brain axis in adult Wistar rats of both sexes*. 2021. 94f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

The prevalence of obesity has more than doubled in the last 30 years. It is now known that the etiology of obesity involves a deregulation in energy balance, which may be due to changes in eating patterns. Some endogenous mediators, such as: gastrointestinal (GI) peptides, as ghrelin, CCK, GLP-1 and PYY, vagus nerve, intestinal microbiota and its metabolites, as short-chain fatty acids, constitute the gut-brain axis, which plays an important role in the regulation of short-term food intake. In our laboratory, we study obesity originated from different insults in critical developmental windows, such as lactation period. Our group showed that litter size reduction and exclusive exposure to nicotine via breast milk cause endocrine-metabolic alterations in adult offspring. Early postnatal overnutrition causes hyperphagia and obesity in offspring of both sexes. On the other hand, nicotine exposure during lactation affects the offspring differently; males are obese and normophagic, while females are eutrophic and hyperphagic. Based on these outcomes, the hypothesis of this work is that both overnutrition by litter reduction and early exposure to nicotine are capable of influencing the gut-brain axis, contributing to understand the eating pattern presented by animals in adulthood. **Model of postnatal overnutrition:** Three days after parturition, litters of Wistar rats were divided into: small litter size group (SL), maintained with 3 pups (3 male litter or 3 female litter); normal litter size group (NL), maintained with 10 pups (5 males and 5 females). The offspring were euthanized on the postnatal day (PN) 150. **Model of maternal nicotine exposure (MNE):** Two days after delivery, we implanted subcutaneous osmotic minipumps in lactating rats that release nicotine free base (6mg/Kg/day) for 14 days of lactation (MNE group). Control rats received minipumps that release saline solution. The MNE and control litters remained with 6 pups (3 males and 3 females). The offspring were euthanized in PN180. In both experimental models, the offspring of each sex were analyzed separately. Adult offspring of the two programming models showed intestinal dysbiosis (increased *Firmicutes* and reduced *Bacteroidetes*), while females showed a reduction in fecal acetate. We did not observe changes in GI peptide receptors and BDNF in the small intestine. We detected vagal hyperactivity in SL offspring of both sexes as well as in MNE males, although the c-Fos content in NTS was normal. In the hypothalamus, we observed a reduction in GLP1R in SL males and an increase in CCK-1R in SL females. MNE offspring did not show hypothalamic alteration of GI peptide receptors. In summary, both programming models cause specific changes in the biomarkers of gut-brain axis of offspring that influence the eating pattern in adult life in a sex-dependent manner.

Keywords: Metabolic programming. Litter reduction. Neonatal overnutrition. Nicotine. Hyperphagia. Obesity. Gut-brain axis. Vagus nerve. Gut microbiota. Rat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de obesidade, segundo o local de deposição adiposa.....	15
Figura 2 -	Esquema saciedade x saciação.....	18
Figura 3 -	Configuração estrutural de ghrelina humana e de rato.....	21
Figura 4 -	Efeitos da ghrelina no organismo humano.....	22
Figura 5 -	Configuração estrutural da CCK.....	24
Figura 6 -	Cadeia peptídica do PYY (1-36) e (3-36).....	25
Figura 7 -	Ação do PYY (3-36) no SNC.....	27
Figura 8 -	Gene pré-proglugacon e seus peptídeos menores.....	28
Figura 9 -	Estrutura química dos AGCCs.....	31
Figura 10 -	Principais desfechos na prole de machos na vida adulta.....	38
Figura 11 -	Principais desfechos na prole de ambos os sexos na vida adulta.....	40
Figura 12 -	Linha do tempo supernutrição pós-natal.....	45
Figura 13 -	Modelo exposição materna à nicotina.....	46
Figura 14 -	Áreas de corte do intestino e coleta de fezes.....	48
Figura 15 -	Impacto da redução do tamanho da ninhada nos marcadores de controle da ingestão alimentar em machos no PND150.....	56
Figura 16 -	Impacto da redução do tamanho da ninhada nos marcadores de controle da ingestão alimentar em machos no PND150.....	57
Figura 17 -	Parâmetros biométricos na prole adulta exposta à nicotina através do leite.....	64
Figura 18 -	Parâmetros do eixo intestino-cérebro em fêmeas adultas expostas à nicotina através do leite.....	66
Figura 19 -	Parâmetros do eixo intestino-cérebro em machos adultos expostos à nicotina através do leite.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação de obesidade segundo IMC (para adultos).....	14
Tabela 2 -	Lista de anticorpos.....	51
Tabela 3 -	Efeito da redução de ninhada nos parâmetros biometricos de machos em PND150.....	53
Tabela 4 -	Efeito da redução de ninhada nos parâmetros biometricos de fêmeas em PND150.....	54
Tabela 5 -	Síntese dos resultados obtidos nas proles adultas de ambos os sexos nos dois modelos de programação estudados nesta Tese.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCCs	Ácidos graxos de cadeia curta
AgRP	Peptídeo relacionado ao agouti
Akt	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina
AP	Área postrema
ARQ	Núcleo arqueado
ATP	Adenosina trifosfato
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
CB1	Receptor de endocanabinoide 1
CCK	Colecistoquinina
CCK-1R	Receptor de colecistoquinina 1
CCK-2R	Receptor de colecistoquinina 2
c-Fos	Fos proto-oncogene
DPP4	Enzima dipeptidil peptidase 4
DVC	Complexo dorso vagal
DVN	Núcleo motor dorsal do vago
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FFAR2	Receptor 2 de ácido graxo livre
FFAR3	Receptor 3 de ácido graxo livre
Fos-LI	Imunorreatividade semelhante à da proteína Fos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GH	Hormônio do crescimento
<i>ghs-r1</i>	Gene do receptor do secretagogo do hormônio do crescimento 1
GHS-R1a	Receptor do secretagogo do hormônio do crescimento 1 tipo A
GHS-R1b	Receptor do secretagogo do hormônio do crescimento 1 tipo B
GHS-R1	Receptor do secretagogo do hormônio do crescimento 1
Gi/o	Proteína G _i
GIP	Polipeptídeo inibidor gástrico
GLP1	Peptídeo semelhante a glucagon 1

GLP-1R	Receptor peptídeo semelhante a glucagon 1
GLP-2R	Receptor peptídeo semelhante a glucagon 2
GLP2	Peptídeo semelhante a glucagon
GOAT	Ghrelina O-acil-transferase
GPR41	Receptor acoplado à proteína G de mamíferos 41
GPR43	Receptor acoplado à proteína G de mamíferos 43
GPR81	Receptor acoplado à proteína G de mamíferos 81
GPR120	Receptor acoplado à proteína G de mamíferos 120
Gq	Proteína Gq
Gs	Proteína Gs
HCl	Ácido clorídrico
IMC	Índice de massa corporal
IP2	Péptido intermedio 2
JAK2	Janus quinase 2
MAPK	Quinase ativada por mitogênio
MC4R	Receptor de melanocortina 4
MCH1	Receptor do hormônio concentrador de melanina
MCT1	Transportador de monocarboxilato 1
NPY	Neuropeptídeo Y
NPY1R	Receptor do neuropeptídeo Y tipo 1
NTS	Núcleo do trato solitário
ObRb	Receptor leptina OB
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
POMC	Pro-opiomelanocortina
PP	Poli-peptídeo P
PPAR γ	Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama
PYY	Peptídeo YY
SMCT1	Transportador 1 de monocarboxilato acoplado a sódio
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SSTR	Receptor de somatostatina

STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TGI	Trato gastrointestinal
UCP2	Proteína desacopladora mitocondrial 2
Y1r	Subtipo 1 do receptor do neuropeptídeo Y
Y2r	Subtipo 2 do receptor do neuropeptídeo Y
Y4r	Subtipo 3 do receptor do neuropeptídeo Y
Y5r	Subtipo 5 do receptor do neuropeptídeo Y
Y6r	Subtipo 6 do receptor do neuropeptídeo Y

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVO	43
1.1	Objetivo geral	43
1.2	Objetivos específicos	43
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
2.1	Ética e procedimentos animais.....	44
2.2	Experimento 1 supernutrição pós-natal.....	44
2.2	Experimento 2 exposição materna à nicotina.....	45
2.3	Determinação da massa gorda total.....	46
2.4	Eletrofisiologia do nervo vago.....	47
2.5	Eutanásia e coleta de tecidos.....	47
2.6	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa - análise de SCFAS.....	48
2.7	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) - 16S RDNA.....	49
2.8	Análise de Western Blotting.....	50
2.9	Análise estatística.....	52
2.9.1	<u>Análise estatística experimento 1.....</u>	52
2.9.2	<u>Análise estatística experimento 2.....</u>	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1	Experimento 1: supernutrição pós-natal.....	53
3.1.1	<u>Resultados.....</u>	53
3.1.2	<u>Discussão.....</u>	58
3.2	Experimento 2: exposição materna à nicotina.....	63
3.2.1	<u>Resultados.....</u>	63
3.2.2	<u>Discussão.....</u>	68
4	RESUMO DOS RESULTADOS.....	73
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
	REFERÊNCIAS.....	76

INTRODUÇÃO

OBESIDADE

A obesidade é mundialmente considerada um problema de saúde pública, pois atinge praticamente todos os países do mundo, sem discriminação de sexo, faixa etária, raça ou classe social (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). De acordo com a definição da Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade é uma doença em que o excesso de gordura corporal é aumentado a ponto de gerar prejuízos a saúde e o bem-estar do indivíduo (WHO, 2000). É uma doença multifatorial e complexa, envolvendo fatores genéticos, ambientais e comportamentais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Esse aumento na adiposidade geralmente é gerado por um balanço energético positivo, que pode vir de um descontrole dos centros que regulam a ingestão alimentar, assunto que será abordado mais à frente.

Sabe-se que o sítio de deposição de gordura no organismo é o grande preditor de risco para a saúde. Indivíduos com obesidade androide (aumento de gordura visceral), são mais predispostos a riscos cardiometabólicos do que os obesos do tipo ginoide (aumento de gordura subcutânea) (Fig. 1) (WHO, 2000). A obesidade é classificada segundo o IMC (índice de massa corporal) (Tab. 1), calculado a partir da fórmula - peso (kg)/altura² (m), que leva em consideração a massa corporal e a altura do indivíduo (WHO, 2000). No entanto, essa classificação pode mascarar um percentual de indivíduos que se encontram dentro da faixa de IMC normal (eutrofia), mas apresentam excesso de gordura corporal, principalmente a gordura visceral, condição que pode comprometer a saúde (ROMERO-CORRAL *et al.*, 2010). Estima-se que 50% dos indivíduos classificados como eutróficos ou pré-obesos apresentem esse perfil (OKORODUDU *et al.*, 2010), sugerindo que devemos nos atentar não somente ao peso e IMC, mas sim no percentual de gordura e a localização desta gordura.

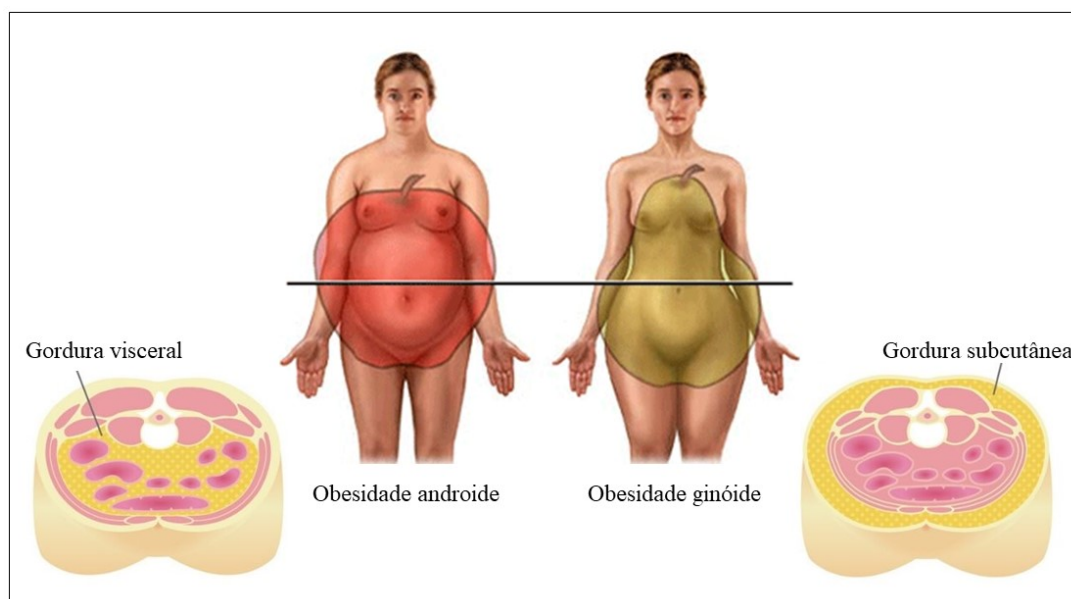
Tabela 1 - Classificação de obesidade segundo IMC (para adultos)

Classificação	IMC (kg/m²)
Baixo peso	< 18,5
Eutrófico	18,5 – 24,9
Pré-obeso	25 – 29,9
Obesidade I	30 – 34,9
Obesidade II	35 – 39,9
Obesidade III	> 40

Fonte: WHO, 2000.

Estima-se que em 2025, o mundo apresente cerca de 2,3 bilhões de indivíduos adultos acima do peso, destes, cerca de 700 milhões estarão com o IMC acima de 30 kg/m^2 (ABESO, 2020). No Brasil, 55,4% dos adultos estão com sobrepeso, sendo ligeiramente mais prevalente no sexo masculino (57,8% vs. 53,9% mulheres), enquanto a obesidade representa cerca de 20,3% dos brasileiros sem diferença entre os gêneros (VIGITEL, 2019), mostrando a necessidade urgente de políticas preventivas.

Figura 1 - Tipos de obesidade, segundo o local de deposição adiposa



Fonte: adaptado de Malbrain *et al.*, 2014.

Hoje, muito se sabe sobre o impacto da obesidade sobre a saúde, resultando em redução significativa da qualidade de vida, desencadeada por condições debilitantes, como: osteoartrite, dificuldades respiratórias, problemas músculo-esquelético e problemas psicológicos (depressão, distúrbios alimentares, imagem corporal distorcida e baixa autoestima); além de doenças crônicas não transmissíveis, como: diabetes tipo 2, hipercolesterolemia, hipertensão arterial, cardiopatias, disfunções hormonais e alguns tipos de câncer (WHO, 2000; MAFFIULETTI *et al.*, 2013; CALDERONE *et al.*, 2017)

Muito dos problemas de saúde causados pela obesidade tem sua gênese no tecido adiposo branco, que deixou de ser considerado um simples tecido armazenador de energia e passou a ser considerado um órgão endócrino devido a sua capacidade de produzir e liberar inúmeras adipocinas (hormônios, citocinas, proteínas da matriz extracelular e fatores de crescimento) (UNAMUNO *et al.*, 2018). Essas adipocinas tornam o tecido adiposo ativo possibilitando que o mesmo se comunique e interaja com outros órgãos/tecidos. Na obesidade,

o acúmulo excessivo de gordura altera o funcionamento do tecido adiposo, gerando desbalanço na produção das adipocinas, na deposição de lipídeos, nos processos de adipogênese, assim como prejuízo na angiogênese, causando hipóxia, inflamação e fibrose local (UNAMUNO *et al.*, 2018). Essas alterações impactam negativamente em importantes funções fisiológicas, dentre as quais, está a regulação do apetite/ingestão alimentar (RODRÍGUEZ *et al.*, 2015).

CONTROLE DA INGESTÃO ALIMENTAR

A ingestão alimentar é fundamental para manutenção da vida e é um importante fator que contribui para o balanço energético (YU, 2017). Este, possui mecanismos altamente regulados que integram mediadores químicos enviados da periferia e *inputs* nervosos oriundo das vísceras com áreas específicas do sistema nervoso central (SNC) (PARK; BLOOM, 2005), gerando as respostas de controle da ingestão alimentar. O hipotálamo, com destaque para o núcleo arqueado (ARQ), é uma região que atua como um sensor de fatores circulantes da periferia e transmissor desses sinais para as regiões hipotalâmicas vizinhas (SOBRINO CRESPO *et al.*, 2014). O tronco encefálico, onde está o complexo dorso vagal, também é região importante, apresentando o núcleo do trato solitário (NTS), que funciona de modo similar ao ARQ, sendo um sensor e distribuidor de fatores circulantes e *inputs* nervosos das fibras aferentes vagais proveniente das vísceras (TRAVAGLI *et al.*, 2006; SAM *et al.*, 2012; ABDALLA, 2017). Além disto, a ingestão alimentar sofre um controle hedônico, realizado pelos sistemas mesocorticolímbico dopaminérgico e os núcleos do sistema endocanabinoide (VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2008; BAIK, 2013).

Na periferia, o grande responsável por controlar a ingestão alimentar é o trato gastrointestinal (TGI), onde o estômago e os intestinos são os órgãos chaves nesse processo (AMIN; MERCER, 2016). O TGI possui um sistema nervoso próprio, o sistema nervoso entérico (SNE) (MUKHTAR; NAWAZ; ABID, 2019), que produz uma gama de neurotransmissores e hormônios que controlam a ingestão alimentar a partir de estímulos mecânicos e químicos (SANTONICOLA *et al.*, 2019), além de possuir uma microbiota que impacta no metabolismo e fisiologia do hospedeiro (AMIN; MERCER, 2016). Essa junção de componentes torna o TGI um componente muito complexo e de grande importância no controle da ingestão alimentar.

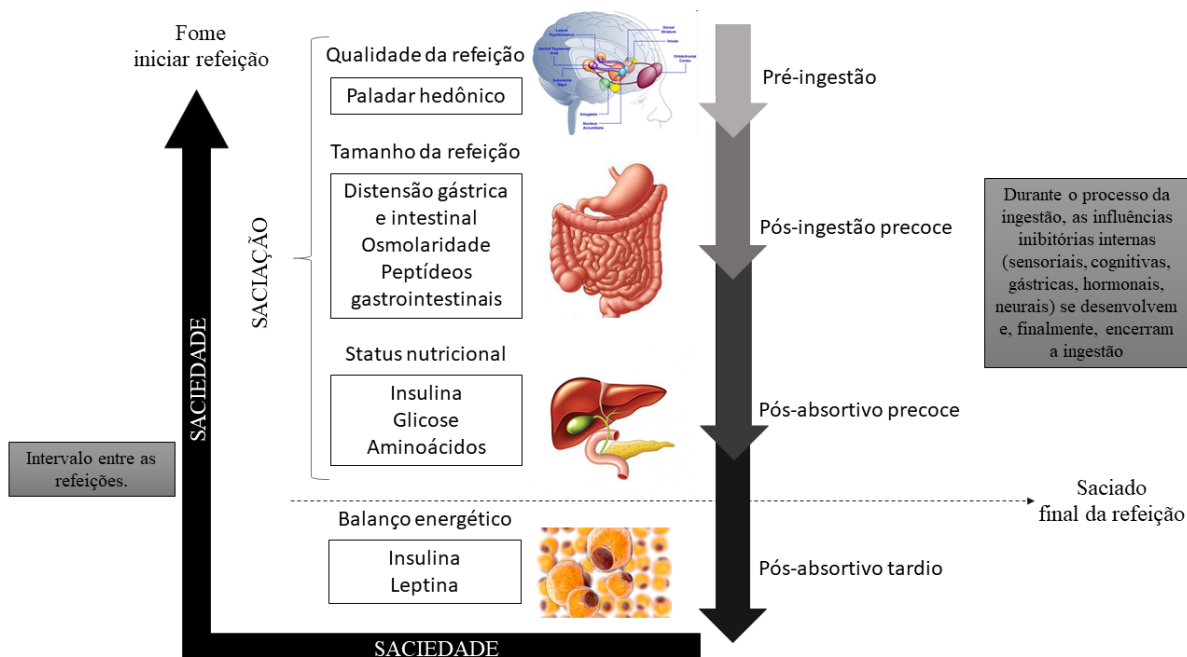
Conectando o SNC e o TGI, temos o sistema nervoso autônomo (SNA) que está envolvido na comunicação bidirecional realizada por nervos simpáticos e parassimpáticos.

Estes são constituídos por fibras eferentes (noradrenérgicas e colinérgicas) que enviam sinais da SNC para a periferia, e fibras aferentes sensoriais que trazem informações da periferia para o SNC (KONTUREK *et al.*, 2004). O principal representante dessa conexão é o nervo vago, que perfaz o eixo intestino-cérebro (BREIT *et al.*, 2018).

Essa complexa circuitaria participa de dois processos fisiológicos, a saciedade e a saciação, que determinam o tamanho e o tempo de uma refeição, além do intervalo entre as refeições (GARCÍA-FLORES *et al.*, 2017). A saciedade é definida como o intervalo entre as refeições, que compreende o período entre acabar de comer e voltar a sentir fome. Esse processo é regulado por marcadores periféricos como glicose, insulina e ghrelina (BLUNDELL, 2010; TREMBLAY; BELLISLE, 2015). Já a saciação é o processo que determina o momento em que o ato de comer é finalizado, que compreende o tempo entre o comer e o sentir-se satisfeito. Em humanos saudáveis, ocorre aproximadamente 20 min após o início da ingestão alimentar e é caracterizada pela interação entre fatores sensoriais, composição dos macronutrientes, densidade energética, fatores cognitivos e pré-absortivos precoces (BLUNDELL, 2010; DE CASTRO, 2010; TREMBLAY; BELLISLE, 2015).

Como demonstrado na Fig. 2, a saciação pode ser dividida em três partes: o componente hedônico, que antecede a ingestão e determina a qualidade da refeição a parte pós-ingestão precoce, que determina o tamanho da refeição; e o período pós-absortivo precoce que é determinado pelo status nutricional (BLUNDELL, 2010). O controle destas etapas é realizado por estímulos sensoriais, hormonais e nervosos de órgãos periféricos, com exceção do componente hedônico que já está localizado no SNC na qual resultarão na ativação dos centros controladores da ingestão específicos localizados no hipotálamo e tronco encefálico (BLUNDELL, 2010). A saciedade (período pós-absortivo tardio) será abordada a seguir.

Figura 2 - Esquema saciedade x saciação



Fonte: adaptado de Blundell, 2010.

Centros controladores da ingestão alimentar

Sistema nervoso central: hipotálamo e tronco encefálico

O hipotálamo é uma estrutura do SNC, mais precisamente do diencefalo, localizada na base do cérebro, abaixo do tálamo e acima da hipófise, em torno do terceiro ventrículo, cujo peso no ser humano adulto não ultrapassa 2,5g. É responsável por uma série de processos fisiológicos, dentre eles o controle da ingestão alimentar. Os principais núcleos envolvidos no controle da saciedade são os núcleos do hipotálamo medial: ARQ, núcleo paraventricular, núcleo ventromedial, núcleo dorsomedial e núcleo dorsal área hipotalâmica (DANIEL, 1976; LECHAN; TONI, 2000; ABUZZAHAB; ROTH; SHOEMAKER, 2019).

O ARQ está localizado na base do hipotálamo medial, e atua como uma central de distribuição de informações, pois possui neurônios que detectam e respondem a hormônios e nutrientes circulantes que revelam as necessidades energéticas corporais, garantindo assim a homeostase energética (DIETRICH; HORVATH, 2013). Esse núcleo, possui duas grandes populações de neurônios que se antagonizam: os orexigênicos, NPY (neuropeptídeo Y) e

AgRP (peptídeo relacionado ao agouti); e os anorexígenos POMC (pro-opiomelanocortina) e CART (cocaine and amphetamine-regulated transcript). Esses neurônios podem ser ativados ou suprimidos por hormônios como insulina e leptina; peptídeos gastrointestinais (ghrelina, CCK, PYY, GLP-1); e nutrientes (KONTUREK *et al.*, 2004; SAM *et al.*, 2012). Especula-se que estes chegam aos neurônios do ARQ por dois caminhos, o primeiro através do transporte mediado por receptores na barreira hematoencefálica, e o segundo através da permeabilidade da eminência mediana (MORITA-TAKEMURA; WANAKA, 2019).

O tronco encefálico, uma extensão inferior do cérebro que o conecta com o cerebelo e medula espinhal, é dividido em 4 regiões: diencéfalo, mesencéfalo, ponte e bulbo (ANGELES FERNÁNDEZ-GIL *et al.*, 2010). Nesta região existe um complexo, denominado complexo dorso vagal (DVC), que transmite sinais hormonais e nervosos do TGI para o hipotálamo. Esse complexo é formado pelo núcleo motor dorsal do vago (DVN), a área postrema (AP) e o NTS.

O NTS, como dito anteriormente, atua de modo muito semelhante ao ARQ, pois recebe, integra e processa os sinais aferentes vagais provenientes das vísceras (TRAVAGLI *et al.*, 2006). É responsável por regular funções vitais, como apetite e digestão (GASPARINI *et al.*, 2020). Está localizado no bulbo encefálico e é constituído por massa cinzenta (BAKER; LUI, 2021). O NTS é dividido em três níveis (rostral, intermedia e caudal), e possui duas subdivisões (lateral e medial), além da região comensural e AP. Cada região dessa é dividida em vários subnúcleos que recebe *inputs* aferentes vagais de diferentes vísceras. A região medial do NTS é a responsável por receber os sinais aferentes vagais gastrointestinais pós-refeição (GASPARINI *et al.*, 2020).

Além disso, uma gama de receptores que regulam a ingestão alimentar foram descritos no NTS, como: Receptor de colecistoquinina 1 e 2 (CCK-1R e CCK-2R); receptor de insulina; receptor do peptídeo semelhante a glucagon 1 e 2 (GLP-1R e GLP-2R); receptor de secretagogo do hormônio de crescimento GHS-R1; assim como o receptor de orexina e de leptina (NAKAZATO, 2016; ABDALLA, 2017; UENO;). Outro importante fator relacionado ao controle da ingestão alimentar observado no NTS, é a presença de neurônios POMC (SCHWARTZ, 2010) e neurônios produtores de peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) (LLEWELLYN-SMITH *et al.*, 2013).

Neste trabalho abordaremos os fatores que impactam no controle da ingestão alimentar a curto prazo. Porém, é importante colocar que os centros citados anteriormente também são influenciados pela leptina, que regula a ingestão alimentar e gasto energético a longo prazo. A leptina é um hormônio principalmente produzido pelo tecido adiposo branco (KLOK;

JAKOBSDOTTIR; DRENT, 2007). Sua atividade no SNC inibe neurônios orexígenos e estimula neurônios anorexígenos, gerando saciedade (ABELLA *et al.*, 2017). Essa atividade é exercida através da ligação da leptina no receptor ObRb, que ativa múltiplas cascatas de sinalização intracelulares, como: Janus quinase 2 / transdutor de sinal e ativador de transcrição (JAK2/STAT3), quinase ativada por mitogênio / quinase regulada por sinal extracelular (MAPK / ERK) e fosfatidilinositol 3 quinase / proteína quinase B (PI3K / Akt) (THON; HOSOI; OZAWA, 2016). No entanto, na obesidade, condição frequentemente acompanhada por um quadro de hiperleptinemia, os efeitos anorexígenos da leptina não são observados devido ao desenvolvimento de resistência à ação desse hormônio (BJØRBAEK *et al.*, 1999). Assim, torna-se cada vez mais importante estudar os mecanismos de controle da ingestão alimentar a curto prazo na obesidade, pois esses podem ser possíveis alvos terapêuticos para a obesidade.

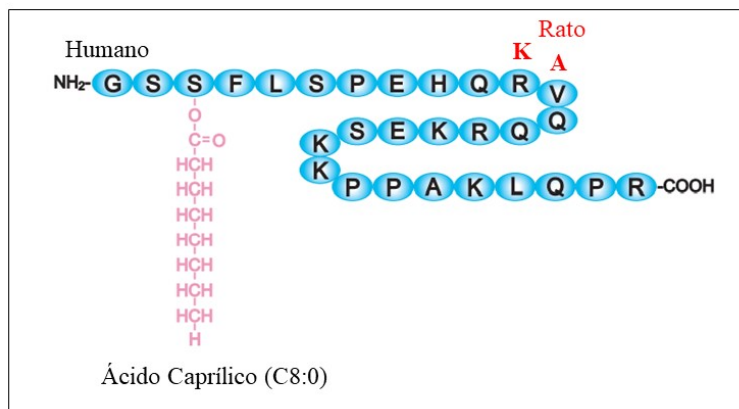
Trato gastrointestinal: estômago e intestino delgado

O estômago possui as funções de armazenar o alimento e controlar a sua saída para o intestino, além de iniciar a digestão de proteínas e inativar alguns micro-organismos pela ação do suco gástrico, composto de ácido clorídrico (HCl) e enzimas proteolíticas (YANG; NELL; SUERBAUM, 2013; HUNT *et al.*, 2015). Além disto, o estômago é responsável pela síntese e secreção de ghrelina.

Ghrelina

A ghrelina é um hormônio peptídico constituído por 28 aminoácidos, que apresenta alta homologia entre humanos e ratos, diferindo apenas em dois aminoácidos (fig. 3). É um dos importantes sinalizadores para o início da ingestão alimentar, um potente peptídeo orexígeno. Sua concentração plasmática encontra-se elevada no jejum e reduzida após ingestão alimentar. Em 2000, foi descoberto que a ghrelina atua no SNC regulando a ingestão alimentar, peso corporal, adiposidade e metabolismo da glicose, por ativar circuitos neuronais orexigênicos, depois outras ações periféricas e centrais também foram descritas (MÜLLER *et al.*, 2015) (Fig. 4).

Figura 3 - Configuração estrutural de ghrelina humana e de rato



Fonte: Kojima; Kangawa, 2005.

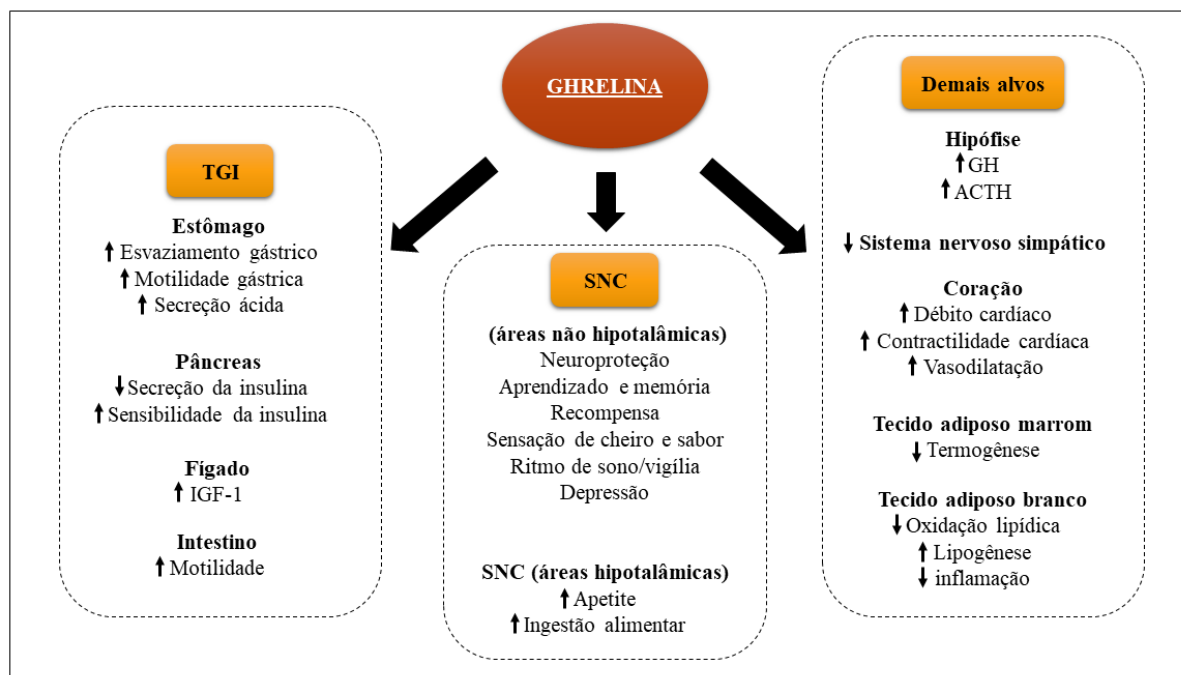
A ghrelina é sintetizada como pré-pro-ghrelina e necessita de uma modificação pós traducional para se tornar ativa e se ligar ao seu receptor. Essa modificação consiste na adição de um ácido graxo octanóico (ácido caprílico) ou decanóico (ácido cáprico) no resíduo de serina 3, realizada pela enzima ghrelina O-acil-transferase (GOAT), que é responsável pela conversão da ghrelina em suas formas acetiladas, biologicamente ativas, a octanoil- e decanoil-ghrelina (KOJIMA; KANGAWA, 2005). Desta forma, a GOAT apresenta um importante papel regulador na atividade da ghrelina.

Este hormônio é principalmente secretado pelas células enteroendócrinas localizadas nas glândulas oxínticas do fundo gástrico. Essas células se apresentam envolvidas por células epiteliais, que impedem o contato direto da célula com o lúmen gástrico, sugerindo que sua estimulação seja maior pela atividade nervosa e plasmáticos do que pelo conteúdo luminal, uma vez que seus receptores ficam em contato com a lâmina própria. Também ocorre secreção de ghrelina por algumas células enteroendócrinas do intestino delgado que estão em contato direto com o lúmen intestinal. Seus receptores estão presentes nas faces apico-lateral dos enterócitos, indicando que estas células são mais responsivas aos nutrientes e/ou conteúdo luminal. Outras células, como as do pâncreas, neurônios ARQ e NTS e aferências vagais, também produzem ghrelina (DATE *et al.*, 2002; KOJIMA; KANGAWA, 2005; ABDALLA, 2017; STEINERT *et al.*, 2017).

Em 1999, Masayasu Kojima e colaboradores descobriram a ghrelina como o ligante endógeno para o receptor de secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R1), que estimula a liberação do hormônio do crescimento (GH) pela adeno-hipófise. Esse receptor é do tipo 7 domínios transmembrana acoplado a proteína G, com atividade G_q (KOJIMA; KANGAWA, 2005). O GHS-R1 é codificado pelo gene *ghs-r1*, que codifica o GHS-R1a e o

GHS-R1b. Ambos os receptores apresentam ampla distribuição nos tecidos corporais, o que possibilita uma grande atuação da ghrelina no organismo (Fig. 4). O papel biológico do GHS-R1b ainda não está claro, mas sabe-se que ele pode heterodimerizar com GHS-R1a levando a inativação do mesmo (MÜLLER *et al.*, 2015).

Figura 4 - Efeitos da ghrelina no organismo humano



Legenda: ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico; GH - hormônio do crescimento; IGF-1 - fator de crescimento semelhante a insulina-1; SNC - sistema nervoso central; TGI - trato gastrointestinal.

Fonte: adaptado de MÜLLER *et al.*, 2015.

Cowley *et al.* (2003) demonstraram como a ghrelina funciona a nível de hipotálamo no controle da ingestão alimentar e gasto energético. No hipotálamo existe uma população de neurônios que produzem ghrelina localizados no ARQ e nas adjacências do terceiro ventrículo. A ghrelina liberada por esses neurônios se liga nos GHS-R dos neurônios NPY/AGRP, estimulando a secreção de NPY e GABA (Ácido gama-aminobutírico). O GABA modula neurônios POMC reduzindo a sua expressão e, assim, a ghrelina estimula o apetite. Mesmo o TGI sendo o grande produtor de ghrelina, o ARQ parece ser o sítio responsável pela produção da ghrelina ativa no SNC, pois em camundongos, a ghrelina é facilmente transportada pela barreira hemato encefálica no sentido cérebro-sangue e, no sentido inverso, o transporte é pequeno (BANKS *et al.*, 2002). Porém, nos aferentes vagais, a ghrelina se liga no GHS-R (acoplado a proteína G_i) o que provoca a hiperpolarização da membrana e conseqüentemente menor excitabilidade do vago (ZHANG *et al.*, 2020). Essa

ligação também foi relacionada com a liberação de NPY/AGRP no hipotálamo (KONTUREK *et al.*, 2004).

A regulação da síntese e secreção da ghrelina ainda não é clara, mas a enzima GOAT é um potente regulador da atividade deste hormônio. Além disso, os nutrientes também regulam a secreção de ghrelina. No período pós prandial em humanos saudáveis, foi demonstrado que o lipídeo teve menor impacto na secreção de ghrelina, enquanto proteína e carboidratos foram mais efetivos em reduzir a concentração plasmática de ghrelina. Porém, o carboidrato apresentou um efeito rebote, levando a ghrelina a níveis acima do período pré-prandial (AROSIO *et al.*, 2004). Outro fator responsável pela liberação da ghrelina é o SNA, cuja importância é evidenciada pela presença de receptores $\beta 1$ -adrenérgicos presentes nas células secretoras de ghrelina (ZHAO *et al.*, 2010). Além disto, a ativação de outros receptores de membrana afeta a secreção de ghrelina (ENGELSTOFT *et al.*, 2013). Receptores acoplados à proteína G_s , que estimulam a liberação de ghrelina: receptores de GIP (Polipeptídeo inibidor gástrico), receptor de secretina, receptor de melanocortina 4 (MC4R). Receptores acoplados a proteína G_i , que inibem a liberação de ghrelina: receptores de somatostatina (SSTRs), receptor de lactato (GPR81), receptores de ácidos graxos de cadeia curta (GPR43) e o receptores de ácidos graxos de cadeia longa (GPR120).

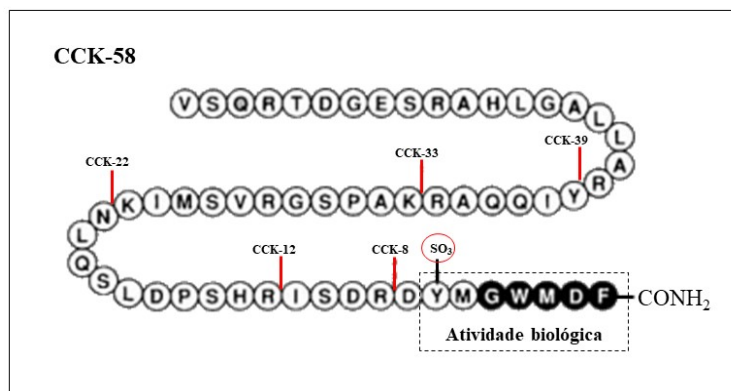
O intestino delgado também secreta peptídeos que agem no controle do metabolismo energético. Esta região tem papel crucial na digestão e absorção dos nutrientes. Consiste em um longo tubo que se inicia no piloro e termina na válvula ileocecal medindo em média cerca de 6,5m de comprimento e é dividido em três regiões, duodeno, jejuno e íleo (VOLK; LACY, 2017). Em humanos e roedores, o duodeno produz e libera a colecistoquinina (CCK), enquanto o jejuno terminal e o íleo sintetizam e secretam o peptídeo YY (PYY) e o peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1) (SVENDSEN *et al.*, 2015). Esses três peptídeos intestinais possuem atividades anorexígenas (STEINERT *et al.*, 2017; FOTHERGILL; FURNESS, 2018).

CCK

É um hormônio peptídico e regulador parácrino, secretado pelas células enteroendócrinas I no duodeno, jejuno e íleo proximal, como também por neurônios do plexo mioentérico e no cérebro (CHANDRA; LIDDLE, 2007). É sintetizado como pré-pro-CCK contendo 115 aminoácidos, que após processamento pós traducional dá origem a CCK-58, maior isoforma deste hormônio em humanos, ratos e cães (CHANDRA; LIDDLE, 2007). A CCK é também encontrada nos comprimentos 39, 33, 22, 12 e 8 resíduos, sendo esta última, a menor forma com atividade biológica (LIDDLE, 2000; MIYASAKA; FUNAKOSHI, 2003).

No seu processamento pós-traducional, o resíduo de tirosina localizado próximo ao C terminal é sulfatado, o que confere a CCK um aumento de atividade de 100 vezes no TGI (MIYASAKA; FUNAKOSHI, 2003) (Fig. 5).

Figura 5 - Configuração estrutural da CCK



Legenda: CCK - colecistiquinina.

Fonte: adaptado de Miyasaka; Funakoshi, 2003.

As células I ficam em contato com o lúmen intestinal, cujos sensores estão na membrana apical, fazendo assim com que o quimo seja um potente secretagogo de CCK, liberada na membrana basolateral (LIDDLE, 2000). Os mais potentes estimuladores de CCK são ácidos graxos e aminoácidos, com destaque para o triptofano e fenilalanina (LIDDLE, 2000; SAM *et al.*, 2012).

A ação da CCK é mediada através da ligação com seu receptor, o CCK-1R e o CCK-2R (MIYASAKA; FUNAKOSHI, 2003). Esses receptores são do tipo 7 domínios transmembrana acoplados a proteína G (família Gq), com ampla distribuição por todo organismo, e com algumas diferenças entre as espécies (MIYASAKA; FUNAKOSHI, 2003). Na periferia, o CCK-1r está majoritariamente na mucosa do TGI, plexo mioentérico, pâncreas, vesícula biliar; enquanto o CCK-2r está principalmente no cérebro e estômago. Em algumas áreas específicas do SNC que regulam a ingestão alimentar, como o NTS e ARQ, a presença do CCK-1r já foi descrita (HONDA *et al.*, 1993; MIYASAKA; FUNAKOSHI, 2003; CHANDRA; LIDDLE, 2007; SAM *et al.*, 2012).

A primeira função descrita desse hormônio foi a contração da vesícula biliar, seguida da descrição de outras funções no TGI, como estímulo da secreção de enzimas digestivas pancreáticas, inibição do esvaziamento gástrico, e estímulo da secreção de células beta-pancreáticas (WILLIAMS, 2019). Até o momento, o mecanismo exato pelo qual a CCK regula a ingestão alimentar, ainda não é claro, mas, sabe-se que tem envolvimento da aferência vagal. A CCK se liga no CCK-1R nas fibras aferentes vagais, que inervam o duodeno e estes

receptores ao serem ativados, estimulam a excitabilidade vagal (DATE, 2012), que envia sinais para o NTS. Além do estímulo hormonal, os aferentes vagais também são ativados pela distensão do estômago que é intensificado pela ação da CCK, uma vez que esta reduz o esvaziamento gástrico (CHANDRA; LIDDLE, 2007). Em roedores, a administração periférica de CCK, reduziu o tempo e o tamanho da refeição. Em roedores e humanos, a administração periférica de CCK reduziu a ingestão de alimentos, aumentando a saciedade (SAM *et al.*, 2012). Além disso, a CCK modula hormônios anorexígenos, atuando de forma sinérgica com a leptina no PVN, e peptídeos orexígenos, inibindo o RNAm da orexina e do hormônio concentrador de melanina (MCH) no hipotálamo lateral. A administração simultânea de CCK e ghrelina bloqueia a expressão de Fos-LI (c-Fos like immunoreactivity) no ARQ, sugerindo poder inibir os efeitos induzidos pela ghrelina (GALLMANN *et al.*, 2005; KOBELT *et al.*, 2005).

PYY

Também chamado de peptídeo tirosina (Y) tirosina (Y), recebeu este nome por apresentar o aminoácido tirosina nas extremidades N e C da proteína. É um peptídeo de 36 aminoácidos que foi isolado do intestino de porcos em 1980 (UENO *et al.*, 2008). O PYY pertence à família de peptídeos que incluem neuropeptídeo Y (NPY) e o polipeptídeo pancreático (PP), chegando a apresentar 70% de homologia entre eles em humanos (UENO *et al.*, 2008). Em ratos, NPY e PP são 67% e 42% homólogos com PYY (KEIRE *et al.*, 2002).

O PYY é liberado pelas células L intestinais principalmente as localizadas na região mais distal do intestino (UENO *et al.*, 2008). Duas formas endógenas são liberadas na circulação: a forma PYY (1-36), com atividade pouco clara sobre o controle alimentar; e a forma PYY (3-36) (KEIRE *et al.*, 2002) (Fig 6).

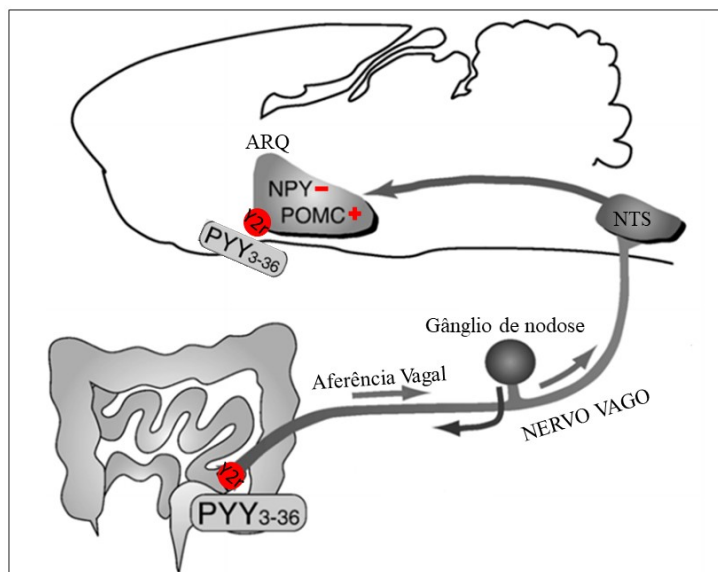
Figura 6 - Cadeia peptídica do PYY (1-36) e (3-36)

se elevado até aproximadamente 6 h (UENO *et al.*, 2008). Com relação a macronutrientes, a proteína parece ter um grande impacto no conteúdo de PYY, como demonstrado pela maior expressão do RNAm de PYY em camundongos que receberam uma dieta hiperproteica, quando comparado a uma dieta normal (BATTERHAM *et al.*, 2006). Outro dado interessante é que a expressão de PYY em humanos tem correlação inversa ao IMC, sendo menor em indivíduos obesos quando comparado a indivíduos magros (BATTERHAM *et al.*, 2003).

Sua atividade biológica ocorre através da ligação a diferentes isoformas de receptores do tipo 7 domínios transmembrana acoplado a proteína G: Y1, Y2, Y4, Y5 e Y6 (KEIRE *et al.*, 2002; PRICE; BLOOM, 2014). O Y1r é expresso em áreas do SNC e na periferia (veias e artérias); o Y2r é expresso no hipotálamo (primariamente no ARQ), hipocampo e periferia (intestino, fibras nervosas simpáticas e parassimpáticas e vasos sanguíneos); o Y4r é expresso no TGI, pâncreas, coração, artérias, hipotálamo e hipocampo; o Y5r é expresso em áreas do cérebro; o Y6r não é expresso em primatas (KEIRE *et al.*, 2002; UENO *et al.*, 2008; PRICE; BLOOM, 2014; NISHIZAWA *et al.*, 2017). Esses receptores diferem quanto a afinidade com seu ligante. A forma PYY (1-36), se liga em todos os tipos de receptor Y, enquanto a forma PYY (3-36) tem maior afinidade pelo Y2r e moderada afinidade pelo Y1r e Y5r (UENO *et al.*, 2008). A ação central anorexigênica do PYY (3-36) resulta na ligação ao Y2r (Fig. 7). Já a ativação central do Y1r ou Y5r causa efeitos orexígenos (KANATANI *et al.*, 2000).

No TGI, o PYY inibe a secreção gástrica, pancreática e intestinal, além da motilidade. No ARQ, o inibe a secreção de NPY e reduz a inibição tônica dos neurônios POMC (PRICE; BLOOM, 2014; UENO *et al.*, 2008). O PYY aumenta a atividade elétrica do nervo vago, aumentando a expressão de c-Fos no NTS, que através de projeções para o ARQ excita os neurônios POMC (UENO *et al.*, 2008; VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2008) (Fig. 7).

Figura 7 - Ação do PYY (3-36) no SNC



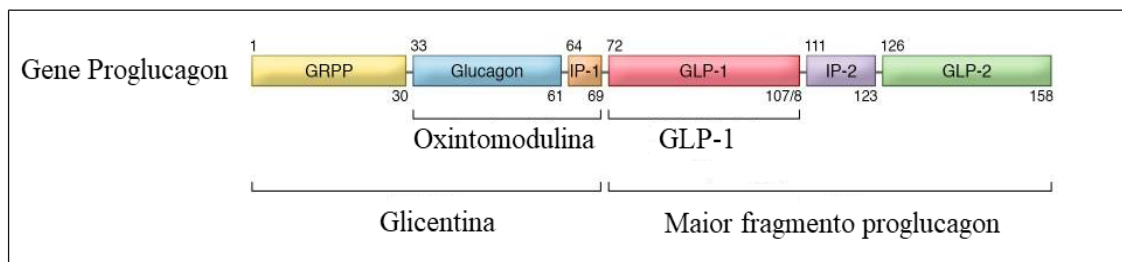
Legenda: ARQ – núcleo arqueado; Y2R – receptor do neuropeptídeo Y2; NPY – Neuropeptídeo Y; NTS – Núcleo do trato solitário; POMC – Pró-opiomelanocortina; PYY – Peptídeo YY.

Fonte: adaptado de Hiroaki *et al.*, 2008.

GLP-1

O peptídeo tipo glucagon-1 foi descoberto na década de 60 após clonagem do pró-glucagon. O gene pré-proglucacon codifica vários peptídeos menores, como: proglucagon (maior fragmento), glicentina, oxintomodulina, glucagon, GLP1, GLP2 e IP2 (SANDOVAL; D’ALESSIO, 2015; DRUCKER; HABENER; HOLST, 2017)(fig.8). O primeiro efeito descrito do GLP-1 foi estimular a secreção de insulina, caracterizando-o como uma incretina. Esse hormônio intestinal é formado por 30 aminoácidos e é produzido pelas células L da região distal do intestino – íleo e colón de ratos, porcos e humanos (EISSELE *et al.*, 1992; D’ALESSIO, 2016). O GLP-1 também é produzido por células nervosas do NTS (SOBRINO CRESPO *et al.*, 2014; KANOSKI; HAYES; SKIBICKA, 2016).

Figura 8 - Gene pré-proglucacon e seus peptídeos menores



Fonte: adaptado de Drucker *et al.*, 2017.

A ingestão alimentar estimula sua secreção de duas maneiras: através de ação direta do nutriente em contato com a mucosa intestinal ou através de ativação neural. Acredita-se que a segunda opção seja a mais relevante, pois as células produtoras de GLP-1 estão na parte distal do intestino e a concentração de GLP-1 na veia porta aumenta logo após o início da refeição, antes que o volume de nutrientes chegue a esta região. Acredita-se que a diferença entre o tempo de passagem dos nutrientes ao longo do intestino e a secreção pós-prandial de GLP-1 envolva sinais neurais ou parácrinos enviados do duodeno para o íleo (BRUBAKER; ANINI, 2003).

Sua ação é mediada através da sua ligação no seu receptor, GLP-1R. Esse é um receptor 7 domínios transmembrana acoplado a proteína G, que pode ter atividade G_s e G_q . (SANDOVAL; D'ALESSIO, 2015). Este receptor está expresso em: células β -pancreáticas, células epiteliais pulmonares, células das fossas gástricas e da mucosa do intestino delgado, miócitos cardíacos atriais e em neurônios de várias regiões do cérebro (ARQ e NTS) e aferentes vagais (SAM *et al.*, 2012; D'ALESSIO, 2016; KANOSKI; HAYES; SKIBICKA, 2016). Já nos aferentes vagais, sua ativação gera despolarização, resultando em maior excitabilidade do vago (ZHANG *et al.*, 2020).

Além de sua ação incretina, o GLP-1 atua no TGI, inibindo o esvaziamento gástrico, a secreção de glucagon e a motilidade, promovendo saciação; no SNC, atua modulando a ingestão alimentar através da sua ação hormonal e/ou neural (TAŞÇI; BINGÖL, 2018). Kanoski, Hayes e Skibicka (2016) reportaram que agonistas de GLP-1R atuam no SNC como anorexígenos em várias regiões incluindo hipocampo, núcleos hipotalâmicos (ARQ, PVH, LH), núcleos do tronco encefálico (NTS) e núcleos relacionados com o sistema de recompensa (VTA, NAc).

No entanto, a ação central do GLP-1 sobre o controle da ingestão tem sido questionada. Foi sugerido que este controle ocorre, via parácrina, através ativação do GLP-1r nos terminais

dos aferentes vagais. De fato, o GLP-1 é rapidamente degradado pela enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP4), promovendo uma meia vida de no máximo 3 minutos (D'ALESSIO, 2016; KANOSKI; HAYES; SKIBICKA, 2016). A DPP4 é expressa em vários tecidos, como: rim, pulmão, intestino delgado, células endoteliais, células imunes e fibroblastos (NISTALA; SAVIN, 2017). Assim, estima-se que quantidades consideráveis de GLP-1 são inativadas pela DPP4 logo que é secretado pelas células L para a veia porta, sugerindo que pouco GLP-1 alcance a circulação sistêmica (D'ALESSIO, 2016). A vagotomia abole o efeito anorexigênico nos animais operados (SAM *et al.*, 2012), o que reforça a ideia de que o GLP-1 cause anorexia via aferência vagal.

Trato gastrointestinal: intestino grosso e microbiota intestinal

O intestino grosso, cujo tamanho pode variar de 1,1m a 2,1m, é dividido em 6 regiões: ceco, cólon ascendente, cólon transverso, cólon descendente, cólon sigmoide e reto (WOZNIAK *et al.*, 2019). Sua principal função fisiológica é absorver água e eletrólitos dos restos não digeridos e absorvidos no intestino delgado dando origem as fezes semissólidas, que ficam armazenadas aguardando o momento da evacuação (BARRETT; RAYBOULD, 2009). O intestino grosso também abriga a maior concentração de micro-organismos vivos que compõem a microbiota intestinal (GILL *et al.*, 2006).

Esta é uma comunidade formada por seres microscópicos (bactérias, arqueas, fungos e vírus) comensais, simbióticos, alguns com potencial patogênico e, outros, patogênicos (BOWCUTT *et al.*, 2014; BIBBÒ *et al.*, 2016). Na condição de simbiose, quando há o equilíbrio nessa população (maior quantidade de bactérias benéficas e menor de maléfica), ela contribui para desenvolvimento do sistema imunológico e regulação de várias vias metabólicas do hospedeiro (SEKIROV *et al.*, 2010).

O intestino humano possui um microbioma que codifica mais de 3 milhões de genes gerando milhares de metabólitos, enquanto o genoma humano é formado por aproximadamente 23 mil genes (VALDES *et al.*, 2018), mostrando que somos muito menos humanos que pensamos (COLLEN, 2016). Essa população bacteriana é taxonomicamente classificada por filos, classes, ordens, famílias, gêneros e espécies (RINNINELLA *et al.*, 2019) Os filos mais comuns que compõe a microbiota intestinal humana são: *Bacteroidetes* e *Firmicutes* que juntos constituem mais de 90% do total das bactérias, seguidos por *Actinobacteria* e *Proteobacteria* (ARUMUGAM *et al.*, 2011).

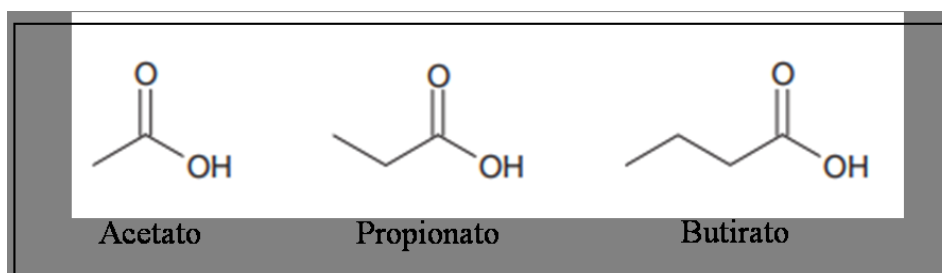
Cada microbiota é única e é desenhada no início da vida, sendo esta formação inicial determinada pelo tipo de parto, tipo e tempo de amamentação, e utilização de medicamentos, como antibióticos (RINNINELLA *et al.*, 2019). Por influências genéticas, ambientais, estilo de vida e alimentação, a diversidade dessa microbiota aumenta, e por volta dos 3 anos de idade a microbiota intestinal se torna madura, sendo a assinatura que será levada até a vida adulta (YATSUNENKO *et al.*, 2012). Em idosos com 70 anos, mudanças foram observadas na composição da microbiota, que pode ser devido a alterações no processo digestivo e/ou redução da atividade imunológica (RINNINELLA *et al.*, 2019).

A microbiota intestinal saudável, em simbiose, desempenha importantes funções fisiológicas para o seu hospedeiro, como: atuação no metabolismo de nutrientes – fermentação de nutrientes não digeridos (carboidratos dão origem aos ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), e as proteínas dão origem a neurotransmissores como o GABA; produção de vitamina K e algumas vitaminas do complexo B; metabolismo de xenobióticos e de drogas; manutenção da integridade estrutural da barreira mucosa intestinal; imunomodulação e proteção contra patógenos (MACFARLANE; MACFARLANE, 2003; JANDHYALA *et al.*, 2015; DURANTI *et al.*, 2020). Quando ocorre um desequilíbrio dessa população bacteriana, quadro conhecido como disbiose, alguns problemas de saúde podem ocorrer. De acordo com Wang *et al.* (2020), a disbiose está relacionada com o desenvolvimento de síndrome metabólica, correlacionando-a à obesidade, hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão, hiperuricemia, doença hepática gordurosa não alcoólica e apneia do sono.

Além da composição da microbiota, seus metabólitos também podem impactar na saúde do hospedeiro, dentre eles estão os AGCCs (BÄCKHED *et al.*, 2005; TSENG; WU, 2019). Os AGCCs são produtos da fermentação bacteriana dos carboidratos não digeridos pelas enzimas endógenas, sendo classificados como ácidos carboxílicos com menos de seis átomos de carbono. Os principais subtipos são: acetato (C₂) (mais abundante), propionato (C₃) e butirato (C₄) (fig. 9). Seu mais importante sítio de produção é o cólon, apresentando uma razão molar aproximada de 60:20:20. Após a absorção colônica, essa razão muda na corrente sanguínea para 91:05:04 (CHAMBERS; MORRISON; FROST, 2015; HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Diariamente, estima-se que o intestino humano produza de 400-600mM de AGCC, o que equivaleria entre 5-10% das nossas necessidades energéticas (CHAMBERS; MORRISON; FROST, 2015). Além de colaborar para a saúde intestinal, esses AGCCs também podem entrar na circulação sistêmica e atuar como moléculas de sinalização, afetando diretamente o metabolismo. O propionato e o butirato podem induzir a gliconeogênese intestinal e a atividade simpática, melhorando a homeostase da glicose e de energia. Baixas

concentrações de propionato e butirato e altas de acetato atingem a circulação sistêmica, atuando nos tecidos periféricos: tecido adiposo branco, onde reduzem a inflamação e aumentam a secreção de leptina; músculo e fígado, onde melhoram a sensibilidade à insulina e reduzem a deposição de lipídios (CANFORA; JOCKEN; BLAAK, 2015; HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Também são capazes de regular a ingestão alimentar (CHAMBERS; MORRISON; FROST, 2015) através de mecanismos que serão descritos a seguir.

Figura 9 - Estrutura química dos AGCCs



Fonte: adaptado de Darzi *et al.*, 2011.

ACETATO

O acetato é principalmente originado pela fermentação de peptídeos e gorduras (KOH *et al.*, 2016). Sua concentração difere do cólon proximal (maior quantidade) para o cólon distal (menor quantidade) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2019) e é produzido por uma grande variedade de espécies bacterianas (MORRISON; PRESTON, 2016)

O acetato parece ser um potente modulador do peso corporal e da ingestão alimentar. Com relação ao peso, existem algumas divergências, pois em roedores submetidos a dieta hiperlipídica, a suplementação de acetato impede o ganho de peso (KONDO *et al.*, 2009), enquanto outro estudo mostra aumento de ghrelina, hiperfagia e, consequente, ganho de peso (PERRY *et al.*, 2016). O controle da ingestão pode ocorrer por ação indireta (ativação vagal), ou direta, pois o acetato atravessa a barreira hematoencefálica e atua nos seus receptores presentes no SNC (tópico a ser abordado adiante) (HERNÁNDEZ *et al.*, 2019). Por exemplo, no hipotálamo, o acetato aumenta a liberação de glutamato-glutamina e GABA pelo glia (FROST *et al.*, 2014). O acetato também pode estimular a secreção colônica de PYY e GLP1. In vitro, o acetato aumentou a expressão do proglucagon (precursor de GLP-1) em células enteroendócrinas, de forma dose dependente. Contudo em humanos com sobrepeso, o aumento do acetato no colón não resultou em aumento de GLP1 e PYY no soro (RAHAT-ROZENBLOOM *et al.*, 2017). De acordo com Hernández *et al.* (2019), os dados divergentes têm relação com a forma/local de administração do acetato, assim como das espécies

utilizadas. Esses dados mostram a necessidade de mais estudos para compreender essas lacunas.

PROPIONATO

O propionato tem importante papel na gliconeogênese hepática e intestinal (DE VADDER *et al.*, 2014; MORRISON; PRESTON, 2016). É sintetizado principalmente por duas vias: a via do succinato, que ocorre em bactérias do filo *Bacteroidetes* e da classe *Negativicutes*; e a via do propanodiol que ocorre em algumas espécies da família *Lachnospiraceae* (LOUIS; FLINT, 2017).

Em ruminantes, o propionato parece reduzir a ingestão alimentar via eixo fígado-cérebro (OBA; ALLEN, 2003). Em humanos com sobrepeso, a suplementação com éster de inulina-propionato causa hipofagia, via estímulo da secreção pós prandial de GLP1 e PYY (CHAMBERS *et al.*, 2015).

BUTIRATO

O butirato é um produto da fermentação de carboidratos não digeríveis, sendo um importante metabolito de quatro grandes famílias do filo *Firmicutes* presente no colón humano: *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Erysipelotrichaceae* e *Clostridiaceae* (LOUIS; FLINT, 2017). Quando comparado com os outros AGCCs, o butirato é quase que totalmente metabolizado no colón, com uma pequena quantidade alcançando fígado e rins (ASTBURY; CORFE, 2012).

O mecanismo proposto para o controle da saciedade pelo butirato é a estimulação da secreção intestinal de GLP1 e PYY (FLUITMAN *et al.*, 2018). Além disso, o butirato aumenta a gliconeogênese intestinal, aumentando a glicemia no sistema porta-hepático, cuja detecção pelo nervo vago estimula saciedade (DE VADDER *et al.*, 2014).

Os AGCCs apresentam concentrações que variam do ceco para o colón; os valores ficam entre 70 a 140 mM no cólon proximal e caem drasticamente no cólon distal (20 a 70mM), sugerindo uma alta taxa de utilização pelos colonócitos e absorção para corrente sanguínea (SUN *et al.*, 2018). A passagem dos AGCCs para o leito venoso ocorre por diferentes vias: difusão passiva e por transportadores como o Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) e sodium monocarboxylic acid transporter 1 (SMCT1) (SUN *et al.*, 2017). Sua ação ocorre pela ligação nos receptores GPR41 (FFAR3) e GPR43 (FFAR2), que são do tipo sete domínios transmembrana acoplados a proteína $G_{i/o}$ (BROWN *et al.*, 2003; CHAMBERS; MORRISON; FROST, 2015).

Os AGCCs também atuam no tecido adiposo, onde modulam o acúmulo de gordura via GPR41 e GPR43, através da inibição da ação da insulina e da adipogênese e aumento da lipólise (KIMURA *et al.*, 2013; SUN *et al.*, 2018). Em camundongos expostos a dieta hiperlipídica, a suplementação com AGCCs reduziu a atividade de PPAR γ , aumentou a expressão da proteína desacopladora mitocondrial 2 (UCP2) e aumentou a proporção AMP-ATP, o que estimulou o metabolismo oxidativo no fígado e tecido adiposo via AMPK (DEN BESTEN *et al.*, 2015).

Inervações extrínsecas do TGI: Nervo vago

Antes de abordar a inervação extrínseca, uma breve explicação da inervação intrínseca faz-se necessária. A inervação intrínseca é formada pelo SNE que é composto por circuitos neurais responsáveis por comunicar o TGI ao SNC. É um componente do SNA com função independente do SNC (MUKHTAR; NAWAZ; ABID, 2019). É constituído por uma rede de gânglios nervosos que se dividem em dois tipos: plexo mioentérico e plexo submucoso, que se estendem do esôfago ao ânus, e controlam a motilidade, proliferação celular, transporte de íons pela mucosa e liberação de hormônios gastrintestinais (SCHEMANN; NEUNLIST, 2004). Esses plexos são compostos por neurônios aferentes sensoriais, interneurônios e neurônios motores. Os neurônios aferentes sensoriais interpretam as informações químicas e estado físico do tecido que eles inervam; os interneurônios são observados em todo TGI e sua ação depende da sua localização, variando de órgão para órgão; e os neurônios motores são classificados em neurônios excitatórios e inibitórios da musculatura lisa do intestino, sendo responsáveis pelo controle da motilidade do TGI e os neurônios secretomotores/vasodilatadores, responsáveis pela inervação da mucosa e pela regulação da secreção, absorção e do fluxo sanguíneo. Todo esse complexo nervoso é capaz de formar um circuito reflexo completo (GALLEGO *et al.*, 2016).

Para que ocorra o pleno funcionamento do TGI, a rede nervosa que forma o SNE deve se comunicar com o sistema nervoso extrínseco, e esta conexão é realizada por fibras aferentes (sensoriais) e eferentes (motoras), com atividades simpáticas ou parassimpáticas. Neste trabalho será abordado a aferência vagal.

O nervo vago, décimo nervo craniano, tem sua origem no tronco cerebral e se estende até a região do abdome. É um nervo misto onde seu axônio é composto por 3 tipos de fibras que possuem atividade fisiológica diferente: fibras A – mielinizadas que carregam principalmente informações somáticas aferentes e eferentes, e pequenas fibras que transmitem

informações aferentes viscerais; fibras B – fornecem inervação pré-ganglionar simpática e parassimpática eferente; fibras C – fibras amielínicas pequenas que carregam informações viscerais aferentes. Esta última está presente em maior quantidade no nervo vago, perfazendo 60-80% das fibras desse nervo (YUAN; SILBERSTEIN, 2016), tornando-o um nervo basicamente aferente. No TGI, as terminações vagais aferentes se iniciam na serosa, onde se conectam com o plexo mioentérico, localizado na camada muscular, e este se comunica com o plexo submucoso, localizado na submucosa (principalmente arteríolas) e mucosa onde captam alterações do ambiente químico no lúmen, do espaço intersticial e vascular, além das mudanças mecânicas da parede do intestino (distensão, relaxamento, contração) (BREIT *et al.*, 2018). No SNC, os terminais aferentes entram pelo troco encefálico e fazem sinapse no NTS que distribui as informações para várias regiões do cérebro, como hipotálamo e sistema límbico (ABDALLA, 2017; SAM *et al.*, 2012). A pequena parte eferente deste nervo faz parte do SNA parassimpático, que no TGI tem a função de aumentar a motilidade intestinal e a secreção glandular (BREIT *et al.*, 2018).

Os reflexos vagais têm sido reconhecidos como importantes reguladores da homeostase energética, principalmente quando a questão é o controle a curto prazo da ingestão alimentar (BROWNING; VERHEIJDEN; BOECKXSTAENS, 2017). Os terminais aferentes vagais podem ser divididos em dois tipos: mecanossensíveis, que controlam o tamanho da refeição por meio de sinalização de volume ou carga; e quimiossensíveis, que são ativados em resposta ao pH luminal, osmolalidade e estimulação química (BROWNING; VERHEIJDEN; BOECKXSTAENS, 2017). Vários neuro-hormônios gastrointestinais possuem a capacidade de ativar seus receptores nas terminações aferentes vagais de forma parácrina e, como consequência dessa ativação, ocorre o aumento dos disparos nervosos, resultando em relaxamento gástrico, redução do esvaziamento gástrico, motilidade alterada e secreção pancreática (BROWNING; VERHEIJDEN; BOECKXSTAENS, 2017). Já a ghrelina inibe os disparos vagais, resultando em estímulo da ingestão alimentar (DATE, 2012).

Na obesidade, o funcionamento da circuitaria vagal está comprometida. O nervo vago possui uma plasticidade que é modulada de acordo com o estado fisiológico; no jejum, a redução de CCK sérica aumenta o receptor de endocanabinoide 1 (CB1) e os receptores do hormônio concentrador de melanina (MCH1) na aferência vagal do intestino, estimulando a ingestão alimentar. No estado alimentado, os níveis séricos de CCK aumentam e há aumento da expressão dos receptores NPY2R e redução de CB1, causando saciedade. Na obesidade induzida por dieta, os aferentes vagais se encontram sempre na condição de estímulo da ingestão alimentar, independente do estado de alimentação (KENTISH *et al.*, 2012). Na

obesidade induzida por dieta ocorre menor excitabilidade neuronal total, o que poderia afetar a resposta dos aferentes vagais a quaisquer estímulos químicos ou mecânicos (BROWNING; VERHEIJDEN; BOECKXSTAENS, 2017). Portanto, obesidade é capaz de alterar a circuitaria vagal levando a condição de hiperfagia, o que contribui para a manutenção da obesidade.

A junção de todos os componentes descritos acima constitui o eixo intestino-cérebro. A desregulação deste eixo pode afetar o controle da ingestão alimentar e tem sido visto como um dos fatores envolvidos na gênese da obesidade (BLISS; WHITESIDE, 2018). Em animais, dieta hiperlipídica reduz a atividade aferente do vago e reduz a resposta do mesmo a CCK, resultando em hiperfagia e ganho de peso (DALY *et al.*, 2011). A administração intraperitoneal de acetato e/ou a suplementação de inulina (carboidrato fermentável, que levou ao aumento da concentração de AGCC no colón) em animais alimentados com dieta hiperlipídica, resultou em hipofagia por elevar a expressão de POMC e reduzir AGRP, resultando em redução do ganho de peso (FROST *et al.*, 2014). Na obesidade em humanos e animais expostos a dieta rica em gordura, um quadro de disbiose é observado, tanto, sendo detectado um aumento na abundância relativa de *Firmicutes* em comparação a *Bacteroidetes* (HORNE *et al.*, 2020; LEY *et al.*, 2006). Nesse sentido, é possível observar que o eixo intestino-cérebro alterado impacta no comportamento alimentar, podendo levar a obesidade.

PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

Nos anos 90, David Barker, um epidemiologista considerado pai da programação metabólica, postulou a hipótese do “fenótipo poupador”. Essa hipótese consiste que em condições de subnutrição materna ou hipóxia, o feto consegue se adaptar a um ambiente uterino adverso otimizando o uso de suprimentos, direcionando nutrientes para órgãos críticos e restringindo para órgãos menos críticos e assim garantindo a sua sobrevivência. Porém, esse mecanismo geraria alterações persistentes no crescimento e função dos tecidos (HALES; BARKER, 1992).

Atualmente, um novo campo da ciência surge e tem como especialidade a programação metabólica, também conhecido por origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (em inglês: *Developmental Origins of Health and Disease* - DOHaD) (MANDY; NYIRENDA, 2018). A programação metabólica ou plasticidade ontogenética é definida como eventos epigenéticos que podem ocorrer devido a alterações nutricionais, hormonais e ambientais em períodos críticos da vida como: gestação, lactação e adolescência, funcionando como fator de “*imprinting*” que podem cursar com alterações metabólicas imediatas e/ou

tardias (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; GODFREY; COSTELLO; LILLYCROP, 2016). Essas alterações epigenéticas estão diretamente associadas a doenças metabólicas, cardiovasculares, neurodegenerativas e autoimunes (HALUSKOVÁ, 2010). As alterações epigenéticas não consistem em modificações do sequenciamento genético, mas sim em processos que envolvem metilação do DNA (metilação e hidroximetilação), modificações de histonas (acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação), RNA não codificantes, looping de cromatina e remodelação nucleossomal (GUIL; ESTELLER, 2009); todos esses eventos impactam na expressão dos genes, que pode resultar em saúde ou doença.

Os primeiros mil dias de vida, fase que vai da concepção até os dois anos de vida em humanos (270 dias pré-natal + 182 dias de lactação + 548 dias primeira infância) compreende os períodos críticos de gestação, amamentação exclusiva e primeira infância. Nesses 1000 dias, todo o organismo está se formando e insultos nessa fase podem comprometer o desenvolvimento do indivíduo, levando a atrasos do desenvolvimento imunológico, cognitivo e físico que podem comprometer a saúde na vida adulta (MAYNERIS-PERXACHS; SWANN, 2019). A amamentação, assim como a fase intra-uterina, também é caracterizada como um período de maturação das funções celulares, incluindo o desenvolvimento neurológico e cognitivo da criança (MATTEI; PIETROBELLI, 2019).

Considerando o grande número de estudos que focam na programação fetal e a escassez de estudos focando na amamentação como um importante período de desenvolvimento para os mamíferos, o nosso grupo de pesquisa tem estudado a programação metabólica em modelos experimentais com roedores, ocorridos exclusivamente durante o período de lactação. Dessa forma, será destacado dois modelos experimentais utilizados no atual trabalho: 1) Redução de ninhada (insulto nutricional) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011); e 2) Exposição neonatal a nicotina (insulto ambiental) (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Estes modelos cursam com alguns distúrbios endócrino-metabólicos, aumento de adiposidade e alterações da ingestão alimentar.

Redução de ninhada

A redução de ninhada no período da lactação é um modelo de programação amplamente utilizado que causa sobrepeso, obesidade abdominal e outras disfunções metabólicas (PLAGEMANN *et al.*, 2009; VELKOSKA; COLE; MORRIS, 2005; HABBOUT *et al.*, 2013). Essa manipulação, reduz a competição entre os filhotes na hora de amamentar, levando ao aumento na ingestão de leite pelos filhotes criados em ninhada reduzida, gerando um aumento no aporte calórico, e consequentemente aumento no ganho de

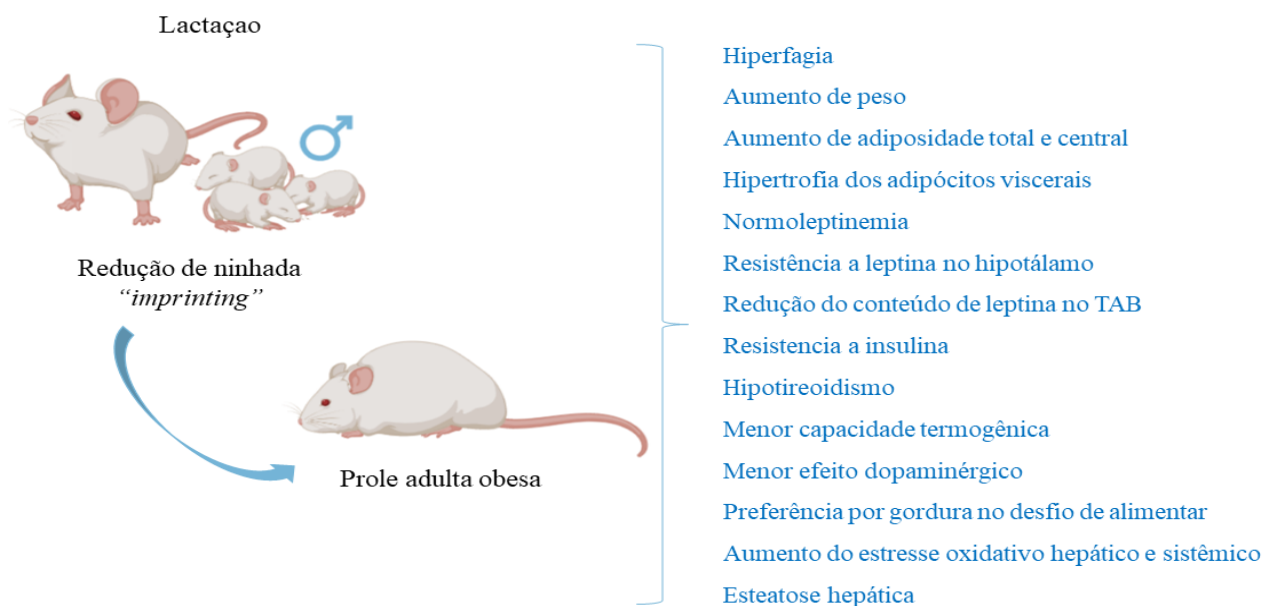
peso (FIOROTTO *et al.*, 1991). Outro ponto importante a ser salientado é que a redução de ninhada modifica a composição do leite produzido pela rata, sendo observado aumento no teor de gordura sem alteração na quantidade de proteínas (ŠEFČÍKOVÁ *et al.*, 2011). Outro estudo apontou que no primeiro terço da lactação, a fração lipídica que aumenta no leite destas mães é o triglicerídeo (XAVIER *et al.*, 2019). Assim, esses são os principais contribuintes para as alterações metabólicas geradas neste modelo de programação.

De acordo com Habbout *et al.* (2013), esse modelo de programação gera alterações sistêmicas a curto prazo como hiperleptinemia e hiperinsulinemia, como também resistência central à ação desses hormônios. Na vida adulta, esses animais cursam com disfunção renal, cardiovascular e diabetes tipo II.

Nosso grupo de pesquisa, expandiu o conhecimento sobre este modelo, caracterizando a hiperfagia, aumento de peso corporal, aumento de gordura total e visceral, hipertrofia de adipócitos, resistência a leptina no hipotálamo, aumento da atividade nervosa autonômica simpática e aumento da termogênese, entre outros desfechos na vida adulta (RODRIGUES *et al.*, 2009, 2011; CONCEIÇÃO *et al.*, 2011, 2016). Todos estes desfechos foram descritos em ratos machos. A partir do presente trabalho, pela primeira vez, nosso grupo estudou a prole fêmea programada pela supernutrição na lactação. Nesse modelo, a redução de ninhada ocorre no terceiro dia de lactação. A ninhada reduzida fica com 3 filhotes fêmeas ou 3 filhotes machos e a ninhada normal é constituída por 10 filhotes, 5 machos e 5 fêmeas.

Os principais achados da prole macho na vida adulta, que já foram descritos neste modelo de programação por nosso grupo estão representados na figura abaixo (fig.10).

Figura 10 - Principais desfechos na prole de machos na vida adulta



Nota: Esses resultados podem ser encontrados na lista de referências RODRIGUES *et al.*, 2009, 2011; CONCEIÇÃO *et al.*, 2011, 2016.

Legenda: TAB: Tecido adiposo branco.

Fonte: A autora, 2021.

Exposição neonatal à nicotina

Em 2000, cerca de 230 milhões de mulheres acima de 15 anos fumavam, e a Organização Mundial da saúde estimou que ano passado (2020), esse número reduziria para 160 milhões, um número ainda muito alto (WHO, 2018). O tabagismo está associado a várias doenças como: alguns tipos de câncer, doenças cardiovasculares e doenças respiratórias, e nos Estados Unidos é considerado uma das principais causas de morte evitável. O ato de fumar durante a gravidez está relacionado com má formação fetal, baixo peso ao nascer, parto precoce e aborto espontâneo (SEALOCK; SHARMA, 2021). No entanto, mesmo com uma extensa divulgação dos malefícios causados pelo cigarro durante a gestação, uma parcela das mulheres ainda fuma neste período (SMEDBERG *et al.*, 2014; DE WOLFF *et al.*, 2019; MADUREIRA *et al.*, 2020) Outro ponto importante a ser levantado é que mais da metade das mulheres fumantes, param de fumar durante a gestação, mas retornam ao hábito na lactação (NAPIERALA *et al.*, 2016).

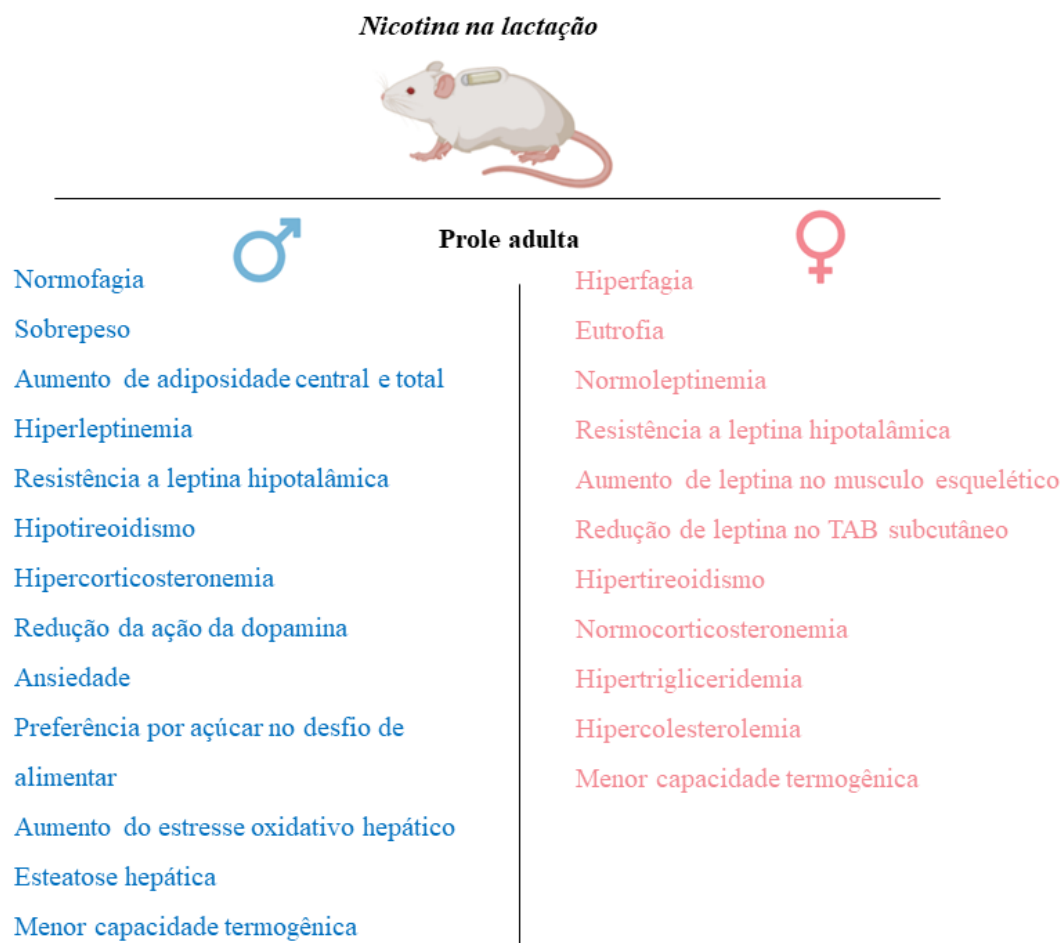
O cigarro é composto por mais de 5000 substâncias, dentre elas está a nicotina, considerada o principal composto psicoativo capaz de causar dependência (TANNER; CHENOWETH; TYNDALE, 2015; NAPIERALA *et al.*, 2016). Estudos mostram que a nicotina é capaz de atuar como disruptor endócrino e fator de "imprinting" na lactação,

acarretando alterações epigenéticas que levam ao desenvolvimento de disfunções metabólicas tardias (MIRANDA; GASPAR DE MOURA; LISBOA, 2020a), uma vez que a nicotina é transferida para o filho através do leite (KOBAYASHI *et al.*, 2020). Por muitos anos, o nosso grupo de pesquisa investiga o modelo de programação pela exposição materna a nicotina no período da lactação e vem demonstrando vários efeitos deletérios desta exposição precoce sobre o metabolismo energético, sistema endócrino e sistema nervoso autonômico da prole de ambos os sexos na vida adulta (OLIVEIRA *et al.*, 2009; YOUNES-RAPOZO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2020; MIRANDA *et al.*, 2020b).

Neste modelo experimental, a exposição à nicotina ocorre através de minibombas osmóticas implantadas no dorso das fêmeas lactantes, que liberam uma dose de 6mg/kg/dia de nicotina, a liberação ocorre do 2° ao 16° dia da lactação (totalizando 14 dias de exposição). Esse modelo tem sua eficácia comprovada pois De Oliveira *et al.* (2010) demonstraram a presença de cotinina o principal metabólito da nicotina, no leite das ratas e no plasma dos filhotes expostos à nicotina.

Abaixo, segue uma figura com os principais resultados da prole adulta exposta a nicotina no início da vida em ambos os sexos descritos por nosso grupo de pesquisa (fig. 11).

Figura 11 - Principais desfechos na prole de ambos os sexos na vida adulta



Legenda: TAB: Tecido adiposo branco.

Fonte: A autora, 2022.

Nota: Esses resultados podem ser encontrados na lista de referências OLIVEIRA *et al.*, 2009; YOUNES-RAPOZO *et al.*, 2013; PINHEIRO *et al.*, 2015; PEIXOTO *et al.*, 2020; MIRANDA *et al.*, 2020b.

JUSTIFICATIVA

A prevalência de obesidade mais que dobrou nos últimos 30 anos. Esta é uma doença multifatorial considerada um grande problema de saúde pública mundial e que está associada a várias outras doenças, como dislipidemia e diabetes. Visto o caráter pandêmico da obesidade e sua elevada morbimortalidade, torna-se necessário investigar os mecanismos envolvidos na sua gênese. Hoje já se sabe que uma possível causa para a obesidade é o desequilíbrio da ingestão alimentar, que irá impactar no balanço energético do indivíduo (YU, 2017).

A ingestão alimentar é um processo altamente regulado por um complexo sistema que integra o sistema nervoso central com a periferia. No SNC, destacamos o ARQ do hipotálamo, que apresenta uma grande quantidade de receptores de leptina, insulina e peptídeos gastrointestinais (SCHWARTZ *et al.*, 2000), e o NTS que, além de apresentar os mesmos receptores hormonais presentes no hipotálamo, também recebe os *inputs* nervosos das fibras aferentes vagais proveniente das vísceras (TRAVAGLI *et al.*, 2006). Na periferia, temos o trato gastrointestinal que também controla a ingestão alimentar através de 3 vias: 1) nervo vago, 2) mediadores orexígenos ou anorexígenos, como ghrelina, CCK, GLP-1 e PYY (VALASSI; SCACCHI; CAVAGNINI, 2008), que agem via endócrina e/ou parácrina, e 3) microbiota intestinal, que produz vários metabolitos com atividade fisiológica (BÄCKHED *et al.*, 2005; TSENG; WU, 2019), como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs, acetato, propionato e butirato). A junção desses componentes constitui o eixo intestino-cérebro. A desregulação deste eixo pode afetar o controle da ingestão alimentar, o que tem sido apontado como um dos fatores envolvidos na gênese da obesidade (BLISS; WHITESIDE, 2018).

Há anos, nosso grupo de pesquisa trabalha com vários modelos de programação metabólica durante a lactação, momento em que alguns órgãos ainda estão finalizando seu processo de diferenciação (ELLSWORTH *et al.*, 2018), e estão suscetíveis às modificações epigenéticas que podem alterar o desenvolvimento normal dos sistemas e cursar disfunções metabólicas durante a vida adulta (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008). Esse campo de estudo utiliza modelos experimentais que tentam mimetizar a vida real, o que auxilia na compreensão da gênese de distúrbios neuroendócrinos tardios.

Neste trabalho abordaremos dois modelos de programação estudados pelo nosso grupo de pesquisa, com fatores de *imprinting* diferentes, um nutricional (redução de ninhada) e um ambiental (exposição neonatal a nicotina). O primeiro modelo induz a superalimentação no início da vida e a prole cursa com hiperfagia e obesidade na vida adulta. No segundo modelo,

onde temos a exposição ao principal componente psicoativo do cigarro, a nicotina, ocorre um dimorfismo sexual; os machos são obesos e normofágicos, enquanto as fêmeas são eutróficas e hiperfágicas. Assim, a partir do fenótipo apresentado por esses animais quando adultos e conhecendo o impacto do eixo intestino-cérebro sobre o padrão alimentar, as seguintes perguntas experimentais foram levantadas:

- 1) A supernutrição neonatal e a exposição neonatal à nicotina podem programar a atividade elétrica do nervo vago?
- 2) Os dois modelos de programação podem alterar os receptores dos peptídeos GI a nível local (intestino delgado) e/ou a nível central (núcleo arqueado)?
- 3) O *imprinting* nutricional e/ou ambiental na lactação pode induzir modificações na microbiota intestinal e os AGCCs, a ponto de gerar uma disbiose na vida adulta?
- 4) Os parâmetros do eixo intestino-cérebro são alterados de forma gênero dependente?

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo Geral

Investigar os marcadores do eixo intestino-cérebro relacionados ao controle da ingestão alimentar na prole de ratos Wistar adultos de ambos os sexos em dois modelos de programação, a saber supernutrição pós-natal e exposição materna à nicotina durante o período de lactação.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade elétrica do nervo vago *in vivo*;
- b) Quantificar o conteúdo proteico de c-Fos no NTS;
- c) Quantificar o conteúdo proteico de BDNF no intestino;
- d) Investigar a ação parácrina dos peptídeos intestinais (CCK, PYY e GLP1) no intestino delgado, através da quantificação de seus receptores;
- e) Investigar a ação endócrina dos peptídeos gastrointestinais (ghrelina, CCK, PYY e GLP-1) no hipotálamo através da quantificação de seus receptores;
- f) Determinar a filogenia da microbiota intestinal a partir das fezes;
- g) Estudar o teor de ácidos graxos de cadeia curta nas fezes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

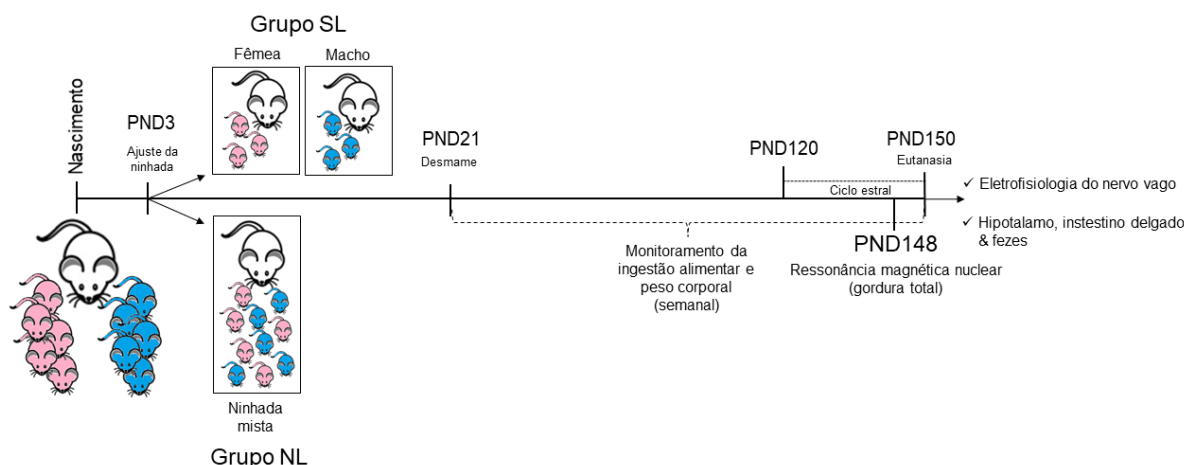
2.1 Ética e procedimentos animais

Os protocolos seguiram o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde e a Lei Federal Brasileira nº 11.794/2008. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional para o Uso de Animais de Laboratório do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Experimento 1 supernutrição pós-natal - número de autorização do projeto: CEUA/033/2019; Experimento 2 exposição materna à nicotina - número de autorização do projeto: CEUA/034/2019). Ratos Wistar foram alojados em uma sala com temperatura (22 ± 1 °C) e umidade (50-55%) controlada em um ciclo de 12 h de luz escura com ração padrão (Nuvilab®, São Paulo, SP, Brasil) e água disponível ad libitum. Ratos fêmeas virgens adultas foram enjaulados com ratos machos na proporção de 3:1 para acasalamento uma vez por semana. Em seguida, as ratas grávidas foram alojadas individualmente até o parto.

2.2 Experimento 1 supernutrição pós-natal

O protocolo do estudo está representado na Figura 12. Para induzir a superalimentação precoce, a redução do tamanho da ninhada foi realizada no dia pós-natal (PND) 3; as mães foram divididas aleatoriamente nos seguintes grupos: ninhada pequena macho (grupo SL, n = 10) foi mantida com 3 machos; ninhada pequena fêmea (grupo SL, n = 10) foi mantida com 3 fêmeas; ninhada normal (grupo NL, n=10) foi mantida com 10 filhotes (5 machos e 5 fêmeas) até o desmame (3 semanas de idade). A ingestão alimentar e a massa corporal foram monitoradas semanalmente até os 5 meses de idade (eutanásia). O ciclo estral da prole fêmea SL e NL foi monitorado nos últimos 30 dias de vida, ambos os grupos tiveram ciclos regulares de 4-5 dias e todas foram eutanasiadas em diestro. O número de ratos planejado para as análises foi de 1 animal/ninhada/sexo. Os demais animais nas gaiolas foram utilizados em outros estudos.

Figura 12 - Linha do tempo supernutrição pós-natal



Legenda: Desenho experimental.

Fonte: A autora, 2021.

2.2 Experimento 2 exposição materna à nicotina

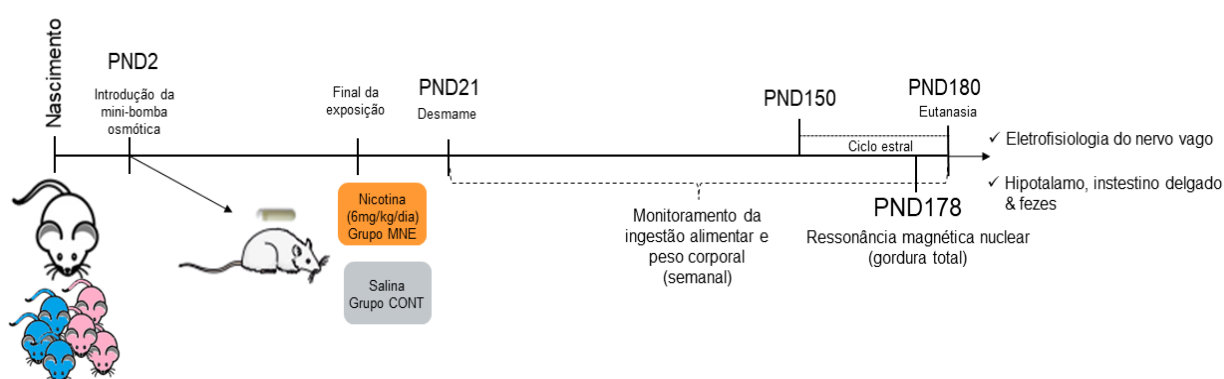
O resumo deste experimento está esquematizado na figura 13. Ao nascimento, que foi considerado o primeiro dia pós-natal, 20 ratas lactantes foram divididas aleatoriamente em dois grupos (10 mães em cada um) e suas ninhadas foram normalizadas para seis filhotes (3 machos e 3 fêmeas) para maximizar o desempenho da lactação. Características do grupo: (1) Grupo de exposição materna à nicotina (MNE) – no 2º dia pós-natal, as mães foram levemente anestesiadas com tiopental (30 mg/kg; Thiopentax, Itapira, SP, Brasil) e uma incisão nas costas foi feita para inserir uma minibomba osmótica (Alzet, 2ML2, Los Angeles, CA, EUA) por via subcutânea. A minibomba osmótica foi preparada com base livre de nicotina (Sigma, St Louis, MO, EUA) diluída em NaCl 0,9% para liberar uma dose de 6 mg/kg de nicotina por dia durante 14 dias. A cotinina, que é um metabólito da nicotina usado para estimar a intensidade da exposição à nicotina, foi detectada no leite e soro materno, bem como no soro dos filhotes (OLIVEIRA et al., 2010). Os níveis de cotinina usando o protocolo mencionado foram equivalentes aos observados em fumantes típicos (YPSILANTIS et al., 2012). (2) Grupo controle (CONT) – as mães foram implantadas com minibombas osmóticas contendo apenas solução salina.

Um filhote macho e uma fêmea por ninhada/grupo foi selecionado aleatoriamente e utilizado no presente estudo. Os filhotes restantes foram usados em outros estudos. Ao

desmame (3 semanas de idade), os filhotes foram separados por sexo e mantidos em gaiolas contendo 3-4 ratos; o acesso à ração padrão para roedores e à água da torneira foi ad libitum. A ingestão alimentar e a massa corporal foram monitoradas uma vez por semana até as 26 semanas de idade, quando todos os animais foram eutanasiados.

O ciclo estral da prole feminina foi monitorado diariamente por esfregaços vaginais que foram coletados todas as manhãs durante os 30 dias que antecederam a eutanásia. Fêmeas MNE e CONT apresentaram ciclos regulares e foram mortas durante o diestro.

Figura 13 - Modelo exposição materna à nicotina



Legenda: Desenho experimental.

Fonte: A autora, 2021.

2.3 Determinação da massa gorda total

A ressonância magnética nuclear (RMN) para pequenos animais vivos foi realizada para a avaliação da massa gorda total em PND148 (supernutrição pós-natal) e em PND178 (exposição materna à nicotina) usando o equipamento Whole-Body Composition Analyzer NMR (Bruker's Minispec LF90 TD-NMR, Rheinstetten, Alemanha), conforme relatado anteriormente (RODRIGUES et al., 2018). Uma verificação de controle de qualidade de voltagens internas, temperatura, ímãs e parâmetros de RMN foi realizada usando um padrão fornecido pelo fabricante. Ratos não anestesiados foram colocados em um cilindro de plástico transparente e mantidos imóveis pela inserção de um êmbolo apertado no cilindro. O cilindro foi inserido na câmara do equipamento por 2 min de varredura. O técnico estava cego quanto à atribuição do grupo. Os dados foram expressos em % de massa gorda.

2.4 Eletrofisiologia do nervo vago

No PND150 (experimento 1) e no PND180 (experimento 2), após 12 h de jejum, os ratos foram anestesiados com tiopental (30 mg/kg de massa corporal) para avaliação *in vivo* da atividade autonômica do nervo vago. O nervo vago esquerdo foi isolado ao nível da artéria carótida esquerda no pescoço e os eletrodos foram inseridos (RENO et al., 2019). Essa região está acima do gânglio vagal superior, onde estão presentes todas as fibras aferentes e eferentes (YUAN; SILBERSTEIN, 2016). Em seguida, os animais foram colocados dentro de uma gaiola de Faraday para evitar interferência eletromagnética; os nervos foram colocados em um par de eletrodos de gancho de platina conectados a um dispositivo eletrônico (Bio-Amplifier, Insight®, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para registro dos sinais elétricos. Para evitar a desidratação, o nervo foi coberto com óleo mineral. A atividade nervosa foi amplificada (10.000 $\times$) e filtrada (cutoff: 60 kHz). Foi utilizado um período de estabilização de 5 minutos e um período de leitura de 10 minutos. O número médio de picos por janela de tempo de 10 s foi anotado. O nível de ruído de fundo foi determinado em um segmento de nervo. Os resultados foram analisados usando o sistema de aquisição de dados PowerLab (8SP; AD Instruments, New South Wales, Austrália).

2.5 Eutanásia e coleta de tecidos

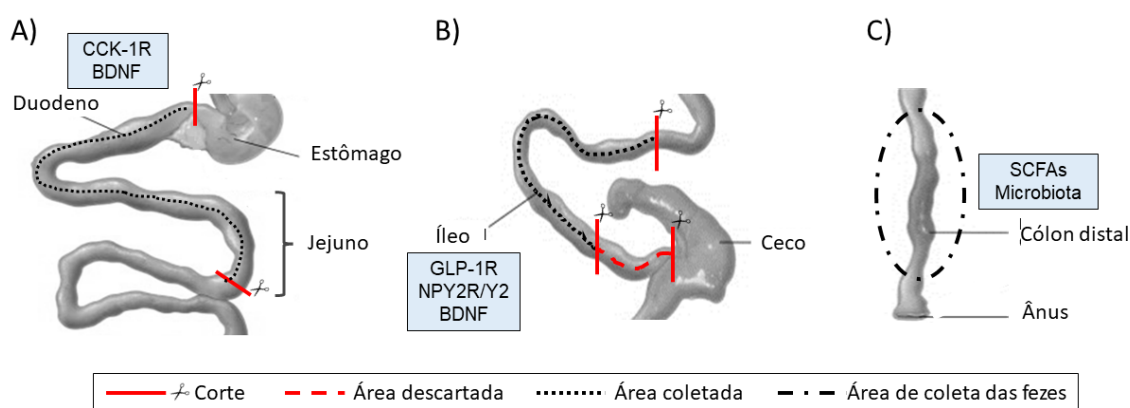
Após a leitura da atividade nervosa, os animais foram eutanasiados por punção cardíaca. Os compartimentos de gordura visceral (retroperitoneal, mesentérico e gonadal) foram coletados, pesados e armazenados a -80 °C. Esses 3 depósitos representam a massa de gordura visceral total. O tecido adiposo subcutâneo do experimento 1, foi calculado pela diferença entre a gordura total obtida por RMN e a quantidade dos 3 compartimentos viscerais.

O intestino delgado foi coletado da seguinte forma (representado na Figura 14): A retirada da região inicial (duodeno mais pequena parte do jejuno proximal) foi realizada a partir de um corte na altura do piloro e medido 10 cm no sentido distal para o próximo corte (para determinar CCK1-R e BDNF (apenas no experimento 2)); para coletar a região mais distal do íleo do intestino delgado, foi feito um corte na junção íleo-cecal, medindo-se 15 cm, os primeiros 5 cm mais próximos do ceco foram descartados e os 10 cm restantes foram utilizados no experimento (para determinar BDNF, GLP1-R e NPY2R/Y2). Todas as regiões foram lavadas com soro fisiológico 0,9%, congeladas imediatamente e armazenadas em freezer. As

fezes utilizadas foram retiradas do interior do cólon distal (para determinar os AGCCs e filos da microbiota). Os tecidos foram armazenados em freezer a -20°C .

O isolamento do núcleo hipotalâmico foi realizado com cortes coronais do cérebro gerados usando um criostato (Hyrax C52, Zeiss, Alemanha). As coordenadas descritas no atlas estereotático (Paxinos & Watson, 2004) foram utilizadas para o isolamento do núcleo arqueado (ARC, bregma $-2,04\text{ mm}$ a $-3,60\text{ mm}$) e núcleo do trato solitário (NTS, bregma $-12,96\text{ mm}$ a $-13,56\text{ milímetros}$). Os núcleos foram então congelados a -80°C para uso em Western blotting.

Figura 14 - Áreas de corte do intestino e coleta de fezes



Legenda: Figura descritiva da metodologia de dissecção intestinal e coleta de fezes. A) Remoção do segmento inicial do intestino delgado (duodeno mais a pequena parte do jejuno proximal): o primeiro corte foi realizado no piloro e o segundo corte foi realizado 10 cm no sentido distal (linha pontilhada preta); expressões proteicas de CCK1-R e BDNF foram avaliadas nesta região; B) Remoção do íleo: foi feito um corte na junção íleo-cecal e medido 15 cm no sentido proximal para o próximo corte. Os últimos 5 cm mais próximos do ceco foram descartados (linha tracejada vermelha) e os restantes 10 cm foram usados no experimento (linha pontilhada preta); expressões proteicas de GLP1-R, NPY2R/Y2 e BDNF foram avaliadas nesta região; C) As fezes foram coletadas do segmento distal do cólon (círculo pontilhado preto).

Fonte: A autora, 2021.

2.6 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa - análise de SCFAS

O protocolo foi adaptado de Pogribna et al. (2008), para medir SCFAs nas fezes. Aproximadamente 350 mg de fezes foram adicionados a 200 μL de ácido fórmico 100 mM (padrão interno) (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA). Em seguida, foram adicionados 200 μL de ácido sulfúrico 10 mol/L (Reagen, Moorestown, NJ, EUA) e 3 mL de éter etílico (Merck Millipore, Burlington, MA, EUA), misturados por 15 minutos em agitador orbital (IKA KS 130 Basic, IKA-Werke GmbH and Co. KG, Carolina do Norte, EUA) e centrifugado por 5 min a 12300 x g. A fase superior foi reduzida sob uma corrente de nitrogênio, transferida para um

frasco e analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS). Foi utilizado equipamento GC/MS Shimadzu, modelo GP2010 Plus, com coluna Agilent DBWAX (polietilenoglicol) (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O injetor foi mantido a 260°C, com divisão de fluxo de 20:1. A temperatura da coluna foi de 75°C, mantida por 2 min, e depois 75-250°C, com taxa de aquecimento de 25°C/min, por 5 min. O hélio foi usado como gás de arraste com uma velocidade linear de 24,7 cm/s. Um volume de 1 μ L de amostra foi injetado no cromatógrafo. Para a detecção por espectrometria de massa, são utilizados um detector contendo uma fonte de ionização de elétrons (EI-70 eV) e um analisador de massa quadrupolo operado em ferramentas de levantamento de 41 a 301 amu. Uma interface foi mantida a 250°C e uma fonte de íons a 25°C. A identificação dos constituintes da mistura foi feita comparando-se os espectros de massa gerados com os espectros da biblioteca NIST05 contidos no computador do espectrômetro de massas, bem como com seus tempos de retenção com os padrões de ácido fórmico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico.

2.7 Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa em tempo real (RT-PCR) - 16S RDNA

Aproximadamente 200 mg de fezes foram usados para extração de DNA microbiano usando um kit comercial (mini kit de fezes QIAamp Fast DNA, Qiagen, Düsseldorf, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Para a reação, foram utilizados 10 ng de DNA extraído por amostra mais 6 μ L de “SYBR green RT-PCR mix” (Life Technologies, Austin, TX, EUA) e 0,2 μ M de cada iniciador: Eubacteria (All Bacteria) (F:5'-ACTCCTACGGGGAGGCAGCAGT-3', R:5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'); Bacteroidetes (F:5'-CRAACAGGATTAGATACCCT-3', R:5'-GGTAAGGTTCTCGCGTAT-3'); Firmicutes (F:5'-TGAAACTYAAAGGAATTGACG-3', R:5'-ACCATGCACCACCTGTC-3'); Proteobactérias de classe γ (F:5'-TCGTCAGCTCGTGTGTGA-3', TCCTCCCTG'-CGTAAGGGCCATGATG-3'); e Actinobactérias (F:5'-TACGGCCGCAAGGCTA-3', R: 5'-TCRTCCCCACCTTCCTCCG-3'). O volume final da reação foi de 12 μ L; água foi adicionada a todas as amostras para atingir esse volume. As amostras foram utilizadas em duplicata e as corridas utilizaram controles negativos sem adição de DNA (NTC, do inglês “Non-TemplateControl”) para detectar possível contaminação da reação. A RT-PCR foi realizada no StepOnePlus™ Real Time PCR System (Life Technologies, Austin, TX, EUA) programado para o seguinte ciclo: 95 °C/10 min;

95°C/15 s; e 60°C/1 min (45 ciclos). As reações de PCR para identificar diferentes filos de bactérias foram baseadas em estudos anteriores (ROSADO et al., 2021; SILVA-VEIGA et al., 2020) levam em consideração a fórmula fornecida por Bacchetti De Gregoris et al. (2011) $X = (Eff. Univ)Ct_{univ}/(Ef. Spec)Ct_{spec} \times 100$; Onde Ct_s (universais e específicos) são os ciclos de limiar registrados pelo termociclador. $Eff. Univ$ refere-se à eficiência calculada de primers universais ($2 = 100\%$ e $1 = 0\%$) e $Eff. Spec$ é a eficiência dos primers específicos do táxon. De acordo com a equação, X representa a porcentagem do número de cópias específicas do táxon 16S em cada amostra. A avaliação da microbiota intestinal foi apresentada como uma abundância relativa.

2.8 Análise de Western Blotting

A expressão proteica no intestino delgado, ARC e NTS foi avaliada por Western blotting. Para extração de proteínas, cada tecido foi homogeneizado por maceração. Após congelamento com nitrogênio líquido, o tecido macerado foi colocado em tampão específico para extração de proteínas (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, CA, EUA). O coquetel inibidor (IC) foi adicionado na proporção de 1 µl de IC para 100 µl de tampão. Homogenatos de intestino delgado foram centrifugados ($12,851 \times g$, 4°C, 25 min), e então a fase sobrenadante foi coletada. O ARC e o NTS foram sonicados (dois pulsos de 10 s com 40% de amplitude, intercalados por 15 s desligados). A concentração de proteína total em homogeneizados foi determinada por um kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, CA, EUA), e análises de proteínas específicas (GHS-R, CCK1-R, GLP-1R, NPY2R/Y2, BDNF e c- Fos) foram realizados por SDS-PAGE. As proteínas do intestino delgado foram normalizadas para 20 µg/amostra, e as proteínas ARC e NTS foram normalizadas para 10 µg/amostra. As amostras foram transferidas para membranas de PVDF (Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Londres, Reino Unido). Todas as membranas foram incubadas com solução salina tamponada com Tris (TBS) contendo 5% de albumina por 45 min. Posteriormente, as membranas foram cortadas seguindo o padrão de peso molecular de cada proteína de interesse. Cada trecho de membrana coletado foi incubado com um anticorpo primário específico para detectar cada proteína presente em diferentes pesos moleculares; em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com Tween TBS (0,1%) após a utilização dos anticorpos secundários. Todos os anticorpos estão descritos na Tabela 2. Após incubação com anticorpos secundários, as membranas foram lavadas seguidas de incubação com peroxidase de

rábano conjugada com estreptavidina (Caltag Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As bandas de proteína foram visualizadas por quimioluminescência (Kit ECL plus, Amersham Biosciences, Londres, Reino Unido) seguida de exposição ao Image Quant LAS (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A área e a densidade da banda foram quantificadas pelo software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, MA, EUA) e normalizadas para β -actina, GAPDH ou ciclofilina. A expressão proteica foi quantificada usando diferentes géis para machos e fêmeas. Os dados são expressos em relação (%) ao grupo controle (NL ou CONT) por sexo.

Tabela 2 - Lista de anticorpos

Anticorpos primários			Anticorpos secundários		
Anticorpo	Descrição	Diluição	Especificidade	Descrição	Diluição
Anti-CCK1-R	Abcam – ab77269	1:300	Anti-goat	Santa Cruz Biotechnology – sc-2352	1:5000
Anti-GLP-1R	Abcam – ab218532	1:300	Anti-rabbit	Sigma-Aldrich – SAB4600068	1:5000
Anti-NPY2R/Y2	Abcam – ab31894	1:200	Anti-rabbit	Sigma-Aldrich – SAB4600068	1:10000
Anti-GHS-R	Abcam – ab85104	1:300	Anti-rabbit	Sigma-Aldrich – SAB4600068	1:7000
Anti-c-Fos	Santa Cruz Biotechnology – GW21144	1:500	Anti-chicken	Sigma-Aldrich – A9046	1:7000
Anti-BDNF	EMD Millipore – GF35L	1:500	Anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology – sc-2377	1:10000
Anti- β -actin	Sigma-Aldrich – A2228	1:1000	Anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology – sc-2377	1:10000
Anti-GAPDH	Cell Signaling Technology – 14C10	1:500	Anti-rabbit	Sigma-Aldrich – SAB4600068	1:10000
Anti-Cyclophilin	Cell Signaling Technology – B7389	1:1000	Anti-rabbit	Sigma-Aldrich – SAB4600068	1:10000

Legenda: CCK1-R - Receptor de colecistoquinina tipo 1; GLP-1R - Receptor do peptídeo semelhante ao glucagon-1; NPY2R/Y2 - receptor NPY tipo 2; GHS-R - Receptor secretagogo do hormônio do crescimento; c-Fos - proto-oncogene c-fos; BDNF - fator neurotrófico derivado do cérebro; β -actina ou GAPDH ou ciclofilina foram usados como controles em Western blot.

Fonte: A autora, 2021.

2.9 Análise estatística

2.9.1 Análise estatística experimento 1

Todos os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) usando GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Apenas uma prole por ninhada por grupo por sexo foi usada aleatoriamente para análise. Homens e mulheres foram analisados separadamente pelo teste t de Student, pois nosso objetivo era entender o efeito da programação em cada sexo ao invés de avaliar a interação. Durante o Western blotting, as corridas dos géis de machos e fêmeas foram realizadas separadamente. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.9.2 Análise estatística experimento 2

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os dados de consumo de ração foram analisados usando uma análise de variância univariada de três vias (uANOVA): Idade (dias pós-natais 60, 90, 120, 150 e 180), Sexo (machos e fêmeas) e Exposição (nicotina e controle) foram usados entre -fatores sujeitos. Os seguintes dados foram submetidos a uANOVAs (sexo e exposição como fatores entre sujeitos): massa corporal, massa gorda total, massa gorda visceral, atividade do nervo vago, bem como os teores de acetato, propionato e butirato. ANOVAs de ordem inferior e testes t de Student foram usados post hoc. Testes t de Student separados por sexo foram usados para avaliar os dados restantes. A significância foi assumida ao nível de $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os subitens “resultados” e “discussão” serão apresentados sob a forma de 2 (dois) experimentos, conforme informados a seguir:

3.1 Experimento 1: supernutrição pós-natal

3.1.1 Resultados

MACHOS

Ingestão alimentar e parâmetros biométricos

Como esperado, os machos SL apresentaram maior ingestão alimentar (+64%, $p = 0,0006$), massa corporal (+20%, $p = 0,0002$), gordura subcutânea (+54%, $p < 0,0001$), % de gordura total (+35%, $p = 0,0002$) e massa gorda visceral (+47%, $p = 0,0002$) do que os machos NL (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito da redução de ninhada nos parâmetros biometricos de machos em PND150

	Macho NL rat	Macho SL rat
Ingestão acumulada (Kg)	7.5 ± 1.1	12.3 ± 0.4 [#]
Massa corporal (g)	503.2 ± 17.2	601.9 ± 12.7 [#]
Gordura corporal (g)	65.9 ± 5.7	101.4 ± 3.8 [#]
Gordura total (%)	18.6 ± 1.2	25.2 ± 0.6 [#]
Gordura visceral/massa corporal (g)	5.2 ± 0.3	7.6 ± 0.4 [#]

Legenda: NL – ninhada normal, SL – ninhada reduzida. [#] $p < 0.05$, Diferença estatística entre SL versus NL; n = 10 animais de diferentes ninhadas/grupo.

Fonte: A autora, 2021.

Eletrofisiologia do nervo vago e conteúdo de c-Fos

Os machos SL apresentaram maior atividade do nervo vago (+67%, $p = 0,009$) na condição basal do que os machos NL (Fig. 15A). Apesar dessa diferença, a expressão da proteína c-Fos no NTS de machos SL não foi significativamente alterada (Fig. 15B).

SCFAs e composição da microbiota nas fezes

O grupo SL apresentou maior abundância dos filos Firmicutes (+19%) e Proteobacteria (+62%), mas menor abundância de Bacteroidetes (-11%) e Actinobacteria (-68%) (Fig. 15C). Este grupo apresentou conteúdo fecal de propionato e butirato inalterados (Fig. 15D).

Receptores de peptídeos GI e BDNF

No intestino delgado, os machos SL não apresentaram alteração na expressão de receptores para peptídeos intestinais (duodeno) e BDNF (íleo) (Fig. 15E).

No hipotálamo, os machos SL apresentaram menor teor de proteína GLP-1R (-43%, $p = 0,03$) do que os machos NL (Fig. 15F).

FÊMEAS

Ingestão alimentar e parâmetros biométricos

Pela primeira vez, estamos estudando as fêmeas desse modelo de programação. As fêmeas SL apresentaram maior ingestão alimentar (+6%, $p = 0,005$), massa corporal (+11%, $p = 0,001$), gordura subcutânea (+23%, $p = 0,02$), gordura total (+27%, $p = 0,003$) e massa gorda visceral (+85%, $p < 0,0001$) do que as fêmeas NL (Tabela 4).

Tabela 4 - Efeito da redução de ninhada nos parâmetros biometricos de fêmeas em PND150

	Female NL rat	Female NL rat
Ingestão acumulada (Kg)	8.3 ± 0.08	$8.8 \pm 0.12^*$
Massa corporal (g)	259.1 ± 3.4	$288.6 \pm 6.9^*$
Gordura corporal (g)	28.7 ± 1.1	$35.4 \pm 2.3^*$
Gordura total (%)	13.9 ± 0.4	$17.6 \pm 0.9^*$
Gordura visceral/massa corporal (g)	2.9 ± 0.1	$5.5 \pm 0.3^*$

Legenda: NL – ninhada normal, SL – ninhada reduzida. * $p < 0.05$, Diferença estatística entre SL versus NL; n = 10 animais de diferentes ninhadas/grupo. .

Fonte: A autora, 2021.

Eletrofisiologia do nervo vago e conteúdo de c-Fos

As fêmeas SL apresentaram maior atividade do nervo vago basal (+148%, $p = 0,006$) do que as fêmeas NL (Fig. 16A), enquanto o conteúdo de c-Fos no NTS não foi diferente entre os grupos (Figura 16B).

SCFAs e composição da microbiota nas fezes

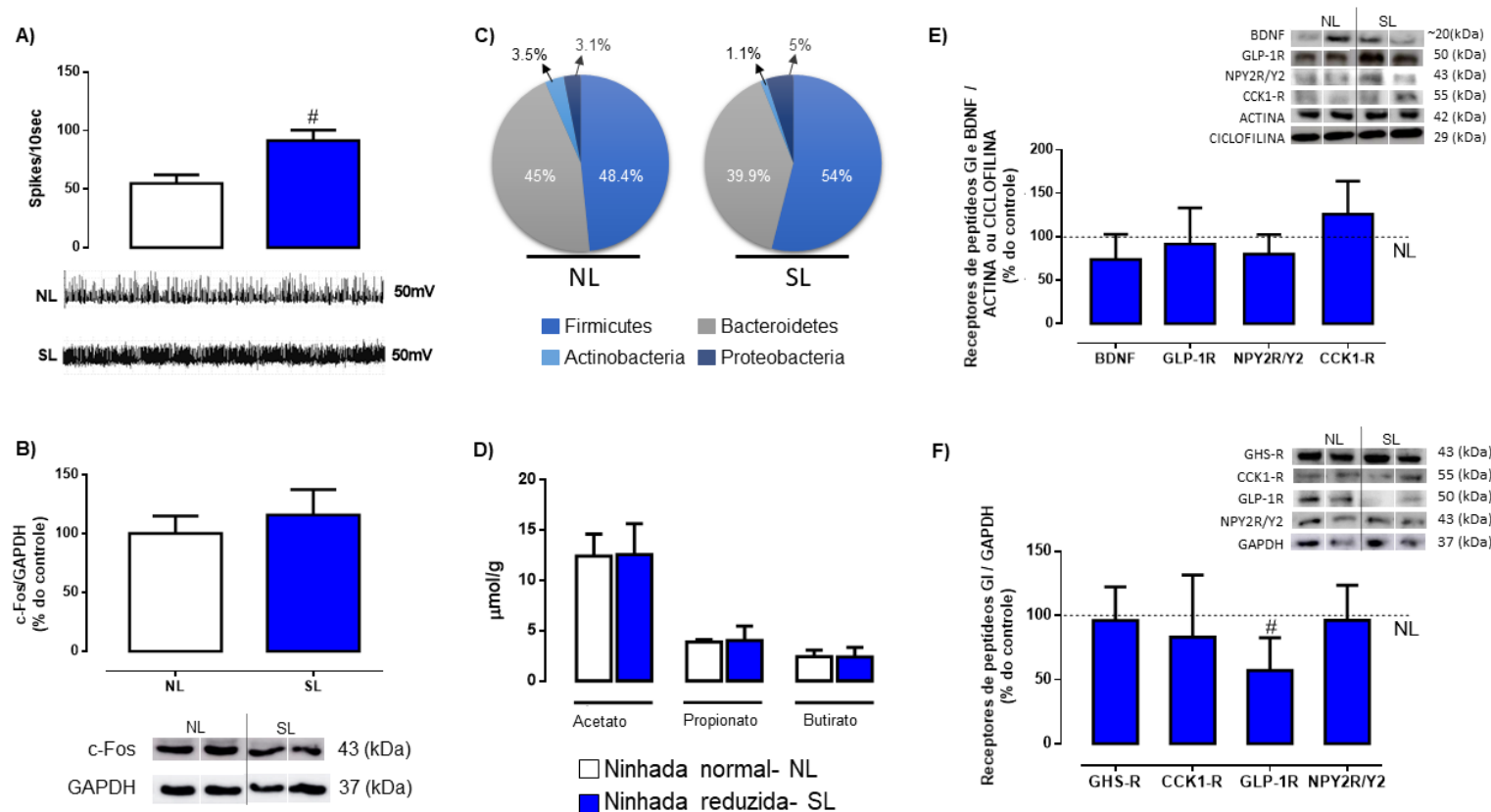
As fêmeas SL apresentaram um aumento na abundância do filo Firmicutes (+ 28%) e um aumento de quase onze vezes em Proteobacteria, com redução em Bacteroidetes (-33%) sem diferença em Actinobacteria (Figura 16C). Conforme ilustrado na Fig. 16D, as fêmeas SL apresentaram menores teores de acetato (-38%, $p = 0,0004$) e propionato (-22%, $p = 0,045$). O butirato fecal foi inalterado entre os grupos femininos.

Receptores de peptídeos GI e BDNF

As fêmeas SL não mostraram diferença das fêmeas NL na expressão de CCK1-R no duodeno, GLP-1R ou NPY2R/Y2 no íleo ou BDNF (Fig. 16E)

No hipotálamo, as fêmeas SL apresentaram apenas maior teor de proteína CCK1-R (+91%, $p = 0,0003$) quando comparado as fêmeas NL (Fig. 16F).

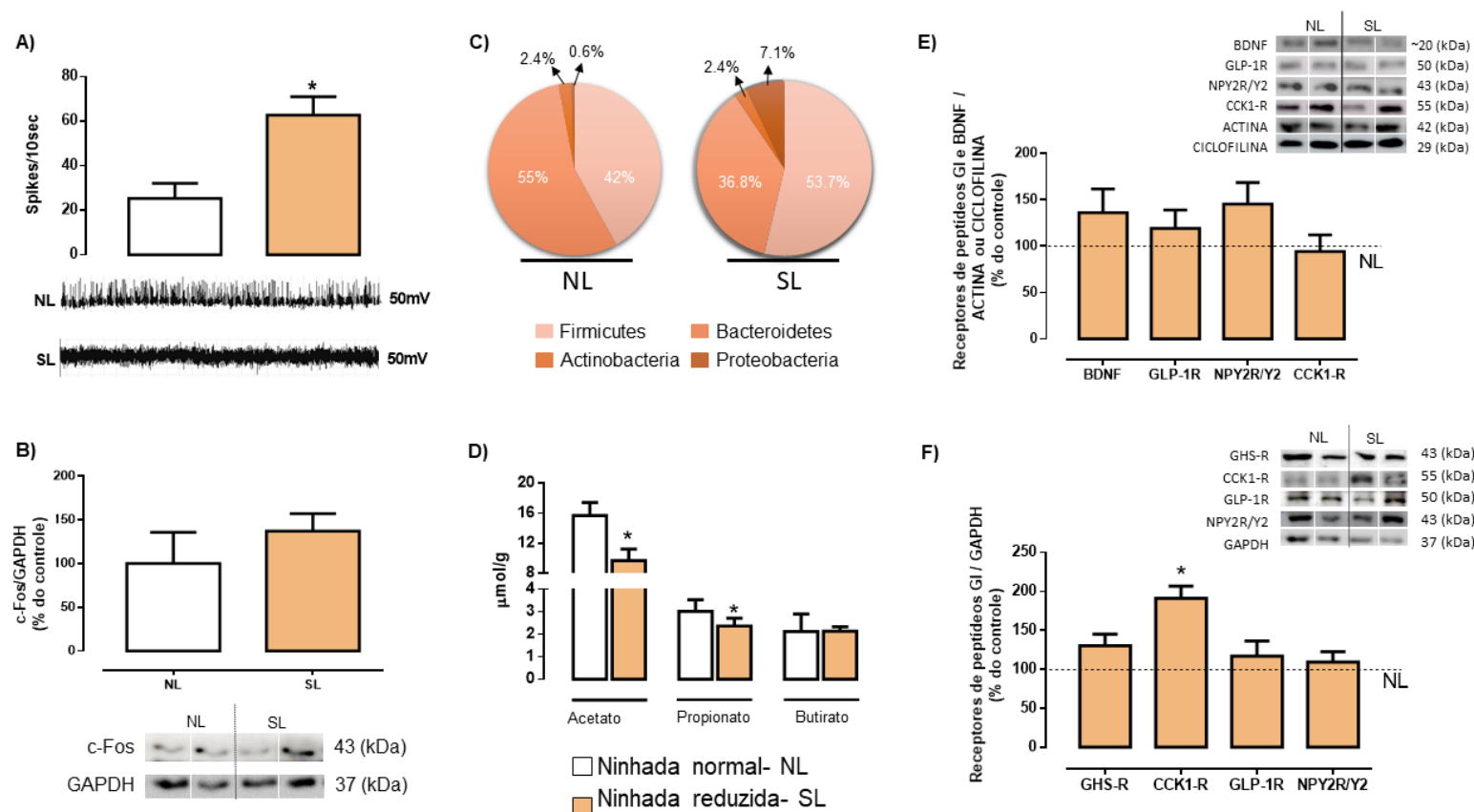
Figura 15 - Impacto da redução do tamanho da ninhada nos marcadores de controle da ingestão alimentar em machos no PND150



Legenda: A) Atividade elétrica do nervo vago; as imagens abaixo representam os picos; n=6-7 ratos por ninhada/grupo; B) Expressão proteica de c-Fos no NTS; n=7 ratos por ninhada/grupo; C) Contribuição relativa (%) de quatro filas da microbiota intestinal nas fezes; n=4-5 ratos por ninhada/grupo; D) Conteúdo de SCFAs nas fezes; n=4-5 ratos por ninhada/grupo; E) Expressão proteica de receptores dos peptídeos intestinais e BDNF no intestino delgado; n=6-7 ratos por ninhada/grupo; F) Expressão proteica de receptores de peptídeos GI no hipotálamo; n=5-7 ratos por ninhada/grupo. NL - ninhada normal; SL - ninhada reduzida. Os valores são expressos como média ± SEM. # p < 0,05, significância estatística entre machos SL versus machos NL.

Fonte: A autora. 2021.

Figura 16 - Impacto da redução do tamanho da ninhada nos marcadores de controle da ingestão alimentar em machos no PND150



Legenda: A) Atividade elétrica do nervo vago; as imagens abaixo representam os picos; n=6-7 ratos por ninhada/grupo; B) Expressão proteica de c-Fos no NTS; n=7 ratos por ninhada/grupo; C) Contribuição relativa (%) de quatro filós da microbiota intestinal nas fezes; n=4-5 ratos por ninhada/grupo; D) Conteúdo de SCFAs nas fezes; n=4-5 ratos por ninhada/grupo; E) Expressão proteica de receptores de peptídeos intestinais e BDNF no intestino delgado; n=6-7 ratos por ninhada/grupo; F) Expressão proteica de receptores de peptídeos GI no hipotálamo; n=4-7 ratos por ninhada/grupo. NL - ninhada normal; SL - ninhada reduzida. Os valores são expressos como média ± SEM. *p< 0,05, significância estatística entre fêmeas SL versus fêmeas NL.

Fonte: A autora, 2021.

3.1.2 Discussão

O modelo de redução do tamanho da ninhada no início da lactação leva ao aumento na ingestão de leite materno pela prole SL, gerando um aumento no aporte calórico, e consequentemente, ganho de peso (FIOROTTO et al., 1991). Além disto, sabemos que a composição do leite produzido pela rata SL é modificada, sendo detectado um aumento no teor de gordura, principalmente triglicerídeo (CUNHA et al., 2009). Estes dois fatores de impressão são os principais responsáveis por causar aumento de peso e acúmulo de adiposidade corporal neste modelo de programação. No presente estudo, a supernutrição neonatal por redução de ninhada provocou aumento do consumo alimentar, de massa corporal e dos depósitos de gordura nos animais, corroborando os muitos dados da literatura em machos (HABBOU et al., 2013; PLAGEMANN et al., 1999; RODRIGUES et al., 2009) e os poucos estudos disponíveis em fêmeas (COSTA et al., 2019; VOITS et al., 1996). Aqui, abordamos parâmetros do eixo intestino-cerebro neste modelo experimental com o intuito de compreender se uma possível disfunção dos parâmetros deste sistema pode explicar a hiperfagia. Animais supernutridos de ambos os sexos apresentaram disbiose e aumento da atividade elétrica do nervo vago, que pode contribuir para o desequilíbrio da ingestão alimentar e, por consequência, gerar o aumento de peso.

Em modelos de obesidade por dieta e no modelo de supernutrição neonatal, há um desequilíbrio do sistema nervoso autonômico, onde a função simpática encontra-se elevada (CONCEIÇÃO et al., 2017; GUARINO et al., 2017) e a função parassimpática reduzida (NAGAI et al., 2003; VERWAERDE et al., 1999). Já foi mostrado que a atividade aferente vagal também se encontra reduzida sob dieta rica em gordura (DALY et al., 2011). Animais expostos a uma alimentação rica em gordura no período perinatal apresentam redução da excitabilidade do motoneurônio vagal (eferência central) de projeção gástrica e redução da resposta glutamatérgica central (BHAGAT; FORTNA; BROWNING, 2015), indicando que a gordura exerce importante impacto na atividade vagal. Sabemos que o leite da rata SL possui maior conteúdo de gordura (CUNHA et al., 2009), semelhante ao leite de mães alimentadas com dieta rica em gordura (BAUTISTA et al., 2016). Assim, desde o período crítico da lactação quando os neurocircuitos sensorio motor estão amadurecendo (BHAGAT; FORTNA; BROWNING, 2015; RINAMAN; LEVITT, 1993), é possível que a prole SL apresente uma falha no desenvolvimento da circuitaria envolvida no reflexo vagal. O desenvolvimento da circuitaria sensorio motora é dependente de BDNF, tanto a nível central quanto nos tecidos

periféricos como o intestino (MURPHY; FOX, 2010). Animais knockout para BDNF intestinal apresentam aumento da inervação sensorial vagal, resultando em redução de duração e tamanho da refeição (BIDDINGER; FOX, 2014). No trabalho atual, a expressão intestinal de BDNF não foi alterada nos animais SL, sugerindo que o aumento do tônus vagal seja um mecanismo independente de BDNF.

Ainda há controvérsias sobre a atividade vagal no controle da ingestão e do peso: 1) Em humanos com obesidade mórbida, o bloqueio do nervo vago (terapia vBLOCK) causa perda de peso (CAMILLERI et al., 2008), embora a faixa de estímulo para bloqueio do vago, na verdade, gere excitabilidade ao invés de bloqueio, mimetizando os sinais enviados do TGI e gerando saciedade (PELOT; BEHREND; GRILL, 2017); 2) Em animais e humanos, a vagotomia pode ou não causar perda de peso (PELOT; GRILL, 2018); 4) Em animais, a estimulação vagal cervical de baixa frequência resulta em inibição da ingestão alimentar e redução do peso corporal (BUGAJSKI et al., 2007; GIL et al., 2009; VAL-LAILLET et al., 2010). No presente estudo, é possível que o aumento do tônus vagal na prole SL cause maior liberação de glutamato. Porém, como o conteúdo de c-Fos no NTS não foi elevado e os animais não são hipofágicos, sugerimos que a prole SL adulta tenha desenvolvido resistência glutamatergica no NTS. A dosagem do receptor de glutamato neste tecido poderia dar uma luz sobre este fenômeno.

A microbiota intestinal é composta por cinco grandes filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Verrucomicrobia*, onde *Firmicutes* e *Bacteroidetes* representam 90% das bactérias presentes na TGI dos mamíferos (SHIN; WHON; BAE, 2015). Na obesidade, tanto em humanos quanto em animais expostos a dieta high fat, vem sendo observado um aumento na abundância relativa de *Firmicutes* em comparação a *Bacteroidetes* (HORNE et al., 2020; LEY et al., 2006), e esse mesmo padrão é observado no modelo de programação por redução de ninhada em ratos Sprague-Dawley machos aos 15 dias de idade (ŠEFČÍKOVÁ et al., 2011). Outro filo relacionado a disfunções metabólicas é o *Proteobacteria*, onde o seu aumento em animais e humanos, também está relacionado com distúrbios metabólicos (SHIN; WHON; BAE, 2015). Esse desequilíbrio na população bacteriana caracteriza disbiose; o aumento da permeabilidade intestinal eleva a concentração sérica de lipopolissacarídeo (LPS) gerando uma inflamação crônica de baixo grau, que é suficiente para causar alterações metabólicas que resultam em aumento da ingestão alimentar e ganho de peso (CANI et al., 2007). O LPS é capaz de inibir a sinalização da leptina nas aferências vagais (DE LA SERRE; DE LARTIGUE; RAYBOULD, 2015). A resistência a leptina vagal reduz a resposta anorexígena da CCK, o que resulta em hiperfagia (DE

LARTIGUE et al., 2012), assim como o uso de um antagonista de leptina no nervo vago leva a hiperfagia (PETERS; SIMASKO; RITTER, 2007). Portanto, de acordo com o padrão dos filos na microbiota fecal dos animais SL de ambos os sexos, caracterizamos um quadro de disbiose intestinal, que deve cursar com inflamação sistêmica de baixo grau e inibição do efeito da leptina no vago, contribuindo para a hiperfagia da prole SL.

Os dados sobre a relação entre a quantidade de AGCCs e obesidade ainda são divergentes. Estudos mostram aumento dos AGCC nas fezes de indivíduos obesos (DE LA CUESTA-ZULUAGA et al., 2018) e no ceco de animais obesos/hiperleptinêmicos (TURNBAUGH et al., 2006). O aumento da concentração cecal dos AGCCs já foi relacionado a disbiose e ao aumento da relação firmicutes:bacteroidetes (DE LA CUESTA-ZULUAGA et al., 2018; TURNBAUGH et al., 2006); por outro lado, foi demonstrado não haver associação entre o aumento de AGCCs fecais com o desbalanço entre *Firmicutes*:*Bacteroidetes* (SCHWIERTZ et al., 2010). No presente trabalho, os machos SL não tiveram quaisquer alterações de AGCCs nas fezes, porém apresentaram aumento de *Firmicute* e redução de *Bacteroidetes*, quando comparado aos controles. Com relação as fêmeas SL, houve redução de acetato e propionato. Este achado foi similar ao observado em camundongos obesos por dieta rica em gordura (MURPHY et al., 2010). A redução de acetato e propionato pode estar relacionada a: 1) maior absorção intestinal desses ácidos graxos e/ou 2) mudança na composição da microbiota intestinal, com redução de espécies bacterianas produtoras de acetato e propionato. No atual trabalho possivelmente, esteja ocorrendo as duas situações, onde a maior absorção dos AGCCs intestinais estaria impactando no balanço energético positivo dessas fêmeas SL, pois tanto em humanos como em camundongos, os AGCCs aumentam o consumo calórico (ISKEN et al., 2010; RILEY; RAPHAEL; FAERSTEIN, 2013), e estimulam o acúmulo de lipídeos no tecido adiposo (DIAMANT; BLAAK; DE VOS, 2011). A redução do filo *Bacteroidetes* pode ter relação direta com a menor produção de propionato, devido a uma redução no gênero *Prevotella*, que está associado a dietas ricas em carboidratos, carboidratos resistentes e fibras, sendo responsável pela produção de grandes quantidades de propionato (PRECUP; VODNAR, 2019; RAHAT-ROZENBLOOM et al., 2017). Na obesidade induzida por dieta high fat ou por redução de ninhada (ratos machos Sprague-Dawley, em PN15 e PN40), observa-se redução do gênero *Prevotella* (MARQUES et al., 2016; ŠEFČÍKOVÁ et al., 2011). Por outro lado, animais obesos após perda de peso apresentaram aumento de *Prevotella*, com consequente aumento de acetato e propionato intestinais (WANG et al., 2020). Outra questão é que o filo Firmicutes está relacionado com maior conversão de acetato em butirato, através da via butiril coenzima A (CoA): acetato-

CoA transferase (PRECUP; VODNAR, 2019). Assim, o aumento de *Firmicutes* nas fêmeas SL deve refletir a redução de acetato. Os AGCCs são extremamente importantes na regulação do balanço energético. A administração in vivo ou em vitro de AGCCs estimula a liberação de PYY e GLP-1, elevando os níveis séricos destes peptídeos intestinais anorexígenos (TOLHURST et al., 2012; ZHOU et al., 2008). Sugerimos que as fêmeas SL secretem menos PYY e GLP-1 pelas células L enteroendócrinas do cólon, favorecendo a hiperfagia. Sabemos que os AGCCs aceleram o trânsito intestinal, enquanto o PYY inibe (CHERBUT et al., 1998). Foi mostrado, em cães, que a redução do esvaziamento gástrico e motilidade intestinal leva a maior ação anorexigênica e redução da ingestão alimentar (SALLAM; CHEN, 2011). Portanto, caso as fêmeas SL tenham menor liberação de PYY, estas podem ter um trânsito intestinal acelerado, contribuindo para a sua hiperfagia.

Os peptídeos GI estão intimamente relacionados com o controle da ingestão alimentar (RODGERS; TSCHÖP; WILDING, 2012), na qual a sua ação parácrina regula a motilidade intestinal (reduzindo o esvaziamento) e ativar a aferência vagal (promovendo saciedade) (KRIEGER, 2020; LO et al., 2014; STEINERT et al., 2017). Humanos obesos apresentam esvaziamento gástrico acelerado, redução de PYY e aumento de GLP-1 plasmático pós prandial (ACOSTA et al., 2015). No entanto, animais machos adultos obesos (PN133), programados pela redução de ninhada, não tiveram alterações nos níveis séricos de PYY e GLP-1, como também do RNAm do proglucagon e PYY no jejuno e cólon (REID et al., 2016). Com relação a CCK, Voits et al. (1996) demonstraram que após a administração de CCK, os animais SL independente do sexo não apresentam hipofagia. Nesse sentido, no atual trabalho medimos a expressão dos receptores de peptídeos GI. Não detectamos alterações na expressão proteica destes receptores no intestino, sugerindo que a ação parácrina dos hormônios GI não foi afetada pela programação. Uma limitação do presente estudo foi não ter medido a concentração sérica de PYY, GLP1, CCK e ghrelina.

No ARC, os peptídeos GI controlam o apetite via ligação a seus receptores específicos (SUZUKI et al., 2010). O papel central do GLP1 tem sido investigado como alvo terapêutico na obesidade (BEIROA et al., 2014; GRILL, 2020; TERRILL et al., 2016). Assim, a redução da expressão do GLP1R no ARC detectada nos machos SL pode resultar em menor ação do GLP1, contribuindo para o fenótipo hiperfágico destes animais. Já o papel central anorexigenico da CCK envolve a inibição da expressão do agouti-related peptide (AGRP) e neuropeptídeo Y (NPY) (BI et al., 2004; DUNN et al., 2013). De forma paradoxical, as fêmeas SL, que são hiperfágicas, apresentam superexpressão do CCKAR no ARC. Devido a disbiose, as fêmeas SL devem apresentar aumento da permeabilidade intestinal. Este aumento pode

gerar a translocação de lipopolissacarídeo (LPS) para a corrente sanguínea; o LPS pode atravessar a barreira hematoencefálica causando neuroinflamação (FUKE et al., 2019; JACKSON et al., 2019) e, possivelmente, super estimulando os receptores de CCK no ARC das fêmeas SL. De fato, o LPS é capaz de up regular a expressão do CCKAR in vitro e in vivo (XU et al., 2004; ZHAO et al., 2005).

Diante do exposto, a superalimentação na lactação causada pela redução de ninhada causou uma disrupção na circuitaria que compõe o eixo intestino-cérebro de animais adultos de ambos os sexos, colaborando para o status de hiperfagia e obesidade já descritos na literatura. Destacamos dois importantes achados neste modelo de programação: 1) o papel dos sinais provenientes do intestino como um importante sítio periférico de regulação da ingestão alimentar e 2) embora pouco estudada, a fêmea SL apresentou perfil similar ao macho SL (hiperfagia, obesidade e disbiose intestinal), contudo houve dimorfismo sexual quanto aos AGCCs fecais e ao receptor de CCK no hipotálamo, sugerindo maior desregulação do eixo intestino-cérebro, que poderia torná-la mais suscetível a desfechos metabólicos negativos. Assim, a desregulação alimentar no início da vida, principalmente pelo consumo de alimentos ricos em gordura, deve ser evitada para minimizar os riscos de surgimento da síndrome metabólica na idade adulta.

3.2 Experimento 2: exposição materna à nicotina

3.2.1 Resultados

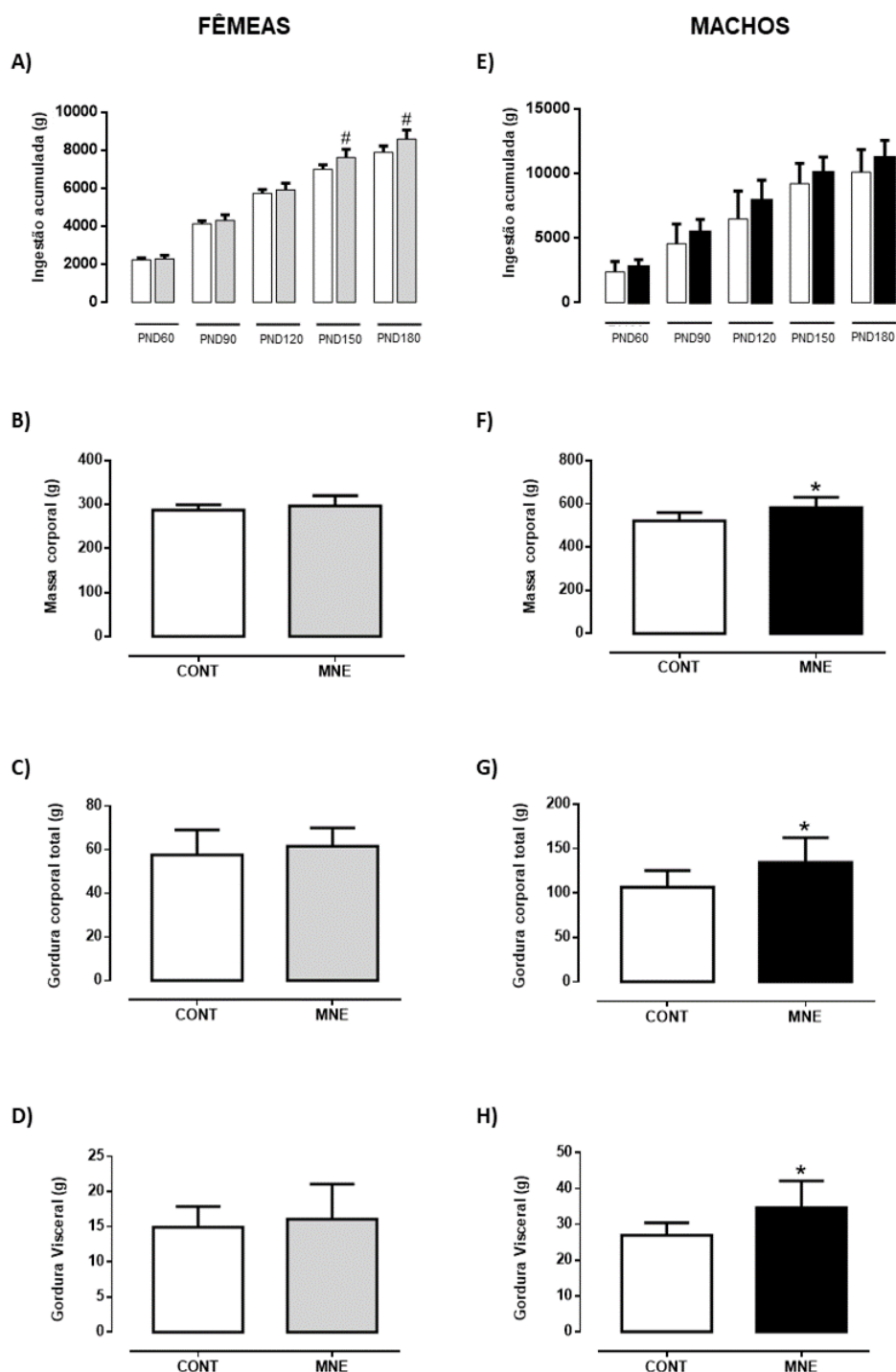
Consumo de ração, massa corporal e massa gorda

A uANOVA mostrou interações Sexo $\times$ Idade ($F_{4,180} = 8,2$, $p < 0,001$) e Sexo $\times$ Exposição ($F_{1,180} = 4,2$, $p = 0,043$). Análises post hoc indicaram que apenas as fêmeas apresentaram consumo de ração significativamente maior (PND 150: +9%, $p = 0,001$; PND 180: +9%, $p = 0,001$ (Fig. 15A). Em relação aos parâmetros somáticos, a Sexo $\times$ Exposição foram observadas interações para massa corporal ($F_{1,36} = 5,8$, $p = 0,021$), gordura corporal ($F_{1,36} = 4,2$, $p = 0,047$) e massa gorda visceral ($F_{1,36} = 4,3$, $p = 0,045$), indicaram que apenas para o sexo masculino, foram evidenciadas diferenças entre os grupos: machos MNE apresentaram maior massa corporal (+12%, $p = 0,006$), gordura corporal (+26%, $p = 0,018$) e massa de gordura visceral (+29%, $p = 0,008$) quando comparados aos machos CONT (Fig. 17F-H) Não foram observadas diferenças entre os grupos femininos (Fig. 17B-D).

Nervo vago

A interação Sexo $\times$ Exposição ($F_{1,18} = 4,5$, $p = 0,048$) foi observada em relação ao estado do nervo vago. Embora não tenha sido observada diferença entre os grupos femininos (Fig. 18A), os machos MNE apresentaram maior atividade do nervo vago (+150%, $p = 0,026$) quando comparados aos machos CONT (Fig. 19A).

Figura 17 - Parâmetros biométricos na prole adulta exposta à nicotina através do leite



Legenda: A) ingestão alimentar em diferentes idades (g), B) Massa corporal (g), C) gordura corporal total (g), D) gordura visceral (g); n=10 ratas fêmeas por grupo; E) ingestão alimentar em diferentes idades (g), F) massa corporal (g), G) gordura corporal total (g), H) massa de gordura visceral (g); n=10 ratos machos por grupo. Os dados são apresentados como média $\pm$ SEM. [#]p < 0,05, significância estatística entre fêmeas CONT versus fêmeas MNE e ^{*}p < 0,05, significância estatística entre machos CONT versus machos MNE.

Fonte: A autora. 2021.

Ácidos graxos de cadeia curta

Não foram observados efeitos ou interações em relação ao conteúdo de propionato e butirato nas fezes. Por outro lado, o teor de acetato mostrou uma interação significativa Sexo $\times$ Exposição ($F_{1,16} = 8,7$, $p = 0,010$): Enquanto as fêmeas MNE apresentaram menor teor (-29%, $p = 0,001$) do que as CONT (Fig. 18B), os machos não mostraram diferenças entre os grupos (Fig. 19B).

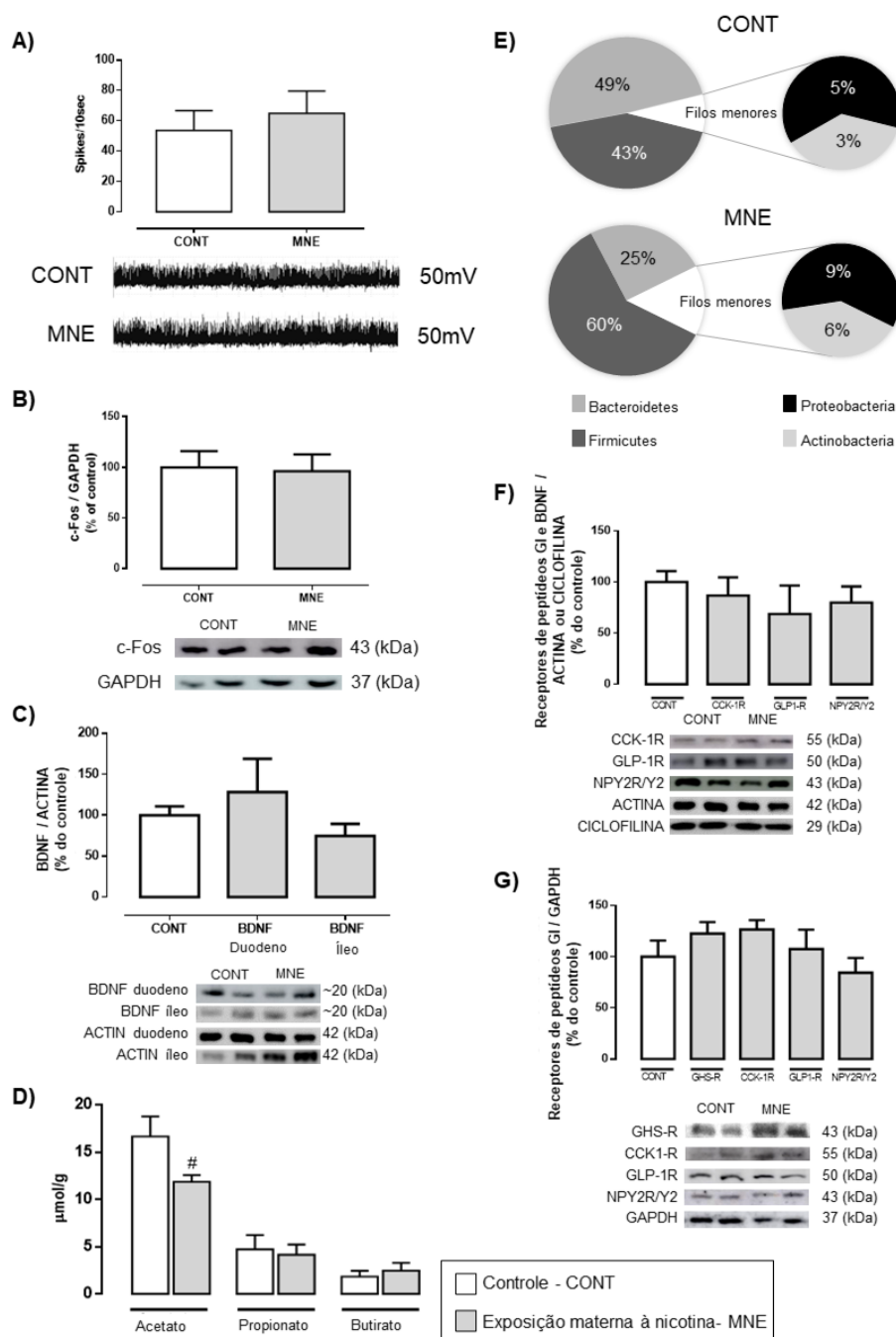
Microbiota intestinal

As fêmeas MNE apresentaram teores menores de Bacteroidetes (-49%) e maiores Firmicutes (+39%), Actinobacteria (aumento de duas vezes) e Proteobacteria (+80%) do que as CONT (Fig. 18C). Machos MNE apresentaram diminuição de Bacteroidetes (-53%) e aumento de Firmicutes (+42%), Actinobacteria (aumento de três vezes) e Proteobacteria (+66%) nas fezes quando comparados aos machos CONT (Fig. 19C).

Western blot

Nas fêmeas, a expressão de c-Fos no NTS não diferiu entre os grupos femininos (Fig. 18D). As fêmeas MNE não apresentaram alteração significativa na expressão do BDNF intestinal quando comparadas às fêmeas CONT (Fig. 18E). As fêmeas MNE não apresentaram alterações significativas nos receptores de peptídeos gastrointestinais no intestino delgado (Fig. 18F) e hipotálamo (Fig. 18G). Quanto aos machos, a expressão de c-Fos foi inalterada no NTS de animais MNE (Fig. 19D). Os machos MNE não apresentaram alteração na expressão proteica do BDNF intestinal quando comparados aos controles (Fig. 19E). Tanto no intestino delgado quanto no hipotálamo, os machos MNE não mostraram alteração nos receptores de peptídeos gastrointestinais (Fig. 19F e 19G).

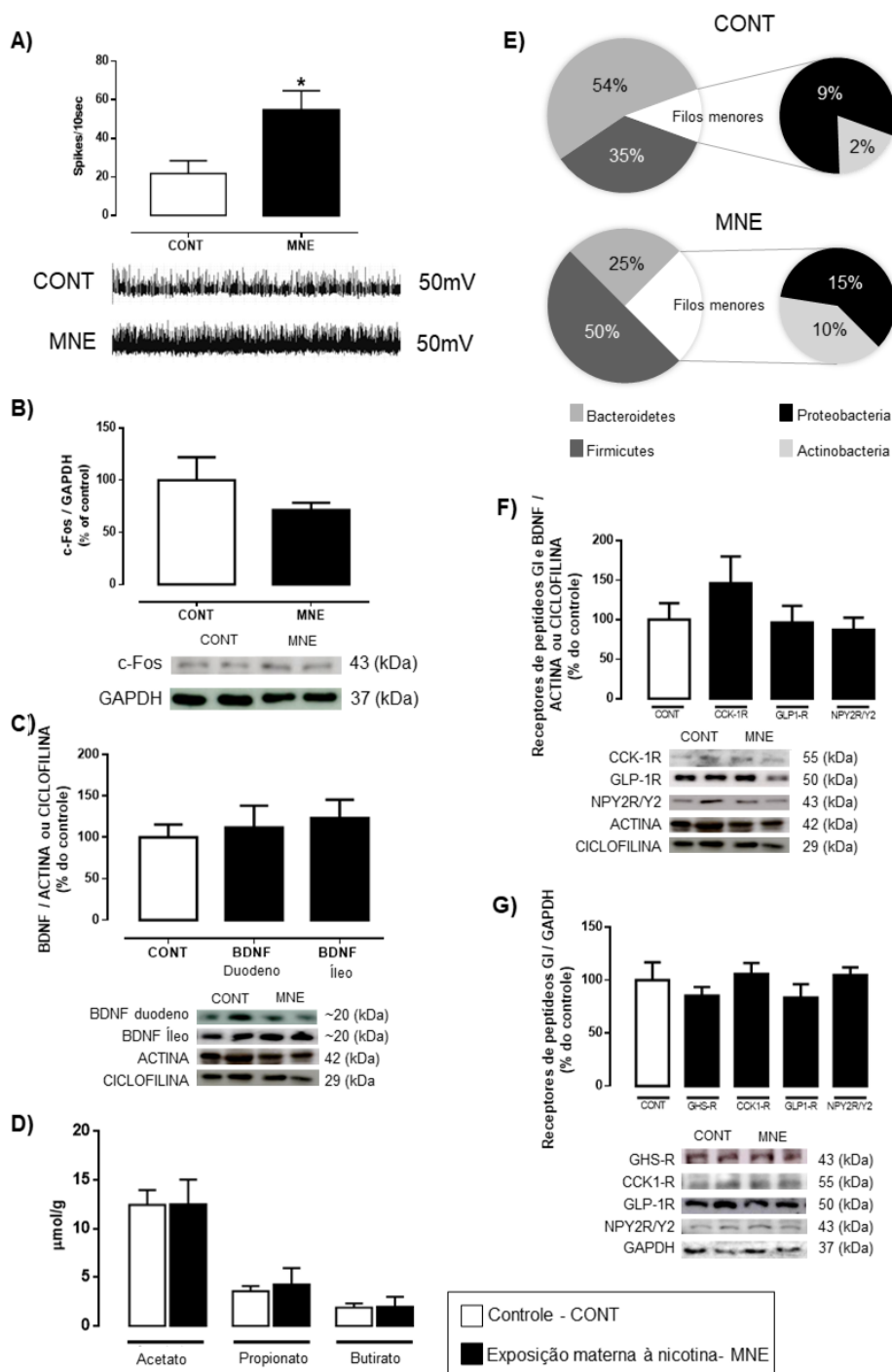
Figura 18 - Parâmetros do eixo intestino-cérebro em fêmeas adultas expostas à nicotina através do leite



Legenda: A) Atividade elétrica do nervo vago; as imagens abaixo representam os picos; n=5 ratos por grupo; B) Expressão proteica de c-Fos no NTS; n=6 ratos por grupo; C) Expressão proteica de BDNF no intestino delgado; n=7 ratos por grupo; D) Conteúdo de SCFAs nas fezes; n=5 ratos por grupo; E) Abundância relativa (%) de quatro filos da microbiota intestinal nas fezes; n=4-5 ratos por ninhada/grupo; F) Expressão proteica de receptores de peptídeos GI no intestino delgado; n=6-7 ratos por grupo; G) Expressão proteica de receptores de peptídeos GI no hipotálamo; n=5-7 ratos por grupo. As imagens representativas do Western blot estão ao lado dos respectivos gráficos. CONT – grupo controle; MNE – exposição materna à nicotina. Os dados são apresentados como média ± SEM. #p<0,05, significância estatística entre fêmeas CONT versus fêmeas MNE.

Fonte: A autora, 2021.

Figura 19 - Parâmetros do eixo intestino-cérebro em machos adultos expostos à nicotina através do leite



Legenda: A) Atividade elétrica do nervo vago; as imagens abaixo representam os picos; n=5 ratos por grupo; B) Expressão proteica de c-Fos no NTS; n=6-7 ratos por grupo; C) Expressão proteica de BDNF no intestino delgado; n=6-7 ratos por grupo; D) Conteúdo de SCFAs nas fezes; n=5 ratos por grupo; E) Abundância relativa (%) de quatro filos da microbiota intestinal nas fezes; n=4-5 ratos por ninhada/grupo; F) Expressão proteica de receptores de peptídeos GI no intestino delgado; n=6-7 ratos por grupo; G) Expressão proteica de receptores de peptídeos GI no hipotálamo; n=6-7 ratos por grupo. As imagens representativas do Western blot estão ao lado dos respectivos gráficos. CONT – grupo controle; MNE – exposição materna à nicotina. Os dados são apresentados como média ± SEM. *p<0,05, significância estatística entre machos CONT versus machos MNE.

Fonte: A autora, 2021.

3.2.2 Discussão

Atualmente a conexão intestino-cérebro tem sido extensamente estudada em seres humanos e roedores e vem demonstrando um importante papel na regulação da ingestão alimentar, principalmente quando a questão se refere ao controle a curto prazo da ingestão alimentar e o tamanho das refeições (ASARIAN; BÄCHLER, 2014). Nosso grupo já demonstrou que a exposição neonatal a nicotina programa o comportamento alimentar dos animais na vida adulta; fêmeas são hiperfágicas e machos são normofágicos, no entanto ambos os sexos apresentam resistência hipotalâmica a leptina e menor efeito de dopamina no núcleo accumbens (DE OLIVEIRA et al., 2010; PEIXOTO et al., 2021; PINHEIRO et al., 2015; SANTOS-SILVA et al., 2010). Tais achados estão relacionados ao controle da ingestão alimentar a longo prazo. No trabalho atual, abordando componentes do eixo intestino-cérebro, demonstrando que também existe um desequilíbrio nos fatores que controlam a ingestão alimentar em curto prazo, pois os machos programados pela nicotina apresentam aumento na atividade do nervo vago, enquanto as fêmeas apresentam redução de acetato. Ambas as situações deveriam causar a hipofagia.

Os machos MNE, que são normofágicos, paradoxalmente apresentaram hiperatividade vagal. Em camundongos machos, o desenvolvimento da aferência vagal que conecta intestino com o cérebro é regulada pelo BDNF intestinal (FOX; MURPHY, 2008). Segundo Biddinger & Fox (2014), a redução de BDNF intestinal leva a maior saciedade, pois eleva as terminações laminares intraganglionares (IGLEs, mecanorreceptores intestinais), o número de axônios longitudinais no intestino e o número de neurônios sensoriais vagais, fazendo com que o animal faça refeições menores (quantidade e tempo) e com maior intervalo entre as refeições. O BDNF é regulado por receptores nicotínicos neuronais de acetilcolina (nAChRs) e a expressão do BDNF por células enteroendócrinas é inibida pela nicotina (QIAN et al., 2016). Assim, é possível que nicotina na lactação tenha reduzido o BDNF intestinal desenhando a circuitaria nervosa dos intestinos dos machos MNE. Porém na vida adulta não houve programação do BDNF intestinal, sugerindo que outros fatores estejam controlando a hiperatividade do vagal de forma compensatória.

A atividade anorexígena vagal no NTS é realizada pelo glutamato (ZHENG et al., 2015). Assim, como os machos MNE não são hipofágicos e tem c-Fos normal no NTS, sugerimos um comprometimento da resposta glutamatérgica no NTS. Os astrócitos do NTS podem ter um papel importante nesse modelo de programação. Os astrócitos modulam as

sinapses glutamatergicas no NTS, retirando glutamato da fenda sináptica para restringir o disparo neuronal (MACDONALD; ELLACOTT, 2020). Além disto, os astrócitos regulam a ingestão alimentar (MACDONALD et al., 2020) via GLP1-R; a inativação dos astrócitos no NTS inibe os efeitos anorexígenos mediados pelo GLP1 (REINER et al., 2016). Anteriormente demonstramos que machos MNE na vida adulta apresentam aumento no número de astrócitos em vários núcleos hipotalâmicos (YOUNES-RAPOZO et al., 2015). Caso o aumento no número de astrócitos também ocorra no NTS, isto impactaria em menor glutamato (maior ingestão) e em up-regulação GLP1-R (maior anorexia), contribuindo assim para um quadro de normofagia nos animais programados pela nicotina.

As fêmeas MNE, que são hiperfágicas, não apresentam alteração da atividade vagal, o que também é paradoxal, pois estas deveriam apresentar hipoatividade e, consequentemente, menor controle vagal da ingestão alimentar no NTS. Assim é possível que a nicotina na lactação programe a aferência vagal especificamente no sexo masculino. Na literatura, já foi reportado os efeitos dimórficos da nicotina em diversos tecidos periféricos in vivo e in vitro, em parte atribuídos ao estrôgenio (ATES et al., 2019; PENG et al., 2019)(ATES et al., 2019; PENG et al., 2019). Em relação a aferência vagal, há presença de receptores de estrogênios alfa e beta (KENTISH; CLAUDINE; WITTERT, 2014); o estrogênio aumenta a densidade das fibras aferentes no NTS (CIRIELLO; CAVERSON, 2016), ativa a antinocicepção via nervo vago (YAN et al., 2014) e aumenta a excitabilidade dos neurônios aferentes vagais mielinizados (QIAO et al., 2009). Já foi demonstrado que a nicotina faz down-regulation do ER- β nas aferências vagais (D'ADESKY et al., 2018; RAVAL et al., 2012). Nosso grupo demonstrou que fêmeas MNE apresentam estradiol sérico normal e aumento de ER- α na tireoide, indicando que neste modelo pode ocorrer alteração tecidual da expressão dos receptores de estrogênio, independente do nível circulante (MIRANDA et al., 2020). É possível que as fêmeas MNE tenham um desbalanço dos ERs no nervo vago. Assim, seu fenótipo hiperfágico parece independente do eixo intestino-cérebro, sendo devido a resistência hipotalâmica a leptina (controle da ingestão a longo prazo) e a falha do sistema dopaminérgico (controle hedônico da ingestão), conforme descrito recentemente (PEIXOTO et al., 2021).

Os peptídeos GI também tem um papel relevante na conexão TGI e cérebro. Em seres humanos fumantes, a grelina é um destes peptídeos que sofre influência da nicotina, tanto na vigência como na abstinência (BOUROS et al., 2006; LEE et al., 2006). A ação orexígena da grelina é, em parte, mediada pelos nAChR (DICKSON et al., 2010). A anorexia gerada pela exposição crônica a nicotina envolve a dessensibilização dos nAChR, que reduz a atividade orexígena da grelina (STOJAKOVIC et al., 2017). Contudo, no presente estudo, não

observamos alteração na expressão dos receptores dos peptídeos GI no intestino delgado ou no ARC de ratos adultos de ambos os sexos programados pela nicotina, sugerindo que o comportamento alimentar observado não está sendo regulado pela ação hipotalâmica e/ou parácrina destes peptídeos.

Sabe-se que microbiota intestinal impacta na resposta inflamatória, balanço energético e obesidade (KLINGBEIL; DE LA SERRE, 2018). A colonização bacteriana inicial do intestino é influenciada pelo tipo de parto, alimentação (amamentação ou fórmula) e por fatores ambientais (NICHOLSON et al., 2012). Agudamente, a nicotina é capaz de alterar a composição da microbiota; em seres humanos, aumenta *Firmicutes* e reduz *Bacteroidetes* (CUSSOTTO et al., 2019), e em animais, diminui a família *Christensenellaceae*, que pertence ao filo *Firmicutes* (CHI et al., 2017). Em relação ao tabaco, os dados em humanos são diferentes aos observados com a exposição à nicotina; fumantes apresentam aumento de *Bacteroidetes* e redução de *Firmicutes* (SAVIN et al., 2018). Bebês com 3 meses de vida que foram expostos a fumaça de cigarro durante a gravidez e na amamentação apresentam aumento de *Firmicutes* (MCLEAN; JUN; KOZYRSKYJ, 2019). Esses dados reforçam a ideia de quão suscetível é o microbioma intestinal aos componentes do tabaco. Essa exposição em uma fase crítica do desenvolvimento pode imprimir um “shape” microbiano intestinal desfavorável para o resto da vida do indivíduo. Além do ambiente, a dieta também é fator determinante para a formação inicial da microbiota intestinal. Dietas hipercalóricas, podem modificar o microbioma intestinal (RICCIO; ROSSANO, 2018). Sabemos que os animais do modelo MNE receberam um leite hipercalórico, rico em lactose (OLIVEIRA et al., 2010). A lactose possui efeito prebiótico e sua fermentação aumenta o conteúdo intestinal de ácido láctico (SZILAGYI, 2004). Em ratos, já foi mostrado que uma dieta contendo 30% de lactose reduziu o pH fecal, que resultou na redução da biodiversidade bacteriana e conteúdo de AGCC (XUE et al., 2020). Em humanos, a sua suplementação de lactose (15g/dia) reduz o conteúdo total de bactérias intestinais e aumenta a população de *Lactobacillus* (ITO et al., 1993). Portanto, ambas as situações, ambiente e dieta, estão relacionadas com a gênese da disbiose. Quando a disbiose ocorre no início da vida, acarreta alterações no desenvolvimento das funções do TGI, sítio regulador da ingestão, e na formação do sistema imunológico, colocando o bebê em um estado pró-inflamatório crônico de baixo grau, semelhante ao observado na obesidade, doença inflamatória intestinal e psoríase (TAMBURINI et al., 2016). É possível que a disbiose intestinal detectada nos animais MNE adultos já ocorra desde o momento da exposição a nicotina via leite materno.

O aumento de *Firmicutes* e redução de *Bacteroidetes*, se relaciona com aumento de permeabilidade intestinal e transloção de lipopolissacrídeo (LPS) (SCHEPPER et al., 2019), uma potente molécula pró inflamatória, tanto a nível sistêmico como central; no hipotálamo, o LPS induz resistência à insulina e à leptina (BORGES et al., 2015; RORATO et al., 2017). Dessa forma, é possível que a resistência central a leptina da prole MNE, demonstrada pelo nosso grupo (PEIXOTO et al., 2021; SANTOS-SILVA et al., 2010) seja devido a disbiose intestinal e ao aumento de LPS.

Os AGCCs são importantes metabólitos da microbiota intestinal que regulam a ingestão alimentar, atuando localmente e no SNC (CANI et al., 2019). Em humanos e animais obesos já foi demonstrada uma relação entre hiperleptinemia e aumento dos AGCCs no ceco e nas fezes (DE LA CUESTA-ZULUAGA et al., 2018; TURNBAUGH et al., 2006). Diferente da literatura, no presente estudo, os machos MNE (obesos e hiperleptinêmicos) não apresentaram alteração dos AGCCs nas fezes, enquanto as fêmeas MNE (eutróficas e normoleptinêmicas) tiveram redução de acetato. A redução de acetato nas fezes das fêmeas MNE pode ser resultado disbiose intestinal detectada, pois o filo *Firmicutes* é um grande conversor de acetato em butirato (PRECUP; VODNAR, 2019). De acordo com Frost et al. (2014), a administração intraperitoneal de acetato atravessou a barreira hematoencefálica, elevou a expressão de POMC e reduziu a de AGRP, resultando em hipofagia. Em porcos, a oferta de uma dieta contendo 1% de acetato resultou em aumento na concentração sérica de PYY e GLP-1 (JIAO et al., 2020) Ambos são anorexígenos e o PYY reduz o trânsito intestinal (CHERBUT et al., 1998; SALLAM; CHEN, 2011). Assim, a soma do menor acetato fecal e o trânsito intestinal acelerado ajudam a entender a hiperfagia observada na fêmeas MNE.

Neste estudo experimental demonstramos a influência de um insulto ambiental (nicotina) apenas via leite materno sobre a programação de um fenótipo disfuncional da prole na vida adulta, o que enfatiza a importância dos cuidados de saúde nos primeiros mil dias de vida do indivíduo. Mais investigações são necessárias para termos uma visão global dos mecanismos que envolvem o papel do eixo intestino-cérebro na programação pela nicotina, por exemplo, como a avaliação da microbiota na vigência da nicotina, dos receptores de glutamato e número de astrócitos no NTS, dos receptores de estrogênio no nervo vago, dos peptídeos GI no soro, dos receptores intestinais dos AGCCs.

Em conclusão, mostramos que exposição materna à nicotina durante a lactação programou alterações no eixo intestino cérebro na prole MNE que podem impactar no comportamento alimentar. Observamos que os animais MNE de ambos os sexos apresentam alterações intestinais similares (disbiose) e distintas (hiperperistalticidade vago). A programação

diferencial quanto ao comportamento alimentar e a adiposidade pode estar associado aos esteroides sexuais. Talvez a disbiose intestinal da prole MNE esteja presente desde a lactação, pela presença da nicotina (disruptor ambiental da microbiota intestinal) e pela alteração da composição no leite materno (disruptor nutricional da microbiota intestinal). Nesse sentido, estratégias públicas de combate ao tabagismo durante a gestação/lactação devem ser intensificadas, assim como o combate ao uso de cigarros eletrônicos e adesivos de nicotina nestes períodos críticos. Alertamos sobre a importância do cuidado nutricional de filhos de mães fumantes. Estratégias nutricionais a partir da alimentação complementar, como “5 ao dia” (em inglês ‘5-a-day’), podem ser estimuladas para tentar corrigir danos na composição inicial da microbiota intestinal, e evitar o impacto de uma disbiose na vida futura do indivíduo.

4 RESUMO DOS RESULTADOS

Tabela 5 - Síntese dos resultados obtidos nas proles adultas de ambos os sexos nos dois modelos de programação estudados nesta Tese

	REDUÇÃO DE NINHADA		EXPOSIÇÃO MATERNA À NICOTINA	
	Macho SL	Fêmea SL	Macho MNE	Fêmea MNE
INGESTÃO ALIMENTAR	↑	↑	=	↑
PESO CORPORAL	↑	↑	↑	=
ADIPOSIDADE TOTAL / VISCERAL	↑	↑	↑	=
ATIVIDADE ELÉTRICA DO NERVO VAGO	↑	↑	↑	=
c-FOS no NTS	=	=	=	=
RECEPTORES DE PEPTÍDEOS GI (núcleo arqueado)	↓ GLP1-R	↑ CCK1-R	=	=
RECEPTORES DE PEPTÍDEOS GI (intestino delgado)	=	=	=	=
BDNF INTESTINAL	=	=	=	=
MICROBIOTA INTESTINAL	<i>Disbiose</i>	<i>Disbiose</i>	<i>Disbiose</i>	<i>Disbiose</i>
AGCCs nas FEZES	=	↓ Acetato Propionato	=	↓ Acetato

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi possível observar que o padrão alimentar dos animais programados por insultos na lactação pode ser decorrente de alterações da complexa rede que constitui o eixo intestino-cérebro. Como já demonstrado pelo nosso grupo, o período de lactação constitui uma importante janela crítica do desenvolvimento, pois vários sistemas ainda se encontram em processos de maturação e, portanto, podem sofrer influência de diferentes fatores. Nesse contexto, tanto a alteração nutricional (redução de ninhada, SL) quanto a ambiental (exposição materna à nicotina, MNE) durante a lactação programam para disbiose intestinal e impactam em algumas disfunções do eixo intestino-cérebro e, consequentemente, sobre o comportamento alimentar.

A redução de ninhada é um modelo de programação muito utilizado na literatura que causa sobrepeso, obesidade abdominal e outras disfunções metabólicas a curto e longo prazo. Nosso grupo e outros já reportaram que machos SL na vida adulta apresentam resistência a leptina no hipotálamo, condição que altera o padrão alimentar a longo prazo. Esta Tese evidenciou que o controle a curto prazo também é comprometido neste modelo, podendo o somatório de fatores contribuir para o fenótipo hiperfágico e obeso exibido pelos animais SL. Aqui, pela primeira vez, avaliamos as fêmeas adultas SL. Em relação a composição corporal e ingestão alimentar, as fêmeas se comportaram como machos, mostrando não existir dimorfismo sexual quanto a estes dois desfechos. Provavelmente, as fêmeas SL também tenham resistência central a leptina, mas isto ainda precisa ser comprovado.

Para abordar o tabagismo materno, insulto amplamente estudado na literatura, utilizamos o segundo modelo de programação, no qual utilizamos a exposição materna exclusiva a nicotina, principal composto psicoativo presente no cigarro, que é transferida pelo leite materno e programa a prole adulta de forma distinta, os machos são normofágicos/obesos e as fêmeas são hiperfágicas/eutróficas. Neste trabalho, observamos menor participação dos parâmetros do eixo intestino-cérebro do que no modelo anterior para regular o padrão alimentar na vida adulta.

Cabe destacar alguns desfechos intrigantes nos dois modelos investigados: 1) Encontramos aumento da atividade elétrica do nervo vago in vivo associado ao conteúdo de c-Fos normal no NTS. Este achado é paradoxal, pois como alguns animais apresentam hiperfagia, esperávamos detectar redução da função deste nervo. Além disso, a hiperatividade vagal deveria cursar com aumento de c-Fos. Estes achados levantam dúvida quanto ao efeito do glutamato no

NTS. 2) O fator que parece mais influenciar o fenótipo das proles é a microbiota intestinal e a produção de AGCCs. Os machos de ambos os modelos (obesos) não apresentaram alteração dos AGCCs na fezes. Todavia, a fêmea SL (obesa e hiperfágica) teve redução de acetato e propionato, enquanto a fêmea MNE (hiperfágica) apresentou redução de acetato. Estes dados nos fazem pensar no papel dos esteroides sexuais sobre o microbioma intestinal. Além disto, seria também interessante conhecer a expressão dos receptores intestinais dos AGCCs nestes animais. Portanto, novos estudos são necessários para esclarecer essas observações.

A disbiose intestinal foi observada em todos os animais programados na idade adulta. Sabemos que a formação da microbiota intestinal no início da vida pode ser alterada por dois fatores principais, o parto e o tipo de amamentação. Em nosso estudo, os dois insultos causaram alteração na composição do leite materno, fazendo com que o leite fosse rico em triglicerídeo (modelo SL) ou rico em carboidrato (modelo MNE). Portanto é possível que a microbiota desequilibrada esteja presente desde a sua formação inicial, podendo ser a origem de todo o desequilíbrio metabólico das proles. Para confirmar esta hipótese, devemos investigar o perfil da microbiota ao longo da lactação nos 2 modelos experimentais.

As descobertas a respeito do importante papel da microbiota são relativamente recentes, advindas de poucas décadas. Hoje, sabe-se que no nosso corpo existem muito mais micro-organismos do que células humanas (90% micróbios vs 10% humanos). De alguma forma, essa população microscópica pode influenciar os mecanismos epigenéticos, comprometendo o padrão de expressão genica e contribuindo para a obesidade originária na lactação. Os resultados apresentados nesta Tese jogam luz sobre esse tema, uma vez que a alimentação do início da vida pode ter selecionado populações bacterianas que, através de seus metabólitos, imprimiram genes, resultado no fenótipo observado.

Nosso trabalho, assim como outras pesquisas experimentais e epidemiológicas sobre o conceito DOHaD, são de suma importância para reforçar as políticas públicas já implementadas, como também para fomentar a criação de novas ações que visam proteger e incentivar o aleitamento materno exclusivo, e alertar sobre a importância da interrupção do tabagismo materno nos primeiros 1000 dias de vida da criança e sobre o cuidado nutricional destas, principalmente na primeira infância. Estratégias nutricionais a partir da alimentação complementar, por exemplo, como “5 ao dia”, podem ser estimuladas para evitar possíveis alterações na composição inicial da microbiota intestinal. O consumo de 5 porções de frutas, legumes e verduras por dia fornecerá uma boa quantidade de prebiótico que trará benefícios para a microbiota intestinal, evitando o surgimento precoce de disbiose e reduzindo o risco da criança desenvolver doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta, como a obesidade.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M. M. I. Central and peripheral control of food intake. *Endocrine regulations*, v. 51, n. 1, p. 52–70, jan. 2017.
- ABELLA, V. et al. Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nature reviews. Rheumatology*, v. 13, n. 2, p. 100–109, fev. 2017.
- ABESO - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO; METABÓLICA, O. E DA S. Mapa da obesidade - ABESO. Disponível em: <<https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade>>.
- ABUZZAHAB, M. J.; ROTH, C. L.; SHOEMAKER, A. H. Hypothalamic Obesity: Prologue and Promise. *Hormone research in paediatrics*, v. 91, n. 2, p. 128–136, 2019.
- ACOSTA, A. et al. Quantitative gastrointestinal and psychological traits associated with obesity and response to weight-loss therapy. *Gastroenterology*, v. 148, n. 3, p. 537–546.e4, mar. 2015.
- AMIN, T.; MERCER, J. G. Hunger and Satiety Mechanisms and Their Potential Exploitation in the Regulation of Food Intake. *Current obesity reports*, v. 5, n. 1, p. 106–112, mar. 2016.
- ANGELES FERNÁNDEZ-GIL, M. et al. Anatomy of the brainstem: a gaze into the stem of life. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*, v. 31, n. 3, p. 196–219, jun. 2010.
- AROSIO, M. et al. Effects of modified sham feeding on ghrelin levels in healthy human subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, v. 89, n. 10, p. 5101–5104, out. 2004.
- ARUMUGAM, M. et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, v. 473, n. 7346, p. 174–180, maio 2011.
- ASARIAN, L.; BÄCHLER, T. Neuroendocrine control of satiation. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, v. 19, n. 3, p. 163–192, set. 2014.
- ASTBURY, S. M.; CORFE, B. M. Uptake and metabolism of the short-chain fatty acid butyrate, a critical review of the literature. *Current drug metabolism*, v. 13, n. 6, p. 815–821, jul. 2012.
- ATES, M. et al. Nicotine increased VEGF and MMP2 levels in the rat eye and kidney. *Environmental science and pollution research international*, v. 26, n. 32, p. 33517–33523, nov. 2019.
- BACCHETTI DE GREGORIS, T. et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. *Journal of microbiological methods*, v. 86, n. 3, p. 351–356, set. 2011.

BÄCKHED, F. et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* (New York, N.Y.), v. 307, n. 5717, p. 1915–1920, mar. 2005.

BAIK, J.-H. Dopamine signaling in reward-related behaviors. *Frontiers in neural circuits*, v. 7, p. 152, 2013.

BAKER, E.; LUI, F. *Neuroanatomy, Vagal Nerve Nuclei*. In: Treasure Island (FL): [s.n.].

BANKS, W. A. et al. Extent and direction of ghrelin transport across the blood-brain barrier is determined by its unique primary structure. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 302, n. 2, p. 822–827, ago. 2002.

BARRETT, K. E. . R. H. E. *Fisiologia gastrointestinal*. In: STANTON, BRUCE A.; KOEPPEN, B. M. (Ed.). . *Berne & Levy : Fisiologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

BATTERHAM, R. L. et al. Inhibition of food intake in obese subjects by peptide YY3-36. *The New England journal of medicine*, v. 349, n. 10, p. 941–948, set. 2003.

BATTERHAM, R. L. et al. Critical role for peptide YY in protein-mediated satiation and body-weight regulation. *Cell metabolism*, v. 4, n. 3, p. 223–233, set. 2006.

BAUTISTA, C. J. et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *The British journal of nutrition*, v. 115, n. 3, p. 538–546, fev. 2016.

BEIROA, D. et al. GLP-1 agonism stimulates brown adipose tissue thermogenesis and browning through hypothalamic AMPK. *Diabetes*, v. 63, n. 10, p. 3346–3358, out. 2014.

BHAGAT, R.; FORTNA, S. R.; BROWNING, K. N. Exposure to a high fat diet during the perinatal period alters vagal motoneurone excitability, even in the absence of obesity. *The Journal of physiology*, v. 593, n. 1, p. 285–303, jan. 2015.

BI, S. et al. Differential roles for cholecystokinin receptors in energy balance in rats and mice. *Endocrinology*, v. 145, n. 8, p. 3873–3880, ago. 2004.

BIBBÒ, S. et al. The role of diet on gut microbiota composition. *European review for medical and pharmacological sciences*, v. 20, n. 22, p. 4742–4749, nov. 2016.

BIDDINGER, J. E.; FOX, E. A. Reduced intestinal brain-derived neurotrophic factor increases vagal sensory innervation of the intestine and enhances satiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 34, n. 31, p. 10379–10393, jul. 2014.

BJØRBAEK, C. et al. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *The Journal of biological chemistry*, v. 274, n. 42, p. 30059–30065, out. 1999.

BLISS, E. S.; WHITESIDE, E. The Gut-Brain Axis, the Human Gut Microbiota and Their Integration in the Development of Obesity. *Frontiers in physiology*, v. 9, p. 900, 2018.

BLUNDELL, J. Making claims: functional foods for managing appetite and weight. *Nature reviews. Endocrinology*, v. 6, n. 1, p. 53–56, jan. 2010.

BORGES, B. DE C. et al. Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPS-induced leptin resistance in male rats. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 308, n. 1, p. E40-50, jan. 2015.

BOUROS, D. et al. Smoking acutely increases plasma ghrelin concentrations. *Clinical chemistry England*, abr. 2006.

BOWCUTT, R. et al. Heterogeneity across the murine small and large intestine. *World journal of gastroenterology*, v. 20, n. 41, p. 15216–15232, nov. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO BÁSICA. *Obesidade*. Brasília: [s.n.].

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE ANÁLISE EM SAÚDE E VIGILÂNCIA DE DOENÇAS NÃO TRANSMISSÍVEIS. *Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estad*. Brasília: [s.n.]. Disponível em:

<<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>>.

BREIT, S. et al. Vagus Nerve as Modulator of the Brain-Gut Axis in Psychiatric and Inflammatory Disorders. *Frontiers in psychiatry*, v. 9, p. 44, 2018.

BROWN, A. J. et al. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *The Journal of biological chemistry*, v. 278, n. 13, p. 11312–11319, mar. 2003.

BROWNING, K. N.; VERHEIJDEN, S.; BOECKXSTAENS, G. E. The Vagus Nerve in Appetite Regulation, Mood, and Intestinal Inflammation. *Gastroenterology*, v. 152, n. 4, p. 730–744, mar. 2017.

BRUBAKER, P. L.; ANINI, Y. Direct and indirect mechanisms regulating secretion of glucagon-like peptide-1 and glucagon-like peptide-2. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, v. 81, n. 11, p. 1005–1012, nov. 2003.

BUGAJSKI, A. J. et al. Effect of long-term vagal stimulation on food intake and body weight during diet induced obesity in rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 58 Suppl 1, p. 5–12, mar. 2007.

CALDERONE, A. et al. Psychopathological Behaviour and Cognition in Morbid Obesity. *Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery*, v. 10, n. 2, p. 112–118, 2017.

CAMILLERI, M. et al. Intra-abdominal vagal blocking (VBLOC therapy): clinical results with a new implantable medical device. *Surgery*, v. 143, n. 6, p. 723–731, jun. 2008.

CANFORA, E. E.; JOCKEN, J. W.; BLAAK, E. E. Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature reviews. Endocrinology*, v. 11, n. 10, p. 577–591, out. 2015.

CANI, P. D. et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, v. 56, n. 7, p. 1761–1772, jul. 2007.

CANI, P. D. et al. Microbial regulation of organismal energy homeostasis. *Nature metabolism*, v. 1, n. 1, p. 34–46, jan. 2019.

CHAMBERS, E. S. et al. Effects of targeted delivery of propionate to the human colon on appetite regulation, body weight maintenance and adiposity in overweight adults. *Gut*, v. 64, n. 11, p. 1744–1754, nov. 2015.

CHAMBERS, E. S.; MORRISON, D. J.; FROST, G. Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? *The Proceedings of the Nutrition Society*, v. 74, n. 3, p. 328–336, ago. 2015.

CHANDRA, R.; LIDDLE, R. A. Cholecystokinin. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, v. 14, n. 1, p. 63–67, fev. 2007.

CHERBUT, C. et al. Short-chain fatty acids modify colonic motility through nerves and polypeptide YY release in the rat. *The American journal of physiology*, v. 275, n. 6, p. G1415–22, dez. 1998.

CHI, L. et al. Nicotine Alters the Gut Microbiome and Metabolites of Gut-Brain Interactions in a Sex-Specific Manner. *Chemical research in toxicology*, v. 30, n. 12, p. 2110–2119, dez. 2017.

CIRIELLO, J.; CAVERSON, M. M. Effect of estrogen on vagal afferent projections to the brainstem in the female. *Brain research*, v. 1636, p. 21–42, abr. 2016.

COLLEN, A. 10% humano. Rio de Janeiro: Sextante, 2016.

CONCEIÇÃO, E. P. S. et al. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*, v. 43, n. 7, p. 513–516, jun. 2011.

CONCEIÇÃO, E. P. S. et al. Calcium reduces vitamin D and glucocorticoid receptors in the visceral fat of obese male rats. *The Journal of endocrinology*, v. 230, n. 2, p. 263–274, ago. 2016.

CONCEIÇÃO, E. P. S. et al. Dietary calcium supplementation in adult rats reverts brown adipose tissue dysfunction programmed by postnatal early overfeeding. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 39, p. 117–125, jan. 2017.

COSTA, V. M. G. et al. Effect of postnatal overfeeding on the male and female Wistar rat reproductive parameters. *Journal of developmental origins of health and disease*, v. 10, n. 6, p. 667–675, dez. 2019.

COWLEY, M. A. et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*, v. 37, n. 4, p. 649–661, fev. 2003.

CUNHA, A. C. DE S. R. et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 20, n. 6, p. 435–442, jun. 2009.

CUSSOTTO, S. et al. Psychotropics and the Microbiome: a Chamber of Secrets.... *Psychopharmacology*, v. 236, n. 5, p. 1411–1432, maio 2019.

D'ADESKY, N. D. et al. Nicotine Alters Estrogen Receptor-Beta-Regulated Inflammasome Activity and Exacerbates Ischemic Brain Damage in Female Rats. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 5, abr. 2018.

D'ALESSIO, D. Is GLP-1 a hormone: Whether and When? *Journal of diabetes investigation*, v. 7 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 50–55, abr. 2016.

DALY, D. M. et al. Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse. *The Journal of physiology*, v. 589, n. Pt 11, p. 2857–2870, jun. 2011.

DANIEL, P. M. Anatomy of the hypothalamus and pituitary gland. *Journal of clinical pathology. Supplement (Association of Clinical Pathologists)*, v. 7, p. 1–7, 1976.

DATE, Y. et al. The role of the gastric afferent vagal nerve in ghrelin-induced feeding and growth hormone secretion in rats. *Gastroenterology*, v. 123, n. 4, p. 1120–1128, out. 2002.

DATE, Y. Ghrelin and the vagus nerve. *Methods in enzymology*, v. 514, p. 261–269, 2012.

DE CASTRO, J. M. The control of food intake of free-living humans: putting the pieces back together. *Physiology & behavior*, v. 100, n. 5, p. 446–453, jul. 2010.

DE LA CUESTA-ZULUAGA, J. et al. Higher Fecal Short-Chain Fatty Acid Levels Are Associated with Gut Microbiome Dysbiosis, Obesity, Hypertension and Cardiometabolic Disease Risk Factors. *Nutrients*, v. 11, n. 1, dez. 2018.

DE LA SERRE, C. B.; DE LARTIGUE, G.; RAYBOULD, H. E. Chronic exposure to low dose bacterial lipopolysaccharide inhibits leptin signaling in vagal afferent neurons. *Physiology & behavior*, v. 139, p. 188–194, fev. 2015.

DE LARTIGUE, G. 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 MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. F. Neonatal programming of neuroimmunomodulation--role of adipocytokines and neuropeptides. *Neuroimmunomodulation*, v. 15, n. 3, p. 176–188, 2008.

DE OLIVEIRA, E. et al. Neonatal nicotine exposure causes insulin and leptin resistance and inhibits hypothalamic leptin signaling in adult rat offspring. *The Journal of endocrinology*, v. 206, n. 1, p. 55–63, jul. 2010.

DE VADDER, F. et al. Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via

gut-brain neural circuits. *Cell*, v. 156, n. 1–2, p. 84–96, jan. 2014.

DE WOLFF, M. G. et al. Prevalence and predictors of maternal smoking prior to and during pregnancy in a regional Danish population: a cross-sectional study. *Reproductive health*, v. 16, n. 1, p. 82, jun. 2019.

DEN BESTEN, G. et al. Short-Chain Fatty Acids Protect Against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -Dependent Switch From Lipogenesis to Fat Oxidation. *Diabetes*, v. 64, n. 7, p. 2398–2408, jul. 2015.

DIAMANT, M.; BLAAK, E. E.; DE VOS, W. M. Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes? *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, v. 12, n. 4, p. 272–281, abr. 2011.

DICKSON, S. L. et al. Blockade of central nicotine acetylcholine receptor signaling attenuate ghrelin-induced food intake in rodents. *Neuroscience*, v. 171, n. 4, p. 1180–1186, dez. 2010.

DIETRICH, M. O.; HORVATH, T. L. Hypothalamic control of energy balance: insights into the role of synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*, v. 36, n. 2, p. 65–73, fev. 2013.

DRUCKER, D. J.; HABENER, J. F.; HOLST, J. J. Discovery, characterization, and clinical development of the glucagon-like peptides. *The Journal of clinical investigation*, v. 127, n. 12, p. 4217–4227, dez. 2017.

DUNN, I. C. et al. Decreased expression of the satiety signal receptor CCKAR is responsible for increased growth and body weight during the domestication of chickens. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 304, n. 9, p. E909–21, maio 2013.

DURANTI, S. et al. *Bifidobacterium adolescentis* as a key member of the human gut microbiota in the production of GABA. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 14112, ago. 2020.

EISSELE, R. et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *European journal of clinical investigation*, v. 22, n. 4, p. 283–291, abr. 1992.

ELLSWORTH, L. et al. Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. *Reproduction (Cambridge, England)*, v. 156, n. 2, p. R23–R42, ago. 2018.

ENGELSTOFT, M. S. et al. Seven transmembrane G protein-coupled receptor repertoire of gastric ghrelin cells. *Molecular metabolism*, v. 2, n. 4, p. 376–392, 2013.

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. R1104–13, jun. 1991.

FLUITMAN, K. S. et al. Potential of butyrate to influence food intake in mice and men. *Gut*, v. 67, n. 7, p. 1203–1204, jul. 2018.

FOTHERGILL, L. J.; FURNESS, J. B. Diversity of enteroendocrine cells investigated at cellular and subcellular levels: the need for a new classification scheme. *Histochemistry and cell biology*, v. 150, n. 6, p. 693–702, dez. 2018.

FOX, E. A.; MURPHY, M. C. Factors regulating vagal sensory development: potential role in obesities of developmental origin. *Physiology & behavior*, v. 94, n. 1, p. 90–104, abr. 2008.

FROST, G. et al. The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism. *Nature communications*, v. 5, p. 3611, abr. 2014.

FUKE, N. et al. Regulation of Gut Microbiota and Metabolic Endotoxemia with Dietary Factors. *Nutrients*, v. 11, n. 10, set. 2019.

GALLEGO, D. et al. Mechanisms responsible for neuromuscular relaxation in the gastrointestinal tract. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*, v. 108, n. 11, p. 721–731, nov. 2016.

GALLMANN, E. et al. Effect of CCK-8 on insulin-induced hyperphagia and hypothalamic orexigenic neuropeptide expression in the rat. *Peptides*, v. 26, n. 3, p. 437–445, mar. 2005.

GARCÍA-FLORES, C. L. et al. [Satiation and satiety in the regulation of energy intake]. *Revista medica de Chile*, v. 145, n. 9, p. 1172–1178, set. 2017.

GASPARINI, S. et al. Central afferents to the nucleus of the solitary tract in rats and mice. *The Journal of comparative neurology*, v. 528, n. 16, p. 2708–2728, nov. 2020.

GIL, K. et al. Physiological and morphological effects of long-term vagal stimulation in diet induced obesity in rats. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 60 Suppl 3, p. 61–66, out. 2009.

GILL, S. R. et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science (New York, N.Y.)*, v. 312, n. 5778, p. 1355–1359, jun. 2006.

GODFREY, K. M.; COSTELLO, P. M.; LILLYCROP, K. A. Development, Epigenetics and Metabolic Programming. *Nestle Nutrition Institute workshop series*, v. 85, p. 71–80, 2016.

GRILL, H. J. A Role for GLP-1 in Treating Hyperphagia and Obesity. *Endocrinology*, v. 161, n. 8, ago. 2020.

GUARINO, D. et al. The Role of the Autonomic Nervous System in the Pathophysiology of Obesity. *Frontiers in physiology*, v. 8, p. 665, 2017.

GUIL, S.; ESTELLER, M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 41, n. 1, p. 87–95, jan. 2009.

HABBOU, A. et al. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *The Journal of nutrition*, v. 143, n. 5, p. 553–562, maio 2013.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v. 35, n. 7, p. 595–601, jul. 1992.

HALUSKOVÁ, J. Epigenetic studies in human diseases. *Folia biologica*, v. 56, n. 3, p. 83–96, 2010.

HERNÁNDEZ, M. A. G. et al. The Short-Chain Fatty Acid Acetate in Body Weight Control and Insulin Sensitivity. *Nutrients*, v. 11, n. 8, ago. 2019.

HONDA, T. et al. Differential Gene Expression of CCK(A) and CCK(B) Receptors in the Rat Brain. *Molecular and cellular neurosciences*, v. 4, n. 2, p. 143–154, abr. 1993.

HORNE, R. G. et al. High Fat-High Fructose Diet-Induced Changes in the Gut Microbiota Associated with Dyslipidemia in Syrian Hamsters. *Nutrients*, v. 12, n. 11, nov. 2020.

HUNT, R. H. et al. The stomach in health and disease. *Gut*, v. 64, n. 10, p. 1650–1668, out. 2015.

ISKEN, F. et al. Effects of long-term soluble vs. insoluble dietary fiber intake on high-fat diet-induced obesity in C57BL/6J mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 21, n. 4, p. 278–284, abr. 2010.

ITO, M. et al. Effects of transgalactosylated disaccharides on the human intestinal microflora and their metabolism. *Journal of nutritional science and vitaminology*, v. 39, n. 3, p. 279–288, jun. 1993.

JACKSON, A. et al. Diet in Parkinson's Disease: Critical Role for the Microbiome. *Frontiers in neurology*, v. 10, p. 1245, 2019.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, v. 21, n. 29, p. 8787–8803, ago. 2015.

JIAO, A. et al. Short chain fatty acids could prevent fat deposition in pigs via regulating related hormones and genes. *Food & function*, v. 11, n. 2, p. 1845–1855, fev. 2020.

KANATANI, A. et al. Role of the Y1 receptor in the regulation of neuropeptide Y-mediated feeding: comparison of wild-type, Y1 receptor-deficient, and Y5 receptor-deficient mice. *Endocrinology*, v. 141, n. 3, p. 1011–1016, mar. 2000.

KANOSKI, S. E.; HAYES, M. R.; SKIBICKA, K. P. GLP-1 and weight loss: unraveling the diverse neural circuitry. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 310, n. 10, p. R885-95, maio 2016.

KEIRE, D. A. et al. Structure and receptor binding of PYY analogs. *Peptides*, v. 23, n. 2, p. 305–321, fev. 2002.

KENTISH, STEPHEN; FRISBY, CLAUDINE; WITTERT, G. A. No Title. Modulation of gastric vagal afferent satiety signals by the mouse estrus cycle and 17 β -estradiol: UEG Week 2014 Oral Presentations (Abstract) United European Gastroenterology Conference. Anais...Vienna: 2014

KENTISH, S. et al. Diet-induced adaptation of vagal afferent function. *The Journal of physiology*, v. 590, n. 1, p. 209–221, jan. 2012.

KIMURA, I. et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature communications*, v. 4, p. 1829, 2013.

KLINGBEIL, E.; DE LA SERRE, C. B. Microbiota modulation by eating patterns and diet composition: impact on food intake. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 315, n. 6, p. R1254–R1260, dez. 2018.

KLOK, M. D.; JAKOBSDOTTIR, S.; DRENT, M. L. The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, v. 8, n. 1, p. 21–34, jan. 2007.

KOBAYASHI, K. et al. Nicotine directly affects milk production in lactating mammary epithelial cells concurrently with inactivation of STAT5 and glucocorticoid receptor in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, v. 63, p. 104741, mar. 2020.

KOBELT, P. et al. CCK inhibits the orexigenic effect of peripheral ghrelin. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 288, n. 3, p. R751-8, mar. 2005.

KOH, A. et al. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, v. 165, n. 6, p. 1332–1345, jun. 2016.

KOJIMA, M.; KANGAWA, K. Ghrelin: structure and function. *Physiological reviews*, v. 85, n. 2, p. 495–522, abr. 2005.

KONDO, T. et al. Acetic acid upregulates the expression of genes for fatty acid oxidation enzymes in liver to suppress body fat accumulation. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 13, p. 5982–5986, jul. 2009.

KONTUREK, S. J. et al. Brain-gut axis and its role in the control of food intake. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society*, v. 55, n. 1 Pt 2, p. 137–154, mar. 2004.

KRIEGER, J.-P. Intestinal glucagon-like peptide-1 effects on food intake: Physiological relevance and emerging mechanisms. *Peptides*, v. 131, p. 170342, set. 2020.

LECHAN, R. M.; TONI, R. Functional Anatomy of the Hypothalamus and Pituitary. In: FEINGOLD, K. R. et al. (Eds.). . South Dartmouth (MA): [s.n.].

LEE, H. et al. Increased leptin and decreased ghrelin level after smoking cessation. *Neuroscience letters*, v. 409, n. 1, p. 47–51, nov. 2006.

LEY, R. E. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, v. 444, n. 7122, p. 1022–1023, dez. 2006.

LIDDLE, R. A. Regulation of cholecystokinin secretion in humans. *Journal of gastroenterology*, v. 35, n. 3, p. 181–187, 2000.

LLEWELLYN-SMITH, I. J. et al. Preproglucagon (PPG) neurons innervate neurochemically identified autonomic neurons in the mouse brainstem. *Neuroscience*, v. 229, p. 130–143, jan. 2013.

LO, C. 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, maio 2014.

LOUIS, P.; FLINT, H. J. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, v. 19, n. 1, p. 29–41, jan. 2017.

MACDONALD, A. J. et al. Regulation of food intake by astrocytes in the brainstem dorsal vagal complex. *Glia*, v. 68, n. 6, p. 1241–1254, jun. 2020.

MACDONALD, A. J.; ELLACOTT, K. L. J. Astrocytes in the nucleus of the solitary tract: Contributions to neural circuits controlling physiology. *Physiology & behavior*, v. 223, p. 112982, set. 2020.

MACFARLANE, S.; MACFARLANE, G. T. Regulation of short-chain fatty acid production. *The Proceedings of the Nutrition Society*, v. 62, n. 1, p. 67–72, fev. 2003.

MADUREIRA, J. et al. The importance of socioeconomic position in smoking, cessation and environmental tobacco smoke exposure during pregnancy. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 15584, set. 2020.

MAFFIULETTI, N.A.; RATEL, S.; SARTORIO, A.; MARTIN, V. The impact of obesity on in vivo human skeletal muscle function. *Curr Obes Rep*, v. 2, p. 251–260, 2013.

MANDY, M.; NYIRENDA, M. Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *International health*, v. 10, n. 2, p. 66–70, mar. 2018.

MARQUES, C. et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. *Adipocyte*, v. 5, n. 1, p. 11–21, 2016.

MATTEI, D.; PIETROBELLI, A. Micronutrients and Brain Development. *Current nutrition reports*, v. 8, n. 2, p. 99–107, jun. 2019.

MAYNERIS-PERXACHS, J.; SWANN, J. R. Metabolic phenotyping of malnutrition during the first 1000 days of life. *European journal of nutrition*, v. 58, n. 3, p. 909–930, abr. 2019.

MCLEAN, C.; JUN, S.; KOZYRSKYJ, A. Impact of maternal smoking on the infant gut microbiota and its association with child overweight: a scoping review. *World journal of pediatrics : WJP*, v. 15, n. 4, p. 341–349, ago. 2019.

MIRANDA, R. A. et al. Thyroid redox imbalance in adult Wistar rats that were exposed to nicotine during breastfeeding. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 15646, set. 2020.

MIRANDA, R. A.; GASPAR DE MOURA, E.; LISBOA, P. C. Tobacco smoking during breastfeeding increases the risk of developing metabolic syndrome in adulthood: Lessons from experimental models. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 144, p. 111623, out. 2020.

MIYASAKA, K.; FUNAKOSHI, A. Cholecystokinin and cholecystokinin receptors. *Journal of gastroenterology*, v. 38, n. 1, p. 1–13, 2003.

MORITA-TAKEMURA, S.; WANAKA, A. Blood-to-brain communication in the hypothalamus for energy intake regulation. *Neurochemistry international*, v. 128, p. 135–142, set. 2019.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, v. 7, n. 3, p. 189–200, maio 2016.

MUKHTAR, K.; NAWAZ, H.; ABID, S. Functional gastrointestinal disorders and gut-brain axis: What does the future hold? *World journal of gastroenterology*, v. 25, n. 5, p. 552–566, fev. 2019.

MÜLLER, T. D. et al. Ghrelin. *Molecular metabolism*, v. 4, n. 6, p. 437–460, jun. 2015.

MURPHY, E. F. et al. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*, v. 59, n. 12, p. 1635–1642, dez. 2010.

MURPHY, M. C.; FOX, E. A. Mice deficient in brain-derived neurotrophic factor have altered development of gastric vagal sensory innervation. *The Journal of comparative neurology*, v. 518, n. 15, p. 2934–2951, ago. 2010.

NAGAI, N. et al. Autonomic nervous system activity and the state and development of obesity in Japanese school children. *Obesity research*, v. 11, n. 1, p. 25–32, jan. 2003.

NAPIERALA, M. et al. Tobacco smoking and breastfeeding: Effect on the lactation process, breast milk composition and infant development. A critical review. *Environmental research*, v. 151, p. 321–338, nov. 2016.

NICHOLSON, J. K. et al. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science (New York, N.Y.)*, v. 336, n. 6086, p. 1262–1267, jun. 2012.

NISHIZAWA, N. et al. Highly potent antiobesity effect of a short-length peptide YY analog in mice. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 25, n. 20, p. 5718–5725, out. 2017.

NISTALA, R.; SAVIN, V. Diabetes, hypertension, and chronic kidney disease progression: role of DPP4. *American journal of physiology. Renal physiology*, v. 312, n. 4, p. F661–F670, abr. 2017.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Intraruminal infusion of propionate alters feeding behavior and decreases energy intake of lactating dairy cows. *The Journal of nutrition*, v. 133, n. 4, p.

1094–1099, abr. 2003.

OKORODUDU, D. O. et al. Diagnostic performance of body mass index to identify obesity as defined by body adiposity: a systematic review and meta-analysis. *International journal of obesity* (2005), v. 34, n. 5, p. 791–799, maio 2010.

OLIVEIRA, E. et al. Short- and long-term effects of maternal nicotine exposure during lactation on body adiposity, lipid profile, and thyroid function of rat offspring. *The Journal of endocrinology*, v. 202, n. 3, p. 397–405, set. 2009.

OLIVEIRA, E. et al. Nicotine exposure affects mother's and pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. *The Journal of endocrinology*, v. 205, n. 2, p. 159–170, maio 2010.

PARK, A. J.; BLOOM, S. R. Neuroendocrine control of food intake. *Current opinion in gastroenterology*, v. 21, n. 2, p. 228–233, mar. 2005.

PEIXOTO, T. C. et al. Nicotine exposure during breastfeeding reduces sympathetic activity in brown adipose tissue and increases in white adipose tissue in adult rats: Sex-related differences. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 140, p. 111328, jun. 2020.

PEIXOTO, T. C. et al. Nicotine exposure during lactation causes disruption of hedonic eating behavior and alters dopaminergic system in adult female rats. *Appetite*, v. 160, p. 105115, jan. 2021.

PELOT, N. A.; BEHREND, C. E.; GRILL, W. M. Modeling the response of small myelinated axons in a compound nerve to kilohertz frequency signals. *Journal of neural engineering*, v. 14, n. 4, p. 46022, ago. 2017.

PELOT, N. A.; GRILL, W. M. Effects of vagal neuromodulation on feeding behavior. *Brain research*, v. 1693, n. Pt B, p. 180–187, ago. 2018.

PENG, X. et al. Estrogen reverses nicotine-induced inflammation in chondrocytes via reducing the degradation of ECM. *International journal of rheumatic diseases*, v. 22, n. 4, p. 666–676, abr. 2019.

PERRY, R. J. et al. Acetate mediates a microbiome-brain- β -cell axis to promote metabolic syndrome. *Nature*, v. 534, n. 7606, p. 213–217, jun. 2016.

PETERS, J. H.; SIMASKO, S. M.; RITTER, R. C. Leptin analog antagonizes leptin effects on food intake and body weight but mimics leptin-induced vagal afferent activation. *Endocrinology*, v. 148, n. 6, p. 2878–2885, jun. 2007.

PINHEIRO, C. R. et al. Maternal nicotine exposure during lactation alters food preference, anxiety-like behavior and the brain dopaminergic reward system in the adult rat offspring. *Physiology & behavior*, v. 149, p. 131–141, out. 2015.

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, jul. 1999.

PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *The Journal of physiology*, v. 587, n. Pt 20, p. 4963–4976, out. 2009.

POGRIBNA, M. et al. Effect of Aloe vera whole leaf extract on short chain fatty acids production by *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium infantis* and *Eubacterium limosum*. *Letters in applied microbiology*, v. 46, n. 5, p. 575–580, maio 2008.

PRECUP, G.; VODNAR, D.-C. Gut Prevotella as a possible biomarker of diet and its eubiotic versus dysbiotic roles: a comprehensive literature review. *The British journal of nutrition*, v. 122, n. 2, p. 131–140, jul. 2019.

PRICE, S. L.; BLOOM, S. R. Protein PYY and its role in metabolism. *Frontiers of hormone research*, v. 42, p. 147–154, 2014.

QIAN, J. et al. Nicotine-Induced Effects on Nicotinic Acetylcholine Receptors (nAChRs), Ca²⁺ and Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in STC-1 Cells. *PloS one*, v. 11, n. 11, p. e0166565, 2016.

QIAO, G.-F. et al. 17Beta-estradiol restores excitability of a sexually dimorphic subset of myelinated vagal afferents in ovariectomized rats. *American journal of physiology. Cell physiology*, v. 297, n. 3, p. C654–64, set. 2009.

RAHAT-ROZENBLOOM, S. et al. Acute increases in serum colonic short-chain fatty acids elicited by inulin do not increase GLP-1 or PYY responses but may reduce ghrelin in lean and overweight humans. *European journal of clinical nutrition*, v. 71, n. 8, p. 953–958, ago. 2017.

RAVAL, A. P. et al. Chronic nicotine exposure inhibits estrogen-mediated synaptic functions in hippocampus of female rats. *Neuroscience letters*, v. 517, n. 1, p. 41–46, maio 2012.

REID, D. T. et al. Postnatal prebiotic fibre intake mitigates some detrimental metabolic outcomes of early overnutrition in rats. *European journal of nutrition*, v. 55, n. 8, p. 2399–2409, dez. 2016.

REINER, D. J. et al. Astrocytes Regulate GLP-1 Receptor-Mediated Effects on Energy Balance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 36, n. 12, p. 3531–3540, mar. 2016.

RENO, C. M. et al. Severe Hypoglycemia-Induced Fatal Cardiac Arrhythmias Are Mediated by the Parasympathetic Nervous System in Rats. *Diabetes*, v. 68, n. 11, p. 2107–2119, nov. 2019.

RICCIO, P.; ROSSANO, R. Diet, Gut Microbiota, and Vitamins D + A in Multiple Sclerosis. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, v. 15, n. 1, p. 75–91, jan. 2018.

RILEY, L. W.; RAPHAEL, E.; FAERSTEIN, E. Obesity in the United States - dysbiosis

from exposure to low-dose antibiotics? *Frontiers in public health*, v. 1, p. 69, 2013.

RINAMAN, L.; LEVITT, P. Establishment of vagal sensorimotor circuits during fetal development in rats. *Journal of neurobiology*, v. 24, n. 5, p. 641–659, maio 1993.

RINNINELLA, E. et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*, v. 7, n. 1, jan. 2019.

RODGERS, R. J.; TSCHÖP, M. H.; WILDING, J. P. H. Anti-obesity drugs: past, present and future. *Disease models & mechanisms*, v. 5, n. 5, p. 621–626, set. 2012.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of physiology*, v. 587, n. Pt 11, p. 2647–2661, jun. 2009.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 22, n. 2, p. 109–117, fev. 2011.

RODRIGUES, V. S. T. et al. Supplementation of suckling rats with cow's milk induces hyperphagia and higher visceral adiposity in females at adulthood, but not in males. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 55, p. 89–103, maio 2018.

RODRÍGUEZ, A. et al. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 309, n. 8, p. E691-714, out. 2015.

ROMERO-CORRAL, A. et al. Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. *European heart journal*, v. 31, n. 6, p. 737–746, mar. 2010.

RORATO, R. et al. LPS-Induced Low-Grade Inflammation Increases Hypothalamic JNK Expression and Causes Central Insulin Resistance Irrespective of Body Weight Changes. *International journal of molecular sciences*, v. 18, n. 7, jul. 2017.

ROSADO, C. P. et al. Green banana flour supplementation improves obesity-associated systemic inflammation and regulates gut microbiota profile in high-fat diet-fed mice. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, jun. 2021.

SALLAM, H. S.; CHEN, J. D. Z. Colon electrical stimulation: potential use for treatment of obesity. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, v. 19, n. 9, p. 1761–1767, set. 2011.

SAM, A. H. et al. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology*, v. 63, n. 1, p. 46–56, jul. 2012.

SANDOVAL, D. A.; D'ALESSIO, D. A. Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease. *Physiological reviews*, v. 95, n. 2, p. 513–548, abr. 2015.

SANTONICOLA, A. et al. Eating Disorders and Gastrointestinal Diseases. *Nutrients*, v. 11, n. 12, dez. 2019.

SANTOS-SILVA, A. P. et al. Neonatal nicotine exposure alters leptin signaling in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in the late postnatal period and adulthood in rats. *Life sciences*, v. 87, n. 5–6, p. 187–195, jul. 2010.

SAVIN, Z. et al. Smoking and the intestinal microbiome. *Archives of microbiology*, v. 200, n. 5, p. 677–684, jul. 2018.

SCHEMANN, M.; NEUNLIST, M. The human enteric nervous system. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, v. 16 Suppl 1, p. 55–59, abr. 2004.

SCHEPPER, J. D. et al. Probiotic *Lactobacillus reuteri* Prevents Postantibiotic Bone Loss by Reducing Intestinal Dysbiosis and Preventing Barrier Disruption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 34, n. 4, p. 681–698, abr. 2019.

SCHWARTZ, G. J. Brainstem integrative function in the central nervous system control of food intake. *Forum of nutrition*, v. 63, p. 141–151, 2010.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. *Nature*, v. 404, n. 6778, p. 661–671, abr. 2000.

SCHWIERTZ, A. et al. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, v. 18, n. 1, p. 190–195, jan. 2010.

SEALOCK, T.; SHARMA, S. Smoking Cessation. In: *Treasure Island (FL)*: [s.n.].

ŠEFČÍKOVÁ, Z. et al. Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. *Physiological research*, v. 60, n. 2, p. 337–346, 2011.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, v. 90, n. 3, p. 859–904, jul. 2010.

SHIN, N.-R.; WHON, T. W.; BAE, J.-W. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in biotechnology*, v. 33, n. 9, p. 496–503, set. 2015.

SILVA-VEIGA, F. M. et al. Gut-liver axis modulation in fructose-fed mice: a role for PPAR-alpha and linagliptin. *The Journal of endocrinology*, v. 247, n. 1, p. 11–24, out. 2020.

SMEDBERG, J. et al. Characteristics of women who continue smoking during pregnancy: a cross-sectional study of pregnant women and new mothers in 15 European countries. *BMC pregnancy and childbirth*, v. 14, p. 213, jun. 2014.

SOBRINO CRESPO, C. et al. Peptides and food intake. *Frontiers in endocrinology*, v. 5, p. 58, 2014.

STEINERT, R. 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. *Physiological reviews*, v. 97, n. 1, p. 411–463, jan. 2017.

STOJAKOVIC, A. et al. Effects of nicotine on homeostatic and hedonic components of food intake. *The Journal of endocrinology*, v. 235, n. 1, p. R13–R31, out. 2017.

SUN, L. et al. Insights into the role of gut microbiota in obesity: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic perspectives. *Protein & cell*, v. 9, n. 5, p. 397–403, maio 2018.

SUN, M. et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *Journal of gastroenterology*, v. 52, n. 1, p. 1–8, jan. 2017.

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

SVENDSEN, B. et al. An analysis of cosecretion and coexpression of gut hormones from male rat proximal and distal small intestine. *Endocrinology*, v. 156, n. 3, p. 847–857, mar. 2015.

SZILAGYI, A. Redefining lactose as a conditional prebiotic. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie*, v. 18, n. 3, p. 163–167, mar. 2004.

TAMBURINI, S. et al. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature medicine*, v. 22, n. 7, p. 713–722, jul. 2016.

TANNER, J.-A.; CHENOWETH, M. J.; TYNDALE, R. F. Pharmacogenetics of nicotine and associated smoking behaviors. *Current topics in behavioral neurosciences*, v. 23, p. 37–86, 2015.

TAŞÇI, S. K.; BINGÖL, S. A. GLP-1 Localisation and Proglucagon Gene Expression in Healthy and Diabetic Mouse Ileum. *Journal of veterinary research*, v. 62, n. 2, p. 237–242, jun. 2018.

TERRILL, S. J. et al. Role of lateral septum glucagon-like peptide 1 receptors in food intake. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 311, n. 1, p. R124–32, jul. 2016.

THON, M.; HOSOI, T.; OZAWA, K. Possible Integrative Actions of Leptin and Insulin Signaling in the Hypothalamus Targeting Energy Homeostasis. *Frontiers in endocrinology*, v. 7, p. 138, 2016.

TOLHURST, G. et al. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, v. 61, n. 2, p. 364–371, fev. 2012.

TRAVAGLI, R. A. et al. Brainstem circuits regulating gastric function. *Annual review of physiology*, v. 68, p. 279–305, 2006.

TREMBLAY, A.; BELLISLE, F. Nutrients, satiety, and control of energy intake. *Applied*

physiology, nutrition, and metabolism = *Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, v. 40, n. 10, p. 971–979, out. 2015.

TSENG, C.-H.; WU, C.-Y. The gut microbiome in obesity. *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, v. 118 Suppl, p. S3–S9, mar. 2019.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, v. 444, n. 7122, p. 1027–1031, dez. 2006.

UENO, H. et al. The role of PYY in feeding regulation. *Regulatory peptides*, v. 145, n. 1–3, p. 12–16, jan. 2008.

UENO, H.; NAKAZATO, M. Mechanistic relationship between the vagal afferent pathway, central nervous system and peripheral organs in appetite regulation. *Journal of diabetes investigation*, v. 7, n. 6, p. 812–818, nov. 2016.

UNAMUNO, X. et al. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. *European journal of clinical investigation*, v. 48, n. 9, p. e12997, set. 2018.

VAL-LAILLET, D. et al. Chronic vagus nerve stimulation decreased weight gain, food consumption and sweet craving in adult obese minipigs. *Appetite*, v. 55, n. 2, p. 245–252, out. 2010.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, v. 18, n. 2, p. 158–168, fev. 2008.

VALDES, A. M. et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ (Clinical research ed.)*, v. 361, p. k2179, jun. 2018.

VELKOSKA, E.; COLE, T. J.; MORRIS, M. J. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 288, n. 6, p. E1236–43, jun. 2005.

VERWAERDE, P. et al. Changes in short-term variability of blood pressure and heart rate during the development of obesity-associated hypertension in high-fat fed dogs. *Journal of hypertension*, v. 17, n. 8, p. 1135–1143, ago. 1999.

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

VOLK, N.; LACY, B. Anatomy and Physiology of the Small Bowel. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*, v. 27, n. 1, p. 1–13, jan. 2017.

WANG, P.-X. et al. Gut microbiota and metabolic syndrome. *Chinese medical journal*, v. 133, n. 7, p. 808–816, abr. 2020.

WHO. Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. p. 252, 1999.

WILLIAMS, J. A. Cholecystikinin (CCK) Regulation of Pancreatic Acinar Cells: Physiological Actions and Signal Transduction Mechanisms. *Comprehensive Physiology*, v. 9, n. 2, p. 535–564, mar. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2000–2025. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/272694/9789241514170-eng.pdf?ua=1>>.

WOZNIAK, S. et al. The large intestine from fetal period to adulthood and its impact on the course of colonoscopy. *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft*, v. 224, p. 17–22, jul. 2019.

XAVIER, J. L. 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 Ciencias*, v. 91, n. 1, p. e20170971, mar. 2019.

XU, S.-J. et al. Effect of lipopolysaccharide on expression and characterization of cholecystikinin receptors in rat pulmonary interstitial macrophages. *Acta pharmacologica Sinica*, v. 25, n. 10, p. 1347–1353, out. 2004.

XUE, H. et al. Lactose-Induced Chronic Diarrhea Results From Abnormal Luminal Microbial Fermentation and Disorder of Ion Transport in the Colon. *Frontiers in physiology*, v. 11, p. 877, 2020.

YAN, X.-J. et al. Vagal afferents mediate antinociception of estrogen in a rat model of visceral pain: the involvement of intestinal mucosal mast cells and 5-hydroxytryptamine 3 signaling. *The journal of pain*, v. 15, n. 2, p. 204–217, fev. 2014.

YANG, I.; NELL, S.; SUERBAUM, S. Survival in hostile territory: the microbiota of the stomach. *FEMS microbiology reviews*, v. 37, n. 5, p. 736–761, set. 2013.

YATSUNENKO, T. et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, v. 486, n. 7402, p. 222–227, maio 2012.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Maternal nicotine exposure during lactation alters hypothalamic neuropeptides expression in the adult rat progeny. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 58, p. 158–168, ago. 2013.

YOUNES-RAPOZO, V. et al. Neonatal Nicotine Exposure Leads to Hypothalamic Gliosis in Adult Overweight Rats. *Journal of neuroendocrinology*, v. 27, n. 12, p. 887–898, dez. 2015.

YPSILANTIS, P. et al. A rat model of cigarette smoke abuse liability. *Comparative medicine*, v. 62, n. 5, p. 395–399, out. 2012.

YU, Y.-H. Making sense of metabolic obesity and hedonic obesity. *Journal of diabetes*, v. 9, n. 7, p. 656–666, jul. 2017.

YUAN, H.; SILBERSTEIN, S. D. Vagus Nerve and Vagus Nerve Stimulation, a

Comprehensive Review: Part I. Headache, v. 56, n. 1, p. 71–78, jan. 2016.

ZHANG, W. et al. Functional interaction between Ghrelin and GLP-1 regulates feeding through the vagal afferent system. *Scientific reports*, v. 10, n. 1, p. 18415, out. 2020.

ZHAO, T.-J. et al. Ghrelin secretion stimulated by β 1-adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 36, p. 15868–15873, set. 2010.

ZHAO, X.-Y. et al. Cholecystokinin octapeptide improves cardiac function by activating cholecystokinin octapeptide receptor in endotoxic shock rats. *World journal of gastroenterology*, v. 11, n. 22, p. 3405–3410, jun. 2005.

ZHENG, H. et al. Glutamatergic phenotype of glucagon-like peptide 1 neurons in the caudal nucleus of the solitary tract in rats. *Brain structure & function*, v. 220, n. 5, p. 3011–3022, set. 2015.

ZHOU, J. et al. Dietary resistant starch upregulates total GLP-1 and PYY in a sustained day-long manner through fermentation in rodents. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, v. 295, n. 5, p. E1160-6, nov. 2008.