UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

LUCAS KNISS DEBARBA

**Efeitos da programação nutricional neonatal em células da glia hipotalâmica em
ratos juvenis e adultos**

Ribeirão Preto – SP

2017

LUCAS KNISS DEBARBA

**Efeitos da programação nutricional neonatal em células da glia hipotalâmica em
ratos juvenis e adultos**

Versão Original

Tese apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Professora Dra. Lucila Leico
Kagohara Elias

**Ribeirão Preto
2017**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Debarba, Lucas Kniess

Efeitos da programação nutricional neonatal em células da glia hipotalâmica em ratos juvenis e adultos/ Lucas Kniess Debarba; Orientadora, Lucila Leico Kagohara Elias. –2017

196f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências) Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

1. Programação nutricional neonatal. 2. Glia. 3. Hipotálamo. 4. Obesidade. 5. Leptina. 6. TCPTP – T-cell protein tyrosine phosphatase. 7. CX30 – conexina 30. 8. CX43 – conexina 43. I. Lucila Leico Kagohara Elias, orient. II. Título.

Nome: Lucas Kniess Debarba

Título: Efeitos da programação nutricional neonatal em células da glia hipotalâmica em ratos juvenis e adultos.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor Ciências (área de concentração: Fisiologia).

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____
Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Lucia Kniess Debarba e Eugênio Carlos Debarba. Dedico à minha mãe por seu especial carinho, zelo, amor e ternura, pelas infindáveis vezes que me ouviu aos meus choros e minhas lamúrias. Pela palavra doce e o consolo pertinente, que refrigeraram minh'alma e fizeram me caminhar avante. Bem como, ao meu pai e minha irmã Alice Kniess Debarba Ludvig, pelo total apoio e incentivo.

Aos meus sobrinhos, Gabriel Debarba Ludvig e Rafael Debarba Ludvig, pela ternura e amor que a mim dedicam, pelo brilho no olhar e pelo abraço apertado a cada reencontro, que transcende palavras e o tempo.

AGRADECIMENTOS

À vida e a toda energia que a ela rege, pela oportunidade de renovação constante, aprimoramento e desenvolvimento humanístico e intelectual.

Aos meus pais, Lucia e Eugênio, que amo imensamente, pelo apoio, zelo e amor incondicional.

Aos meus sobrinhos Gabriel e Rafael, a quem muito amo sem medidas, pelo seu afeto e amor.

À minha irmã Alice, e meu cunhado Fabiano, pelo apoio, carinho e incentivo.

Aos meus avós Jerônimo Kniess (*in memoriam*) e Luzia Heidemann Kniess (*in memoriam*), pelo auxílio prestado na minha formação moral e na imensa sabedoria compartilhada e pelos nossos laços amorosos que se perpetuam na eternidade.

Aos grandes amigos da pós-graduação, parceiros e colaboradores: Beatriz Borges, Fernanda Maria Veanholi Vechiato, Hellen Veida, Heloísa Della Coletta Francescato, Jade Venâncio, Juliana B. Medeiros de Lima, Márcia Umeoka, Nayara Pestana, Ricardo Coletti e Rodrigo C. Rorato pela disposição em me ouvir, auxiliar e discutir tanto no âmbito das fragilidades humanas assim como do raciocínio científico.

Aos meus grandes amigos, conselheiros e incentivadores que Ribeirão Preto me concedeu, Eduardo Augusto S. Buzzatto, João Marco Pádua, Samuel Barroso e Vinícius Warisaia.

Aos meus amigos catarinenses, irmãos de alma, que o afeto, o abraço e o brilho no olhar sempre foram os maiores presentes que recebi a cada reencontro, Denize Ramos, Natália Saretta Sulzbach, Thays Saretta Sulzbach e Juliana Bordin.

Aos colegas do Laboratório de Neuroendocrinologia: Abner Borges, Ana Luíza Romero, André Mecawi, Carla Martins, Ernane Uchôa, Fabiana L. de Oliveira, Gislaine Almeida, Lisandra Margatho, Paula Marangon, Priscila Rivas, Silvia Ruginsk, Sabrina Tristão, Susana Cognuck, Tatiane Franco, Rafaella Volpi, Vanessa Cunha e Wagner Reis. Obrigado pela amizade, discussões, auxílio e incentivo.

As alunas Ana Luiza Romero e Carolina Mesquita pelo auxílio na elaboração da figura representativa do trabalho.

Aos profissionais técnicos: Lilian Eslaine, Maria Valci Santos, Milene Mantovani, Roberta Rosales e Rubens Melo, o meu muito obrigado pelo trabalho prestado, a instrução, a cooperação e a amizade.

Aos profissionais da secretaria, Cláudia de Barcello Vanzela, Elisa Maria Aleixo, Fernando Cesar Rastello e Igor Mateus da Silva, pela solicitude, agilidade e carinho.

À CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro, sem o qual a realização desta pesquisa não seria possível.

Ao professor Dr. José Antunes Rodrigues, referência como pesquisador na área de neuroendocrinologia e exemplo humanístico. Agradeço imensamente sua chefia, por todo empenho na qualidade, manutenção, organização e na harmonia do laboratório. Agradeço também pelas palavras de incentivo, pela amizade, e pelas enormes contribuições de caráter científico.

À professora Dra. Lucila Leico Kagohara Elias, pela orientação, por fomentar imensamente minha formação e amadurecimento científico. Muito obrigado pelas discussões, pelo constante auxílio no desenvolvimento do trabalho, a confiança, amizade e companheirismo.

Se me fosse dado, um dia, uma oportunidade, seguraria todos os meus amigos, que já não sei onde e como estão, e diria: Vocês são extremamente importantes para mim. Dessa forma, eu digo: não deixe de fazer algo que gosta devido à falta de tempo.

Não deixe de ter alguém ao seu lado, ou de fazer algo, por puro medo de ser feliz. A única falta que terá, será desse tempo que infelizmente...não voltará mais.

Mario Quintana

RESUMO

DEBARBA, L.K. **Efeitos da programação nutricional neonatal em células da glia hipotalâmica em ratos juvenis e adultos.** 2017, 196f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As alterações nutricionais no período neonatal são capazes de comprometer o controle hipotalâmico da ingestão alimentar e o metabolismo do indivíduo em fases posteriores do desenvolvimento. Avaliamos as alterações decorrentes do modelo de programação nutricional neonatal em células gliais hipotalâmicas, devido ao seu importante papel na homeostase energética. Os astrócitos possuem função metabólica ativa, e por sua vez, fornecem substrato energético aos neurônios por meio das conexinas 30 (CX30) e 43 (CX43). A CX30, por sua vez, exerce função, também, na manutenção morfológica astrocitária, contribuindo na inserção astrocitária na fenda sináptica, portanto interferindo na neurotransmissão. A TCPTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*) proteína contra-reguladora da sinalização celular da leptina e a insulina participam nos mecanismos de resistência a esses hormônios e está presente em células da glia e possui ação moduladora na atividade de CX43. Sendo assim, a hipótese do presente trabalho é de que alterações em células da glia no hipotálamo participam nos efeitos da programação nutricional neonatal na modulação do balanço energético na vida juvenil e adulta. Para investigarmos essa hipótese, utilizamos o modelo de programação nutricional neonatal de alteração do tamanho da ninhada, sendo a quantidade de filhotes por lactante formada da seguinte maneira: 3 filhotes, ninhada pequena (SL), 10 filhotes, ninhada normal (NL) e de 16 filhotes, ninhada grande (LL). O peso corporal da ninhada foi verificado semanalmente até o desmame, realizado no 21º dia de vida (PN21). Após o desmame, o peso corporal foi verificado a cada cinco dias até o 60º dia de vida (PN60). A ingestão alimentar individual foi determinada entre o PN50 e PN60. Os animais SL apresentaram maior peso corporal ($72,3 \pm 2,08\text{g}$) ao desmame, quando comparados aos grupos NL ($57,2 \pm 3,5\text{g}$) e LL ($36,3 \pm 1,8\text{g}$) e essa diferença entre os grupos foi mantida até o PN60. Observou-se, porém, que a ingestão alimentar dos animais adultos SL, não foi diferente do grupo NL. Todavia, os animais LL apresentaram um ganho de peso reduzido ao desmame, porém, esses animais alcançaram o ganho de peso corporal dos animais NL (NL: $165 \pm 3,97\text{g}$; LL: $145,4 \pm 4,5\text{g}$), a partir do PN35, fenômeno esse associado ao comportamento hiperfágico. No PN21, observou-se no grupo SL um aumento nas concentrações plasmáticas de leptina ($6,4 \pm 0,9\text{ng/ml}$) e insulina ($1,9 \pm 0,15 \text{ ng/ml}$), quando comparado aos grupos NL (leptina: $3,8 \pm 0,3\text{ng/ml}$; insulina: $1,3 \pm 0,2 \text{ ng/ml}$) e LL (leptina: $1,2 \pm 0,1\text{ng/ml}$;

insulina: $1,0 \pm 0,1\text{ng/ml}$). No PN60, ambos os grupos SL (leptina: $5,2 \pm 1,15\text{ng/ml}$; insulina: $2,5 \pm 0,4\text{ng/ml}$) e LL (leptina: $4,3 \pm 0,5\text{ng/ml}$; insulina: $3,4 \pm 0,5\text{ng/ml}$) apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de leptina e insulina, comparados ao grupo NL (leptina: $1,8 \pm 0,4\text{ng/ml}$; insulina: $1,2 \pm 0,1\text{ng/ml}$). Quando avaliada a expressão do RNAm de *Ptpn2*, gene que codifica TCPTP, e a expressão dessa proteína no núcleo arqueado (ARC), observamos um aumento no PN21 no grupo SL e em ambos os grupos no PN60, quando comparados ao grupo NL. O grupo SL apresentou aumento na imunorreatividade para GFAP no PN21 e ambos os grupos apresentaram essa mesma resposta no PN60. O mesmo resultado foi observado na imunorreatividade para a molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado-1 (IBA-1) no PN21 e PN60 nos grupos SL e LL. Houve colocalização da TCPTP com GFAP, porém não com IBA-1. A TCPTP possui ação demonstrada na modulação de CX43, ao investigá-la observou-se no PN21, um aumento na expressão do RNAm de *Gja1*, gene que codifica CX43, assim como na imunorreatividade para CX43 apenas no grupo SL. No PN21 e PN60 observou-se redução da expressão do RNAm de *Gja6*, gene que codifica CX30, em ambos os grupos SL e LL. Observou-se redução na imunorreatividade de CX30 em ambos os grupos, SL e LL no PN60. No PN21, a expressão do RNAm de *Il1b* aumentou no ARC em ambos os grupos SL e LL. No entanto, no PN60, apenas o grupo LL apresentou um aumento da expressão do RNAm de *Il1b*. Adicionalmente, no PN60 ambos os grupos SL e LL apresentaram um aumento na expressão do RNAm de *Tnfa* no ARC. Na análise morfológica das células da glia, no PN21, observou-se no grupo SL um aumento na imunorreatividade do soma da microglia e do astrócito, assim como, nos processos de extensão de ambas as células. No PN60 ambos os grupos apresentaram um aumento na imunorreatividade do soma e dos processos de extensão astrocitários, no entanto, apenas o grupo SL apresentou um aumento na imunorreatividade do soma microglial. Para analisarmos o efeito da leptina na morfologia dos astrócitos e a participação da TCPTP nesse processo, realizamos a cultura primária de astrócitos hipotalâmicos de ratos neonatos que foram estimulados com leptina [1000ng/ml], [5000ng/ml] e LPS [500ng/ml]. O LPS foi utilizado como controle positivo do protocolo. Observamos que os estímulos com leptina e LPS, aumentaram a expressão do RNAm de *Ptpn2*, a imunorreatividade para TCPTP e a área astrocitária. O tratamento com LPS foi capaz de promover um aumento na expressão do RNAm de *Gja1* e o inverso foi observado na expressão de *Gja6*. Todavia, tanto o tratamento com leptina e LPS promoveu aumento na imunorreatividade para CX43 e o inverso observou-se na imunorreatividade para CX30. Para avaliarmos a participação da TCPTP nos efeitos da leptina na morfologia dos astrócitos, realizamos o silenciamento de seu gene, utilizando o siRNA *Ptpn2*. O silenciamento de *Ptpn2* foi capaz de reverter os efeitos da leptina tanto na expressão gênica, na imunorreatividade assim como na morfologia astrocitária. O silenciamento de *Ptpn2* reverteu também as respostas de redução de CX30 e o aumento de CX43 promovidas pelo LPS pela leptina. De maneira inédita esses dados sugerem a importância da TCPTP na modulação das conexinas nos efeitos da leptina e LPS na morfologia astrocitária hipotalâmica. Observamos que apenas o tratamento com LPS foi capaz de promover um aumento na expressão do RNAm de *Ptpn1*, e o silenciamento de *Ptpn2* intensificou esse aumento da expressão de *Ptpn1*, demonstrando de forma inédita

que a TCPTP exerce ação contra regulatória sobre a PTP1B. Como esperado o estímulo dos astrócitos com LPS aumentou a expressão do RNAm de *Il6*, *Il1b* e *Tnfa*. Interessantemente, o silenciamento de *Ptpn2* intensificou esse aumento da expressão do RNAm de *Il6*, *Il1b* e *Tnfa*, demonstrando desse modo que a TCPTP possui ação contra regulatória na secreção dessas citocinas. O conjunto de dados demonstra que a alteração nutricional neonatal é capaz de promover alterações no balanço energético na vida juvenil e adulta. Estas alterações estão associadas a modificações morfológicas das células da glia e ao aumento de citocinas inflamatórias, caracterizando um estado reativo glial. Adicionalmente, demonstramos em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos que a leptina altera a morfologia destas células e pela primeira vez demonstramos, também, que a TCPTP modula esses efeitos da leptina, por meio de suas ações na conexina CX30. A CX30 participa na modulação da morfologia dos astrócitos e sua redução está associada ao aumento na área e nos processos de extensão destas células. Em conclusão, o presente estudo demonstra que alterações na disponibilidade nutricional na vida neonatal acarretam alterações no comportamento alimentar e no peso corporal na vida juvenil e adulta em ratos. Demonstramos, também, que tais alterações nutricionais neonatais estão associadas a alterações em células da glia. A leptina induz alterações morfológicas em astrócitos, sendo este efeito mediado pela TCPTP e sua regulação sobre a expressão da proteína CX30. O conjunto dos dados indica a importância das células não neuronais no controle central da homeostase energética em modelo de programação nutricional neonatal.

Palavras – chave: programação nutricional, hipotálamo, glia, leptina, TCPTP, CX30, CX43.

Abstract

DEBARBA, L.K. **Effects of neonatal nutritional programming on hypothalamic glial cells in juvenile and adult rats**. 2017, 196S. Thesis (Ph.D.) – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, 2017.

Nutritional changes in the neonatal period can affect the hypothalamic control of food intake and metabolism in later life. We evaluated the influence of the neonatal nutritional programming on hypothalamic glial cells, known to play an important role in the energy homeostasis. Astrocytes have active metabolic function and provide energy substrate for the neurons through connexin 43 (CX43). CX30 is important in the maintenance of astrocyte morphology, contributing to the insertion of its process into the synaptic cleft. The TCPTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*) is a counter-regulator of cellular signaling of leptin and insulin, contributing to the molecular mechanisms of resistance to these hormones and it is expressed in glial and modulates CX43 activity. We hypothesized that alterations in the hypothalamic glial cells participate in the long-lasting effects on energy balance induced by neonatal nutritional programming. For this purpose, we used the model of neonatal nutritional programming induced by changing the litter size, according to the number of offspring per dam: 3 offsprings, small litter (SL), 10 offsprings, normal litter (NL) and 16 offsprings, large litter (LL). The body weight of the litter was determined weekly until weaning on the 21st day of life (PN21). After weaning, body weight was determined every five days until the 60th day of life (PN60). Individual dietary intake was determined between PN50 and PN60. The SL animals presented higher body weight ($72.3 \pm 2.08\text{g}$) at weaning, when compared with the NL ($57.19 \pm 3.49\text{g}$) and LL ($36.27 \pm 1.79\text{g}$) groups and the difference between these groups were maintained until the PN60. However, the food intake of adult SL animals was not different from the NL group. On the other hand, LL animals presented a reduced weight gain at weaning but they had a catch up of reaching the body weight of NL animals (NL: $165 \pm 3.97\text{g}$; LL: $145.42 \pm 4.55\text{g}$) from PN35 on, and this response was associated with higher food intake. At PN21, there was an increase in plasma leptin ($6.41 \pm 0.90 \text{ ng/ml}$) and insulin ($1.97 \pm 0.11\text{ng/ml}$) concentrations in the SL group, when compared with the NL group (leptin: $3.79 \pm 0.35\text{ng/ml}$; insulin: $1.32 \pm 0.21\text{ng/ml}$) and LL (leptin: $1.23 \pm 0.10\text{ng/ml}$; insulin: $0.99 \pm 0.10 \text{ ng/ml}$). At PN60, both SL (leptin: $5.26 \pm 1.15\text{ng/ml}$, insulin: $2.53 \pm 0.36\text{ng/ml}$) and LL (leptin: $4.30 \pm 0.51\text{ng/ml}$, insulin: $3.39 \pm 0.47\text{ng/ml}$) groups presented increased plasma leptin and insulin concentrations compared with the group NL (leptin: $1.79 \pm 0.41\text{ng/ml}$; insulin: $1.19 \pm 0.09\text{ng/ml}$). The mRNA expression of *Ptpn2* mRNA, gene encoding TCPTP, and its protein in the arcuate nucleus (ARC) was increased at PN21 in the SL group and in both groups at PN60, compared with the NL group. The SL group showed an increased immunoreactivity for GFAP at PN21 and

both groups showed this increased response at PN60. Similar response was observed for ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA-1) immunoreactivity at PN21 and PN60. There was an overlap of TCPTP with GFAP immunoreactivity, but not with IBA-1. At PN21 there was an increase in the mRNA expression of *Gjal*, gene coding for CX43, as well as in the immunoreactivity of CX43 in the SL group only. At PN21 and PN60, mRNA expression of the *Gja6*, gene encoding for CX30, was reduced in both SL and LL groups. However, at PN60 it was reduction of CX30 immunoreactivity in both groups, SL and LL. At PN21, *Il1b* mRNA expression was increased in the ARC in both SL and LL groups. However, at PN60, only the LL group showed an increased *Il1b* mRNA expression. Additionally, at PN60 both SL and LL groups showed an increase in the *Tnfa* mRNA expression in the ARC. In the morphological analysis of glia cells, at PN21, there was an increase in the immunoreactivity of the microglia and astrocyte in the SL group, as well as in the extension processes of both cells. At PN60, both groups showed an increase in the soma immunoreactivity and astrocytic processes extension, however, only the SL group showed an increase in the immunoreactivity of the microglial soma. To analyze the effect of leptin on astrocyte morphology and the participation of TCPTP in this process, we performed the primary culture of hypothalamic astrocytes from neonatal rats that were stimulated with leptin [1000ng/ml], [5000ng/ml] and LPS [500ng/ml]. The LPS was used as a positive control of the protocol. We observed that the leptin and LPS stimuli increased the *Ptpn2* mRNA expression, the TCPTP immunoreactivity and the astrocyte area. The LPS treatment increased the *Gjal* mRNA expression and the opposite was observed in the *Gja6* expression. On the other hand, both treatment with leptin and LPS increased the immunoreactivity for CX43 and the opposite was observed for the CX30 immunoreactivity. In order to evaluate the participation of TCPTP in the effects of leptin on the astrocyte morphology, we performed the silencing of its gene using the siRNA *Ptpn2*. The silencing of *Ptpn2* was able to reverse the effects of leptin and LPS on gene expression, immunoreactivity as well as astrocyte morphology. The silencing of *Ptpn2* was able to revert the reduction of CX30 and the increase of CX43 immunoreactivity and the its gene expression promoted by LPS leptin. These data are the first to show the importance of TCPTP in the modulation of connexins on the leptin and LPS effects on the morphology of hypothalamic astrocytes. Additionally, only LPS treatment was able to promote an increase in the *Ptpn1* mRNA expression and *Ptpn2* silencing enhanced this increase in *Ptpn1* mRNA expression. These data demonstrate an unprecedented way that *Ptpn2* exerts regulatory action against *Ptpn1*. As expected, the stimulation with LPS increased the mRNA expression of the *Il6*, *Il1b* and *Tnfa*. The silencing of *Ptpn2* amplified this effect of LPS on cytokine gene expression, demonstrating that TCPTP has a counterregulatory action on the secretion of IL6, IL1 β and *Tnfa*. Taken together these data demonstrate that the neonatal nutritional changes are able to promote alterations in the energy balance in the juvenile and adult life. These effects are associated with morphological changes in glial cells and increase of inflammatory cytokines, characterizing a glial reactive state. Additionally, using primary cell culture, we demonstrated that leptin alters the morphology of hypothalamic astrocytes. We also demonstrate for the first time that TCPTP modulates these effects of

leptin, through its actions regulating the expression of CX30. The data shown indicate the importance of non-neuronal cells in the central control of energy homeostasis in a model of neonatal nutritional programming.

Keywords: nutritional programming, hypothalamus, glia, leptin, TCPTP, CX30, CX43.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo Experimental 1.	41
Figura 2. Protocolo Experimental 2.	51
Figura 3. Protocolo Experimental 3.	53
Figura 4. Protocolo Experimental 4.	57
Figura 5. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre o ganho de peso corporal (g) da ninhada pequena (SL), normal (NL), e grande (LL) até o desmame no PN21, n=8-16 (A); fotografia representativa do peso corpora no PN14 (B); e ganho de peso corporal individual pós desmame do PN21 ao PN60, n=16-25 (C); e ingestão alimentar (g/100g de peso corporal) durante o PN50 ao PN60, n=18-23(D). Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.....	60
Figura 6. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a concentração de leptina plasmática (A) e de insulina (B) plasmática no PN21 e PN60 nos grupos SL, NL e LL, n=7. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.	62
Figura 7. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a expressão relativa do RNAm de <i>Ptpn1</i> , no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (A) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (B) e de <i>Ptpn2</i> no ARC (C) e PVN (D) no PN21 e PN60 nos grupos SL, NL e LL, n=9. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno <i>b-actin</i> . Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.	63
Figura 8. Efeito da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a expressão proteica hipotalâmica de TCPTP no PN21 e PN60 nos grupos SL, NL e LL, n=7. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.....	64
Figura 9. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a imunorreatividade (pixel médio) de TCPTP (A), GFAP (B) e IBA-1 (C) nos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.....	66
Figura 10. Fotomicrografias representativas da tripla marcação de TCPTP (verde), GFAP (vermelho) e IBA-1 (Azul) no ARC no PN21 (A) e PN60 (B) nos grupos SL, NL e LL. Escala do ARC: 200 μ m; TCPTP, GFAP e IBA-1: 25 μ m; Magnificência: 63x...	67
Figura 11. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a expressão relativa do RNAm de <i>Gja6</i> (A) e RNAm de <i>Gjal</i> no ARC no PN21 e PN60 nos grupos SL, NL e LL, n=10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno <i>b-actin</i> . Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.....	70
Figura 12. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a imunorreatividade de CX30 (verde), GFAP (vermelho) e IBA-1 (Azul) no PN21 e PN60 no ARC nos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados	

pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.....	72
Figura 13. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para CX30 (verde), GFAP (vermelho) e IBA-1 (Azul) no ARC no PN21 (A) e PN60 (B) nos grupos SL, NL e LL. Escala do ARC: 200 μ m; TCPTP, GFAP e IBA-1: 25 μ m; Magnificência: 63x... 73	73
Figura 14. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a imunorreatividade de CX43 ($\pm$ pixels) no ARC nos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.	75
Figura 15. Fotomicrografias representativas da tripla marcação de CX43 (verde), GFAP (vermelho) e IBA-1 (Azul) no ARC no PN21 (A) e PN60 (B) nos grupos SL, NL e LL. Escala do ARC: 200 μ m; TCPTP, GFAP e IBA-1: 25 μ m; Magnificência: 63x... 76	76
Figura 16. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a imunorreatividade do soma por imunomarcação de GFAP - astrócito (A) e de IBA-1 - microglia (C); processos de extensão por imunomarcação de GFAP (B) e IBA-1 (D), nos grupos SL, NL e LL, n=8-14. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.....	79
Figura 17. Fotomicrografias representativas da imunomarcação do soma e dos processos de extensão da imunomarcação de GFAP (vermelho) e IBA-1 (azul) no ARC no PN21 (A) e no PN60 (B), nos grupos SL, NL e LL. Setas indicativas do soma de astrócitos e microglia. Escala de 10 μ m. Magnificência: 63x.....	80
Figura 18. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a quantidade de células microglias no ARC (A) e PVN (D), assim como, na área do soma no ARC (B) e PVN (E) e no raio celular no ARC (C) e PVN (F), n=7. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.	82
Figura 19. Fotomicrografias representativas da imunomarcação de IBA-1 no ARC (A) e PVN (B) no PN21 e PN60 dos grupos SL, NL e LL. Magnificência de 20 e 100x, com escalas respectivas de 20 e 100 μ m.	83
Figura 20. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a expressão do RNAm de <i>Il6</i> (A), <i>Il1b</i> (B) e de <i>Tnf</i> no ARC no PN21 e PN60, nos grupos SL, NL e LL, n=7-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno <i>b-actin</i> . Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.....	85
Figura 21. Efeito do estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina (LEP) nas concentrações de [100ng/ml], [1000ng/ml] e [5000 ng/ml] durante 24 horas, em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na expressão do RNAm de <i>Ptpn1</i> (A), <i>Ptpn2</i> (B), n=9. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno <i>b-actin</i> . Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.....	87
Figura 22. Efeito do estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina (LEP) nas concentrações de [100ng/ml], [1000ng/ml] e [5000 ng/ml] durante 24 horas, em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na imunorreatividade de TCPTP, n=22-	

28 (A) e no tamanho da área astrocitária, n=20-51 (B). Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ em relação aos demais grupos; & $p < 0,05$ em relação às diferentes concentrações de leptina. 89

Figura 23. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para TCPTP (verde), GFAP (vermelho) e DAPI (azul) (A) de células astrocitárias estimuladas com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina (LEP) nas concentrações de [100ng/ml], [1000ng/ml] e [5000 ng/ml] durante 24 horas. Escala de 50µm. Magnificência: 40x... 90

Figura 24. Padronização da transfecção do silenciamento de *Ptpn2*, expressão relativa do RNAm de *Gapdh* (A), e *Ptpn2*, em condição basal (CTL), com controle negativo (CTL NEG), siRNA *Gapdh* ou siRNA *Ptpn2* durante 48 horas, n=6. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL 92

Figura 25. Efeito do estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina (LEP) na concentração de [5000 ng/ml] durante 24 horas, em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na expressão relativa do RNAm de *Ptpn1* (A), *Ptpn2* (B), *Gja6* (C) e *Gjal* (D), n=6-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL..... 93

Figura 26. Efeito do silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas e o tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP - 5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na expressão relativa do RNAm de *Ptpn1* (A,B,C), *Ptpn2* (D,E,F), *Gja6* (G,H,I) e *Gjal* (F,G,H), n=7-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados pelo teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$ 96

Figura 27. Efeito do silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP - 5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na imunorreatividade de TCPTP, n=23-28 (A) e no tamanho da área astrocitária (µm²), n=16-19 (B). Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL+CTL NEG; # $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo CTL NEG; & $p < 0,05$ em relação ao tratamento diferente. 98

Figura 28. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para TCPTP (verde), GFAP (vermelho) e DAPI (azul) de astrócitos submetidos ao silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas, seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP - 5000 ng / ml] durante 24 horas. Escala de 50µm. Magnificência: 40x. (*). 99

Figura 29. Efeito do silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP - 5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos na imunorreatividade para CX30, n=37-47. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL+CTL NEG; # $p < 0,05$ em

relação ao seu respectivo grupo CTL NEG; & $p < 0,05$ em relação ao diferente tratamento.	100
Figura 30. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para CX30 (verde), GFAP (vermelho) e DAPI (azul), de astrócitos submetidos ao silenciamento de <i>Ptpn2</i> (siRNA <i>Ptpn2</i>) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng/ml] ou leptina [LEP-5000 ng/ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos. Escala de 50µm. Magnificência: 40x.	101
Figura 31. Efeito do silenciamento de <i>Ptpn2</i> (siRNA <i>Ptpn2</i>) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP-5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na imunorreatividade de CX43, n=28-36. Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ em relação grupo CTL+CTL NEG; # $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo CTL NEG; & $p < 0,05$ em relação ao diferente tratamento.	103
Figura 32. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para CX43 (verde), GFAP (vermelho) e DAPI (azul) de astrócitos submetidos ao silenciamento de <i>Ptpn2</i> (siRNA <i>Ptpn2</i>) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng/ml] ou leptina [LEP-5000ng/ml] durante 24 horas. Escala de 50µm. Magnificência: 40x.	104
Figura 33. Efeito do estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina [LEP - 5000 ng/ml] durante 24 horas, em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na expressão do RNAm de <i>Il6</i> (A), <i>Il1b</i> (B) e <i>Tnf</i> (C), n=8-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno <i>b-actin</i> . Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL	106
Figura 34. Efeito do silenciamento de <i>Ptpn2</i> (siRNA <i>Ptpn2</i>) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na expressão relativa do RNAm de <i>Il6</i> (A,B,C), <i>Il1b</i> (D,E,F) e <i>Tnf</i> (G,H,I), n=8-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno <i>b-actin</i> . Valores expressos como média ± EPM. Dados analisados pelo teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$	108
Figura 35. Efeito dos diferentes tratamentos utilizados nos protocolos experimentais na viabilidade celular astrocitária. CTL- condição basal; CTL NEG – controle negativo; siRNA <i>Gapdh</i> – silenciamento de <i>Gapdh</i> , siRNA <i>Ptpn2</i> – silenciamento da <i>Ptpn2</i> , LEP – leptina [5000 ng/ml], LPS – [500ng/ml], siRNA <i>Ptpn2</i> +LEP,], siRNA <i>Ptpn2</i> +LPS, DMSO – dimetilsulfóxido. Os tratamentos com LEP e LPS foram realizados após 24 horas do silenciamento, permanecendo durante esse mesmo tempo. Os demais tratamentos permaneceram durante 48 horas. Valores expressos como média ± EPM, n=5. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ vs DMSO.	109
Figura 36. Esquema representativo sobre o efeito da leptina e do LPS na modulação das conexinas por meio da ação da TCPTP e consequente alteração morfológica astrocitária em cultura primária hipotalâmica. (A) O aumento das concentrações de leptina ou LPS promove por meio da modulação da TCPTP, redução da expressão de CX30 e aumento	

na expressão de CX43, resultando consequente alteração morfológica astrocitária. (B) O silenciamento de *Ptpn2* (siRNA) reverte o efeito da leptina e do LPS no aumento da expressão de CX30 e na redução da expressão de CX43, consequentemente impedindo os efeitos na morfologia astrocitária..... 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tripla marcação de TCPTP, GFAP e IBA-1.	46
Tabela 2. Tripla marcação de CX30, GFAP e IBA-1.....	46
Tabela 3. Tripla marcação de CX43, GFAP e IBA-1.....	47
Tabela 4. Efeitos da supernutrição e subnutrição neonatal na análise da co-localização (Teste de Manders) da imunorreatividade de TCPTP com GFAP ou IBA-1, no ARC, no PN21 e PN60 dos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.	68
Tabela 5. Efeitos da supernutrição e subnutrição neonatal na análise da sobreposição (Teste de Manders) da imunorreatividade de CX30 com GFAP ou IBA-1, no ARC, no PN21 e PN60 dos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.	74
Tabela 6. Efeitos da supernutrição e subnutrição neonatal na análise da co-localização (Teste de Manders) da imunorreatividade de CX43 com GFAP ou IBA-1, no ARC, no PN21 e PN60 dos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.	77

LISTA DE SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AgRP	Proteína Relacionada ao agouti
AKT	Proteína Quinase B
AMPK	Proteína Quinase Ativada por AMP
ARC	Núcleo Arqueado do Hipotálamo
ATP	Trifosfato de Adenosina
CART	Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina
CX30	Conexina 30
CX43	Conexina 43
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DOAD	Origem Fetal Do Desenvolvimento De Doenças Na Fase Adulta
DOHaD	Origem Desenvolvimentista de Saúde e Doença
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
<i>Gapdh</i>	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
<i>Gja1</i>	<i>Gap Junction Protein, Alpha-1</i> - Proteína de junção comunicante alfa 1.
<i>Gja6</i>	<i>Gap Junction Protein, Alpha 6</i> - Proteína de junção comunicante alfa 6.
GLUT1	Transportador de Glicose Isoforma 1
GLUT2	Transportador de Glicose Isoforma 2
GLUT3	Transportador de Glicose Isoforma 3
HFD	Dieta Hiperlipídica
HMB	Hipotálamo Medial Basal
IBA-1	Molécula Adaptadora Ligante De Cálcio Ionizado-1
icv	Intracerebroventricular
IKK	<i>Inhibitory Kappa B Kinase</i> - Proteína Quinase Inibitória Kappa B
IL1 β	Interleucina 1 Beta
IL6	Interleucina 6
ip	Intraperitoneal
IRS	Substrato do Receptor de Insulina
I κ B	<i>NF Kappa B Inhibitor Beta</i> - Proteína Inibidora do NF κ B
JAK	<i>Janus Kinase 2</i> – Proteína Janus Quinase 2
LEP	Leptina
LepR	Receptor de Leptina
LepRb	Isoforma Longa do Receptor de Leptina
LHA	Área Hipotalâmica Lateral
LL	Ninhada Grande
LPS	Lipopolissacarídeo
MC4R	Receptor de Melanocortina 4
NeuN	Proteína Núcleo Neuronal
NF κ B	Fator Nuclear Kappa B

NL	Ninhada Normal
NPY	Neuropetídeo Y
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PBS	Tampão Fosfato Salina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-Quinase
POMC	Proopiomelanocortina
PTP1B	Protein Tyrosine Phosphatase 1B
<i>Ptpn1</i>	<i>Tyrosine-Protein Phosphatase Non-Receptor Type 1</i> - Proteína Tirosina Fosfatase Não-Receptora Isoforma 1
<i>Ptpn2</i>	<i>Tyrosine-Protein Phosphatase Non-Receptor Type 2</i> - Proteína Tirosina Fosfatase Não-Receptora Isoforma 2
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RNAM	Ácido Ribonucleico Mensageiro
SL	Ninhada Pequena
SNC	Sistema Nervoso Central
SOCS3	Supressor da Sinalização de Citocinas 3
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TBS	Tampão Salina Tris
TCPTP	<i>T-cell protein tyrosine phosphatase</i> - Proteína Tirosina Fosfatase de Célula T
TLR4	Receptor do Tipo Toll 4
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VMH	Hipotálamo Ventromedial
α -MSH	Hormônio Melanotrófico Alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo Geral.....	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
3.1 – Avaliação das células da glia hipotalâmica no balanço energético em modelo de sub- e supernutrição neonatal.....	40
3.1.1 Animais.....	40
3.1.1 Protocolo experimental I	40
3.1.2 Dosagem hormonal.....	42
3.1.3 Western blotting.....	42
3.1.4 Microdissecção, isolamento de RNA total e PCR em tempo real.	43
3.1.5 Perfusão.....	44
3.1.6 Imunoistoquímica de tecido hipotalâmico	44
3.1.7 Imunofluorescência de tecido hipotalâmico.....	45
3.1.8 Processamento fotomicrográfico de imunofluorescência	48
3.2 Avaliação da TCPTP na modulação morfologia astrocitária e na expressão de conexinas CX30 e CX43.....	49
3.2.1 Cultura primária de células astrocitárias hipotalâmicas	49
3.2.2 Coleta das células	50
3.2.3 Avaliação do efeito da estimulação com LPS e diferentes concentrações de leptina na morfologia astrocitária e expressão de TCPTP.....	50
3.2.4 Avaliação da participação da TCPTP na morfologia celular e na expressão das conexinas e citocinas em cultura astrocitária hipotalâmica.....	52
3.2.5 Silenciamento de <i>Ptpn2</i> em cultura primária de astrócito hipotalâmico.	52
3.2.6 PCR em tempo real de cultura primária astrocitária hipotalâmica.	54
2.2.7 Imunofluorescência de cultura primária astrocitária hipotalâmica.	54
3.2.8 Processamento fotomicrográfico de imunofluorescência de cultura primária astrocitária hipotalâmica.....	55
3.2.9 Ensaio de viabilidade celular por redução do sal de tetrazólio (MTT) dos tratamentos realizados em cultura astrocitária hipotalâmica.	56

3.3 Análise estatística	58
4 RESULTADOS	59
4.1. Caracterização do modelo de subnutrição e supernutrição neonatal.	59
4.1.1. Ganho de peso corporal e ingestão alimentar.....	59
4.1.1. Concentração hormonal plasmática.	61
4.1.2. Expressão relativa de RNAm de <i>Ptpn1</i> e <i>Ptpn2</i> no hipotálamo.	63
4.1.3. Expressão proteica de TCPTP no hipotálamo.....	64
4.1.5. Imunorreatividade para TCPTP, GFAP e IBA-1 no ARC.	65
4.1.6 Expressão do RNAm de <i>Gja6</i> e <i>Gja1</i> no ARC.	69
4.1.7. Imunorreatividade de CX30, GFAP e IBA-1.	71
4.1.8 Imunorreatividade de CX43, GFAP e IBA-1 no ARC.....	75
4.1.9 Morfologia da célula astrocitária e da microglia no ARC.....	77
4.1.10 Quantificação e morfologia da microglia no ARC e PVN.	81
4.1.11 Expressão do RNAm de <i>Il6</i> , <i>Il1b</i> e <i>Tnf</i> no ARC.....	84
4.2 Efeito da TCPTP na expressão de CX30, CX43 e na morfologia de astrócito hipotalâmico em cultura primária.	86
4.2.1 Efeito do LPS e das diferentes concentrações de leptina na expressão do RNAm de <i>Ptpn1</i> e <i>Ptpn2</i> em cultura primária de astrócito hipotalâmico.....	86
4.2.3 Padronização do silenciamento do gene <i>Ptpn2</i> em cultura primária de astrócitos.	91
4.2.4 Efeito do tratamento com leptina e LPS na expressão do RNAm de <i>Ptpn1</i> , <i>Ptpn2</i> , <i>Gja6</i> e <i>Gja1</i> em cultura primaria de células astrocitárias.....	93
4.2.4 Efeito do silenciamento do gene <i>Ptpn2</i> na expressão do RNAm de <i>Ptpn1</i> , <i>Gja1</i> e <i>Gja6</i> em cultura primária de células astrocitárias.	94
4.2.5 Efeito do silenciamento do gene <i>Ptpn2</i> na imunorreatividade de TCPTP e na morfologia astrocitária de cultura primária hipotalâmica.	97
4.2.6 Efeito do silenciamento do gene <i>Ptpn2</i> na imunorreatividade de CX30 em cultura primária de células astrocitárias.	100
4.2.7 Efeito do silenciamento do gene <i>Ptpn2</i> na expressão do RNAm de <i>Gja6</i> e na imunorreatividade de CX43 em cultura primaria de células astrocitárias.	102
4.2.8 Efeito do tratamento com leptina e LPS na expressão do RNAm de <i>Il6</i> , <i>Il1b</i> e <i>Tnf</i> em cultura primaria de células astrocitárias.....	105
4.2.9 Efeito do silenciamento do gene <i>Ptpn2</i> na expressão do RNAm de <i>Il6</i> , <i>Il1b</i> e <i>Tnf</i> em cultura primaria de células astrocitárias.	107
4.2.10 Ensaio de viabilidade celular.....	109

5 DISCUSSÃO	110
6 CONCLUSÕES	132
7 REFERÊNCIAS	134
APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	157

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, entre 2010 e 2014, a Organização Mundial da Saúde observou que 17% dos brasileiros, 23% dos europeus e mais de 30% dos norte-americanos apresentam sobrepeso e obesidade (WHO, 2014). Aproximadamente 39% dos adultos no mundo, acima de 18 anos apresentam sobrepeso (38% de homens e 40% das mulheres), o dobro quando comparado ao ano de 1980 (WHO, 2014). Em crianças menores de 5 anos a prevalência de sobrepeso e obesidade é de aproximadamente 42 milhões (6,3%) (UNICEF-OMS-WB, 2014; WHO, 2014). Assim, a investigação acerca da fisiopatologia e dos mecanismos que concorrem para o desenvolvimento da obesidade é essencial para que intervenções efetivas possam ser instituídas, visando a redução da prevalência desta doença e das co-morbidades associadas.

Evidências epidemiológicas sólidas demonstraram que a desnutrição na vida intra-uterina e neonatal não só afeta o crescimento fetal/neonatal, mas também tem consequências para a saúde na fase adulta (NAVARRO et al., 2017). Kermack, McKendrick e McKinlay (1934), levantaram a hipótese de que os primeiros 15 anos de vida influenciariam a saúde ao longo da vida do indivíduo, enquanto Forsdahl (1977) demonstrou uma associação significativa entre a mortalidade infantil nos primeiros anos de vida e mortalidade de adultos (idades de 40-69 anos) por doença coronariana, e concluiu que "grande miséria na infância e adolescência, seguida pela prosperidade, é um fator de risco para doença arteriosclerótica". De modo similar, Barker e Osmond (1986) evidenciaram na Inglaterra e no País de Gales uma correlação positiva entre mortalidade infantil entre 1921-1925 e taxas de mortalidade por doenças cardíacas entre 1968-1978. Resultados positivos confirmados pelo trabalho destes autores posteriormente demonstraram uma correlação entre o baixo peso ao nascer até um ano de vida e morte por doença arterial coronariana na vida adulta (BARKER et al., 1989). A ideia de que a deficiência de crescimento durante o desenvolvimento fetal poderia ser associada a uma série de doenças crônicas na fase adulta, como doença arterial coronariana (BARKER; OSMOND, 1986), tolerância reduzida à glicose (HALES et al., 1991), diabetes melito tipo 2 (HALES; BARKER, 1992) ou obesidade e hipertensão (VICKERS et al., 2000) ficou conhecida como hipótese de "origem fetal do desenvolvimento de doenças na fase adulta" (DOAD) (BARKER et al., 1990). A relação do sobrepeso, aumento da pressão arterial e alterações no metabolismo da glicose, com eventos anteriores ao desenvolvimento do indivíduo foi intitulada de

“programação” (BARKER, 1998). Adicionalmente, relacionada à programação por subnutrição fetal, cunhou-se a hipótese do “fenótipo poupador” ao qual fará com que o embrião se prepare para uma vida de escassez com subsequente supercrescimento acelerado (*catch-up*) em condições de abundância no período pós-natal precoce, facilitando desse modo a deposição de gordura, obesidade e condições relacionadas (HALLES; BARKER, 1992; HALLES; BARKER, 2001).

Atualmente, tem se observado que os (1) eventos anteriores à concepção também promovem alterações epigenéticas em gametas parentais que são transmitidas para a prole (MCPHERSON et al., 2015), (2) eventos periconcepcional promovem alterações epigenéticas nas células embrionárias (HUANG et al., 2014), onde o ambiente fetal pode influenciar ou programar a expressão de genes (BORRELLI et al., 2008; SWEATT et al., 2009; BALE et al., 2010). (3) eventos nas fases iniciais após a diferenciação da linhagem celular podem induzir alterações tecido-específicas (YANG et al., 2013). Considerando todos esses eventos de programação epigenética, em diferentes estágios do desenvolvimento e causados por diferentes estímulos adversos surgiu um novo conceito “origem desenvolvimentista de saúde e doença” (DOHaD) (DE BOO; HARDING, 2006; GLUCKMAN; HANSON, 2004; KAPPIL; WRIGHT; SANDERS, 2016).

As alterações provocadas pela programação epigenética são decorrentes de determinadas modificações na expressão de um gene e não na variação de sua sequência de bases (INSEL et al., 2009; BIRD 2007; BALE et al., 2010). A programação epigenética envolve uma variedade de mecanismos, tais como (1) metilação de DNA, pela ação da DNA metil-transferase em sítios de dinucleotídeos citosina guanina (CpG) e consequentemente, a estimulação da proteína de ligação a metil-CpG (MeBP), assim como, o impedimento da ligação de fatores de transcrição (JONES; LIANG, 2009, DAY; SWEATT, 2010; DAY; SWEATT, 2011; DAY et al., 2015), (2) Acetilação ou desacetilação é promovida pela atividade das enzimas histona acetil transferase (HAT) e histona desacetilase, respectivamente (CHENG; BLUMENTHAL, 2010; CAMPOS; REINBERG, 2009; GELATO; FISCHLE, 2008). O processo de acetilação das histonas promove a abertura da cromatina o que permite a transcrição do gene, o inverso é observado com a desacetilação (CHENG; BLUMENTHAL, 2010; CAMPOS; REINBERG, 2009; GELATO; FISCHLE, 2008), (3) Recentemente têm-se demonstrado outros fatores envolvidos na maquinaria epigenética, os micro-RNAs (miRNA). Os miRNAs são pequenos RNAs que não codificam, e eles se dirigem a região 3'-UTR do

RNA_m, promovendo a sua degradação e repressão da tradução. Além disso, os miRNAs podem silenciar a transcrição de genes por remodelação da cromatina (GONZALEZ et al., 2008; HEMMATZADEH et al., 2016a; HEMMATZADEH et al., 2016b).

Existem fortes evidências em roedores que o excesso na alimentação ou subnutrição durante o período inicial de desenvolvimento pós-natal possui correlação com a obesidade na vida adulta (MARTORELL; STEI; SCHOROEDER, 2001). A programação neonatal induzida pela alteração do tamanho da ninhada (Patterson et al., 2010; ZHANG; ZHANG; WANG, 2011) promove consequentemente aumento na competição pelo aleitamento (RUSSEL, 1980), sendo capaz de promover alterações neuroendócrinas, aumentando o ganho de massa corporal e modificando a homeostase energética na vida adulta (REMMERS et al., 2008; LIRA et al., 2014; ZHANG; ZHANG; WANG, 2011). Adicionalmente, em ratos subnutridos durante o período neonatal tem se observado após o período de desmame uma recuperação do peso corporal, bem como sobrepeso e hiperfagia na fase adulta (REMMERS et al., 2008; LIRA et al., 2014). Além disso, associada ao comportamento hiperfágico desses animais observou-se uma maior estimulação do núcleo do trato solitário (NTS) (LIRA et al., 2014). No entanto, proles provenientes de ninhadas pequenas (SL) apresentam no período adulto maior susceptibilidade à obesidade e resistência central à leptina (RODRIGUES, 2011; ZHANG; ZHANG; WANG, 2011; GLAVAS, et al., 2010; LIU, et al., 2013). Observou-se em ratos SL uma hipermetilação, do principal neuro-hormônio anorexigênico, na região promotora do gene da pró-opio-melanocortina (POMC) no 21º dia pós-natal (PN21), especificamente em dinucleotídeos CpG dentro das duas sequências de ligação relacionadas com Sp1 (Sp1, NF-κB) (PLAGEMANN et al., 2009), um dos principais ativadores da transcrição do gene da POMC (THERRIEN; DROUIN, 1991), essencial para a mediação dos efeitos da leptina e da insulina (YANG et al., 2009).

O período de lactação na prole de roedores é um período crítico do desenvolvimento de áreas do SNC relacionadas com a homeostase energética, pois nesse período o núcleo arqueado do hipotálamo apresenta-se imaturo, completando a sua maturação na terceira semana após o nascimento (GROVE et al., 2005). A maioria dos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) é detectada entre os dias 11-12 do período embrionário de camundongos, como a diferenciação de neurônios progenitores de POMC (SHIMADA; NAKAMURA, 1973; PADILLA; CARMODY; ZELTSER, 2010). Após o dia embrionário 14, alguns neurônios silenciam a expressão

de POMC e começam a expressar neuropeptídeo Y (NPY) (PADILLA; CARMODY; ZELTSER, 2010). Além disso, o número de neurônios que expressam NPY, peptídeo relacionado a agouti (AgRP), ácido gama-aminobutírico (GABA) e POMC atingem níveis estáveis no PN15 (PADILLA; CARMODY; ZELTSER, 2010). Adicionalmente, neurônios envolvidos com a ingestão alimentar presentes no ARC (BETLEY et al., 2013), tais como, neurônios que co-expressam NPY, AgRP, GABA e de POMC, e suas projeções para área hipotalâmica lateral (LHA) são detectadas a partir do PN12 em roedores (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004). A diferenciação de neurônio POMC versus NPY, AgRP, GABA pode ser influenciada durante o desenvolvimento fetal por fatores metabólicos maternos (CARMODY et al., 2010). O ambiente neonatal também pode ser determinante na formação dessas circuitaria, como demonstrado pela exposição à subnutrição durante o período de lactação a qual está associada a um aumento na porcentagem de neurônios NPY, AgRP e GABA no ARC, no número de projeções de neurônios AgRP para o PVN e no aumento de sinapses de NPY/AgRP no PVN entre a 3^a e 4^a semana pós natal (PLAGEMANN et al., 1999; PATTERSON et al., 2010; LÓPEZ et al., 2005; CRIPPS et al., 2009). Além disso, observou-se um atraso na expressão de canais de K_{ATP} , que desempenham função de hiperpolarização em neurônios NPY, AgRP e GABA, proporcionado pela ação da leptina nesses neurônios e consequentemente supressão da ingestão alimentar (JUAN DE SOLIS et al., 2016). Adicionalmente, observou-se um atraso no desenvolvimento das projeções de neurônios NPY para o PVN em modelo de subnutrição neonatal de restrição proteica ou calórica (ROCHA et al., 2014). Esse atraso na maturação dessas vias e da retroalimentação negativa está associado ao alcance no peso corporal similar aos animais controles na fase adulta (JUAN DE SOLIS et al., 2016).

A leptina, um peptídeo produto do gene *Lep*, é produzida predominantemente nos adipócitos e é capaz de regular a ingestão de alimentos e o balanço energético por meio de suas ações no hipotálamo (CAMPFIELD et al., 1995; PELLEYMOUNTER et al., 1995). A leptina atua no hipotálamo em neurônios do núcleo do arqueado (ARC) (CONE, 2005; ELIAS et al., 1999; MERCER et al., 1996a; ELMQUIST et al., 1997; ELMQUIST et al., 1998; SCOTT et al., 2009), hipotálamo ventro-medial, núcleo dorsal do hipotálamo (MERCER et al., 1996b; ELMQUIST et al., 1997; ELMQUIST et al., 1998; SCOTT et al., 2009) e área hipotalâmica lateral (LEINNINGER et al., 2009; SHENG et al., 2014; GOFORTH et al., 2015). A leptina liga-se ao seu receptor (LepRb) que ativa a proteína Janus Kinase 2 (JAK2), que, por sua vez, é capaz de fosforilar

resíduos de tirosina do receptor LepRb (FRÜHBECK, 2006). O receptor LepRb quando ativado promove a ativação de STAT3 - *signal transducer and activator of transcription-3*, que em sua forma fosforilada se dimeriza translocando-se para o núcleo (FRÜHBECK, 2006). A STAT3 no núcleo estimula a transcrição do gene da pró-opiomelanocortina (POMC) e do supressor de sinalização de citocinas (SOCS3). A SOCS3 possui função de retroalimentação negativa, pois inibe a fosforilação de resíduos de tirosinas no receptor LepRb (BJORBAEK et al., 2000; FRÜHBECK, 2006), impedindo assim a sinalização subsequente da leptina

No hipotálamo, o hormônio estimulador de melanócito alfa (α -MSH), produto da clivagem do precursor POMC (KRISTENSEN et al., 1998), é capaz de se ligar ao receptor MC4R presente no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (MINOKOSHI et al., 2004). O receptor MC4R quando ativado suprime a fosforilação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) no PVN, apresentando uma redução da ingestão de alimentos (MINOKOSHI et al., 2004). A atividade da AMPK também possui importante função na regulação do metabolismo celular por inibição das vias de consumo de energia e indução de vias metabólicas relacionadas na produção de ATP (HARDIE et al., 2003; DAGON et al., 2005). Segundo Pimentel et al., 2013, os efeitos anorexígenos da inibição da atividade da AMPK são mediados por pelo menos dois mecanismos: (1) a ativação da acetil-CoA carboxilase (ACC), que converte acetil-CoA em malonil-CoA, que em altos níveis inibe carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT1), que catalisa a β -oxidação, resultando na translocação de ácidos graxos através da membrana mitocondrial e (2) ativação de *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e fosforilação da p70S6 quinase (p70S6K), e *eukaryotic initiation factor 4E-binding protein* (4EBP1). A ativação destas vias culmina na inibição da atividade de neurônios orexígenos (AgRP/ neuropeptídeo Y [NPY]) e na ativação de neurônios que expressam neuropeptídeos anorexígenos (POMC / transcrito regulado pela cocaína e anfetamina [CART]) (PIMENTEL et al., 2013).

No ARC os astrócitos também possuem importante participação no balanço energético e na ingestão alimentar (YANG et al., 2015; KIM et al., 2014; WANG et al., 2015). Um estudo recente demonstrou que as células astrocitárias promovem redução da ingestão alimentar por mecanismo mediado por adenosina, via receptores A1, na inibição de neurônios AgRP no ARC, tanto em estado basal quanto por estímulo de ghrelina (YANG et al., 2015). A expressão de LepRb foi demonstrada também em células não neuronais (KIM et al., 2014; PINTEAUX et al., 2007; LAFRANCE et al.,

2010), como astrócitos (KIM et al., 2014) e células microgliais (PINTEAUX et al., 2007; LAFRANCE et al., 2010).

A expressão de LepRb em astrócitos é importante para sinalização adequada mediada por pSTAT3 hipotalâmica (WANG et al., 2015), sendo a sinalização de leptina em astrócitos essencial para a regulação neuroendócrina da homeostase energética (WANG et al., 2015; KIM et al., 2014). Camundongos com deleção de LepRb em células astrocitárias, expostos à dieta hipelipídica (HFD) por 2 meses apresentam aumento na porcentagem de gordura corporal e hiperleptinemia. Isso coincidiu com alteração morfológica astrocitária, adquirindo uma maior espessura dos processos de extensão, caracterizando uma leve gliose reativa no hipotálamo (WANG et al., 2015). Sendo a astrogliose caracterizada por grande número de astrócitos reativos, distinguindo-se dos astrócitos normais por seu maior tamanho, processos longos e maior espessura e aumento de marcação dos filamentos gliais (NORTON et al., 1992). Adicionalmente, a leptina promove aumento da proliferação de astrócitos no hipotálamo na vida pós-natal e a deleção de receptores LepRb em astrócitos limita a sua proliferação (ROTTKAMP et al., 2015). Adicionalmente, o tratamento crônico com leptina no ARC de ratos aumenta o tamanho e a quantidade de processos de extensão de astrócitos (GARCÍA-CÁCERES et al., 2011).

Alterações na morfologia dos astrócitos indicativas de astrogliose em resposta a HFD têm sido implicadas em alterações na função sináptica dos neurônios centrais do sistema da melanocortina (HORVATH et al., 2010). A supressão de LepRb no hipotálamo promove alteração na morfologia de células astrogliais, assim como, alteração na cobertura sináptica, aumentando consequentemente a frequência das correntes pós-sinápticas inibitórias em miniatura de neurônios POMC do hipotálamo (KIM et al., 2014). No entanto, a dieta rica em lipídeos não é o único fator que promove alterações gliais, alteração nutricional no período neonatal também é preponderante para tais alterações (GARCÍA-CÁCERES et al., 2011; FUENTE-MARTÍN et al., 2012). A supernutrição em ratos (4 proles/lactante) no período neonatal induz um aumento da área e na quantidade de astrócitos na vida adulta (FUENTE-MARTÍN et al., 2012). O ganho de peso aumentado em ratos com supernutrição neonatal (4 proles/lactante) promoveu um aumento dos níveis hipotalâmicos da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) uma proteína estrutural glial, associado ao excesso de peso e hiperleptinemia na vida adulta (GARCÍA-CÁCERES et al., 2011).

O desenvolvimento de células do sistema nervoso central ocorre a partir de células tronco neurais que são células multipotentes, que podem dar origem a neurônios e células não neuronais, como astrócitos e oligodendrócitos (GRANDBARBE et al., 2003; MILLER; GAUTHIER, 2007). A função de células não neuronais na neurogênese, sinaptogênese e função neuronal é importante não só durante as fases iniciais do desenvolvimento, mas também em roedores adultos tem sido bem reconhecida (HAYDON; CARMIGNOTO, 2006; FILOSA; BLANCO, 2007; MILLER et al, 2014).

Em modelos de obesidade como dieta com alto teor de lipídeos (HFD) observa-se uma modulação da neurogênese do ARC no período pós-natal (MCNAY et al., 2012). O modelo de dieta obesogênica em ratos e camundongos adultos induz em ambos o aumento do número e ativação da microglia no ARC (THALER et al., 2012). Alteração do ambiente nutricional neonatal também promove alterações na microglia, tais como em ratos senescentes provenientes de ninhadas grandes (12 proles/lactante) apresentam no hipocampo maior quantidade de células microgliais, expansão de projeções e aumento do soma (VIANA et al., 2013). Em ratos que foram supernutridos (4 filhotes / lactante) durante a vida neonatal observa-se maior número de células microgliais ativadas no VMH (TAPIA-GONZÁLEZ et al., 2013) e PVN (ZIKO et al., 2014). Sendo a microglia considerada ativada morfológicamente quando apresenta aumento do corpo celular assim como processos pequenos e com maior espessura (SZNEJDER-PACHOLEK et al., 2017).

A dieta com alto teor lipídico pode promover o desenvolvimento de resistência à insulina (PISTELL et al, 2010; THALER et al, 2012; JAYARAM et al., 2013) e leptina no hipotálamo (MCNAY et al., 2012; (PISTELL et al, 2010; THALER et al, 2012; JAYARAM et al, 2013). O processo de desenvolvimento de resistência à leptina no hipotálamo está intrinsecamente relacionado a processos inflamatórios e têm se atribuído fortemente a participação das células da glia nesse evento (PISTELL et al, 2010; THALER et al, 2012; LI et al., 2012).

A neurodegeneração relacionada com a obesidade tem sido atribuída à produção excessiva de citocinas dependentes de IKK β /NF- κ B tais como TNF- α e IL-1 β de células microgliais, que sustentam um estado inflamatório através das ações parácrinas destas citocinas (LI et al. , 2012). De fato, a deleção de IKK β em células da microglia promove um aumento da sobrevivência e neurogênese de células tronco neurais hipotalâmicas (LI et al., 2012).

Recentemente, observou-se que em astrócitos a via de sinalização IKK β /NF- κ B é requerida na obesidade induzida por HFD na inflamação hipotalâmica, que por sua vez está envolvida no aumento da ingestão alimentar, redução do gasto energético, tolerância reduzida à glicose e resistência à insulina (DOUGLASS et al., 2017). Vias pró-inflamatórias induzem a expressão de contra reguladores negativos da via de sinalização de leptina e insulina (ZHANG et al., 2008; ZABOLOTNY et al., 2008). A proteína SOCS3 hipotalâmica, por sua vez, pode ser induzida pela via de sinalização de IKK β /NF- κ B (ZHANG et al., 2008), uma via efetora de TNF- α . Enquanto que a expressão hipotalâmica de PTP1B (fosfatase de tirosina proteica 1B) pode ser induzida diretamente pelo TNF- α em modelo *in vivo* (ZABOLOTNY et al., 2008) e *in vitro* (ITO et al., 2012). Observa-se em camundongos com deleção da via IKK β em células astrocíticas (IKK β -AKO) uma redução de aproximadamente 50% na imunorreatividade de GFAP, assim como uma pronunciada redução do tamanho celular, no ARC e no hipotálamo médio basal (MBH) de ratos IKK β -AKO (DOUGLASS et al., 2017).

A PTP1B possui também ação contra-reguladora da sinalização promovida pela ligação Leptina/LepRb, por meio da defosforilação de JAK2 (KOREN; FANTUS, 2007; TUPS, 2009). Adicionalmente, a atividade da PTP1B está implicada na regulação da homeostase energética, caracterizada como regulador negativo da via de sinalização da leptina, conferindo resistência à sinalização deste hormônio. Camundongos com deleção do gene que codifica PTP1B (PTP1B $^{-/-}$) em neurônios que expressam POMC no ARC (BANNO et al., 2010; ELCHEBLY et al., 1999; KLAMAN et al., 2000) apresentam redução da adiposidade, devido ao aumento do gasto energético e resistência à dieta obesogênica, com melhora na homeostase da glicose. A função como regulador negativo da leptina foi demonstrada em camundongos PTP1B $^{-/-}$, por meio do aumento da sensibilidade à leptina mediada pelo aumento da expressão de p-STAT3 em neurônios que expressam POMC (BANNO et al., 2010). Adicionalmente, estudos demonstram que a deficiência em PTP1B está envolvida na melhora na sensibilidade à leptina tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CHENG et al., 2002; ZABOLOTNY et al., 2002). No modelo em camundongos com deficiência central de PTP1B, resulta no aumento da sensibilidade à insulina no fígado e músculo, sem efeitos no peso corporal e na adiposidade (DELIBEGOVIC et al., 2007, 2009). Em resumo, os resultados indicam que a PTP1B possui efeito regulador central, com efeito na homeostase energética e no peso corporal, por meio da sua interação como regulador negativo da via de sinalização

da leptina e insulina e possivelmente por outras vias não identificadas (TSOU; BENCE, 2012).

A proteína *T-cell protein tyrosine phosphatase* (TCPTP) também conhecida por PTPN2, codificado pelo gene *Ptpn2* em camundongos, está intimamente relacionada com a PTP1B, possuindo 72% de similaridade estrutural primária e terciária (TIGANIS; BENNETT, 2007). Curiosamente, PTP1B defosforila JAK2, porém não JAK1/3 e TCPTP defosforila JAK 1/3, porém não JAK2 (MYERS et al., 2001; SIMONCIC et al., 2002; ZABOLOTNY et al., 2002; LOH et al., 2011). O *splicing* alternativo de *Ptpn2*, pode originar duas formas variantes, sendo elas TCPTP de 48 kDa (TC48) que possui relação com o retículo endoplasmático e a TCPTP de 45 kDa (TC45) que pode ser localizada dentro e fora do núcleo (COOL et al., 1989; SHIELDS et al., 2008; TIGANIS; BENNETT, 2007; YAMAMOTO et al., 2002). Demonstrou-se que a TCPTP (TC45) age defosforilando STAT3 nuclear (SHIELDS et al., 2008; TIGANIS; BENNETT, 2007; YAMAMOTO et al., 2002; LOH et al., 2011) e não citoplasmática, porém, observou-se que a TCPTP não interfere na via da Ras/MAPK (LOH et al., 2011).

A proteína TCPTP é expressa nos vários núcleos hipotalâmicos, como o arqueado, hipotálamo dorsomedial, ventromedial, área hipotalâmica lateral e núcleo paraventricular (LOH et al., 2011). Os níveis protéicos de TCPTP (TC48 e TC45) foram aumentados cerca de duas vezes, nas áreas mencionadas acima, assim como o RNAm hipotalâmico de *Ptpn2* em camundongos obesos, que foram submetidos à dieta hiperlipídica por 12 semanas (LOH et al., 2011). Conjuntamente, foi observado também nesses animais o aumento hipotalâmico dos níveis protéicos de PTP1B e SOCS3 (LOH et al., 2011). O aumento nas concentrações plasmáticas de leptina é um forte indutor para o aumento de TCPTP hipotalâmico (LOH et al., 2011), por outro lado, foi observada que camundongos com deficiência em leptina apresentam redução protéica de TCPTP no hipotálamo (LOH et al., 2011). Adicionalmente com a injeção de leptina (5 mg/g i.p.) em camundongos com 18 semanas de vida observou-se um aumento protéico de TCPTP e do RNAm de *Ptpn2* no hipotálamo (LOH et al., 2011).

A deficiência neuronal em TCPTP aumenta exacerbadamente a ação da leptina sobre a expressão hipotalâmica de POMC e AgRP, promovendo aumento da expressão de POMC e redução da expressão de AgRP, no entanto, não observou-se alterações na expressão de NPY (LOH et al., 2011). Dados *ex-vivo* de hipotálamos de camundongos com *knockdown* de *Ptpn2*, demonstraram aumento da secreção de α -MSH após estímulo

com leptina, porém, a secreção de NPY foi reduzida quando estimulada com leptina independente da deficiência ou não de TCPTP (LOH et al., 2011). Esses dados demonstram que a deficiência de TCPTP aumenta os efeitos da leptina na expressão de neuropeptídeos, de forma específica, de POMC/ α -MSH e AgRP, porém não de NPY (LOH et al., 2011). Quando administrado i.c.v. o inibidor seletivo de TCPTP, *compound 8*, observou-se aumento das ações da leptina no peso corporal, aumento do consumo de oxigênio e consumo energético (LOH et al., 2011). Esses autores demonstraram os mesmos efeitos em camundongos com deleção condicional de *Ptpn2*. Demonstrando o papel da TCPTP na modulação de vias neurais hipotalâmicas, importantes na modulação do gasto energético e peso corporal.

Estudos *in vitro* demonstram que a TCPTP é capaz de defosforilar a conexina 43 (CX43) nos resíduos de tirosina pY247 e pY265, com maior ação sobre o resíduo pY265 (LI et al., 2014). Em células do epitélio renal de rato (NRK) com ausência do fator de crescimento epidermal (EGF) observou-se a presença nuclear de TCPTP e a de CX43 na membrana plasmática. Essas células quando tratadas com EGF, observou-se um recrutamento de TCPTP e sua co-localização com CX43 na membrana plasmática (Li et al., 2014). Co-imunoprecipitação usando um anticorpo específico para TCPTP que interage com o domínio C-terminal de anti TCPTP-CT, com posterior análise por *Western blot* observou-se um mesmo complexo de TCPTP e CX43 (LI et al., 2014). Esses dados indicam que a TCPTP possui ação moduladora sobre a CX43, e consequente aumento da CX43 na membrana celular (LI et al., 2014).

No sistema nervoso central as redes de comunicação entre os astrócitos são de suma importância, essas redes se estabelecem por meio de junções comunicantes (PANNASCH et al., 2013; CLASADONTE; HAYDON, 2014). As junções comunicantes são formadas pela justaposição de dois hemicanais na membrana celular, sendo cada hemicanal uma estrutura hexamérica constituída por uma única unidade chamada conexina. As junções comunicantes são arranjadas por largos agrupamentos que podem alcançar a concentração de 10^4 junções comunicantes/ μm^2 na membrana plasmática (LAUF et al., 2002). As junções comunicantes são consideradas de baixa seletividade, a difusão das moléculas depende da sua constituição e ambiente iônico ao redor das junções comunicantes (HARRIS, 2007). A troca intercelular de moléculas nas junções comunicantes são de moléculas de pequeno peso molecular (principalmente abaixo de 1 kDa), tais como metabolitos (glicose, lactato), segundos mensageiros (ATP, IP3) ou íons (Ca^{2+} , Na^+) (SOHL; WILLECKE, 2004; HARRIS, 2007), assim como, no

clearance de potássio durante a atividade sináptica (PANNASCH et al., 2011; CLASADONTE; HAYDON, 2014). Os astrócitos são as células gliais que expressam a maior quantidade de junções comunicantes, embora os neurônios e demais células da glia também expressem tais junções (GIAUME; LIU, 2012). Os astrócitos expressam principalmente CX43 e CX30, tanto em roedores como no cérebro humano (VERSELIS; SRNIVAS, 2013). A dupla deleção astrocitária de CX43 e CX30 em camundongo acarreta uma falha na comunicação intercelular de fatias hipocampais (ROUACH et al., 2008).

Embora os astrócitos sejam considerados como células não excitáveis, as junções comunicantes presentes em astrócitos participam da formação e propagação de ondas de cálcio, que são primordiais para a sincronização de sinal, amplificação e comunicação intercelular (SCEMES; GIAUME, 2006; DE BOCK et al., 2014). Bernardinelli, Magistretti e Chatton (2004) demonstraram que as ondas de cálcio iniciadas em astrócitos por estimulação elétrica ou mecânica são acompanhadas por "ondas metabólicas" em cultura de células corticais. O aumento de Ca^{2+} através de redes astrogliais induz aumento de Na^+ intracelular, levando à captação de glicose (BERNARDINELLI; MAGISTRETTI; CHATTON, 2004). Em fatias de hipocampo de camundongo com deleção de CX30 e CX43 as ondas de sódio são completamente abolidas, demonstrando que as junções comunicantes desempenham função primordial nesse evento (LANGER et al., 2012).

No mesmo modelo de deleção de ambas as conexinas, ou quando se utilizou bloqueio farmacológico a atividade metabólica neuronal foi prejudicada (MÜLLER et al., 2014). Considerando que os astrócitos constituem o maior reservatório de glicogênio no cérebro (MÜLLER et al., 2014), a glicose é inicialmente captada pelo astrócito e esse, por sua vez, metaboliza em lactato, o lactato por sua vez, perpassa uma rede astrocitária que fornece o lactato aos neurônios, sustentando dessa forma a atividade sináptica (ROUACH et al., 2008). O lactato e a glicose são transportados entre a rede de astrócitos através das conexinas, fornecendo, desse modo substrato para as células neuronais (MÜLLER et al., 2014; Rouach et al., 2008). No modelo de deleção específica de CX30 e CX43 em célula astrocitária de camundongos, a difusão de glicose dos vasos para a rede astrocitária reduziu aproximadamente 30 e 50%, respectivamente, e aboliu totalmente nos camundongos duplamente deletados (ROUACH et al., 2008). A conexina 43 tem sido considerada como um sensor de metabolismo de glicose em astrócitos (ALLARD et al., 2013,2014; GANDHI et al.,

2010, BALL et al., 2011). De acordo com este conceito, os dados da literatura mostram que a diminuição induzida nos níveis de glucose no sangue em jejum atenua a expressão de CX43, enquanto que a infusão hiperglicêmica curta (3 horas) ou de longo prazo (48 horas) aumenta a expressão de CX43 no hipotálamo, sem alterar a expressão de CX30 em nenhum dos modelos (ALLARD et al., 2014). A redução na expressão de CX43 de forma moderada (~30%) por utilização de siRNA de interferência no núcleo ventromedial, inibiu a secreção de insulina (ALLARD et al., 2014), sugerindo desse modo, a função da CX43 como sensor metabólico da glicose no hipotálamo.

A CX30 astrogial regula transmissão sináptica e memória, por controlar a morfologia astrocitária e promover a adequada inserção de processos dos astrócitos na fenda sináptica (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). O gene que codifica a CX30 quando inativado (Cx30^{-/-}) em camundongo induz redução da atividade sináptica basal excitatória na região CA1 *Schaffer collateral*, contudo, sem afetar a atividade sináptica inibitória (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). Adicionalmente, a amplitude da corrente através do receptor α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionato (AMPA) em neurônios piramidais CA1, não foi alterada, demonstrando que as modificações não ocorreram na densidade de receptor AMPA (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). Adicionalmente camundongos transgênicos com ablação condicionada em astrócitos e CX43 e de ablação global de CX30 exibem nos neurônios do hipocampo prejuízo na depuração de K⁺ (WALLRAFF et al., 2006). A amplitude do potencial excitatório pós-sináptico em miniatura foi reduzida nos animais CX30^{-/-}, indicando que ocorreu redução dos níveis de glutamato na fenda sináptica (PANNASCH et al., 2014). Decorrente de tais alterações os camundongos apresentaram redução da memória de medo contextual após 24 h e observou-se redução no potencial de longa duração (LTP) no hipocampo (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). A expressão de CX30 por meio de injeção de lentivírus em camundongos CX30^{-/-} restabelece a comunicação sináptica glutamatérgica normal, no entanto, quando injetado CX30 com a porção C-terminal truncada (C30 Δ Cter) isso não é observado (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). Desse modo, observou-se que a porção C-Terminal da CX30 estava intimamente relacionada com a função sináptica glutamatérgica normal (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014).

As conexinas possuem outras funções ligadas à porção C-terminal que não a de canal, estão presentes na diferenciação celular e tumorigênese por interagir com uma variedade de proteínas associadas ao citoesqueleto, enzimas quinases e fosfatases, moléculas de adesão e cascatas moleculares de sinalização (ZHOU; JIANG, 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). A ablação de CX43 nos astrócitos em camundongo diminuiu significativamente a proliferação celular no neocortex (WIENCKEN-BARGER et al., 2007) e hipocampo (LIEBMANN et al., 2013), além disso, reduziu a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo (LIEBMANN et al., 2013). Em contraste, a eliminação de CX30 aumentou significativamente a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo (LIEBMANN et al., 2013). Esses dados revelam que CX43 promove a sobrevivência de novos neurônios no hipocampo de camundongos adultos enquanto CX30 restringe sua sobrevivência (LIEBMANN et al., 2013).

Em diversos sistemas neuroendócrinos, as alterações na cobertura glial nos neurônios do hipotálamo têm se demonstrado inversamente relacionado com o número de *inputs* sinápticos (GARCIA-SEGURA et al., 1999). A CX30 possui interação com proteínas do citoesqueleto envolvidas com a regulação das células de adesão e de motilidade (QU; GARDNER; SCHRIJVER, 2009; CLASADONTE; HAYDON, 2014). As análises histológicas demonstraram mudanças morfológicas nos astrócitos de camundongos CX30^{-/-}. Além disso, técnica de imunocoloração para glia para marcação de GFAP demonstrou processos alongados e aumento das ramificações nos astrócitos de camundongos CX30^{-/-} (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). Utilizando o método de análise de detalhe ultraestrutural por microscopia eletrônica em camundongos Cx30^{-/-} observou-se um aumento no tamanho e no número de processos finos distais de astrócitos na proximidade pós-sináptica, assim como um aumento no contato com a fenda sináptica pelos astrócitos (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). Mudanças na estrutura glial não são apenas envolvidas em modificações do número de *inputs* sinápticos, mas também afetam a eficácia sináptica devido a sua participação na depuração do glutamato e pelo controle das concentrações iônicas extracelulares, alterando desse modo a excitabilidade neuronal (ARAQUE; NAVARRETE, 2010).

Os estudos têm demonstrado que a programação nutricional neonatal é capaz de alterar uma série de mecanismos em populações neuronais hipotalâmicas envolvidas com a ingestão alimentar e o gasto energético. A hipótese do presente trabalho é de que alterações em células da glia no hipotálamo participam nos efeitos da programação

nutricional neonatal na modulação do balanço energético na vida juvenil e adulta. Considerando que as células gliais hipotalâmicas possuem importante função na homeostase energética, por estarem envolvidas em processos sinápticos, de gliotransmissão e na liberação de citocinas, dentre outros, objetivou-se investigar as possíveis alterações nessas células decorrentes da programação nutricional neonatal. A plasticidade celular glial está estritamente relacionada com as conexinas, que por sua vez participam tanto no metabolismo celular neuronal quanto na cobertura sináptica, por contribuir na morfologia astrocitária. Desse modo, avaliamos o envolvimento das conexinas, assim como de proteínas fosfatases, envolvidas na sinalização celular de leptina, na regulação da plasticidade glial, decorrente de eventos nutricionais durante o período de desenvolvimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da programação nutricional neonatal na glia do hipotálamo de ratos juvenis e adultos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o ganho de massa corporal e a ingestão alimentar em animais com alteração nutricional neonatal;
- Analisar as concentrações plasmáticas de leptina e insulina em animais com alteração nutricional neonatal na vida juvenil e adulta;
- Avaliar a expressão de citocinas, PTP1B e TCPTP e conexinas no hipotálamo de animais com alteração nutricional neonatal na vida juvenil e adulta;
- Analisar a morfologia de células da glia em animais com alteração nutricional neonatal na vida juvenil e adulta;
- Analisar a função da TCPTP na morfologia e na expressão de conexinas e citocinas em cultura primária astrocitária.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DA GLIA HIPOTALÂMICA NO BALANÇO ENERGÉTICO EM MODELO DE SUB- E SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL.

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos no primeiro dia de nascimento pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo – Campus Ribeirão Preto. Todos os animais foram mantidos em temperatura controlada (23 ± 1 C), ciclo de claro / escuro 12:12 (luzes acesas 6:00-18:00 h), com água e ração *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da FMRP-USP (Protocolo N. 53/2013 e Protocolo N. 58/2016).

3.1.1 Protocolo experimental I

Após o nascimento, foram mantidos 3 filhotes machos (ninhada pequena – SL), 10 filhotes (ninhada normal – NL) ou 16 filhotes (ninhada grande – LL) com cada fêmea lactante. Os filhotes excedentes foram eutanasiados por decapitação. Foram mantidos em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob regime de luz com ciclo claro–escuro de 12/12 horas (período de luz: 06h às 18h). Os animais receberam dieta padrão e água *ad libitum* durante todo período experimental.

Durante o período de lactação foi avaliado o ganho de peso da ninhada duas vezes por semana até o desmame no 21º dia de vida (PN21), quando foram separados em caixas contendo 5 animais e pesados individualmente. No PN50 ao PN60 de vida os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individualizadas para o controle da ingestão alimentar basal. No PN21 e PN60, os animais de grupos experimentais distintos, foram decapitados, o plasma coletado para posterior dosagem hormonal e o cérebro coletado em condições livres de RNase para posterior realização de PCR em tempo real ou *Western blotting*. Adicionalmente, outros grupos distintos de animais, no PN21 e PN60 foram anestesiados e perfundidos transcardiamente, como descrito abaixo, para posterior procedimento de imunoistoquímica ou imunofluorescência (Figura 01).

Figura 1. Protocolo Experimental 1.

3.1.2 Dosagem hormonal

No PN21 e PN60 o sangue do tronco foi coletado por decapitação em tubos contendo heparina e o plasma heparinizado foi armazenado em freezer a -20°C. A dosagem de leptina e insulina foram realizadas por kit de Elisa (EZRL-83K e EZRMI-13K).

3.1.3 Western blotting

Os fragmentos hipotalâmicos foram dissecados (espessura: 2.7 mm) de uma área de 1,0 mm lateral à linha mediana na borda anterior do quiasma óptico e da borda anterior dos corpos mamilares. A proteína hipotalâmica total foi extraída usando Tri-HCl (100mM Tri-HCl pH 7,4, 1% Triton-X 100, 2mM EDTA e 1% inibidor de protease e fosfatase Single-Use Cocktail, EDTA-Free [Thermo Scientific, 78443]), centrifugadas a 4°C e 15000 *g* por 50 min. Posteriormente, realizou-se a dosagem das proteínas em duplicatas, pelo método de BCA (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit) em espectrofotômetro. As alíquotas de 30 µg de lisados de proteína foram desnaturadas em tampão de amostra Laemmli pH6,8 (glicerol 20%, Tris·1M (pH 6.8), SDS 4%, DTT 0,1M, azul de bromofenol 0.02%) a 95°C por 5 minutos e aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE 10%, com 0,75 mm de espessura. Posteriormente, realizou-se a eletroforese e em seguida a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose 0,45 mm Trans Blot. Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução tampão de bloqueio das ligações inespecíficas (5% leite em pó desnatado em Tris-tampão salina-Tween 20X [TBS-T]) por 90 minutos em temperatura ambiente. As membranas foram incubadas *overnight*, sob agitação, a 4°C, com anticorpo primário rabbit anti-TCPTP [1:3000] (AB180714-Abcam) em solução contendo TBS-T. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBS-T e em seguida incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit-IgG conjugado a peroxidase [1:10000] (Cell Signaling-7074) em solução contendo TBS-T por 1 hora em temperatura ambiente. O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado usando detecção por quimioluminescência amplificada (ECL Prime– Amersham Biosciences) incubado durante 5 minutos. A detecção foi realizada no sistema Chemidoc XRS + Imaging System (Bio-Rad), com exposição de 240 segundos e captura a cada 10 segundos. As imagens digitais foram processadas utilizando o programa *Quantity One* 4.5.0 software (Bio-Rad).

3.1.4 Microdissecção, isolamento de RNA total e PCR em tempo real.

Usando uma agulha de aço inoxidável de 1,5 mm de diâmetro, as microdissecações (ARC: 1500 µm; PVN: 900 µm) foram obtidas em um criostato de acordo com as coordenadas do atlas Paxinos e Watson, (1997): PVN, -0,92 para -2,12 mm de bregma; ARC, -2,3 para -3,5 mm de bregma. As amostras de tecidos foram transferidas para um microtubo contendo RNA-later (Ambion) e armazenado a -80°C durante um período máximo de 24h até a extração de RNA.

O isolamento do RNA total a partir de cada amostra ocorreu por meio da utilização do reagente Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, realizou-se a remoção do DNA residual por meio do kit DNA-free kit (DNase treatment and removal reagents, Ambion). A integridade e a qualidade do RNA total foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,2% e foram consideradas aceitáveis para uso posterior somente quando as bandas 18S e 28S do RNA ribossômico foram visualizadas no gel. A quantificação do RNA total foi realizada por espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific).

Posteriormente efetuou-se a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir de 500ng de RNA, utilizando o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). Utilizou-se os seguintes reagentes: 2,5µL de 10X RT Buffer, 1 µL de 25X dNTP Mix (100mM), 2,5 µL de 10X RT Random Primers, 1,25 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase e 12,75µL de água RNase free. Utilizou-se em seguida o termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Applied Biosystems) para promover a transcrição reversa, nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C e 120 minutos a 37°C. O cDNA foi diluído em água RNase free na proporção 1:2, determinada anteriormente pela curva de quantificação por PCR em tempo real, e armazenado em freezer -20°C até a quantificação por PCR em tempo real

A quantificação por PCR em tempo real foi realizada utilizando Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. A reação de PCR foi realizada em triplicata, com 4 µL de cDNA e de 8µL de uma mistura contendo 6,25µL de solução Taqman 2X Master Mix (Applied Biosystems), 0,65µL de sonda específica e 1,6 µL de água livre de RNase. Os seguintes ensaios Taqman foram utilizados neste estudo: Rn01423685_m1 - (*Ptpn1*- PTP1B), Rn00588846_m1- (*Ptpn2* - TCPTP), Rn00584528_m1- (*Gjb6* -

CX30), Rn01433957_m1 - (*Gjal* - CX43), Rn01410330_m1 (*Il6*), Rn00580432_m1 (*Il1b*), Rn99999017_m1- (*Tnf*), 4352340E - (*Actb* – β -actina). Como controle negativo foi utilizado água em vez de cDNA, o gene endógeno (β -actina) foi utilizado para cada amostra de cDNA. Os resultados foram analisados pelo método de $\Delta\Delta CT$ ou curva padrão, quando a eficiência de amplificação não se encontrava entre 90-110%. A determinação do transcrito em cada amostra foi obtida pelo método $\Delta\Delta CT$. Para cada amostra, o ciclo limiar (CT) de RNAm foi determinado e normalizado pela média do CT do gene *housekeeping* ($\Delta CT = CT$ desconhecido – o gene CT endógeno). O RNAm na amostra desconhecida corrigido pelo grupo controle (calibrador, grupo NL), foi determinada pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ Desconhecido- ΔC_T controle. Os dados foram apresentados como uma expressão de RNAm relativo ao grupo controle.

3.1.5 Perfusão

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (TBE) 2,5% (1ml/100g, intraperitoneal), posteriormente foram posicionados em decúbito dorsal, após o desaparecimento dos reflexos raqui-medulares. Realizou-se então a incisão a partir do processo xifóide, em ambos os lados do gradil costal, até a cabeça do úmero. Na sequência, seccionou-se o diafragma, expondo completamente a cavidade torácica e consequentemente o coração. Foi inserida uma agulha ligada a uma bomba peristáltica no ventrículo esquerdo, em sentido à artéria aorta descendente, e seguido de uma incisão pequena no átrio esquerdo. A perfusão através do coração foi realizada com a infusão de 150 ml de solução tampão fosfato salina (PBS) 0,01 M, seguida pela infusão de 350 ml de paraformaldeído a 4%. Para realização da infusão foi utilizada uma bomba peristáltica com velocidade de 5 ml/minuto para os animais de 21 dias e de 15 ml/minuto para os animais de 60 dias. Posteriormente, o encéfalo foi recolhido e pós-fixado por 1 h em paraformaldeído 4%, após esse período, colocados em PBS contendo 30% de sacarose a 4°C por 4 dias, e posteriormente realizados os cortes histológicos em criostato.

3.1.6 Imunoistoquímica de tecido hipotalâmico

Os cortes encefálicos coronais foram cortados de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson, (1997): (PVN, -1.80 até -1.90 mm do bregma; ARC, -1.80 até -2.04mm do

bregma) em uma espessura de 30 μM e mantidos preservados em solução crioprotectora a -20°C . Uma em cada três secções foram utilizadas para a quantificação da imunomarcção de IBA-1. As secções foram lavadas com tampão salina Tris 1X (pH 7,6) e incubadas *overnight* em temperatura ambiente com anticorpo primário rabbit anti IBA-1 (1:5000 Wako). No segundo dia, após a lavagem, as secções foram incubadas durante 1 h com o anticorpo secundário *goat anti rabbit* biotilado (1:1200) e processado utilizando o reagente *Vectastain Elite*, um método de imunoperoxidase avidina-biotina (Vector Laboratories). Solução contendo diaminobenzidina, sulfato de níquel e H_2O_2 foi utilizada para gerar imunomarcção marrom-escuro. Posteriormente, os cortes foram montados nas lâminas e passaram pelo tratamento de contra coloração por cresil violeta. A contra coloração ocorreu utilizando o seguinte protocolo: as lâminas foram embebidas durante 2 minutos nas seguintes soluções, [Xilol I; Xilol II; Álcool 100° II; Álcool 100° I; Álcool 95° II; Álcool 95° I; Álcool 70°; Álcool 50°; H_2O destilada], sendo essa a fase de hidratação do tecido. Posteriormente, os cortes foram embebidos em cresil violeta durante aproximadamente 2 a 7 minutos, em seguida foram mergulhados em H_2O destilada. Posteriormente, os cortes foram embebidos nas seguintes soluções, durante 1 minuto [Álcool 50°; Álcool 70°; Diferenciador (1ml de ac. acético em 100ml de álcool); Álcool 70°; Álcool 96° I; Álcool 96° II; Álcool 100° I; Álcool 100° II; Xilol I; Xilol II], sendo essa a fase de desidratação do tecido, seguindo então para o selamento com lamínula. As fotomicrografias foram capturadas com o microscópio Leica equipado com uma câmara digital DC 200 ligado a um dispositivo de aumento de contraste e a quantificação da microglia foi realizada pelo programa ImageJ. As análises dos aspectos morfológicos, tais como raio e área do soma celular, foram realizadas pelo software Image-pro plus. Utilizou-se o mínimo de 10 células por série, sendo realizadas 3-4 séries do ARC e do PVN por animal. O resultado obtido foi a média do total de células analisadas por animal.

3.1.7 Imunofluorescência de tecido hipotalâmico

Os cortes encefálicos coronais foram cortados em uma espessura de 30 μm , como especificado acima, e mantidos preservados em solução crioprotetora a -20°C . Uma em cada três secções foi usada para o teste de imunofluorescência. As secções foram lavadas com tampão salina tris TBS (pH7,6) 1X e incubadas durante 48 horas a 4°C com o anticorpo primário, (Tabela 1), *rabbit* anti-TCPTP [1:500] (Abcam,

AB180714), *mouse* anti-GFAP [1:400] (Sigma, G3893, marcador para células astrocitárias, e *goat* anti-IBA-1 [1:1000] (Abcam, AB5076), marcador para células microgliais. Após a lavagem, as secções foram incubadas durante 1 h com anticorpo secundário [1:500], alexa fluor 488 *donkey anti rabbit* (Molecular Probes, A21206); alexa fluor 594 *donkey anti mouse* (Jackson ImmunoResearch - 715587003) e *donkey* biotinilado anti *goat* (Jackson ImmunoResearch -705065147) Após a lavagem, os cortes foram incubados por 1h com estreptavidina [1:500] e depois novamente, os cortes foram incubados por 10 min com Alexa fluor 350-Tiramida [1:1000] e tampão com H₂O₂ [1:100] (Life Technologies T20935).

Tabela 1. Tripla marcação de TCPTP, GFAP e IBA-1.

Anticorpos primários	Anticorpos secundários	Amplificação do Sinal
<i>rabbit</i> anti TCPTP [1: 500]	alexa fluor 488 <i>donkey anti rabbit</i> [1: 500]	1° - estreptavidina [1: 500]; 2° alexa fluor 350-tiramida [1:1000] e tampão com H ₂ O ₂ [1:100].
<i>mouse</i> anti GFAP [1: 400]	alexa fluor 594 <i>donkey anti mouse</i> [1: 500]	
<i>goat</i> anti IBA-1 [1: 1000]	<i>donkey anti goat</i> biotinilado [1: 500]	

Outro conjunto de secções (Tabela 2) foi incubado com anticorpo primário *rabbit anti connexin 30* [1: 500] (Life Technologies, 712200) *mouse* anti GFAP [1:400] (Sigma, G3893) e de *goat* anti IBA-1 [1:1000] (Abcam, AB5076). Após a lavagem, as secções foram incubadas por 1h com anticorpo secundário, alexa fluor 594 *donkey anti rabbit* [1:3000] (Jackson ImmunoResearch, 711585152), alexa fluor 488 *donkey anti goat* [1:500] (Molecular Probes, A11055), alexa fluor 647 *donkey anti mouse* [1:250] (Jackson ImmunoResearch, 715605151).

Tabela 2. Tripla marcação de CX30, GFAP e IBA-1.

Anticorpos primários	Anticorpos secundários
<i>rabbit anti connexin 30</i> [1:500]	alexa fluor 594 <i>donkey anti rabbit</i> [1:3000]
<i>mouse</i> anti GFAP [1: 400]	alexa fluor 647 <i>donkey anti mouse</i> [1:250]
<i>goat</i> anti IBA-1 [1: 1000]	alexa fluor 488 <i>donkey anti goat</i> [1:500]

Outro conjunto de secções (Tabela 3) foi incubado com *mouse anti connexin 43* [1:500] (Pharmingen-610062), *rabbit anti GFAP* [1:400] (Sigma-G9269) e de *goat anti IBA-1* [1:1000] (Abcam-AB5076). Após a lavagem, as secções foram incubadas por 1h com anticorpo secundário apropriado, alexa fluor 647 *donkey anti mouse* [1:250] (Jackson ImmunoResearch, 715545151), alexa fluor 594 *donkey anti rabbit* [1:500] (Jackson ImmunoResearch, 711585152), alexa fluor 488 *donkey anti goat* [1:500] (Molecular Probes, A11055).

Tabela 3. Tripla marcação de CX43, GFAP e IBA-1.

Anticorpos primários	Anticorpos secundários
<i>mouse anti connexin 43</i> [1:500]	alexa fluor 647 <i>donkey anti mouse</i> [1:250]
<i>rabbit anti GFAP</i> [1:400]	alexa fluor 594 <i>donkey anti rabbit</i> [1:500]
<i>goat anti IBA-1</i> [1: 1000]	alexa fluor 488 <i>donkey anti goat</i> [1:500]

3.1.8 Processamento fotomicrográfico de imunofluorescência

As imagens de imunofluorescência foram obtidas utilizando o microscópio de varredura a laser multifóton (LSM 780 - Axio Observer - Zeiss) equipado com uma objetiva de 63x. As fatias de imagens consecutivas foram tomadas em intervalos de 0,4mm, adquiridas sequencialmente em Z e foram reconstruídos usando Fiji-ImageJ. A determinação da imunorreatividade total bem como da imurreatividade do soma e o tamanho da extensão dos processos gliais foi analisada pelo software ImageJ-Fiji (POOL et al, 2007; LONGAIR et al, 2011). Utilizou-se 3-4 séries do ARC e o resultado obtido foi a média do total de células analisadas por animal. A co-localização das proteínas foi analisada em série de 35 planos ópticos individuais do núcleo arqueado de cada amostra, utilizando o teste de co-localização de Manders (TCM), por meio do *software* ImageJ-Fiji como análise quantitativa, ao qual mediu a fração de colocação de uma proteína com uma segunda proteína (MANDERS; VERBEEK; ATEN, 1993). Para duas sondas, denotadas como G (*Green*) e R (*Red*), dois valores diferentes são derivadas da TCM, M1, a fracção de G em compartimentos contendo R e M2, a fracção de R em compartimentos contendo G. Os coeficientes foram simplesmente calculados como:

$$M1 = \frac{\sum_i G_{i,colocal}}{\sum_i G_i}$$

Onde $G_{i,colocal} = G_i$ se $R_i > 0$ e $G_{i,colocal} = 0$ if $R_i = 0$ e

$$M2 = \frac{\sum_i R_{i,colocal}}{\sum_i R_i}$$

Onde $R_{i,colocal} = R_i$ se $G_i > 0$ e $R_{i,colocal} = 0$ if $G_i = 0$.

R_i e G_i refere-se aos valores de intensidade dos canais de “red” e “green”, respectivamente e de *pixel i* (DUNN; KAMOCKA; MCDONALD, 2011). Todavia os resultados apresentados foram apenas da fração $M1 = G$ (proteína alvo) em compartimentos R (célula). O coeficiente de Manders varia de 0 a 1, independentemente da intensidade dos pixels de um dado canal, sendo considerados valores acima de 0,6 como indicativo de co-localização (ZINCHUK; GROSSENBACHER-ZINCHUK, 2009).

3.2 AVALIAÇÃO DA TCPTP NA MODULAÇÃO DA MORFOLOGIA ASTROCITÁRIA E NA EXPRESSÃO DE CONEXINAS CX30 E CX43.

3.2.1 *Cultura primária de células astrocíticas hipotalâmicas*

A cultura primária de astrócitos foi realizada com base no protocolo proposto por McCarthy e Vellis (1980). Após a coleta dos HMB de ratos neonatos de 1 dia, precedida pela remoção das meninges, em meio de dissecação (HBSS modificado [sem cálcio e sem magnésio gibco 14190144]), foram transferidos para um tubo falcon (gentleMACS tubo C) contendo um mix de enzimas a partir do kit de dissociação (enzima 1 [50 µL] e 2 [1900µL], Kit neural tissue dissociation, MiltenyiBiotec). Em seguida, o tubo com os tecidos foi pré-aquecidos e acoplado ao homogenizador (gentle MACS dissociator, MiltenyiBiotec), e homogenizados por 30 segundos. Na sequência, o tubo foi incubado (incubadora Dubnoff, 95% O₂ e 5% CO₂ a 37°C, 30 ciclos/min), por 15 minutos. Posteriormente, homogeneizado por 30 segundos e então, adicionado um mix de enzimas (enzima 3 [20 µL] e 4 [10 µL] do Kit), e novamente incubado, sob as mesmas condições, por 15 minutos. Posteriormente, o tubo foi acoplado ao homogenizador por 60 segundos e incubado por 15 minutos. Ao final o homogenato de tecido foi filtrado (40 µm, Milipore) e o filtro lavado com 10 ml de DMEN puro (Dulbecco's Modified Eagle Medium, [Life technologies # 11885076]). Em seguida foi realizada a centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspensão com 1 a 2 ml de meio enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB) inativado e 1% de solução de penicilina (10,000 IU/ml)-streptomicina (10,000 µg/ml) (PS; Mediatech). Após a homogeneização do precipitado, as células foram cultivadas em frascos de cultura P75 (75 cm²), contendo 10ml de solução de DMEN (meio) completa, em incubadora (Galaxy 170R, Eppendorf) contendo 5% de CO₂ a 37°C. Transcorrida 1 hora, foi realizado o replaqueamento das células em suspensão em novo frasco de cultura, P75. Este procedimento foi realizado 2 vezes, seguindo achados de Couchman et al. (1983) que mostraram o tempo de adesão dos fibroblastos em superfície de poliestireno. Terminados os dois procedimentos de replaqueamento, as células foram mantidas em cultivo por um período de 8-10 dias, havendo troca parcial do meio de incubação (50%) a cada 48-72 horas.

3.2.2 Coleta das células

Atingida a confluência de 80%, as células foram submetidas à repicagem que consiste na agitação de 200 rpm por um período de 2h a 37°C, a fim de separar os oligodendrócitos, microglia e neurônios dos astrócitos. As células em suspensão foram desprezadas e realizada a lavagem das células aderidas com 1ml de PBS sem cálcio e sem magnésio. Em seguida foram adicionados 5ml de tripsina-EDTA 1X (Sigma 15400054), sendo o frasco mantido por 15 minutos na incubadora (5% de CO₂ a 37°C). Finalizada a etapa de tripsinização, foi adicionada a mesma quantidade de meio completo, para interromper a reação enzimática da tripsina. O conteúdo foi removido e transferido para um tubo falcon, e centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado com 2 a 3 ml de meio completo. Uma alíquota da suspensão foi separada para contagem das células viáveis através do método de exclusão com *trypan blue*, utilizando a proporção de 1:1, por visualização direta na câmara de Neubauer. As células foram então cultivadas em placa de 24 ou 96 poços, contendo ou não lamínulas pré-tratadas com *cell-tak* (Corning®, [354240]), a depender do protocolo experimental. Os experimentos foram realizados quando a confluência das células atingiu em torno de 80%, geralmente, 2 dias após a repicagem. Todos os experimentos para cada procedimento metodológico foram realizados no mínimo 3 vezes.

3.2.3 Avaliação do efeito da estimulação com LPS e diferentes concentrações de leptina na morfologia astrocitária e expressão de TCPTP.

As células astrocitárias hipotalâmicas, após dois dias da repicagem, como descrito acima, foram estimuladas durante 24 horas com LPS [500ng/ml] e leptina (LEP) [100ng/ml], [1000ng/ml] e [5000 ng/ml]. O estímulo com LPS foi utilizado como controle positivo do método. Experimentos distintos foram realizados para (1) imunofluorescência, onde foi realizada a marcação para GFAP, TCPTP e DAPI; (2) e PCR em tempo real onde foi realizada a avaliação da expressão do RNAm de *Ptpn1* e *Ptpn2* (**Figura 02**).

Figura 2. Protocolo Experimental 2.

3.2.4 Avaliação da participação da TCPTP na morfologia celular e na expressão das conexinas e citocinas em cultura astrocitária hipotalâmica.

3.2.5 Silenciamento de *Ptpn2* em cultura primária de astrócito hipotalâmico.

No dia da repicagem, as culturas destinadas à transfecção (40.000 células/poço – placa de 24 poços) foram incubadas com meio completo sem antibiótico. Após dois dias da repicagem, as células foram transfectadas com 25nM de cada siRNA para o silenciamento de *Ptpn2* (Thermofisher, 4390771 - s138533; s138532; s138531), 0,25% de DharmaFECT (GE Healthcare) e DMEN sem antibiótico num volume final de 500µL em placa de 24 poços utilizada para experimentos de imunofluorescência ou 1000µL utilizada para PCR, seguindo as condições do fabricante. Como controle negativo, *Silencer® Select Negative Control No. 1 siRNA* (Thermofisher), como controle positivo de transfecção foi utilizado o *Silencer Select GAPDH Positive Control siRNA*. Após 24 horas da transfecção, as células foram estimuladas com leptina [5000ng/ml] ou LPS [500ng/ml] sendo o estímulo mantido por mais 24 horas. Posteriormente, experimentos distintos foram realizados para (1) realização do PCR em tempo real para verificação da expressão de RNAm de *Ptpn1*, *Ptpn2*, *Gja6*, *Gja1*, *Il6*, *Il1b* e *Tnfa*; ou imunofluorescência para marcação de GFAP, TCPTP/CX30/CX43 e DAPI (Figura 03).

Figura 3. Protocolo Experimental 3.

3.2.6 PCR em tempo real de cultura primária astrocitária hipotalâmica.

As células astrocitárias, obtidas como descrito acima, foram plaqueadas (90.000 células em 500µL) em placas de 24 poços. O RNA total foi isolado a partir de cada amostra, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), e 250 ng de RNA total foi usado para a síntese do cDNA, utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). A expressão gênica foi verificada por PCR em tempo real (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System). Foram utilizados os seguintes ensaios TaqMan (Applied Biosystems): Rn00584528_m1- (*Gjb6* - CX30), Rn01433957_m1 - (*Gjal* - CX43), Rn01423685_m1 (*Ptpn1*), Rn00588846_m1 (*Ptpn2*), Rn01410330_m1 (*Il6*), Rn00580432_m1 (*Il1b*), Rn99999017_m1- (*Tnfa*), 4352340E - (*Actb* - β -actina). Cada reação de PCR foi realizada em triplicata. Água em vez de cDNA foi utilizada como controle negativo. β -actina foi utilizada como controle endógeno (*housekeeping*) para cada amostra de cDNA. A expressão relativa do gene-alvo em cada amostra foi obtida pelo método $\Delta\Delta Ct$.

2.2.7 Imunofluorescência de cultura primária astrocitária hipotalâmica.

As células astrocitárias, obtidas como descrito acima, foram plaqueadas (40.000 células em 500ul) em placas de 24 poços, contendo lamínulas pré-tratadas como se segue. As lamínulas foram imersas sob agitação em HCl 6N diluído em álcool etílico, seguido por lavagem em etanol puro e posterior flambagem. Posteriormente, foi realizado o esfregão com a solução de *Cell Tak* (80% *Cell Tak* [Corning®, 354240], 20% Na_2CO_3 2M). As lamínulas foram inseridas na placa e mantidas durante aproximadamente 20 minutos abertas no fluxo laminar para secagem. Após esse período, as lamínulas foram lavadas duas vezes com 500µL de meio puro. O plaqueamento foi realizado em meio puro e condicionada à placa na estufa contendo 5% de CO_2 a 37°C durante 20 minutos. Na sequência acrescentou-se 200µL de meio completo.

No dia do experimento, após 24 horas dos estímulos com leptina ou LPS, como descritos nos protocolos experimentais, a imunofluorescência (IF) foi iniciada a partir da lavagem dos poços com TBS (pH 7,6) (1X), em seguida, incubou-se com PFA 2% por 20 minutos para fixação das células à lamínula. Transcorrido este período as células foram lavadas com glicina 0,1M por 5 minutos seguido da lavagem das mesmas com

TBS 1X (2X). A seguir, foram incubadas com 200µl de solução de bloqueio (PBS 0,1M; NHS 5%; triton 0,3% ou Sapopina 0,01% para marcação de CX30), por 1 hora em temperatura ambiente, posteriormente o anticorpo primário por 1 hora: *rabbit* anti TCPTP [1: 500] (Abcam-AB180714), *mouse* anti GFAP [1:400]. Outro conjunto experimental foi incubado com anticorpo primário *rabbit anti connexin30* [1:200] (Life Technologies 712200) e *mouse* anti GFAP [1: 400]. Após a lavagem, foi realizada a incubação com anticorpos secundários [1:400] por 1h: alexa fluor 488 *donkey anti rabbit* (Jackson Immunoresearch, 711547003) e alexa fluor 594 *donkey anti mouse* (Jackson Immunoresearch, 715585150). Outro conjunto experimental foi incubado com anticorpo primário *mouse anti connexin 43* [1:250] (Pharmingen-610062) e *rabbit* anti GFAP [1:1000] (Sigma-G9269). Após a lavagem, foi realizada a incubação com anticorpos secundários [1:400] por 1h: alexa fluor 488 *donkey anti mouse* (Jackson Immunoresearch, 715545151) e alexa fluor 594 *donkey anti rabbit* (Jackson Immunoresearch, 711585152). Para verificação da ausência de microglia ou de neurônios na cultura foi realizada a incubação com anticorpo *goat* anti IBA-1 [1:1000] (Abcam-AB5076) ou *mouse* anti NeuN [1:500] (Milipore, MAB377). Após a lavagem, foi realizada a incubação com anticorpos secundários [1:400] por 1h: alexa fluor 488 *donkey anti goat* (Molecular Probes, A11055) e alexa fluor 488 *donkey anti mouse* (Jackson Immunoresearch, 715545151), respectivamente. Após a incubação com o anticorpo secundário, as lamínulas foram incubadas com *DAPI* (4',6-diamidino-2-phenylindole) um marcador nuclear [15mM] por 2 minutos.

3.2.8 Processamento fotomicrográfico de imunofluorescência de cultura primária astrocitária hipotalâmica.

As imagens de imunofluorescência foram obtidas utilizando o microscópio de varredura a laser multifóton (LSM 780 - Axio Observer - Zeiss) equipado com uma objetiva de 40x. As fatias de imagens consecutivas foram tomadas em intervalos de 0,4mm, adquiridas sequencialmente em Z e foram reconstruídos usando o *software Fiji-ImageJ*. A medição da imunorreatividade da célula bem como a análise da área celular foi analisada pelo *software Fiji-ImageJ* e utilizou-se 4-5 campos aleatórios por poço e o dado obtido foi expresso por célula analisada.

3.2.9 Ensaio de viabilidade celular por redução do sal de tetrazólio (MTT) dos tratamentos realizados em cultura astrocitária hipotalâmica.

A redução do MTT é um método colorimétrico, neste ensaio, as células incorporam o MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] de cor amarela e lipofílico, promovendo no interior da mitocôndria a redução do anel tetrazólico deste sal pela succinato-coenzima Q mitocondrial resultando na formação de cristais de *formazan* de cor azul (MOSMANN, 1983). Desse modo, a redução mitocondrial reflete de forma geral o estado funcional da cadeia respiratória, consequentemente o ensaio de MTT permite avaliar a viabilidade celular.

Conforme sugerido por ZHANG et al. (2015), o ensaio de MTT (MTT; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) foi submetido a adaptações nos protocolos envolvendo culturas primárias de astrócitos hipotalâmicos. As células astrocitárias hipotalâmicas foram plaqueadas em microplacas de 96 poços, contendo 3×10^4 células em 150 μ L de DMEN completo por poço. Após 48 h de incubação na estufa nas seguintes condições (95%CO e 5% H₂O, a 37° C) os astrócitos atingiram 80% de confluência. Posteriormente ao atingir a confluência realizaram-se os seguintes tratamentos: (1) grupo controle (CTL); (2) controle de morte celular induzido por DMSO (3) controle negativo (CTL NEG); (4) siRNA *Gapdh*; (5) siRNA *Ptpn2*; (6) siRNA *Ptpn2* + LEP (7) siRNA *Ptpn2* + LPS, durante 48 horas. Adicionalmente, o tratamento apenas com (8) LEP; ou (9) LPS durante 24 horas (Figura 04).

No final do período de tratamento, foram adicionados 15 μ L por poço de solução de MTT (5 mg/ml) e, posteriormente as células foram incubadas a 37°C durante 4 h. Considerando que as células astrocitárias se aderem ao poço, o sobrenadante foi então descartado, e adicionado 150 μ L de solubilizante álcool isopropanol por poço e incubados durante 10 minutos a 37°C. Posteriormente, a leitura foi realizada em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como viabilidade celular relativa em comparação com o grupo controle.

Figura 4. Protocolo Experimental 4.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão e os resultados foram analisados utilizando o software Statistica. A análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas foi utilizada para analisar o peso corporal e da ingestão alimentar e os outros parâmetros foram analisados por ANOVA de uma via. O teste de ANOVA de duas vias foi utilizado para os experimentos de cultura primária astrocitária com silenciamento e posterior estímulo para a análise da área astrocitária e imunorreatividade. Na sequência foi realizado o teste *post hoc* de Newman-Keuls. Nos experimentos de cultura primária astrocitária de silenciamento e posterior estímulo para análise de PCR em tempo real os dados foram analisados pelo teste de Mann Whitney. A estimativa do efeito está expressa pelo valor de eta quadrado parcial (η_p^2). O nível de significância (α) foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE SUBNUTRIÇÃO E SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL.

4.1.1. Ganho de peso corporal e ingestão alimentar.

O ganho de peso corporal das ninhadas foi verificado desde o nascimento (PN1) até o dia 21 (PN21) pós-natal. Observou-se que a alteração nutricional no período neonatal modulou o ganho de peso corporal durante a lactação ($F_{2,29} = 35,82$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,71$), assim como a idade dos animais ($F_{4,116} = 907,58$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,97$). Observou-se também uma interação entre a alteração nutricional neonatal e a idade ($F_{8,116} = 51,29$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,78$) de modo que o ganho de peso corporal foi maior no SL e menor no LL, ($p < 0,01$), em comparação com o grupo NL, no PN14 e PN21 (Figura 5A).

Após o desmame, os animais foram pesados individualmente a cada 5 dias até o PN60. Observou-se que a alteração nutricional no período neonatal modulou o ganho de peso corporal ($F_{2,53} = 95,03$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,78$) assim como a idade dos animais ($F_{8,424} = 1501,93$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,96$). Observou-se também uma interação entre a alteração nutricional neonatal e a idade ($F_{16,428} = 4,92$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,16$) na vida adulta, de forma que o ganho de peso no grupo SL foi significativamente maior ($p < 0,01$) ao longo da análise, em comparação com o grupo NL (Figura 5C). Por outro lado, o grupo LL apresentou menor peso corporal ($p < 0,01$) entre o PN21 e PN30 (Figura 5B), após esse período o grupo LL apresentou peso corporal semelhante ao grupo NL.

Quando avaliamos a ingestão alimentar, entre o PN50 ao PN60, observou-se que a alteração nutricional neonatal modulou a ingestão alimentar após o desmame ($F_{2,61} = 188,56$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,86$), assim como a idade dos animais ($F_{10,61} = 3,44$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,05$), de modo que no grupo SL observou-se ingestão alimentar semelhante ao grupo NL, enquanto que o grupo LL apresentou aumento ($p < 0,01$) na ingestão alimentar em comparação com o grupo NL (Figura 5D).

Figura 5. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre o ganho de peso corporal (g) da ninhada pequena (SL), normal (NL), e grande (LL) até o desmame no PN21, $n=8-16$ (A); fotografia representativa do peso corpora no PN14 (B); e ganho de peso corporal individual pós desmame do PN21 ao PN60, $n=16-25$ (C); e ingestão alimentar (g/100g de peso corporal) durante o PN50 ao PN60, $n=18-23$ (D). Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

4.1.1. Concentração hormonal plasmática.

A avaliação de dosagem hormonal demonstrou que a alteração no período neonatal nutricional modificou as concentrações plasmáticas de leptina no PN21 ($F_{2,17} = 18,54$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,68$) e insulina ($F_{2,17} = 10,72$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,56$). Observou-se no PN21 um aumento ($p < 0,01$) na concentração de leptina e insulina plasmática no grupo SL ($6,4 \pm 0,9$ ng/ml e $1,97 \pm 0,15$ ng/ml, respectivamente), em comparação com os grupos NL ($3,8 \pm 0,3$ ng/ml e $1,3 \pm 0,2$ ng/ml, respectivamente) e LL ($1,2 \pm 0,1$ ng/ml e $0,99 \pm 0,09$ ng/ml, respectivamente) (Figura 6A). No entanto, o grupo LL apresentou uma diminuição ($p < 0,01$) na concentração de leptina plasmática quando comparado com o grupo NL.

A programação nutricional neonatal também modificou as concentrações plasmáticas de leptina (SL: $5,2 \pm 1,1$ ng/ml; NL: $1,8 \pm 0,4$ ng/ml; LL: $4,3 \pm 0,5$ ng/ml) no PN60 ($F_{2,17} = 5,34$, $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,38$) e insulina (SL: $2,5 \pm 0,4$ ng/ml; NL: $1,2 \pm 0,09$ ng/ml; LL: $3,4 \pm 0,5$ ng/ml), ($F_{2,16} = 11,62$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,59$). Adicionalmente, os grupos SL e LL apresentaram concentrações aumentadas de leptina plasmática ($p < 0,05$; Figura 6A) e insulina ($p < 0,01$; Figura 6B) em comparação com o grupo NL.

Figura 6. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a concentração de leptina plasmática (A) e de insulina (B) plasmática no PN21 e PN60 nos grupos SL, NL e LL, $n=7$. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

4.1.2. Expressão relativa de RNAm de *Ptpn1* e *Ptpn2* no hipotálamo.

Na análise por PCR em tempo real observou-se que a alteração nutricional neonatal não promoveu alteração significativa na expressão de *Ptpn1* no ARC (Figura 7A) e no PVN (Figura 7B) e de *Ptpn2* no PVN (Figura 7D). No entanto, a alteração nutricional neonatal promoveu modulação na expressão de RNAm de *Ptpn2* no ARC (Figura 7C) no PN21 ($F_{2,15} = 5,34$ $p < 0,05$, $\eta_p^2 = 0,41$) e no PN60 ($F_{2,23} = 9,38$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,44$). Observou-se que somente o grupo SL apresentou um aumento ($p < 0,01$) na expressão do RNAm de *Ptpn2* no PN21 quando comparado ao grupo NL. Por outro lado, no PN60 ambos os grupos SL e LL tiveram um aumento ($p < 0,05$) na expressão do RNAm de *Ptpn2* quando comparados com o grupo NL.

Figura 7. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a expressão relativa do RNAm de *Ptpn1*, no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (A) e no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (B) e de *Ptpn2* no ARC (C) e PVN (D) no PN21 e PN60 nos grupos SL, NL e LL, $n=9$. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

4.1.3. Expressão proteica de TCPTP no hipotálamo.

Utilizando o método de *Western Blotting* para quantificação proteica, observou-se que a programação nutricional neonatal promoveu alteração na expressão proteica de TCPTP no hipotálamo (Figura 8) no PN21 ($F_{2,17} = 3,72$ $p < 0,05$, $\eta_p^2 = 0,30$) e no PN60 ($F_{2,12} = 4,45$ $p < 0,05$, $\eta_p^2 = 0,43$). Observou-se um aumento ($p < 0,05$) da expressão proteica de TCPTP hipotalâmica no grupo SL no PN21, quando comparado ao grupo NL. Todavia, no PN60 ambos os grupos SL e LL, apresentaram um aumento ($p < 0,05$) na expressão proteica de TCPTP quando comparado ao grupo NL.

Figura 8. Efeito da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a expressão proteica hipotalâmica de TCPTP no PN21 e PN60 nos grupos SL, NL e LL, $n=7$. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL

4.1.5. Imunorreatividade para TCPTP, GFAP e IBA-1 no ARC.

A programação nutricional neonatal promoveu alteração na imunorreatividade de TCPTP no PN21 (Figura 9A; 10A), ($F_{2,27} = 53,30$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,79$) e PN60 (Figura 9A; 10B), ($F_{2,30} = 71,30$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,83$). Observou-se que no PN21, o SL apresentou um aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade de TCPTP quando comparado com o grupo NL. No entanto, na PN60 ambos os grupos, SL e LL, apresentaram aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade TCPTP.

Da mesma forma, a programação nutricional neonatal promoveu alteração na imunorreatividade de GFAP no PN21 (Figura 9B; 10A), ($F_{2,27} = 19,19$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,59$) e PN60 (Figura 9B; 10A), ($F_{2,30} = 177,25$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,92$). Observou-se que no PN21, o SL apresentou um aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade para GFAP quando comparado com o grupo NL. Todavia, no PN60 ambos os grupos, SL e LL, apresentaram aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade de GFAP.

Concomitantemente às alterações de TCPTP e de GFAP, a alteração nutricional neonatal promoveu alteração na imunorreatividade de IBA-1 no PN21 (Figura 9C; 10A), ($F_{2,27} = 29,30$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,59$) e PN60 (Figura 9C, 10B), ($F_{2,30} = 18,97$ $p < 0,01$, $\eta^2 = 0,56$). No PN21, observou-se que o grupo SL apresentou um aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade de IBA-1 quando comparado com o grupo NL. No entanto, o grupo LL apresentou uma diminuição ($p < 0,05$) na imunorreatividade de IBA-1 quando comparado com o grupo NL. Por outro lado, no PN60 ambos os grupos, SL e LL, apresentaram aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade de IBA-1.

Com intuito de avaliar de forma quantitativa a colocalização utilizamos o coeficiente de Manders. Ao utilizar esse método os dados podem variar de 0 a 1, sendo que acima de 0,6 representa a co-localização das marcações. Observou-se que a alteração no período neonatal nutricional modulou a co-localização da imunorreatividade para TCPTP / GFAP (Tabela 4) no PN21 ($F_{2,27} = 113$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,89$) e PN60 ($F_{2,30} = 51,92$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,77$). No PN21, observou-se que o grupo SL apresentou um aumento ($p < 0,01$) na co-localização quando comparado com o grupo NL. Todavia, no PN60, ambos os grupos SL e LL apresentaram um aumento ($p < 0,01$) na co-localização quando comparado com o grupo NL. Além disso, a marcação de TCPTP não apresentou co-localização com a imunorreatividade de IBA-1 no PN21, assim como no PN60.

Figura 9. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a imunorreatividade (pixel médio) de TCPTP (A), GFAP (B) e IBA-1 (C) nos grupos SL, NL e LL, $n=10$. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

Figura 10. Fotomicrografias representativas da tripla marcação de TCPTP (verde), GFAP (vermelho) e IBA-1 (Azul) no ARC no PN21 (A) e PN60 (B) nos grupos SL, NL e LL. Escala do ARC: 200µm; TCPTP, GFAP e IBA-1: 25µm; Magnificação: 63x.

Tabela 4. Efeitos da supernutrição e subnutrição neonatal na análise da co-localização (Teste de Manders) da imunorreatividade de TCPTP com GFAP ou IBA-1, no ARC, no PN21 e PN60 dos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

PN	Sobreposição	SL	NL	LL
PN21	TCPTP/ GFAP	0,9450 $\pm$ 0,0180*	0,554 $\pm$ 0,0230	0,5042 $\pm$ 0,0265
PN60	TCPTP/ GFAP	0,9796 $\pm$ 0,0065*	0,7912 $\pm$ 0,0247	0,9832 $\pm$ 0,0065*
PN21	TCPTP/IBA1	0,2286 $\pm$ 0,0330	0,2738 $\pm$ 0,0330	0,2423 $\pm$ 0,0399
PN60	TCPTP/IBA1	0,1903 $\pm$ 0,0249	0,2349 $\pm$ 0,0341	0,2186 $\pm$ 0,04146

4.1.6 Expressão do RNAm de *Gja6* e *Gja1* no ARC.

No PN21, observou-se que a alteração nutricional neonatal promoveu alterações na expressão do RNAm de *Gja6*, gene que codifica a CX30 (Figura 11A), (tamanho de ninhada: $F_{2,21} = 6,11$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,37$), assim como, a expressão do RNAm de *Gja1*, gene que codifica CX43 (Figura 11B), ($F_{2,27} = 21,81$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,61$). Observou-se que ambos os grupos SL e LL apresentaram uma diminuição ($p < 0,01$) da expressão do RNAm de *Gja6*, quando comparados com o grupo NL. Observou-se no grupo SL um aumento ($p < 0,05$) na expressão do RNAm de *Gja1*, quando comparado ao grupo NL.

No PN60, observou-se que a alteração nutricional neonatal promoveu alterações na expressão do RNAm de *Gja6* (Figura 11A), ($F_{2,27} = 149,22$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,92$). Observou-se que ambos os grupos SL e LL apresentaram a redução da expressão do RNAm de *Gja6* ($p < 0,01$), quando comparados com o grupo NL. Todavia, no PN60 a programação nutricional neonatal não promoveu alteração na expressão do RNAm de *Gja1* (Figura 11B).

Figura 11. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a expressão relativa do RNAm de *Gja6* (A) e RNAm de *Gja1* no ARC no PN21 e PN60 nos grupos SL, NL e LL, n=10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

4.1.7. Imunorreatividade de CX30, GFAP e IBA-1.

No PN21, observou-se que a alteração nutricional neonatal não promoveu modificações na imunorreatividade de CX30 (Figura 12, 13A) no ARC. No PN60, no entanto, observou-se que a alteração nutricional neonatal promoveu modificações na imunorreatividade de CX30 (Figura 12, 13B), ($F_{2,23} = 4,76$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,29$). Observou-se que ambos os grupos SL e LL apresentaram uma redução imunorreatividade de CX30 ($p < 0,05$) quando comparados com o grupo NL. Além disso, o grupo SL também apresentou uma redução ($p < 0,01$) na imunorreatividade de CX30 quando comparado com o grupo LL.

No PN21, observou-se sobreposição da imunorreatividade de CX30/GFAP, no entanto, a programação nutricional neonatal não alterou a co-localização de CX30/GFAP (Tabela 5).

No entanto, no PN60 a programação nutricional neonatal modulou a co-localização de CX30/GFAP ($F_{2,27} = 28,77$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,57$). Observou-se que os grupos SL e LL apresentaram uma diminuição ($p < 0,01$) na co-localização de CX30/GFAP, quando comparado com o grupo NL.

Embora tenha sido observada a co-localização CX30/IBA-1 no PN21 e PN60, a programação nutricional neonatal não promoveu alteração neste parâmetro.

Figura 12. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a imunorreatividade de CX30 (verde), GFAP (vermelho) e IBA-1 (Azul) no PN21 e PN60 no ARC nos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

Figura 13. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para CX30 (verde), GFAP (vermelho) e IBA-1 (Azul) no ARC no PN21 (A) e PN60 (B) nos grupos SL, NL e LL. Escala do ARC: 200µm; TCPTP, GFAP e IBA-1: 25µm; Magnificação: 63x.

Tabela 5. Efeitos da supernutrição e subnutrição neonatal na análise da sobreposição (Teste de Manders) da imunorreatividade de CX30 com GFAP ou IBA-1, no ARC, no PN21 e PN60 dos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

PN	Sobreposição	SL	NL	LL
PN21	CX30/ GFAP	0,8985 $\pm$ 0,0233	0,8630 $\pm$ 0,0283	0,8637 $\pm$ 0,0240
PN60	CX30/ GFAP	0,6379 $\pm$ 0,0197*	0,8905 $\pm$ 0,0325	0,6792 $\pm$ 0,0216*
PN21	CX30/IBA1	0,7862 $\pm$ 0,0225	0,7870 $\pm$ 0,0290	0,7459 $\pm$ 0,0265
PN60	CX30/IBA1	0,6683 $\pm$ 0,0095	0,6455 $\pm$ 0,0240	0,7043 $\pm$ 0,0532

4.1.8 Imunorreatividade de CX43, GFAP e IBA-1 no ARC.

No PN21, observou-se que a programação nutricional neonatal modulou a imunorreatividade de CX43 no ARC (Figura 14, 15A), ($F_{2,22} = 7,75$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,41$). Observou-se no grupo SL um aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade de CX43, assim como, ($p < 0,05$) na expressão do RNAm de *Gjal*. Todavia, no PN60 a programação nutricional neonatal não promoveu alteração na imunorreatividade para CX43 (Figura 14, 15B).

No PN21, a programação nutricional neonatal promoveu alterações na co-localização de CX43/GFAP ($F_{2,18} = 18,54$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,67$). Observou-se no grupo SL um aumento ($p < 0,01$) na co-localização de CX43/GFAP (Tabela 6)

No PN60, observou-se sobreposição entre CX43/GFAP, porém a programação nutricional neonatal não modulou a entrecho-localização de CX43/GFAP (Tabela 3). O mesmo resultado foi observado com a co-localização de CX43/IBA-1 tanto no PN21 quanto no PN60.

Figura 14. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a imunorreatividade de CX43 ($\pm$ pixels) no ARC nos grupos SL, NL e LL, $n=10$. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

Figura 15. Fotomicrografias representativas da tripla marcação de CX43 (verde), GFAP (vermelho) e IBA-1 (Azul) no ARC no PN21 (A) e PN60 (B) nos grupos SL, NL e LL. Escala do ARC: 200µm; TCPTP, GFAP e IBA-1: 25µm; Magnificência: 63x.

Tabela 6. Efeitos da supernutrição e subnutrição neonatal na análise da co-localização (Teste de Manders) da imunorreatividade de CX43 com GFAP ou IBA-1, no ARC, no PN21 e PN60 dos grupos SL, NL e LL, n=10. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

PN	Sobreposição	SL	NL	LL
PN21	CX43/ GFAP	0,9336 $\pm$ 0,014*	0,7777 $\pm$ 0,2215	0,7376 $\pm$ 0,0323
PN60	CX43/ GFAP	0,8817 $\pm$ 0,0096	0,9051 $\pm$ 0,0181	0,8526 $\pm$ 0,0302
PN21	CX43/IBA1	0,8803 $\pm$ 0,0225	0,8383 $\pm$ 0,0243	0,8519 $\pm$ 0,0273
PN60	CX43/IBA1	0,7176 $\pm$ 0,0458	0,8189 $\pm$ 0,0198	0,7230 $\pm$ 0,0265

4.1.9 Morfologia da célula astrocitária e da microglia no ARC.

No PN21, a programação nutricional neonatal promoveu alteração na imunorreatividade do soma (Figura 16A; 17A), ($F_{2,27} = 44,22$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,76$) e no tamanho processo de extensão (Figura 16B, 17A), ($F_{2,24} = 4,85$ $p < 0,05$, $\eta_p^2 = 0,29$) de células astrocitárias do ARC. Observou-se no grupo SL um aumento na imunorreatividade do soma ($p < 0,01$) e no tamanho processo de extensão ($p < 0,05$) da célula astrocitária quando comparada com o grupo NL.

No PN60, a programação nutricional neonatal promoveu alteração na imunorreatividade do soma (Figura 16A; 17B) e no tamanho do processo de extensão (Figura 12A; 13B) de células astrocitárias do ARC ($F_{2,27} = 18,80$, $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,58$; $F_{2,27} = 15,87$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,54$). Adicionalmente, ambos os grupos SL e LL tiveram um aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade do soma e no tamanho do processo de extensão da célula astrocitária quando comparados com o grupo NL.

No PN21, a alteração nutricional neonatal promoveu modificação na imunorreatividade do soma (Figura 16C; 17A) e do processo de extensão (Figura 16D; 17A) da microglia no ARC ($F_{2,21} = 13,13$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,55$; $F_{2,21} = 9,50$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,47$, respectivamente). Observou-se que o grupo SL apresentou um aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade do soma e no tamanho do processo extensão da microglia quando comparado com o grupo NL.

No PN60, todavia, a alteração nutricional neonatal promoveu modificação apenas na imunorreatividade do soma da microglia (Figura 16D; 17B), ($F_{2,29} = 13,18$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,48$). Observou-se que o grupo o SL apresentou um aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade do soma da microglia, quando comparado com o grupo NL.

Figura 16. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a imunorreatividade do soma por imunomarcacão de GFAP - astrócito (A) e de IBA-1 - microglia (C); processos de extensão por imunomarcacão de GFAP (B) e IBA-1 (D), nos grupos SL, NL e LL, n=8-14. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

Figura 17. Fotomicrografias representativas da imunomarcagem do soma e dos processos de extensão da imunomarcagem de GFAP (vermelho) e IBA-1 (azul) no ARC no PN21 (A) e no PN60 (B), nos grupos SL, NL e LL. Setas indicativas do soma de astrócitos e microglia. Escala de 10µm. Magnificação: 63x.

4.1.10 Quantificação e morfologia da microglia no ARC e PVN.

No PN21, a programação nutricional neonatal promoveu alteração na quantidade de células microgliais no ARC (Figura 18A; 19A), ($F_{2,19} = 27,59$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,74$), assim como, na área do soma (Figura 18B; 19A), ($F_{2,21} = 11,65$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,52$), e no raio celular (Figura 18C; 19A), ($F_{2,22} = 4,58$ $p < 0,02$, $\eta_p^2 = 0,29$). Observou-se que o grupo SL apresentou um aumento ($p < 0,01$) na quantidade de células microglias no ARC, assim como, na área do soma, ($p < 0,05$) e no raio celular, quando comparado com o grupo NL e LL.

No PN60, a programação nutricional neonatal promoveu alteração na quantidade de células microgliais no ARC (Figura 18A; 19A), ($F_{2,18} = 9,44$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,51$), assim como na área do soma (Figura 18B; 19A), ($F_{2,18} = 9,39$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,51$), no entanto, não promoveu alteração no raio celular (Figura 14C; 15A). Observou-se que ambos os grupos SL e LL apresentaram um aumento na quantidade de células microgliais ($p < 0,05$), quando comparados ao grupo NL. Todavia, apenas o grupo SL apresentou um aumento na área do soma ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo NL.

No PN21 e no PN60, a programação nutricional neonatal não promoveu alteração na quantidade de células microgliais no PVN (Figura 18D; 19B), também não foi observada alteração na área do soma (Figura 18E; 19B) e no raio celular (Figura 18F; 19B).

Figura 18. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a quantidade de células microglias no ARC (A) e PVN (D), assim como, na área do soma no ARC (B) e PVN (E) e no raio celular no ARC (C) e PVN (F), $n=7$. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

Figura 19. Fotomicrografias representativas da imunomarcção de IBA-1 no ARC (A) e PVN (B) no PN21 e PN60 dos grupos SL, NL e LL. Magnificência de 20 e 100x, com escalas respectivas de 20 e 100 μ m.

4.1.11 Expressão do RNAm de *Il6*, *Il1b* e *Tnf* no ARC.

A programação nutricional neonatal não alterou a expressão do RNAm de *Il6* no ARC no PN21 e no PN60 (Figura 20A). No entanto, a programação nutricional neonatal promoveu alteração na expressão do RNAm de *Il1b* no PN21 ($F_{2,24} = 4,95$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,29$) e no PN60 ($F_{2,21} = 6,24$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,37$), (Figura 20B). Observou-se, no PN21 que ambos os grupos, SL e LL, apresentaram um aumento ($p < 0,05$) na expressão do RNAm de *Il1b*, quando comparados com o grupo NL. Todavia, no PN60 apenas o grupo LL apresentou um aumento na expressão *Il1b*, quando comparado com o grupo NL.

A programação nutricional neonatal não alterou a expressão do RNAm de *Tnf* no PN21, todavia observou-se alteração na expressão do RNAm de *Tnf* no PN60 ($F_{2,21} = 4,39$ $p < 0,05$, $\eta_p^2 = 0,29$), (Figura 20C). Observou-se no PN60, que ambos os grupos SL e LL apresentaram um aumento ($p < 0,05$) na expressão do RNAm de *Tnf* quando comparados ao grupo NL.

Figura 20. Efeitos da subnutrição e supernutrição neonatal sobre a expressão do RNAm de *Il6* (A), *Il1b* (B) e de *Tnf* no ARC no PN21 e PN60, nos grupos SL, NL e LL, n=7-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs NL.

4.2 EFEITO DA TCPTP NA EXPRESSÃO CULTURA PRIMÁRIA. DE CX30, CX43 E NA MORFOLOGIA DE ASTRÓCITO HIPOTALÂMICO EM

4.2.1 Efeito do LPS e das diferentes concentrações de leptina na expressão do RNAm de Ptpn1 e Ptpn2 em cultura primária de astrócito hipotalâmico.

No estudo in vitro, o estímulo com LPS foi utilizado como controle positivo dos parâmetros analisados (SONG et al., 2016). O tratamento com leptina (LEP) e LPS na cultura primária astrocitária durante 24 horas de exposição promoveu alteração na expressão do RNAm de *Ptpn1* (Figura 21A), ($F_{2,29} = 6,71$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,41$) e *Ptpn2* (Figura 21B), ($F_{4,39} = 16,77$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,63$). Observou-se que o estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] apresentou um aumento ($p < 0,01$) na expressão do RNAm de *Ptpn1* e *Ptpn2* quando, comparado com o grupo CTL, incubado apenas com o meio de cultura. O estímulo com leptina nas concentrações de [1000ng/ ml] e [5000ng/ml] apresentou um aumento ($p < 0,01$) somente na expressão do RNAm de *Ptpn2*, quando comparado com o grupo CTL. Todavia, o estímulo com leptina na concentração de [100ng/ ml] não alterou a expressão de RNAm de *Ptpn1*, *Ptpn2* na cultura primária astrocitária hipotalâmica.

Figura 21. Efeito do estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina (LEP) nas concentrações de [100ng/ml], [1000ng/ml] e [5000 ng/ml] durante 24 horas, em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na expressão do RNAm de *Ptpn1* (A), *Ptpn2* (B), n=9. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ em relação aos demais grupos.

4.2.2 Efeito do LPS e das diferentes concentrações de leptina na imunorreatividade de TCPTP na morfologia astrocitária de cultura primária hipotalâmica.

O tratamento com leptina e LPS na cultura primária astrocitária durante 24 horas de exposição promoveu alteração na imunorreatividade de TCPCP (Figura 22A; 23), ($F_{4,151} = 797,07$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,95$) e no tamanho da área astrocitária (Figura 22B; 23), ($F_{4,417} = 91,04$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,71$, respectivamente). Observou-se que o estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] apresentou um aumento ($p < 0,01$) na imunorreatividade de TCPTP e no tamanho da área astrocitária quando comparado com o grupo CTL. O estímulo com leptina nas concentrações de [1000ng/ ml] e [5000ng/ml] aumentou ($p < 0,01$) a imunorreatividade de TCPTP e no tamanho da área astrocitária quando comparado com o grupo CTL. Todavia, o estímulo com leptina na concentração de [100ng/ ml] não alterou aa imunorreatividade de TCPTP e no tamanho da área astrocitária.

Figura 22. Efeito do estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina (LEP) nas concentrações de [100ng/ml], [1000ng/ml] e [5000 ng/ml] durante 24 horas, em cultura primária de astrócitos hipotâmicos na imunoreatividade de TCPTP, n=22-28 (A) e no tamanho da área astrocitária, n=20-51 (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ em relação aos demais grupos; & $p < 0,05$ em relação às diferentes concentrações de leptina.

Figura 23. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para TCPTP (verde), GFAP (vermelho) e DAPI (azul) (A) de células astrocíticas estimuladas com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina (LEP) nas concentrações de [100ng/ml], [1000ng/ml] e [5000 ng/ml] durante 24 horas. Escala de 50 μ m. Magnificação: 40x.

4.2.3 Padronização do silenciamento do gene *Ptpn2* em cultura primária de astrócitos.

Como controle de transfecção foi realizado o silenciamento do gene endógeno *Gapdh*, que como esperado, promoveu alteração na expressão do RNAm de *Gapdh* (Figura 24A), ($F_{3,20} = 74,30$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,92$). A transfecção do siRNA *Gapdh* reduziu ($p < 0,01$) da expressão do RNAm de *Gapdh*, quando comparado ao grupo controle (CTL). Como esperado, também, não observou alteração na expressão do RNAm de *Gapdh* quando os astrócitos foram transfectados com controle negativo (CTL NEG), ou com siRNA *Ptpn2*.

Para testar o silenciamento de *Ptpn2*, foi realizada a transfecção de siRNA *Ptpn2* e observou-se que o silenciamento alterou a expressão do RNAm de *Ptpn2* (Figura 24B), ($F_{3,20} = 9,74$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,59$). A transfecção de siRNA *Ptpn2* reduziu ($p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Ptpn2*, quando comparado ao grupo CTL. Todavia, como esperado, os grupos CTL NEG, siRNA *Gapdh* não alteraram a expressão do RNAm de *Ptpn2*, quando comparado ao grupo CTL, evidenciando a especificidade do silenciamento realizado.

Figura 24. Padronização da transfecção do silenciamento de *Ptpn2*, expressão relativa do RNAm de *Gapdh* (A), e *Ptpn2*, em condição basal (CTL), com controle negativo (CTL NEG), siRNA *Gapdh* ou siRNA *Ptpn2* durante 48 horas, n=6. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisado pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL

4.2.4 Efeito do tratamento com leptina e LPS na expressão do RNAm de *Ptpn1*, *Ptpn2*, *Gja6* e *Gja1* em cultura primária de células astrocíticas.

O tratamento com LEP e LPS na cultura primária astrocítica durante 24 horas de exposição promoveu alteração na expressão do RNAm de *Ptpn1* (Figura 25A), ($F_{2,24} = 27,53$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,70$), *Ptpn2* (Figura 25B), ($F_{2,25} = 26,26$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,68$), *Gja6* (Figura 25C), ($F_{2,20} = 5,74$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,36$) e *Gja1* (Figura 25D), ($F_{2,25} = 16,01$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,56$). Observou-se que o tratamento com LPS aumentou ($p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Ptpn1*, *Ptpn2* e *Gja1* quando comparado com a cultura sem tratamento. No entanto, observou-se que o tratamento com LPS reduziu ($p < 0,01$) na expressão do RNAm de *Gja6* quando comparado com a cultura sem tratamento. Adicionalmente, o tratamento com leptina aumentou ($p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Ptpn2* quando comparado com a cultura sem tratamento.

Figura 25. Efeito do estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina (LEP) na concentração de [5000 ng/ml] durante 24 horas, em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na expressão relativa do RNAm de *Ptpn1* (A), *Ptpn2* (B), *Gja6* (C) e *Gja1* (D), n=6-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expre expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL.

4.2.4 Efeito do silenciamento do gene *Ptpn2* na expressão do RNAm de *Ptpn1*, *Gjal* e *Gja6* em cultura primária de células astrocíticas.

O silenciamento de *Ptpn2* unicamente (siRNA *Ptpn2* + CTL) não promoveu alteração na expressão do RNAm de *Ptpn1* (Figura 26A). Todavia, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Ptpn1* quando comparado ao grupo tratado com leptina sem silenciamento (CTL NEG + LEP), (Figura 26B). Adicionalmente, o grupo com silenciamento da expressão do RNAm de *Ptpn2* e tratado com LPS (siRNA *Ptpn2* + LPS) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Ptpn1* quando comparado ao grupo tratado com LPS sem silenciamento (CTL NEG + LPS), (Figura 26C).

O silenciamento de *Ptpn2* unicamente (siRNA *Ptpn2* + CTL) promoveu como esperado, uma redução ($U, p < 0,001$) na expressão do RNAm de *Ptpn2* quando comparado a cultura sem nenhuma manipulação (CTL NEG + CTL), (Figura 26D). Adicionalmente, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) reduziu ($U, p < 0,001$) a expressão do RNAm de *Ptpn2* quando comparado ao grupo tratado com leptina sem silenciamento (CTL NEG + LEP), (Figura 26E). O mesmo foi observado ($U, p < 0,001$) com o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com LPS (siRNA *Ptpn2* + LEP) quando comparado ao grupo tratado com LPS sem silenciamento (CTL NEG + LPS), (Figura 26F).

O silenciamento de *Ptpn2* unicamente (siRNA *Ptpn2* + CTL) não promoveu alteração na expressão do RNAm de *Gja6* quando comparado a cultura sem nenhuma manipulação (CTL NEG + CTL), (Figura 26G). Todavia, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) não observou-se a expressão do RNAm de *Gja6* (Figura 22H). Adicionalmente, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com LPS (siRNA *Ptpn2* + LEP) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Gja6* quando comparado ao grupo tratado com LPS sem silenciamento (CTL NEG + LPS), (Figura 26I).

O silenciamento da expressão do RNAm de *Ptpn2* unicamente (siRNA *Ptpn2* + CTL) não promoveu alteração na expressão do RNAm de *Gjal* (Figura 26J). Adicionalmente, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) também não apresentou alteração na expressão do RNAm de *Gjal* (Figura 26K). Todavia, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com LPS (siRNA

Ptpn2 + LEP) reduziu ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Gjal* quando comparado ao grupo tratado com LPS sem silenciamento (CTL NEG + LPS), (Figura 26L).

Figura 26. Efeito do silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas e o tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP - 5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos hipotálamicos na expressão relativa do RNAm de *Ptpn1* (A,B,C), *Ptpn2* (D,E,F), *Gja6* (G,H,I) e *Gjal1* (F,G,H), n=7-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

4.2.5 Efeito do silenciamento do gene *Ptpn2* na imunorreatividade de TCPTP e na morfologia astrocitária de cultura primária hipotalâmica.

O silenciamento de *Ptpn2* ($F_{1,108} = 528,45$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,94$) e o tratamento com LPS ou leptina ($F_{2,108} = 553,15$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,91$), em cultura primária de células astrocitárias hipotalâmicas apresentaram efeito significativo na imunorreatividade de TCPTP. Observou-se também uma interação entre o silenciamento e o tratamento com LPS ou leptina com consequente alteração na imunorreatividade de TCPTP ($F_{2,108} = 528,45$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,91$), (Figura 27A, 28). O tratamento com LPS (CTL NEG + LPS) ou leptina (CTL NEG + LEP) aumentou ($p < 0,01$) a imunorreatividade de TCPTP quando comparado com o grupo sem nenhum tratamento (CTL NEG + CTL), sendo esta resposta maior após o tratamento com LPS ($p < 0,05$). Todavia, o silenciamento de *Ptpn2* reduziu ($p < 0,01$) estes efeitos do LPS (siRNA *Ptpn2* + LPS) e da leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) na imunorreatividade de TCPTP, quando comparado aos respectivos grupos sem silenciamento. Observou-se também que o silenciamento de *Ptpn2* reduziu ($p < 0,01$) a imunorreatividade de TCPTP em astrócitos incubados apenas com o meio de cultura (siRNA *Ptpn2* + CTL).

O silenciamento de *Ptpn2* ($F_{1,90} = 434,65$, $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,83$) e o tratamento com LPS ou leptina ($F_{2,90} = 101,37$, $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,69$), apresentaram um efeito significativo com consequente alteração no tamanho da área astrocitária. Observou-se também uma interação significativa entre o silenciamento e o tratamento com LPS ou leptina no tamanho da área astrocitária ($F_{2,90} = 101,35$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,69$), (Fig. 27B, 28). O tratamento com LPS (CTL NEG + LPS) ou leptina (CTL NEG + LEP) aumentou ($p < 0,01$) o tamanho da área astrocitária, quando comparado com o grupo sem nenhum tratamento (CTL NEG + CTL), sendo esta resposta maior após o tratamento com LPS ($p < 0,05$). Todavia, o silenciamento de *Ptpn2* aboliu ($p < 0,01$) estes efeitos do LPS (siRNA *Ptpn2* + LPS) e da leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) no tamanho da área astrocitária, quando comparado aos respectivos grupos sem silenciamento.

Figura 27. Efeito do silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP - 5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na imunorreatividade de TCPTP, n=23-28 (A) e no tamanho da área astrocitária (μm^2), n=16-19 (B). Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL+CTL NEG; # $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo CTL NEG; & $p < 0,05$ em relação ao tratamento diferente.

Figura 28. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para TCPTP (verde), GFAP (vermelho) e DAPI (azul) de astrócitos submetidos ao silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas, seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP - 5000 ng / ml] durante 24 horas. Escala de 50µm. Magnificação: 40x. (*).

4.2.6 Efeito do silenciamento do gene *Ptpn2* na imunorreatividade de CX30 em cultura primária de células astrocitárias.

O silenciamento de *Ptpn2* ($F_{1,108} = 82,16$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,23$) e o tratamento com LPS ou leptina ($F_{2,108} = 7,65$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,23$) apresentaram um efeito significativo na imunorreatividade de CX30. Observou-se também uma interação significativa entre o silenciamento e o tratamento de LPS ou leptina com consequente alteração na imunorreatividade de CX30 ($F_{2,108} = 16,32$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,23$), (Figura 29; 30). O tratamento com LPS (CTL NEG + LPS) ou leptina (CTL NEG + LEP) reduziu ($p < 0,01$) a imunorreatividade de CX30, quando comparado ao grupo sem tratamento (CTL NG + CTL), sendo essa resposta menor ($p < 0,01$) após o tratamento com LPS (CTL NEG + LPS). Todavia, o silenciamento de *Ptpn2* reverteu ($p < 0,01$) o efeito do LPS e leptina quando comparados aos seus respectivos grupos controles.

Figura 29. Efeito do silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP - 5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos na imunorreatividade para CX30, n=37-47. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL+CTL NEG; # $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo CTL NEG; & $p < 0,05$ em relação ao diferente tratamento.

Figura 30. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para CX30 (verde), GFAP (vermelho) e DAPI (azul), de astrócitos submetidos ao silenciamento de Ptpn2 (siRNA Ptpn2) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng/ml] ou leptina [LEP-5000 ng/ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos. Escala de 50µm. Magnificação: 40x.

4.2.7 Efeito do silenciamento do gene Ptpn2 na expressão do RNAm de Gja6 e na imunorreatividade de CX43 em cultura primaria de células astrocitarias.

O silenciamento de *Ptpn2* ($F_{1,186} = 45,08$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,19$) e o tratamento com LPS ou leptina ($F_{2,186} = 29,50$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,24$) apresentaram um efeito significativo na imunorreatividade de CX43. Observou-se também uma interação significativa entre o silenciamento e o tratamento com LPS ou leptina com consequente alteração na imunorreatividade de CX43 ($F_{2,186} = 12,1789$, $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,23$), (Figura 31; 32). Observou-se que o tratamento com LPS (CTL NEG + LPS) ou leptina (CTL NEG + LEP) aumentou ($p < 0,01$) a imunorreatividade de CX43 quando comparado com o grupo sem tratamento. Adicionalmente, após o tratamento com LPS (CTL NEG + LPS) observou-se uma maior ($p < 0,01$) imunorreatividade de CX43. No entanto, o silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2* + LPS) reverteu ($p < 0,01$) o efeito promovido pelo LPS ou pela leptina na imunorreatividade de CX43 quando comparado com a cultura tratada com LPS sem silenciamento (CTL NEG + LPS).

Figura 31. Efeito do silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [LEP-5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na imunoreatividade de CX43, n=28-36. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ em relação grupo CTL+CTL NEG; # $p < 0,05$ em relação ao seu respectivo grupo CTL NEG; & $p < 0,05$ em relação ao diferente tratamento.

Figura 32. Fotomicrografias representativas da tripla marcação para CX43 (verde), GFAP (vermelho) e DAPI (azul) de astrócitos submetidos ao silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng/ml] ou leptina [LEP-5000ng/ml] durante 24 horas. Escala de 50µm. Magnificência: 40x.

4.2.8 Efeito do tratamento com leptina e LPS na expressão do RNAm de *Il6*, *Il1b* e *Tnf* em cultura primária de células astrocitárias.

O tratamento com LEP e LPS na cultura primária astrocitária durante 24 horas de exposição promoveu alteração na expressão do RNAm de *Il6* (Figura 33A), *Il1b*, (Figura 33B) e *Tnf* (Figura 33C), (*IL6*: $F_{2,21} = 15,80$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,60$; *Il1b*: $F_{2,22} = 25,53$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,70$; *Tnf*: $F_{2,22} = 25,35$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,70$). Observou-se que o tratamento com LPS aumentou a expressão do RNAm de *Il6* ($p < 0,01$), *Il1b* ($p < 0,01$) e *Tnf* ($p < 0,01$), quando comparado com a cultura sem tratamento.

Figura 33. Efeito do estímulo com LPS na concentração de [500ng/ml] e de leptina [LEP - 5000 ng/ml] durante 24 horas, em cultura primária de astrócitos na expressão do RNAm de *Il6* (A), *Il1b* (B) e *Tnf* (C), n=8-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL

4.2.9 Efeito do silenciamento do gene *Ptpn2* na expressão do RNAm de *Il6*, *Il1b* e *Tnf* em cultura primaria de células astrocíticas.

O silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2* + CTL) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Il6* quando comparado com a cultura sem nenhuma manipulação (CTL NEG + CTL), (Figura 34A). Adicionalmente, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Il6* quando comparado ao grupo tratado com LEP sem silenciamento (CTL NEG + LEP), (Figura 34B). Adicionalmente, observou-se que o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com LPS (siRNA *Ptpn2* + LPS) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Ptpn1* quando comparado ao grupo tratado com LPS sem silenciamento (CTL NEG + LPS), (Figura 34C).

O silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2* + CTL) não alterou a expressão do RNAm de *Il1b* (Figura 34D). No entanto, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Il1b* quando comparado ao grupo tratado com LEP sem silenciamento (CTL NEG + LEP), (Figura 34E). Adicionalmente, observou-se que o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com LPS (siRNA *Ptpn2* + LPS) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Il1b* quando comparado ao grupo tratado com LPS sem silenciamento (CTL NEG + LPS), (Figura 34F).

O silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2* + CTL) não alterou a expressão do RNAm de *Tnf* (Figura 34G). No entanto, o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com leptina (siRNA *Ptpn2* + LEP) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Tnf* quando comparado ao grupo tratado com leptina e sem silenciamento (CTL NEG + LEP), (Figura 34H). Adicionalmente, observou-se que o grupo com silenciamento de *Ptpn2* e tratado com LPS (siRNA *Ptpn2* + LPS) aumentou ($U, p < 0,01$) a expressão do RNAm de *Tnf* quando comparado ao grupo tratado com LPS sem silenciamento (CTL NEG + LPS), (Figura 34I).

Figura 34. Efeito do silenciamento de *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) durante 48 horas seguido de tratamento com LPS [500ng / ml] ou leptina [5000 ng / ml] durante 24 horas em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos na expressão relativa do RNAm de *Il6* (A,B,C), *Il1b* (D,E,F) e *Tnf* (G,H,I), n=8-10. A expressão relativa do RNAm foi normalizada pela expressão do controle endógeno *b-actin*. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Valores expressos como média $\pm$ EPM. Dados analisados pelo teste Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

4.2.10 Ensaio de viabilidade celular.

A avaliação da viabilidade celular nos diferentes tratamentos realizados foi testada pelo ensaio de redução do sal de tetrazólio (MTT). Os diferentes tratamentos foram capazes de promover alterações no MTT (Figura 35), ($F_{8,36} = 55,36$ $p < 0,01$, $\eta_p^2 = 0,92$). O DMSO, utilizado como controle positivo de morte celular, promoveu redução do MTT ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo CTL. Os grupos CTL NEG, siRNA *Gapdh*, siRNA *Ptpn2*, LEP, LPS, siRNA *Ptpn2* + LEP, siRNA *Ptpn2* + LPS observou-se um aumento ($p < 0,01$) no MTT em relação ao grupo DMSO. Adicionalmente, os grupos LEP, LPS, siRNA *Ptpn2* + LEP, siRNA *Ptpn2* + LPS apresentaram um aumento ($p < 0,01$) em relação ao grupo CTL, demonstrando que tais tratamentos aumentaram a atividade metabólica celular

Figura 35. Efeito dos diferentes tratamentos utilizados nos protocolos experimentais na viabilidade celular astrocitária. CTL- condição basal; CTL NEG – controle negativo; siRNA *Gapdh* – silenciamento de *Gapdh*, siRNA *Ptpn2* – silenciamento da *Ptpn2*, LEP – leptina [5000 ng/ml], LPS – [500ng/ml], siRNA *Ptpn2* +LEP,], siRNA *Ptpn2* +LPS, DMSO – dimetilsulfóxido. Os tratamentos com LEP e LPS foram realizados após 24 horas do silenciamento, permanecendo durante esse mesmo tempo. Os demais tratamentos permaneceram durante 48 horas. Valores expressos como média $\pm$ EPM, $n=5$. Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman Keuls. * $p < 0,05$ vs CTL; # $p < 0,05$ vs DMSO.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se que alterações na ingestão nutricional na vida neonatal, tanto na supernutrição (ratos SL) quanto na subnutrição (ratos LL), induzem mudanças no ganho de peso corporal na vida pós-natal. Esses efeitos estão associados a mudanças na morfologia das células gliais, e mostramos pela primeira vez que estas alterações na glia estão relacionadas à ação da TCPTP pela modulação da conexina 30.

Ao desmame, os ratos SL apresentaram um aumento significativo no peso corporal, enquanto os ratos LL apresentaram menor peso corporal devido à maior ou menor disponibilidade de aleitamento, respectivamente. No entanto, lactantes de ninhadas grandes apresentam a produção de leite semelhante à das lactantes controle (RUSSEL, 1980), de modo que a disputa por amamentação, com consequente menor aporte nutricional, pode explicar o menor peso corporal observado no grupo LL (LÓPEZ et al., 2005; PATTERSON et al., 2010). Estudos relatam que proles de ninhadas SL, após o nascimento apresentam comportamento hiperfágico durante a amamentação (BABICKY et al., 1973; LÓPEZ et al., 2007) e após a primeira semana do desmame (LÓPEZ et al., 2007), justificando o elevado ganho de peso observado nesses animais nesse período.

No PN21 observamos que ratos SL apresentaram hiperleptinemia, hiperinsulinemia e maior peso corporal. Dados similares foram observados por Plagemann et al. (2010) assim como, hiperglicemia e um aumento da relação insulina/glicose. Após o desmame, observamos que os ratos SL mantiveram o maior peso corporal. Esse dado é similar aos trabalhos que investigaram os efeitos da supernutrição neonatal em ratos Wistar (PLAGEMANN et al., 1999; RODRIGUES et al., 2007; SCHMIDT et al., 2001), ratos Sprague-Dawley (LÓPEZ et al., 2005) e camundongos (GLAVAS et al., 2010; PENTINAT et al., 2010). No entanto ao avaliarmos a ingestão alimentar entre o PN50 ao PN60 os animais SL apresentaram uma quantidade similar de ingestão alimentar em relação ao grupo NL. O acentuado ganho de peso corporal em ratos adultos criados em ninhadas pequenas também foi observado por Li et al. (2013), e esse fenômeno foi associado a uma redução no gasto energético, o que indica que a programação por supernutrição no período neonatal predispõe à obesidade e desordens metabólicas na vida adulta, mesmo na ausência de hiperfagia.

Diferentemente dos ratos SL, os ratos LL apresentaram reduzido ganho de peso corporal até o desmame, atingindo um peso semelhante ao grupo controle no PN35,

sendo esse efeito associado com o comportamento hiperfágico observado nesses animais. Resultados semelhantes ao nosso em modelo de ninhada grande (20 proles/lactante) constatou-se um aumento na eficiência alimentar em ratos adultos em ambos os sexos (REMMERS et al., 2008). Em modelo de restrição alimentar intrauterina observou-se um comportamento hiperfágico na 8ª semana de vida (DESAI et al., 2005; 2007). Adicionalmente, no modelo de subnutrição por dieta pobre em proteína no período neonatal também se constatou um aumento na ingestão alimentar (LIRA et al., 2014). No entanto, em modelo ovino de fetos expostos à desnutrição materna observou-se hipometilação do gene da POMC no hipotálamo, porém a transcrição deste gene no hipotálamo não foi aumentada (STEVENS; BEGUM; WHITE, 2011). Portanto, deve se considerar a especificidade do modelo animal estudado e seus efeitos epigenéticos no hipotálamo.

Uma das prováveis explicações para o nosso achado de hiperfagia no grupo LL, e consequentemente ganho de peso corporal similar ao grupo NL após o desmame é que a subnutrição durante o período de lactação está associada ao aumento de projeções e da atividade de vias orexinérgicas hipotalâmicas (PLAGEMANN et al., 1999; PATTERSON et al., 2010; LÓPEZ et al., 2005; CRIPPS et al., 2009). Observou-se em modelos de subnutrição neonatal um aumento na porcentagem de neurônios NPY, AgRP e GABA no ARC, assim como no número de projeções de neurônios AgRP para o PVN, bem como, no aumento das sinapses de NPY/AgRP no PVN entre a 3ª e 4ª semana de vida pós natal (PLAGEMANN et al., 1999; PATTERSON et al., 2010; LÓPEZ et al., 2005; CRIPPS et al., 2009); Foi observado também aumento da atividade de neurônios do tronco encefálico, aumento no número de células ativadas na região rostral e medial do NTS na idade adulta (LIRA et al., 2014). Além disto, foi relatado redução na expressão de canais de K_{ATP} , que desempenham função de hiperpolarização em neurônios NPY, AgRP e GABA pela ação da leptina nesses neurônios (JUAN DE SOLIS et al., 2016). No entanto, observou-se um atraso no desenvolvimento das projeções de neurônios NPY para o PVN nos modelos de restrição proteica e calórica no período neonatal em ratos (ROCHA et al., 2014). Esses dados reforçam a noção de que a plasticidade neuronal pode ser modulada pela subnutrição e contribuir desse modo para o comportamento hiperfágico observado nesses animais na vida pós-natal.

A leptina, composta por 146 aminoácidos, um peptídeo produto do gene *Lep* em roedores, é produzida predominantemente nos adipócitos e é capaz de regular a ingestão

de alimentos e o balanço energético por meio de suas ações no hipotálamo (CAMPFIELD et al., 1995; PELLEYMOUNTER et al., 1995).

A elevação nas concentrações plasmáticas de leptina no grupo SL no PN21 ocorre em um período crítico, considerando que o período de lactação pode influenciar o desenvolvimento do cérebro e as mudanças nesse período podem promover mudanças no controle metabólico central na vida adulta (RODRIGUES et al., 2011; GLAVAS et al., 2010). Em roedores, a elevação da leptina na segunda semana pós-natal é crucial para o desenvolvimento de circuitos hipotalâmicos relacionados à homeostase energética (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004). De fato, a infusão de leptina em camundongos *ob/ob*, deficientes na produção de leptina, durante os primeiros dias de vida apresenta um aumento na densidade de fibras e no desenvolvimento de projeções neurais do ARC para demais núcleos hipotalâmicos (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004). A maioria dos neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) é detectada entre os dias 11-12 do período embrionário, assim como a diferenciação de neurônios progenitores de POMC (SHIMADA; NAKAMURA, 1973; PADILLA; CARMODY; ZELTSER, 2010). Após o dia embrionário 14, alguns neurônios silenciam a expressão de POMC e começam a expressar NPY (PADILLA; CARMODY; ZELTSER, 2010). Além disso, o número de neurônios que expressam NPY, AgRP, ácido gama-aminobutírico (GABA) e POMC atingem níveis estáveis no PN15 (PADILLA; CARMODY; ZELTSER, 2010). Adicionalmente, neurônios envolvidos com a ingestão alimentar presentes no ARC (BETLEY et al, 2013), tais como, neurônios que co-expressam NPY, AgRP, GABA e POMC, e suas projeções para área hipotalâmica lateral (LHA) são detectados a partir do PN12 em roedores (BOURET; DRAPER; SIMERLY, 2004). Sendo o período neonatal uma janela biológica crucial para o desenvolvimento de circuitarias envolvidas com o balanço energético, estímulos adversos podem modular essas circuitarias e comprometer o metabolismo na fase adulta (KAPPIL; WRIGHT; SANDERS, 2016).

As alterações nos níveis séricos de leptina e insulina assim como as desordens metabólicas associadas podem estar relacionadas com a programação epigenética, que por sua vez, envolve uma variedade de mecanismos, tais como a metilação de DNA, pela ação da DNA metil-transferase em sítios de dinucleotídeos citosina guanina (CpG) e consequentemente, a estimulação da proteína de ligação a metil-CpG (MeBP), assim como, o impedimento da ligação de fatores de transcrição (JONES; LIANG, 2009, DAY; SWEATT, 2010; DAY; SWEATT, 2011; DAY et al., 2015). Outro mecanismo a

ser relatado, é de acetilação ou desacetilação de histonas promovida pela atividade das enzimas histona acetil transferase (HAT) e histona desacetilase, respectivamente (CHENG; BLUMENTHAL, 2010; CAMPOS; REINBERG, 2009; GELATO; FISCHLE, 2008). O processo de acetilação das histonas promove a abertura da cromatina o que permite a transcrição do gene, o inverso é observado com a desacetilação (CHENG; BLUMENTHAL, 2010; CAMPOS; REINBERG, 2009; GELATO; FISCHLE, 2008).

Em ratos Wistar SL (03 proles / lactante) foi descrita a hipermetilação de sítios de dinucleotídeos CpG, relacionados com Sp1 (Sp1, NF- κ B), da região promotora do gene da POMC no hipotálamo no PN21 (PLAGEMANN et al., 2009). O fator de transcrição Sp1 é o principal ativador da transcrição do gene da POMC (THERRIEN; DROUIN, 1991), sendo as sequências Sp1, NF- κ B essenciais para a mediação dos efeitos da leptina e da insulina na expressão de POMC (YANG et al., 2009). Os neurônios da POMC estão envolvidos não só com a redução da ingestão alimentar, mas também com o aumento do gasto energético (ELLACOTT; CONE, 2008). Assim, o maior peso corporal do grupo SL observado no presente estudo pode ser decorrente da redução no gasto energético como relatado por LI et al. (2013). Os mecanismos epigenéticos podem promover alterações metabólicas não só a nível central (YANG et al., 2009), mas também periférico (KHALYFA et al., 2013). No modelo com HFD no período final da gestação observou-se hipermetilação na região promotora do gene que codifica o receptor de leptina no tecido adiposo, associado com a diminuição da expressão deste gene (KHALYFA et al., 2013). Esses dados corroboram o fato de que a hiperleptinemia e hiperinsulinemia no PN21 e PN60 observada em nosso trabalho, nos animais SL e de ambos os grupos, respectivamente, podem estar relacionadas a eventos epigenéticos por alterar a liberação hormonal periférica, bem como, a ação central desses hormônios.

O eixo pró-inflamatório IkK quinase β (IKK β) e seu subsequente alvo o fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) no hipotálamo está relacionado a situações de sub- e supernutrição e consequente desbalanço energético, acúmulo de massa gorda e ganho de peso corporal (KLEINRIDDERS et al., 2009; MENG et al., 2011; MILANSKI et al., 2009; OH-I et al., 2010; POSEY et al., 2009; PURKAYASTHA; ZHANG; CAI, 2011; ZHANG et al., 2013). De Souza et al. (2005) foi o primeiro a demonstrar que a HFD aumentava a expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF α e promovia a ativação da cascata de sinalização inflamatória, da proteína c-Jun N-

terminal quinase (JNK) e NF- κ B no hipotálamo de rato. O aumento de ácidos graxos (AGs) na dieta é capaz de ativar o sistema imune inato em tecidos periféricos (LEE et al., 2001; LEE et al., 2003; KÖNNER; BRUNING, 2011; LEE; LEE, 2014;), assim como no sistema nervoso central (DE SOUZA et al., 2005; LEHNARDT et al., 2003; MILANSKI et al., 2009, POSEY et al., 2009, KLEINRIDDERS et al. 2009) por meio da ativação do receptor do tipo toll like 4 (TLR4) (LEE et al., 2001; LEE et al., 2003; KÖNNER; BRUNING, 2011). A interação do ligante com TLR4 leva o recrutamento de várias proteínas do domínio TIR contendo proteínas adaptadoras, tais como o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) e a proteína adaptadora contendo domínio TIR indutor de interferon beta (TRIF) (KAWAI et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2003; KÖNNER; BRUNING, 2011). Adicionalmente, outras proteínas adaptadoras são requeridas para ativação dessa via de sinalização, tais como a proteína adaptadora contendo domínio TIR (TIRAP) e a molécula adaptadora relacionada à TRIF (TRAM) (YAMAMOTO et al., 2003; KAWAI et al., 1999; KÖNNER; BRUNING, 2011). MyD88 por sua vez, promove o recrutamento de proteínas da família da quinase associada ao receptor de interleucina-1 (IRAK) e o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6) (KAWAI et al., 1999; KÖNNER; BRUNING, 2011). Na sequência, TRAF6 ativa a proteína quinase 1 ativada por fator de crescimento transformador beta (TAK1) (KÖNNER; BRUNING, 2011). A proteína TAK1 ativada promove subsequentemente a fosforilação do complexo quinase IKK, que consiste nas proteínas IKK α , IKK β e IKK γ /NEMO, NF κ B (KÖNNER; BRUNING, 2011). A ativação desse complexo resulta na fosforilação e consequente degradação de I κ B, permitindo a translocação de NF κ B para o núcleo (KÖNNER; BRUNING, 2011). A proteína TAK1 ativada também promove a ativação da via da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), tais como as proteínas JNK e P38, que resulta na fosforilação e ativação da proteína ativadora 1 (AP-1) (KÖNNER; BRUNING, 2011). A ativação desses dois diferentes fatores de transcrição, NF- κ B e da AP-1, promove o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, interleucina (IL)-1 β , IL6 e do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e de quimiocinas (CCL2, C-XC e CXCL10) (YAMAMOTO et al., 2003; KÖNNER; BRUNING, 2011).

No desmame, ambos os grupos SL e LL apresentaram um aumento na expressão do RNAm de *Il1b*. Na vida adulta, observamos que ambos os grupos SL e LL apresentaram aumento da expressão de RNAm de *Tnf* e observamos aumento de *Il1b* apenas no grupo LL. A expressão diferenciada dessas citocinas pode também contribuir

para a hiperfagia do grupo LL, considerando seu importante papel na inflamação do hipotálamo associado à obesidade e à ingestão alimentar (BORGES et al., 2011; DOUGLASS et al., 2017). Proles adultas de fêmeas Wistar tratadas com dieta de gordura vegetal hidrogenada durante a gestação e lactação apresentaram um aumento das citocinas IL1 β , IL6 e TNF α no soro e na expressão proteica de TLR4, NF κ Bp65 e MyD88 no hipotálamo (PIMENTEL et al., 2012). Recentemente, Douglass et al. (2017) demonstraram que as citocinas IL1 β e IL6, porém não TNF α , estavam associadas ao aumento da ingestão alimentar e ganho de peso corporal promovida pela sinalização IKK β / NF- κ B de células astrocitárias (DOUGLASS et al., 2017). A injeção periférica de leptina em ratos Sprague–Dawley aumenta os níveis de IL-1 β hipotalâmico, sendo que a injeção central do antagonista de IL-1 β inibe o efeito de hipofagia promovido pela injeção de leptina (LUHESHI et al., 1999). Em camundongo, a ablação do receptor de IL-1 β inibiu a resposta da leptina de redução da ingestão alimentar, sugerindo que a IL-1 β age como um importante mediador das ações da leptina no hipotálamo (LUHESHI et al., 1999). Todavia deve-se considerar nesses estudos a especificidade ou não da célula estudada. O aumento de TNF α e IL6 no hipotálamo foi associado ao aumento de ganho de peso corporal em modelo de ratos tratados com HFD (THALER et al., 2012). Além disso, a injeção intracerebroventricular (icv) de TNF α e leptina bloqueou o efeito anorexigênico da leptina por meio da inibição da via de sinalização de PI3K–Akt–FoxO1 (ROMANATTO et al., 2007). No entanto, no atual trabalho não observamos alteração na expressão de *Il6*, que é comumente classificada como pró-inflamatória, embora também tenha se demonstrado que a IL-6 possui um efeito anti-inflamatório e pode regular negativamente a inflamação na fase aguda, aumentando IL-10, receptor antagonista da IL-1 (IL-1ra) e dos receptores solúveis de TNF (sTNF-R) (PETERSEN; PEDERSEN, 2005). Em modelo de camundongos tratados com HFD o exercício físico foi capaz de reduzir a inflamação hipotalâmica (IKK β / NF- κ B e o estresse do retículo endoplasmático), revertendo a resistência à leptina e insulina de maneira dependente de IL-6 e IL-10 (ROPELLE et al., 2010). Além disso, a infusão central de IL-6 recombinante aumentou a fosforilação hipotalâmica de STAT3 (ROPELLE et al., 2010). Adicionalmente, a IL-6 em modelo de HFD, suprimiu a hiperfagia e inibiu a ativação hipotalâmica de IKK β (ROPELLE et al., 2010). O tratamento periférico de IL-6 em camundongos IL6 $-/-$, reverteu a obesidade desses animais, assim como o tratamento icv de IL-6 aumentou o gasto energético (WALLENIOUS et al., 2002a), e reduziu a ingestão alimentar absoluta (WALLENIOUS et al., 2002b). De acordo com

esses dados, camundongos tratados com HFD e suplementado com IL6 humana circulante (*hIL6^{tg}*) secretada predominantemente no cérebro e do pulmão, apresentaram consumo alimentar reduzido, aumento no gasto energético e aumento da sensibilidade à leptina (SADAGURSKI et al., 2010). Além disso, a superexpressão de IL-6 em astrócitos reduz o ganho de peso e a adiposidade induzido por HFD (HIDALGO et al., 2010). Esses dados sugerem uma interação neuro-imuno-endócrina capaz de modular o balanço energético desses animais de modo citocina específica.

A leptina compartilha algumas proteínas da sinalização da insulina, estimulando o substrato do receptor de insulina (IRS) e consequentemente a PI3K (NISWENDER et al., 2001). Além disso, a insulina por sua vez, potencializa a sinalização da leptina por meio da fosforilação de JAK2, induzindo a ativação JAK2-STAT3 (CARVALHEIRA et al., 2001; CARVALHEIRA et al., 2003). Os mecanismos de resistência hipotalâmica à insulina são mediados por serinas quinases capazes de fosforilar o substrato de serina de IRSs, assim como, os mecanismos de resistência hipotalâmica à leptina são mediados pelo aumento de PTPs e de SOCs (KÖNNER; BRUNING, 2011; XU et al., 2005; NISWENDER; BASKIN; SCHWARTZ, 2004; ZABOLOTNY et al., 2002). Deve-se considerar que, moléculas pró-inflamatórias estão associadas com o aumento de PTP1B e SOCS3 ou impedindo a habilidade de fosforilação de IRS. Especificamente, em camundongos *knockout* para TNF tratados com HFD, observa-se redução da atividade da PTP1B hipotalâmica (ZABOLOTNY et al., 2008), enquanto que citocinas pró inflamatórias promovem a expressão de SOCS3 (EHLTING et al., 2007; BODE et al., 1999). Além disso, serinas quinases, como IKK, JNK, MAPK e PKR induzem a fosforilação de IRSs, bem como, a óxido nítrico-sintase (iNOS) atua na nitrosilação dessa proteína diminuindo sua capacidade de fosforilação em resíduo de tirosina (CARVALHO-FILHO et al., 2005; ROPELLE et al., 2013; MARSHALL; HESS; STAMLER, 2004; STAMLER; HESS, 2010; REYNAERT et al., 2004). Adicionalmente, o TLR2 e TLR4 quando ativados por ácidos graxos livres, por meio da sinalização de MYD88-JNK-IKK β promovem a fosforilação de resíduos de serina no IRS-1 resultando consequentemente na resistência à insulina (TSUKUMO et al., 2007; CARICILLI et al., 2011; EHSES et al., 2010; SHI et al., 2006).

Em ratos tratados com HFD observou-se um aumento de intermediários da sinalização inflamatória, tais como a proteína JNK (MILANSKI et al., 2009, POSEY et al., 2009, KLEINRIDDERS et al. 2009) e de NF κ B no hipotálamo, subsequente aumento da produção de citocinas TNF α , IL-1 β e IL-6, associado com o

comprometimento da sinalização de insulina e leptina (MILANSKI et al., 2010; POSEY et al., 2009, KLEINRIDDERS et al., 2009, PISTELL et al., 2010, VALDEARCOS et al., 2014, LI et al., 2012). A ativação hipotalâmica da via de sinalização de IKK β -NF κ B, promove a superexpressão IKK β no hipotálamo médio basal (HMB), aumentando a ingestão alimentar, o ganho de peso, assim como, o prejuízo da sinalização de leptina (ZHANG et al., 2008; MENG et al., 2011; BENZLER et al., 2015). Adicionalmente, em camundongo *knockout* de IKK β ou por deleção de IKK β mediada por lentivírus no HMB observa-se uma atenuação da obesidade quando animal é tratado com HFD (ZHANG et al., 2008; MENG et al., 2011; BENZLER et al., 2015). A estimulação icv com ácidos graxos saturados aumenta a expressão de MyD88 (KLEINRIDDERS et al., 2009). Além disso, a deleção específica de MyD88 no sistema nervoso central aumenta a sensibilidade à leptina em camundongos tratados aguda e cronicamente com AGs, sugerindo o papel de MyD88 no desenvolvimento da resistência central à leptina (KLEINRIDDERS et al., 2009). O IKK ϵ é uma molécula presente na via de sinalização de NF κ B, a inibição da atividade de IKK ϵ reduz a resistência à leptina, reativando a sinalização de JAK2-STAT3 e IRS-PI3K-Akt no hipotálamo de camundongos tratados com HFD (WEISSMANN et al., 2014). Esses dados sugerem que a via de sinalização que culmina na expressão de citocinas pró-inflamatórias esta intimamente relacionada ao prejuízo na sinalização central a leptina e insulina.

O prejuízo metabólico que resulta da ativação da via de sinalização de IKK β -NF κ B, também modula as células neuronais, sendo que em neurônios POMC e AgRP sugere efeitos opostos. A inativação de IKK β -NF κ B em neurônios AgRP preveniu a obesidade nos animais expostos à HFD (ZHANG et al., 2008). No entanto, a ativação da sinalização de IKK β em neurônios AgRP reduziu a sensibilidade à insulina desses neurônios e promoveu alteração sistêmica na homeostase da glicose, todavia, sem alterar o peso corporal e a sensibilidade à leptina (TSAOUSIDOU et al., 2014). A sinalização de NF κ B em neurônios POMC é ativada por leptina e promove efeitos anorexígenos (JANG et al., 2010). Todavia, em camundongos tratados com HFD, o NF κ B liga-se à região promotora do gene da POMC, promovendo uma hipermetilação, limitando a capacidade da leptina de promover a expressão de POMC (SHI et al., 2013). A leptina e o LPS compartilham da mesma via de sinalização no hipotálamo. Similarmente à leptina, uma única injeção intraperitoneal de LPS aumenta a fosforilação de STAT3 e a expressão hipotalâmica de POMC, além de diminuir a atividade de

AMPK, promovendo desse modo a redução da ingestão alimentar (BORGES et al., 2015; SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004). Além disso, um única dose de LPS promove aumento do tônus de neurônios POMC e redução do tônus de AgRP/NPY (REIS et al., 2015). No entanto, repetidas doses de LPS intraperitoneal levam a redução da resposta ao LPS, implicando num perfil de resistência ao LPS. Adicionalmente, a resistência à leptina em ratos tratado com HFD não apresentaram resposta hipofágica quando estimulados com LPS (BORGES et al., 2011). Adicionalmente, as células não neuronais também participam da relação imune-endócrina, sendo que o bloqueio do receptor TLR4 em células da microglia reduz o efeito inibitório da dose única de LPS em neurônios AgRP/NPY (REIS et al., 2015). Recentemente, demonstrou-se em camundongos que a deleção condicionada de IKK β em células astrocitárias hipotalâmica na vida adulta reduz a expressão do RNAm de NPY, bem como o ganho de peso corporal e a ingestão alimentar absoluta (DOUGLASS et al., 2017).

As células da glia, astrócito e microglia, são ativadas por AG e mais especificamente por ácidos graxos saturados em modelo *in vitro* (VALDEARCOS et al., 2014). Quando estimuladas *in vivo* com ácidos graxos saturados, células microgliais hipotalâmicas são ativadas, enquanto que o mesmo não é observado em células astrocitárias (VALDEARCOS et al., 2014). Em camundongos com ablação microglial com PLX5622, assim como com infusão de minociclina, um inibidor seletivo de microglia não se observou alteração do peso corporal e na ingestão alimentar nesses animais tratados com dieta padrão (VALDEARCOS et al., 2014; DJOGO et al., 2016; REIS et al., 2015). No entanto, nos camundongos com depleção da microglia por PLX5622, quando administrado uma solução com ácidos graxos saturados por gavagem, não se observa a neuroinflamação, bem como, quando oferecida a dieta padrão, eles reduziram a ingestão de dieta padrão (VALDEARCOS et al., 2014). Sugerindo que a microglia pode interferir com a sensibilidade hipotalâmica aos nutrientes da dieta (VALDEARCOS et al., 2014). As células não neuronais, como microglia e astrócitos, estão fortemente relacionadas à inflamação hipotalâmica induzida por HFD (HORVATH et al., 2010; THALER et al., 2012). A ingestão de HFD foi associada com o início de processos hipotalâmicos de inflamação após 3 dias de exposição, apresentando aumento de ativação microglial no hipotálamo médio basal (THALER et al., 2012). Consistente com esses resultados, a expressão de genes de citocinas pró-inflamatórias é aumentada em células microgliais extraídas do hipotálamo de camundongos expostos a HFD, sendo observada tal alteração no 3º dia e no 3º mês

após a exposição de HFD (VALDEARCOS et al., 2014; THALER et al., 2012). Adicionalmente, o tratamento com o antagonista de *colony stimulating factor 1 receptor* (CSF1R) reverteu a inflamação hipotalâmica e reduziu a imunorreatividade de chaperona Hsp72, marcador de estresse neuronal (VALDEARCOS et al., 2014). No entanto, a deleção gênica condicionada de NFκB em astrócito, inibiu a ativação astrocitária, e paradoxalmente potencializou a resposta hiperfágica a HFD nas primeiras 24 horas após a oferta da dieta (BUCKMAN et al., 2015). Esses dados são consistentes com a possibilidade de que a inflamação astrocitária inicial possibilita uma resposta adaptativa à ingestão de HFD, limitando o estresse neuronal e restringindo o gasto energético (DOUGLASS; DORFMAN; THALER, 2017). Todavia, a exposição prolongada à HFD, promove gliose (microglial e astrocitária), associada à disfunção neuronal e obesidade (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

No presente estudo, a nutrição excessiva neonatal induziu aumento de células e alterações na morfologia microglial, tais como aumento do soma e dos processos de extensão no ARC no PN21 e apenas do soma no PN60 no grupo SL. Adicionalmente, na idade adulta animais subnutridos no período neonatal apresentam aumento na quantidade de células microgliais. Vários modelos morfológicos microgliais são propostos em situações de neuroinflamação extensiva (WALKER et al., 2014). Davis, Foster e Thomas (1994) propuseram o modelo que células microgliais maduras transformam-se em um estado ativado caracterizado pelo aumento do soma, aumento parcial das ramificações e aumento dos processos de extensão. Adicionalmente, caracteriza-se como reativa quando os processos de extensão estão ausentes e finalmente um estágio celular multinucleado e de grande tamanho (DAVIS; FOSTER; THOMAS, 1994), apesar desse último estágio ser uma evidência especulativa (WALKER et al., 2014). No modelo proposto por Streit, Walter e Pennell (1999), a transformação da microglia assume inicialmente um aspecto morfológico “reativo” que é similar ao proposto por Davis, Foster e Thomas (1994), seguindo para um fenótipo “ativado”, com aumento dos processos de extensão, e posteriormente assumindo um estado “hiper-ramificado” e finalmente a fase fagocítica que corresponde à fase reativa proposta por Davis, Foster e Thomas (1994). No entanto, Stence, Waite e Dailey (2001), foram os primeiros pesquisadores que basearam o modelo de análise morfológica na captura das imagens em tempo real. Seu modelo sugere que os processos neuroinflamatórios promovem retração das ramificações, passando por um estágio de redução no tamanho dos processos de extensão, seguindo para um fenótipo

“*hand-like protrusions*” e finalmente um estágio de motilidade chamado locomotor (STENCE; WAITE; DAILEY, 2001). A microglia age respondendo a uma variedade de danos celulares no SNC, incluindo patógenos, isquemia e dano neuronal. Sendo a microglia rapidamente recrutada para as regiões de dano celular, onde prolifera *in situ* transformando-se de quiescente, com morfologia altamente ramificada para um fenótipo ameboide característica de estado ativo (RANSOHOFF; CARDONA, 2010). Todavia, esses modelos embora ainda não possuam uma nomenclatura consensual decorrente dos diferentes estímulos inflamatórios empregados em cada modelo, eles demonstram que a microglia passa por vários estágios intermediários de modulação, não apenas o “ameboide” caracterizado por estado ativado, porém variadas transições de ramificação (WALKER et al., 2014).

A microglia pode também ser classificada por dois diferentes fenótipos, sendo didaticamente classificada em M1 ou M2 decorrente do perfil de citocinas liberado (WALKER et al., 2014). O fenótipo M1 pode ser produzido pela exposição da microglia ao LPS, levando à expressão de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , interferon- γ , assim como marcadores de superfície como CD86 e CD68 um marcador fagocítico. No entanto, a exposição a IL-4 induz um perfil M2, que é caracterizada pela expressão de IL-4, arginase1, Ym1, CD206 e IL-1 (KOBAYASHI et al., 2013). Numerosos estudos com variados modelos de neuroinflamação, apresentam o perfil morfológico M1 com maior tamanho do soma, processos de extensão retraídos e um aspecto celular ameboide (EYO; DAILEY, 2013; FRANCIOSI et al., 2012; KLOSS et al., 2001; MADORE et al., 2013). A característica ameboide é provavelmente a melhor descrição e associação com o fenótipo pró-inflamatório, e está frequentemente associada ao aumento da expressão de marcadores de superfície como CD68 e MHC-II (WALKER et al., 2014; EYO; DAILEY, 2013; FRANCIOSI et al., 2012; KLOSS et al., 2001; MADORE et al., 2013). Além disso, observa-se o aumento na expressão de PCNA, Kv1.3, Kv1.5 e p-p38- MAPK (YAMADA; JINNO 2013).

Observamos um aumento de células microgliais e na imunorreatividade para IBA-1 marcador para microglia no grupo SL ao desmame e na vida adulta. Além disto, observamos uma morfologia ameboide das células microgliais na vida adulta dos animais deste grupo. Em ratos que foram supernutridos SL (4 proles/ lactante) durante a vida neonatal foi observado maior número de microglias ativadas no VMH (TAPIA-GONZÁLEZ et al., 2011) e PVN (ZIKO et al., 2014). Em modelo de indução de obesidade observou tanto em ratos quanto em camundongos adultos aumento do

número de células microgliais, assim como na ativação da microglia no ARC relação positiva com o aumento no tamanho celular e na quantidade de células microgliais com o aumento do ganho de peso corporal proporcionado por HFD em ratos (Thaler et al., 2012). Em proles de fêmeas Sprague Dawley tratadas com HFD, observou-se um maior número de microglia no córtex somatosensorial após estímulo com hipóxia (TEO; MORRIS; JONES, 2016), além disso, a dieta HFD na lactante exacerbou o estímulo com hipóxia com maior quantidade de células microgliais ameboides no córtex somatosensorial (TEO; MORRIS; JONES, 2016). Portanto, os dados do presente estudo indicam que o aumento do número de células microgliais com a exposição nutricional em excesso é um evento precoce (detectado ao desmame) e que persiste na vida adulta mesmo na ausência de hiperfagia.

Nossos dados demonstraram um aumento de células microgliais em ratos LL adultos, assim como, na imunorreatividade para IBA-1. Ratos senescentes provenientes de ninhadas grandes (12 proles/lactante) apresentam no hipocampo maior quantidade de células microgliais, expansão de projeções e aumento do soma (VIANA et al., 2013). Portanto, é provável que o *status* nutricional neonatal possa afetar a quantidade e a morfologia da microglia de diferentes regiões do hipotálamo dependendo do modelo.

De fato, observamos alterações nas células microgliais na idade juvenil e adulta de forma mais proeminente promovido pela supernutrição neonatal, e apenas um aumento de células microgliais na idade adulta promovidos pela subnutrição neonatal, a qual induziu hiperfagia, quando com a livre disponibilidade da dieta. Esses achados foram observados apenas no ARC, apesar de não termos avaliados o VMH, não encontramos diferenças significativas no PVN. Deve-se considerar que o ARC é um dos principais alvos da leptina circulante, pelo fato de a barreira hematoencefálica ser relativamente permeável, o que permite que a leptina circulante tenha acesso ao hipotálamo (VAN SWIETEN et al., 2014). Esse efeito observado em nosso modelo de sub- e supernutrição pode estar relacionado ao aumento observado nos níveis plasmáticos de leptina no grupo SL no PN21 e em ambos os grupos SL e LL na idade adulta. De fato, o tratamento com leptina aumenta o número de células microgliais e a sua ramificação em camundongos *ob/ob*, mesmo quando associado à perda de peso corporal (GAO et al., 2014). Além disso, as células microgliais tratadas com leptina apresentaram uma forma bipolar, com aumento da ramificação (LAFRANCE et al., 2010). Embora o objetivo do atual trabalho não tenha sido avaliar neurogênese e a sobrevivência dessas células, a neurodegeneração relacionada com a obesidade tem sido

atribuída à produção excessiva de citocinas dependentes de IKK β / NF-kB tais como TNF- α e IL-1 β de células microgliais (LI et al., 2012). De fato, a deleção de IKK β em células da microglia promove um aumento da sobrevivência e neurogênese de células tronco neurais hipotalâmicas (LI et al., 2012).

Os astrócitos no ARC também possuem importante participação no balanço energético e na ingestão alimentar (YANG et al., 2015; KIM et al., 2014; PINTEAUX et al., 2007; LAFRANCE et al., 2010; WANG et al., 2015). Um estudo recente demonstrou que as células astrocitárias promovem redução da ingestão alimentar por mecanismo mediado por adenosina, via receptores A1, na inibição de neurônios AgRP no ARC, tanto em estado basal quanto por estímulo de ghrelina (YANG et al., 2015).

As células astrocitárias expressam receptores de leptina e estão relacionadas com a homeostase energética (KIM et al., 2014; ROTTKAMP et al., 2015). A ativação de astrócitos hipotalâmicos por leptina pode modificar as conexões neuronais adjacentes (CHEUNSUANG; MORRIS, 2005; FUENTE-MARTIN et al., 2012). Além disso, a deleção do receptor de leptina em astrócitos resulta no remodelamento da circuitaria neuronal hipotalâmica e promove hipofagia (KIM et al., 2014; ROTTKAMP et al., 2015; HSUCHOU et al., 2009; JAYARAM et al., 2013). O LepRb em astrócito no hipotálamo é essencial para sinalização da leptina e seus efeitos na homeostase da regulação neuroendócrina na obesidade (WANG et al., 2015; KIM et al., 2014).

As células astrocitárias também desempenham importante função como sensor e de suporte metabólico (LELOUP et al., 2015). Em proles de lactantes com HFD observa-se alteração da atividade elétrica estimulada por glicose e captação de glicose em neurônios hipotalâmicos associado com a deficiência na homeostase da glicose observada nesses animais (FUENTE-MARTIN et al., 2012). Observou-se nesses animais um aumento de GLUT1 no hipotálamo, e mais interessante, o "glicosensor" GLUT2, fortemente expresso em astrócitos no ARC também é aumentado, enquanto a isoforma GLUT3 neuronal é reduzida (FUENTE-MARTIN et al., 2012). Em contraste, o jejum *per se* induz um aumento no GLUT1 (que oferece neuroproteção contra a hipoglicemia), enquanto que o GLUT2 diminui (FUENTE-MARTIN et al., 2012), condição que induz aumento da ingestão alimentar (Bady et al., 2006), em conjunto com a diminuição do nível de leptina (FUENTE-MARTIN et al., 2012). Deve-se considerar também que o aumento na expressão dessas proteínas pode estar relacionado com o próprio aumento de células astrocitária e as mudanças morfológicas observadas nos astrócitos no ARC dos animais tratados com HFD (FUENTE-MARTIN et al.,

2012). Sugerindo desse modo que o quadro de gliose pode alterar componentes do metabolismo da glicose em astrócitos decorrente de alterações no aporte nutricional neonatal.

Camundongos com deleção específica de LepRb em astrócitos, expostos à HFD por 2 meses apresentam aumento na porcentagem de tecido adiposo corporal e hiperleptinemia (WANG et al., 2015). Isso coincidiu com alteração morfológica astrocitária, adquirindo uma maior espessura dos processos de extensão, caracterizando uma leve gliose reativa no hipotálamo (WANG et al., 2015). No presente trabalho demonstramos um aumento da imunorreatividade para GFAP e alterações na morfologia dos astrócitos de ratos SL no desmame e de ambos os grupos SL e LL na vida adulta. O efeito proporcionado nas células astrocitárias pode estar relacionado à hiperleptinemia observada no grupo SL no desmame e em ambos os grupos SL e LL na vida adulta. Em camundongos com deleção de LepR $-/-$, condicionada a vida adulta em célula astrocitária, observa-se redução no número de astrócitos e uma redução nos processos de extensão (KIM et al., 2014). Observamos ao desmame e na vida adulta um aumento dos processos de extensão e no corpo celular dos astrócitos no grupo SL, e de forma inédita também no grupo LL na idade adulta. Esse quadro é similar ao processo de astrogliose, que é caracterizada por grande número de astrócitos reativos, maior proliferação (SOFRONIEW; VINTERS, 2010; HORVATH et al., 2010), distinguindo-se dos astrócitos normais por seu maior tamanho, com processos longos e de maior espessura, aumento de marcação dos filamentos gliais (NORTON et al., 1992; SOFRONIEW; VINTERS, 2010; HORVATH et al., 2010) e da produção de citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo (SOFRONIEW; VINTERS, 2010). No sobrepeso e obesidade, o excesso de adiposidade associado ao aumento na concentração de leptina circulante, assim como, de ácidos graxos, pode diretamente ativar as células astrocitárias (GARCÍA-CÁCERES et al., 2011; GUPTA et al. 2012), sugerindo que a inflamação hipotalâmica e a gliose são resultantes de fatores nutricionais e modificações hormonais associadas com o aumento da adiposidade.

De forma similar ao nosso achado, em estudos com supernutrição em ratos SL (4 proles/lactante) no período neonatal observa-se um aumento da área e na quantidade de astrócitos no ARC na vida adulta (FUENTE-MARTÍN et al., 2012; GARCÍA-CÁCERES et al., 2011), também associado ao excesso de peso e hiperleptinemia (GARCÍA-CÁCERES et al., 2011). Em ratos com HFD foi relatado um aumento na imunorreatividade de células astrocitárias após uma semana, bem como, um aumento

nos processos astrocitários (THALER et al., 2012). Além disso, em proles de Sprague Dawley tratadas com HFD, quando estimulados com hipóxia observou-se um aumento das células astrocitárias no córtex somatosensorial (TEO; MORRIS; JONES, 2016). Adicionalmente, a leptina promove aumento da proliferação de astrócitos no hipotálamo na vida pós-natal e a deleção de receptores LepRb em astrócitos limita esta proliferação (ROTTKAMP et al., 2015), sendo que, o tratamento crônico com leptina no ARC de ratos Wistar adultos *naive* aumenta o tamanho e a quantidade de processos de extensão (GARCÍA-CÁCERES et al., 2011). Assim, estes dados indicam que o aumento de leptina circulante contribui para as alterações no aumento e na morfologia de células astrocitárias.

As alterações na morfologia dos astrócitos hipotalâmico indicativas de astrogliose em resposta ao tratamento com HFD (HORVATH et al., 2010; YI et al., 2011; THALER et al., 2012), têm sido implicadas em alterações na função sináptica dos neurônios centrais de melanocortina (HORVATH et al., 2010; THALER et al., 2012). Camundongos após 20 semanas tratados com HFD apresentaram um aumento de autofagossomas em neurônios POMC, bem como, após 8 meses observou-se uma redução de aproximadamente 20% de neurônios POMC (THALER et al., 2012). No modelo de tratamento materno com HFD por 6 semanas antes da gestação, até o desmame da prole, observou-se nas proles com 24 dias de vida um aumento na cobertura sináptica de neurônios POMC, associada a uma redução na frequência da corrente inibitória pós-sináptica em miniatura (FUENTE-MARTÍN et al., 2012). A supressão específica de LepRb em astrócito em modelo de deleção condicionada na vida adulta, promove alteração na morfologia de células astrogliais, assim como, alteração na cobertura sináptica, aumentando consequentemente a frequência das correntes pós-sinápticas inibitórias em miniatura de neurônios POMC do hipotálamo (KIM et al., 2014). Sugerindo desse modo que o status nutricional neonatal, associado a uma hiperleptinemia, pode promover alterações observadas na imunorreatividade e morfologia astrocitária, bem como, sugere-se alteração em neurônios e em mecanismos sinápticos importantes para o adequado balanço energético desses animais.

Observamos no presente trabalho um aumento na imunorreatividade de células astrócitárias, no tamanho do soma e nos processos de extensão que coincidiram com a diminuição da expressão de CX30 em ratos adultos SL e LL. Adicionalmente, na análise de colocalização de CX30 com GFAP observou-se redução especificamente nas células astrocitárias. As conexinas possuem funções ligadas à porção C-terminal que

não a de canal, estão presentes na diferenciação celular e tumorigênese por interagir com uma variedade de proteínas associadas ao citoesqueleto, enzimas quinases e fosfatases, moléculas de adesão e cascatas moleculares de sinalização (ZHOU; JIANG, 2014; Clasadonte e Haydon, 2014). A participação de CX30 na integridade morfológica de células de astrócitos foi demonstrada por Pannasch e Coll. (2014) em que camundongos *knockout* para CX30 apresentaram processos alongados e aumento das ramificações no astrócitos no hipocampo (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). Utilizando o método de análise de detalhe ultraestrutural por microscopia eletrônica em camundongos Cx30^{-/-} observou-se um aumento no tamanho e no número de processos finos distais de astrócitos na proximidade pós-sináptica, assim como um aumento no contato com a fenda sináptica pelos astrócitos (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014).

Estas alterações morfológicas dos astrócitos foram atenuadas pela injeção intrahipocampal de vetor lentiviral para a expressão de CX30 em camundongos Cx30^{-/-}, o que não foi observado com a injeção do vetor expressando CX30 Δ Cter, demonstrando o papel da porção C-Terminal da CX30 no citoesqueleto do astrócito (PANNASCH et al., 2014; Clasadonte e Haydon, 2014).

A amplitude do potencial excitatório pós-sináptico em miniatura foi reduzida nos animais CX30^{-/-}, indicando que ocorreu redução dos níveis de glutamato na fenda sináptica (PANNASCH et al., 2014). Demonstrando dessa forma que a falta de CX30 promove um aumento no *clearence* de glutamato e consequente atenuação da transmissão sináptica (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014). Sendo, a CX30 consequentemente importante para a morfologia astrocitária basal necessária para adequada recaptação de glutamato na fenda sináptica (PANNASCH et al., 2014; CLASADONTE; HAYDON, 2014).

Mudanças na estrutura glial não são apenas envolvidas em modificações do número de *inputs* sinápticos, mas na adequada recaptação de glutamato que proporciona uma excitabilidade neuronal funcional ao sistema (ARAQUE; NAVARRETE, 2010). Além disso, mudanças na estrutura glial afeta a eficácia sináptica devido a sua participação na depuração do glutamato e no controle das concentrações iônicas extracelulares, alterando desse modo a excitabilidade neuronal (ARAQUE; NAVARRETE, 2010). Em diversos sistemas neuroendócrinos, as alterações na cobertura glial nos neurônios do hipotálamo têm se demonstrado inversamente relacionadas com o número de inputs sinápticos (GARCIA-SEGURA et al., 1999).

Sugerindo no nosso modelo de alteração nutricional neonatal (sub- e supernutrição), que a redução da CX30 na idade adulta e consequente alteração morfológica observada, podem alterar aspectos importantes da sinapse glutamatérgica relacionada ao balanço energético. Considerando que neurônios POMC recebem *inputs* glutamatérgicos provenientes do VMH (STERNSON et al., 2005; SOHN et al., 2013), sugere-se que o modelo de alteração nutricional neonatal possa promover alterações nessa circuitaria neuronal decorrente das modificações astrocitárias.

Nosso trabalho demonstrou que a proteína TCPTP se colocaliza com células astrocitárias no ARC, assim como, observamos de forma inédita a indução do aumento da expressão RNAm de TCPTP e imunorreatividade a esta proteína pelo estímulo com LPS em cultura primária astrocitária hipotalâmica. O aumento nas concentrações plasmáticas de leptina é um forte indutor para o aumento de TCPTP hipotalâmica, tal evidência foi observada em camundongos com deficiência em leptina que possuíam redução proteica de TCPTP (LOH et al., 2011). Adicionalmente, quando injetado leptina (5 mg/g i.p.) em camundongos com 18 semanas de vida observou-se um aumento proteico de TCPTP e do RNAm de *Ptpn2* no hipotálamo (LOH et al., 2011).

O *splicing* alternativo de *Ptpn2*, pode originar duas formas variantes, sendo elas TCPTP de 48 kDa (TC48) que possui relação com o retículo endoplasmático (RE) e a TCPTP de 45 kDa (TC45) que tem função de substrato e transportador nuclear (COOL et al., 1989; SHIELDS et al., 2008; TIGANIS; BENNETT, 2007; YAMAMOTO et al., 2002). A isoforma TC45 age defosforilando STAT3 nuclear e não citoplasmática, porém, observou-se que a TCPTP não interfere na via da Ras/MAPK, agindo de forma específica (LOH et al., 2011). Na cultura primária de astrócitos hipotalâmicos no estado basal observamos a presença da proteína TCPTP próxima ao núcleo, o que sugere por sua vez maior concentração da proteína no retículo endoplasmático. No entanto, quando estimulada com leptina ou LPS observa-se sua presença de forma mais homogênea na célula, sugerindo encontrar-se em ambos os compartimentos celulares, no citoplasmático e no RE. Outros estudos serão necessários para compreender o significado fisiológico desta mudança de sua expressão nos diferentes compartimentos celulares.

A proteína TCPTP é expressa nos vários núcleos hipotalâmicos, como no ARC, hipotálamo dorsomedial, ventromedial, lateral e núcleo paraventricular (LOH et al., 2011) e está intimamente relacionada com a PTP1B, possuindo 72% de similaridade estrutural primária e terciária (TIGANIS; BENNETT, 2007). Os níveis proteicos de

TCPTP (TC48 and TC45) foram aumentados cerca de duas vezes, nas áreas mencionadas acima, assim como o RNAm hipotalâmico de *Ptpn2* em camundongos obesos, que foram submetidos à HFD por 12 semanas (LOH et al., 2011). Demonstramos em nosso trabalho, pela primeira vez, um aumento na expressão do mRNA do *Ptpn2* que codifica TCPTP, e o aumento da expressão proteica de TCPTP no ARC de ratos SL ao desmame e em ambos os grupos SL e LL na vida adulta. Esse fenômeno foi associado à hiperleptinemia e hiperinsulinemia nesses indivíduos. Dados de Marangon (2015), demonstraram um quadro de resistência central à leptina em ambos os grupos SL e LL na vida adulta, que não promoveu alteração na expressão de pSTAT3 após estímulo com este hormônio no ARC. A proteína TCPTP é contra reguladora da via de sinalização de leptina, uma vez que provoca a desfosforilação de p-STAT3 no citoplasma e no núcleo (LOH et al., 2011). Portanto, nossos dados indicam que o aumento da expressão de TCPTP contribui para a resistência à ação da leptina no ARC de ratos adultos submetidos à exposição nutricional excessiva ou deficiente na vida neonatal. Essa hipótese é corroborada pelo relato de que camundongos com deleção condicional de *Ptpn2* em neurônios (Nes-Cre;*Ptpn2*^{lox/lox}), comparados aos controles, apresentaram aumento na sensibilidade à leptina e menor ganho de peso corporal e preservação da sensibilidade à insulina, quando submetidos à dieta hiperlipídica (23% de lipídeos) durante 12 semanas (LOH et al., 2011). A proteína TCPTP atua negativamente na sinalização da insulina através da desfosforilação do IRS em Y1162 / Y1163 (GALIC et al., 2003; TSOU; BENCE, 2013). Observou-se que a supernutrição neonatal promoveu hiperglicemia e um aumento da relação insulina/glicose na vida adulta (PLAGEMANN et al., 2011). Adicionalmente, em ambos os modelos de sub e supernutrição observou-se uma redução na tolerância à glicose na vida adulta (MARANGON, 2015). Portanto, no modelo de alteração nutricional neonatal sugere-se a participação da TCPTP na resistência central à insulina.

A ação contra reguladora da TCPTP na sinalização da leptina e insulina, como citado, está associada com o aumento da PTP1B e SOCS3, no hipotálamo em indivíduos obesos (LOH et al., 2011). No entanto, no modelo de programação nutricional neonatal não apresentou alteração na expressão de PTPB1, assim como, não se observou alteração na expressão de SOCS3 (MARANGON, 2015). Outro dado interessante é que na cultura primária de astrócitos hipotalâmicos o estímulo com leptina (24 horas) não foi capaz de estimular a expressão de *Ptpn1*, por outro lado a leptina teve um efeito aumentando a expressão de TCPTP. Esses dados corroboram com

os achados no modelo de alteração nutricional neonatal de que a TCPTP possui papel central em mecanismos contra-reguladores associados aos elevados níveis séricos de leptina e insulina.

Os animais supernutridos no período neonatal apresentaram um aumento da TCPTP desde o desmame, associado a um aumento da expressão de CX43. Tem sido demonstrado que a TCPTP é capaz de desfosforilar CX43 e aumentar a sua expressão na membrana plasmática de células renais NRK (*normal rat kidney*) (LI et al., 2014). Em células do epitélio renal de rato (NRK) com ausência do fator de crescimento epidermal (EGF) observou-se a presença nuclear de TCPTP e de CX43 na membrana plasmática. Essas células quando tratadas com EGF, observou-se um recrutamento de TCPTP e sua consequente co-localização com CX43 na membrana plasmática (LI et al., 2014), indicando desse modo, a modulação da TCPTP sobre a CX43, promovendo consequentemente o aumento da CX43 na membrana celular.

A CX43 é uma proteína de membrana integral, que é fortemente expressa em astrócitos (GIAUME et al., 1991, TABERNERO et al., 2015) e o modelo de supernutrição neonatal no desmame promoveu um aumento na sua expressão em células astrocíticas. Adicionalmente, observou-se na cultura primária de astrócito hipotalâmico um aumento na expressão gênica de *Gja6* e na imunorreatividade de CX43 quando estimulada com LPS e apenas na imunorreatividade quando estimulada com leptina. Resultados similares foram observados em cultura de células de macrófago de murino (RAW 264.7), onde o estímulo com LPS promoveu um aumento na expressão gênica e proteica de CX43 (QIN et al., 2016). No estudo de programação com exposição intrauterina com LPS observou-se um aumento na atividade da CX43 e na expressão de CX43 na superfície das células de cultura astrocítica da prole (AVENDAÑO et al., 2015). Esses dados contribuem com os nossos achados, demonstrando o LPS por meio da TCPTP modula a CX43.

A conexina 43 tem sido considerada como um sensor de metabolismo da glicose em astrócitos (ALLARD et al., 2013,2014; GANDHI et al., 2010; BALL et al., 2011). De acordo com este conceito, os dados da literatura mostram que a diminuição induzida nos níveis de glicose no sangue em jejum atenua a expressão de CX43, enquanto que a infusão hiperglicêmica curta (3 horas) ou de longo prazo (48 horas) aumenta a expressão de CX43 no hipotálamo (ALLARD et al., 2014). Foi relatado que em tecido cerebral de ratos diabéticos adultos há menor expressão de CX30 e CX43 (GANDHI et al., 2010, BALL et al., 2011), embora tenham sido avaliados em áreas cerebrais não

sensíveis a glicose. Em um modelo de 48h de hiperglicemia e hiperinsulinemia (ALLARD et al., 2013), os níveis de CX43 foram maiores no hipotálamo ventromedial (ALLARD et al., 2014), sendo a expressão de CX43 associada nesse modelo a um estado pré-diabético (ALLARD et al., 2014). Considerando que os animais da ninhada SL apresentam um maior aporte nutricional no período de lactação, outros estudos serão necessários para melhor elucidação da possível contribuição deste fator nutricional na expressão de CX43 em astrócitos hipotalâmicos.

No PN60, no entanto, não observamos alteração da CX43 no ARC, devemos considerar também o fato de que outras possíveis áreas envolvidas com a sensibilidade da glicose, como o núcleo ventromedial do hipotálamo não foram avaliadas. No modelo de supernutrição neonatal no PN21 observamos um aumento da TCPTP, que por sua vez promove a desfosforilação de CX43 (LI et al., 2014). A CX43 quando fosforilada na região carboxi terminal pode alterar as estruturas de α -hélices e influenciar o tamanho e abertura do poro da junção comunicante, alterando desse modo a sua atividade de canal (EK-VITORIN et al., 1996; MORLEY; TAFFET; DELMAR, 1996). Necessitando desse modo maiores estudos sobre a influência da programação nutricional neonatal na presença de CX43 nos diferentes compartimentos celulares e na sua atividade.

Demonstrou-se uma relação inversa na expressão das conexinas CX43 e CX30, sendo que a deleção de CX43 especificamente em astrócitos está associada com um aumento na expressão CX30 (THEIS et al., 2003). Dessa forma, ao avaliar a ação da TCPTP na modulação de CX30 observamos pela primeira vez na cultura primária de astrócitos que a TCPTP quando estimulada com leptina promove redução na imunorreatividade para CX30. Esse efeito foi também associado à mudança no aumento de tamanho da área astrocitária, sendo estes efeitos revertidos com o silenciamento de *Ptpn2*. Deve-se considerar como já mencionado, que a CX30 possui função na morfologia astrocitária, como observado em camundongos com ablação da CX30 (CX30^{-/-}) que apresentaram no hipocampo um aumento na imunorreatividade para GFAP, um aumento na área astrocitária, bem como dos processos de extensão e arborização (PANNASCH et al., 2014). Desse modo, demonstramos que as alterações observadas na morfologia de células astrocitárias promovidas pela ação da leptina (KIM et al., 2014, ROTTKAMP et al., 2015) e do LPS no aumento do tamanho da área dessas células (NORDEN et al., 2015), se dá pelo aumento da TCPTP e seu ação na redução de CX30, resultado esse observado pela primeira vez.

O silenciamento de TCPTP em cultura primária de astrócitos induziu um aumento marcante da expressão de PTP1B. Esse resultado sugere que a TCPTP promove uma inibição da expressão de PTP1B, e a redução da TCPTP acarretaria em aumento compensatório de PTP1B, sugerindo uma possível alça de regulação entre estas fosfatases. Visto que a expressão da PTP1B aumentou após o silenciamento da TCPTP sugere-se que a PTP1B não participa das alterações morfológicas observadas, considerando que o silenciamento da TCPTP reverteu às alterações morfológicas observadas.

A estimulação de células astrocíticas com LPS promoveu um aumento na expressão de RNAm de citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL1 β e TNF α e a TCPTP por sua vez promoveu um mecanismo de *feedback* negativo, considerando que, o efeito do LPS na expressão dessas citocinas foi potencializado quando se utilizou o silenciador da expressão de *Ptpn2*. Essa resposta está associada ao fato de que a TCPTP também possui papel no controle da resposta inflamatória (YOU-TEN et al., 1997; MYERS et al., 2001, SIMONCIC et al., 2002; VAN VLIET et al., 2005). O modelo de camundongo deficiente em TCPTP apresenta um perfil inflamatório grave e amplo, levando a letalidade entre a 3^a-4^a semanas de idade (YOU-TEN et al., 1997). De fato, a TCPTP é um importante regulador negativo da sinalização de citocinas e os alvos de desfosforilação da TCPTP são JAK1 e JAK3, que por sua vez participam da ativação dos receptores de citocinas (MYERS et al., 2001, SIMONCIC et al., 2002). Adicionalmente, a TCPTP reduz a expressão de IL-6 induzida por TNF- α em células do sistema imune por meio da interação com a proteína adaptadora TRAF2, e a desfosforilação da proteína Src tirosina quinase, levando à inativação da via da Erk (VAN VLIET et al., 2005). Considerando que a TCPTP foi estimulada pelo LPS e que por sua vez possui função de retroalimentação negativa na expressão de citocinas pró-inflamatórias, esses resultados sugerem um papel adaptativo da TCPTP em modelos de indução de obesidade, regulando desse modo o *status* inflamatório crônico característico desta condição.

Em conclusão, este trabalho confirma em ratos que alterações no *status* nutricional neonatal, de sub- e supernutrição, no balanço energético, alteram o ganho de peso corporal e a ingestão alimentar na vida juvenil e adulta desses indivíduos.

Demonstramos pela primeira vez que o modelo de sub- e supernutrição neonatal promoveu redução da CX30 no ARC na vida adulta e que essa por sua vez está associada às alterações morfológicas de astrócitos, relacionadas ao aumento da TCPTP

e a um *status* de gliose no ARC, associado a um perfil pró-inflamatório. Demonstramos também, de forma inédita, em cultura primária de astrócitos que a leptina induz alterações na morfologia destas células, sendo este efeito mediado pela expressão aumentada de TCPTP. O aumento da expressão de TCPTP induz redução da CX30, proteína com função demonstrada na morfologia dos astrócitos. Estes dados reforçam a importância do papel das células gliais na regulação do balanço energético e reforçam a noção de que as células não neuronais participam na programação nutricional neonatal a qual impacta no estado metabólico e energético na vida adulta.

6 CONCLUSÕES

Concluí-se nesse trabalho que a programação nutricional neonatal de sub- e supernutrição promoveu alterações no ganho de peso corporal e no balanço energético em ratos juvenis e adultos, corroborando com a teoria de DOHaD, que preconiza a influência da exposição a eventos adversos durante as diferentes fases do desenvolvimento no maior risco de morbidades na vida pós natal. Observou-se um quadro de hiperleptinemia, hiperinsulinemia e de gliose hipotalâmica na vida adulta em animais sub- e supernutridos no período neonatal. Essas alterações observadas foram relacionadas ao quadro de gliose em ambos os modelos na vida adulta, sendo pela primeira vez associado ao aumento de TCPTP, bem como da expressão de *Tnf* no núcleo arqueado do hipotálamo. O aumento da TCPTP hipotalâmico está, por sua vez, relacionado, ao aumento das concentrações plasmáticas de leptina, insulina e da expressão de citocinas hipotalâmicas, sendo a TCPTP por sua vez, capaz de modular de forma adaptativa a expressão das citocinas. Além disso, de forma inédita, concluímos que a PTP1B possui ação modulatória sobre a TCPTP, relacionada às funções fisiológicas adaptativas.

A TCPTP é estimulada pela leptina e o LPS, além disso, é capaz de reduzir a expressão de CX30. Adicionalmente, as alterações morfológicas, de aumento de área observadas nas células astrocitárias foram relacionadas à redução de CX30, através da ação da TCPTP (Figura 36).

Figura 36. Esquema representativo sobre o efeito da leptina e do LPS na modulação das conexinas por meio da ação da TCPTP e consequente alteração morfológica astrocitária em cultura primária hipotalâmica. (A) O aumento das concentrações de leptina ou LPS promove por meio da modulação da TCPTP, redução da expressão de CX30 e aumento na expressão de CX43, resultando consequente alteração morfológica astrocitária. (B) O silenciamento de *Ptpn2* (siRNA) reverte o efeito da leptina e do LPS no aumento da expressão de CX30 e na redução da expressão de CX43, consequentemente impedindo os efeitos na morfologia astrocitária.

REFERÊNCIAS¹

- ALLARD, C.; CARNEIRO, L.; COLLINS, S.C.; CHRÉTIEN, C.; GRALL, S.; PÉNICAUD, L.; LELOUP, C. Alteration of hypothalamic glucose and lactate sensing in 48 h hyperglycemic rats. **Neuroscience Letters**. v.534, p.75–79, 2013.
- ALLARD, C.; CARNEIRO, L.; GRALL, S.; CLINE, B.H.; FIORAMONTI, X.; CHRÉTIEN, C.; BABA-AISSA, F.; GIAUME, C.; PÉNICAUD, L.; LELOUP, C. Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. **Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism**. v.34, p.339-346, 2014.
- ARAQUE, A.; NAVARRETE, M. Glial cells in neuronal network function. **Philosophical Transactions of the Royal Society London. Series B, Biological Science**. v.365(1551), p.2375-2381, 2010.
- AVENDAÑO, B.C.; MONTERO, T.D.; CHÁVEZ, C.E.; VON BERNHARDI, R.; ORELLANA, J.A. Prenatal exposure to inflammatory conditions increases Cx43 and Panx1 unopposed channel opening and activation of astrocytes in the offspring effect on neuronal survival. **Glia**. 2015.
- BABICKÝ, A.; OSTÁDALOVÁ, I.; PARÍZEK, J.; KOLÁR, J.; BÍBR, B. Onset and duration of the physiological weaning period for infant rats reared in nests of different sizes. **Physiologia Bohemoslovaca**.v.22(5), p.449-456, 1973.
- BADY, I.; MARTY, N.; DALLAPORTA, M.; EMERY, M.; GYGER, J.; TARUSSIO, D.; FORETZ, M.; THORENS, B. Evidence from glut2-null mice that glucose is a critical physiological regulator of feeding. **Diabetes** v.55, p.988–995, 2006.
- BALE, T.L.; BARAM, T.Z.; BROWN, A.S.; GOLDSTEIN, J.M.; INSEL, T.R.; MCCARTHY, M.M.; NEMEROFF, C.B.; REYES, T.M.; SIMERLY, R.B.; SUSSER, E.S.; NESTLER, E.J. Early life programming and neurodevelopmental disorders. **Biological Psychiatry**, v. 68(4), p.314-319, 2010.
- BALL, K.K.; HARIK, L.; GANDHI, G.K.; CRUZ, N.F.; DIENEL, G.A. Reduced gap junctional communication among astrocytes in experimental diabetes: contributions of altered connexin protein levels and oxidative-nitrosative modifications. **Journal Neuroscience Research**. v.89,p.2052-2067, 2011.
- BANNO, R.; ZIMMER, D.; DE JONGHE, B.C.; ATIENZA, M.; RAK, K.; YANG, W.;BENCE, KK. PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. **Journal of Clinical Investigation**.v.120, p.720-734, 2010.
- BARKER ,D.J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**, v1, p.1077-1081, 1986.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

BARKER, D. J. P; BULL, A. R; OSMOND, C; SIMMONDS, S. J. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **British Medical Journal**. v.301, p259–262, 1990.

BARKER, D.J.; WINTER, P.D.; OSMOND, C.; MARGETTS, B.; SIMMONDS, S.J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, v.2, p.577–580, 1989.

BARKER, D.J.P. In utero programming of chronic disease. MRC Environmental Epidemiology Unit, University of Southampton, Southampton General Hospital, Southampton, SO16 6YD, U.K **Clinical Science**, v.95, p.115-128, 1998.

BENZLER, J.; GANJAM, G.K.; PRETZ, D.; OELKRUG, R.; KOCH, C.E.; LEGLER, K.; STOHR, S.; CULMSEE, C.; WILLIAMS, L.M.; TUPS, A. Central inhibition of IKKbeta/NF-kappaB signaling attenuates high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. **Diabetes**. v.64, p.2015-2027, 2015.

BERNARDINELLI, Y.; MAGISTRETTI, P.J.; CHATTON, J-Y. Astrocytes generate Na⁺-mediated metabolic waves. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, p.14937-14942, 2004.

BETLEY, J.N.; CAO, Z.F.; RITOLA, K.D, STERNSON SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. **Cell**.v.5, p.155(6):1337-50, 2013.

BETLEY, J.N.; CAO, Z.F.; RITOLA, K.D. STERNSON S.M. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. **Cell**. v.155(6), p.1337-1350, 2013.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v.447, p.396–398, 2007.

BJØRBAEK, C.; BUCHHOLZ, R.M.; DAVIS, S.M.; BATES, S.H.; PIERROZ, D.D.; GU H.; NEEL, B.G.; MYERS, M.G. JR, FLIER, JS. Divergent roles of SHP-2 in ERK activation by leptin receptors. **Journal of biological chemistry**. v.276(7), p.4747-4755, 2001.

BODE, J.G., NIMMESGERN, A., SCHMITZ, J., SCHAPER, F., SCHMITT, M., FRISCH, W., HAUSSINGER, D., HEINRICH, P.C., GRAEVE, L. LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. **FEBS Letters**. v.463, p.365-370, 1999.

BORGES, B.C.; RORATO, R.; AVRAHAM, Y.; DA SILVA, L.E.; CASTRO, M.; VOROBIAV, L.; BERRY E.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS L.L. Leptin resistance and desensitization of hypophagia during prolonged inflammatory challenge. **American journal of physiology - Endocrinology and metabolism**.v.300(5), p.E858-869, 2011.

BORGES, B.C.; RORATO, R.C.; UCHOA, E.T.; MARANGON, P.B.; ELIAS, C.F.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ELIAS, L.L. Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPS-induced leptin resistance in male rats. **American journal of physiology - Endocrinology and metabolism**. v.1, p.308(1):E40-50, 2015.

BORRELLI, E.; NESTLER, E.J.; ALLIS, C.D.; SASSONE-CORSI, P. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. **Neuron**. v.60, p.961–974, 2008.

BOURET, S.G.; DRAPER, S.J.; SIMERLY, R.B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. **Science**, v.304, p.108-110, 2004.

BUCKMAN, L.B.; THOMPSON, M.M.; LIPPERT, R.N.; BLACKWELL, T.S.; YULL, F.E.; ELLACOTT, K.L. Evidence for a novel functional role of astrocytes in the acute homeostatic response to high-fat diet intake in mice. **Molecular Metabolism** v.4, p.58–63, 2015.

CAMPFIELD, L.A.; SMITH, F.J.; GUISEZ, Y.; DEVOS, R.; BURN, P. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**. v.269(5223), p.546-549, 1995.

CAMPOS, E.I.; REINBERG, D. Histones: annotating chromatin. **Annual Reviews Genetics**. v.45, p.559-599, 2009.

CARICILLI, A.M.; PICARDI, P.K.; DE ABREU, L.L.; UENO, M.; PRADA, P.O.; ROPELLE, E.R.; HIRABARA, S.M.; CASTOLDI, A.; VIEIRA, P.; CAMARA, N.O.; CURI, R.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J., 2011. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. **PLoS Biology**. v.9, p.e1001212, 2011.

CARMODY, J. S.; WAN, P.; ACCILI, D.; ZELTSER, L. M.; LEIBEL, R. L. Respective contributions of maternal insulin resistance and diet to metabolic and hypothalamic phenotypes of progeny. **Obesity**. v.19, p.492-499, 2010.

CARVALHEIRA, J.B., RIBEIRO, E.B., ARAUJO, E.P., GUIMARAES, R.B., TELLES, M.M., TORSONI, M., GONTIJO, J.A., VELLOSO, L.A., SAAD, M.J. Selective impairment of insulin signalling in the hypothalamus of obese Zucker rats. **Diabetologia**. v.46, p.1629-1640, 2003.

CARVALHEIRA, J.B.; SILOTO, R.M.; IGNACCHITTI, I.; BRENELLI, S.L.; CARVALHO, C.R.; LEITE, A.; VELLOSO, L.A.; GONTIJO, J.A.; SAAD, M.J., 2001. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS Letters**. v.500, p.119-124, 2001.

CARVALHO-FILHO, M.A.; UENO, M.; HIRABARA, S.M.; SEABRA, A.B.; CARVALHEIRA, J.B.; DE OLIVEIRA, M.G.; VELLOSO, L.A.; CURI, R.; SAAD, M.J. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. **Diabetes**. v.54, p.959-967, 2005.

CHENG, A.; UETANI, N.; SIMONCIC, P.D.; CHAUBEY, V.P.; LEE-LOY, A.; MCGLADE, C.J.; KENNEDY, B.P.; TREMBLAY, M.L. Attenuation of leptin action and regulation of obesity by protein tyrosine phosphatase 1B. **Developmental Cell**. v.4, p.497-503, 2002.

CHENG, X.; BLUMENTHAL, R.M. Coordinated chromatin control: structural and functional linkage of DNA and histone methylation. **Biochemistry**. v.49(14), p.2999-3008, 2010.

CHEUNSUANG, O.; MORRIS, R. Astrocytes in the arcuate nucleus and median eminence that take up a fluorescent dye from the circulation express leptin receptors and neuropeptide Y Y1 receptors. **Glia**. v.52, p.228-233, 2005.

CLASADONTE, J.; HAYDON, P.G. Connexin 30 controls the extension of astrocytic processes into the synaptic cleft through an unconventional non-channel function. **Neuroscience Bulletin**.v.30(6), p.1045-8, 2014.

CONE, R.D. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. **Nature Neuroscience**. v.5, p.571-578, 2005.

COOL DE, TONKS NK, CHARBONNEAU H, WALSH KA, FISCHER EH, KREBS EG. cDNA isolated from a human T-cell library encodes a member of the protein-tyrosine-phosphatase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.86(14):5257-5261, 1989.

COUCHMAN, J.R.; HÖÖK, M.; REES, D.A.; TIMPL, R. Adhesion, growth, and matrix production by fibroblasts on laminin substrates. **Journal Cell Biology**. v.96(1), p.177-183, 1983.

CRIPPS, R.L.; MARTIN-GRONERT, M.S.; ARCHER, Z.A.; HALES, C.N.; MERCER, J.G.; OZANNE, S.E. Programming of hypothalamic neuropeptide gene expression in rats by maternal dietary protein content during pregnancy and lactation. **Clinical Science**.v.15;117(2), p.85-93, 2009.

DAGON, Y.; AVRAHAM, Y.; MAGEN, I.; GERTLER, A.; BEN-HUR, T.; BERRY, E.M. Nutritional status, cognition, and survival: a new role for leptin and AMP kinase. **Journal of Biological Chemistry**. v.280, p.42142-42148, 2005.

DAVIS, E.; FOSTER, T.; THOMAS, W. Cellular forms and functions of brain microglia. **Brain Research Bulletin**. v.34, p.73-78, 1994.

DAY, J.J.; KENNEDY, A.J; SWEATT, J.D. DNA methylation and its implications and accessibility for neuropsychiatric therapeutics. **Annual Review of Pharmacology Toxicology**. v.55, p.591-611, 2015.

DAY, J.J.; SWEATT, J.D. DNA methylation and Memory Formation. **Nature neuroscience**. v.13, p.1319-1323, 2010

DAY, J.J.; SWEATT, J.D. Epigenetic mechanisms in cognition. **Neuron**. v.70, p.813-829, 2011.

DE BOCK, M.; DECROCK, E.; WANG, N.; BOL, M.; VINKEN, M.; BULTYNCK, G.; LEYBAERT, L. The dual face of connexin-based astroglial Ca(2+) : a key player in brain physiology and a prime target in pathology. **Biochemistry Biophysics Acta**. v.1843, p.2211-2232, 2014.

DE BOO H.A.; HARDING J.E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v.46, p.4-14, 2006.

DE SOUZA, C.T.; ARAUJO, E.P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R.L.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**. v.146, p.4192-4199, 2005.

DELIBEGOVIC, M.; BENCE, K.K.; MODY, N.; HONG, E.G.; KO, H.J.; KIM, J.K.; KAHN, B.B.; NEEL, B.G. Improved glucose homeostasis in mice with muscle-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B. **Molecular Cell Biology**. v.27(21), p.7727-7734, 2007.

DESAI, M.; GAYLE, D.; BABU, J.; ROSS, M.G. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative Comparative Physiology**. v.288(1), p.R91-96, 2005.

DESAI, M.; GAYLE, D.; HAN, G.; ROSS, M.G. Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. **Reproductive Sciences**. v.14(4), p.329-337, 2007.

DJOGO, T.; ROBINS, S.C.; SCHNEIDER, S.; KRYZSKAYA, D.; LIU, X.; MINGAY, A.; GILLON, C.J.; KIM, J.H.; STORCH, K.F.; BOEHM, U.; BOURQUE, C.W.; STROH, T.; DIMOU, L.; KOKOEVA, M.V. Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. **Cell Metabolism**. v.23(5), p.797-810, 2016.

DOUGLASS, J.D.; DORFMAN, M.D.; FASNACHT, R.; SHAFFER, L.D.; THALER, J.P. Astrocyte IKKb/NF-kB signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. **Molecular Metabolism**. v.6(4), p.366-373, 2017.

DOUGLASS, J.D.; DORFMAN, M.D.; THALER, J.P. Glia: silent partners in energy homeostasis and obesity pathogenesis. **Diabetologia**. v.60(2), p.226-236, 2017.

DUNN, K.W.; KAMOCKA, M.M.; MCDONALD, J.H. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**. v.300(4), p.C723-742, 2011.

EHLTING, C.; LAI, W.S.; SCHAPER, F.; BRENNENDORFER, E.D.; MATTHES, R.J.; HEINRICH, P.C.; LUDWIG, S.; BLACKSHEAR, P.J.; GAESTEL, M.; HAUSSINGER, D.; BODE, J.G., 2007. Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. **Journal of Immunology**. v.178, p.2813-2826, 2007.

EHSES, J.A.; MEIER, D.T.; WUEEST, S.; RYTKA, J.; BOLLER, S.; WIELINGA, P.Y.; SCHRAENEN, A.; LEMAIRE, K.; DEBRAY, S.; VAN LOMMEL, L.; POSPISILIK, J.A.; TSCHOPP, O.; SCHULTZE, S.M.; MALIPIERO, U.; ESTERBAUER, H.; ELLINGSGAARD, H.; RUTTI, S.; SCHUIT, F.C.; LUTZ, EK-VITORÍN, J.F.; CALERO, G.; MORLEY, G.E.; COOMBS, W.; TAFFET, S.M.; DELMAR, M. PH regulation of connexin43: molecular analysis of the gating particle. **Biophysical Journal**. v.71(3), p.1273-1284, 1996.

ELCHEBLY, M.; PAYETTE, P.; MICHALISZYN, E.; CROMLISH, W.; COLLINS, S.; LOY, A.L.; NORMANDIN, D.; CHENG, A.; HIMMS-HAGEN, J.; CHAN, C.C.;

RAMACHANDRAN,C., GRESSER, M.J.; TREMBLAY, M.L.; KENNEDY, B.P. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. **Science**. v.283(5407), p.1544-1548, 1999.

ELIAS, C.F.; ASCHKENASI, C.; LEE, C.; KELLY, J.; AHIMA, R.S.; BJORBAEK, C.; FLIER, J.S.; SAPER, C.B.; ELMQUIST, J.K. Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**. v.23, p.775-786, 1999.

ELLACOTT, K.L.; CONE, R.D. The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. **Philosophical Transactions of the Royal Society London. Series B, Biological Science**. v. 361(1471), p. 1265-1274, 2006.

ELMQUIST, J.K.; AHIMA, R.S.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S.; SAPER, C.B. Leptin activates neurons in ventrobasal hypothalamus and brainstem. **Endocrinology**.v.138(2), p.839-842, 1997.

ELMQUIST, J.K.; BJØRBAEK, C.; AHIMA, R.S.; FLIER, J.S.; SAPER, C.B. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**. v.395(4), p.535-547, 1998.

EYO, U.B.; DAILEY, M.E. Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**. v.8 (3), p.1-16, 2013.

FILOSA, J.A.; BLANCO, V.M. Neurovascular coupling in the mammalian brain. **Experimental Physiology**. v.92, p.641-646, 2007.

FORSDAHL, A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? **British Journal of Preventive & Social Medicine**, v.31, p.91-95, 1977.

FRANCIOSI, S.; RYU, J.K.; SHIM, Y.; HILL, A.; CONNOLLY, C.; HAYDEN, M.R.; MCLARNON, J.G.; LEAVITT, B.R. 2012. Age-dependent neurovascular abnormalities and altered microglial morphology in the YAC128 mouse model of Huntington disease. **Neurobiology and Diseases**. v.45, p.438-449, 2012.

FRÜHBECK, G. Intracellular signaling pathways activated by leptin. **Biochememical Journal**. v.393, p. 7-20, 2006.

FUENTE-MARTÍN, E.; GARCÍA-CÁCERES, C.; GRANADO, M.; DE CEBALLOS, M.L.; SÁNCHEZ-GARRIDO, M.Á.; SARMAN, B.; LIU, Z.W.; DIETRICH, M.O.; TENA-SEMPERE, M.; ARGENTE-ARIZÓN, P.; DÍAZ, F.; ARGENTE, J.; HORVATH, T.L.; CHOWEN, J.A. Leptin regulates glutamate and glucose transporters in hypothalamic astrocytes. **Journal of Clinical Investigation**. v.122(11), p.3900-3913, 2012.

GALIC, S.; KLINGLER-HOFFMANN, M.; FODERO-TAVOLETTI, M. T.; PURYER, M. A.; MENG, T.-C.; TONKS, N. K.; TIGANIS, T. Regulation of Insulin Receptor

Signaling by the Protein Tyrosine Phosphatase TCPTP. **Molecular and Cellular Biology**, v.23(6), p.2096-2108, 2003.

GANDHI, G.K.; BALL, K.K.; CRUZ, N.F.; DIENEL. Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. **ASN Neuro**, v2, p.e30, 2010.

GAO, Y.; OTTAWAY, N.; SCHRIEVER, S.C.; LEGUTKO, B.; GARCÍA-CÁCERES, C.; DE LA FUENTE, E.; MERGEN, C.; BOUR, S.; THALER, J.P.; SEELEY, R.J.; FILOSA, J.; STERN, J.E.; PEREZ-TILVE, D.; SCHWARTZ, M.W.; TSCHÖP, M.H.; YI, C.X. Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. **Glia**. v.62(1), p.17-25, 2014.

GARCÍA-CÁCERES, C.; FUENTE-MARTÍN, E.; BURGOS-RAMOS, E.; GRANADO M.; FRAGO, L.M.; BARRIOS, V.; HORVATH, T.; ARGENTE, J.; CHOWEN, J.A. Differential acute and chronic effects of leptin on hypothalamic astrocyte morphology and synaptic protein levels. **Endocrinology**. v.152(5), p.1809-1818, 2011.

GARCIA-SEGURA, L.M.; NAFTOLIN, F.; HUTCHISON, J.B.; AZCOITIA, I.; CHOWENJA. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. **Journal of Neurobiology**. v.40, p.574–584, 1999.

GELATO, K.A.; FISCHLE, W. Role of histone modifications in defining chromatin structure and function. **Biological Chemistry**, v.389(4), p.353-363, 2008.

GIAUME, C.; LIU, X. From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking. **Journal Physiology**.v.106(1-2), p.34-39, 2012.

GLAVAS, M.M.; KIRIGITI, M.A.; XIAO, X.Q.; ENRIORI, P.J.; FISHER, S.K.; EVANS, A.E.; GRAYSON, B.E.; COWLEY, M.A.; SMITH, M.S.; GROVE, K.L. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. **Endocrinology**, v.151, p.1598–1610, 2010.

GLUCKMAN P.D.; HANSON, M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, v.305, p.1733–1736, 2004.

GOFORTH, P.B.; LEINNINGER, G.M.; PATTERSON, C.M.; SATIN, L.S.; MYERS, M.G. JR. Leptin acts via lateral hypothalamic area neurotensin neurons to inhibit orexin neurons by multiple GABA-independent mechanisms. **Journal of Neuroscience**. v.34(34), p.11405-11415, 2014.

GONZALEZ, S.; PISANO, D.G.; SERRANO, M. Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. **Cell Cycle**. v.15;7(16), p.2601-2608, 2008.

GRANDBARBE, L.; BOUISSAC, J.; RAND, M.; HRABÉ DE ANGELIS, M.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; MOHIER, E. Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. **Development**, v.130(7), p.1391-1402, 2003.

GROVE, K.L.; GRAYSON, B.E.; GLAVAS, M.M.; XIAO, X.Q.; SMITH, M.S. Development of metabolic systems. **Physiology & Behavior**. v.86, p.646–660, 2005.

GUPTA, S.; KNIGHT, A.G.; GUPTA, S.; KELLER, J.N.; BRUCE-KELLER, A.J. 2012 Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. **Journal of Neurochemistry**. v.120, p.1060-1071, 2012.

HALES C.N.; BARKER, D.J. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v.60, p.5-20, 2001.

HALES C.N.; BARKER, D.J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **International Journal of Epidemiology**, v.42, p.1215-1222, 1992.

HALES, C.N.; BARKER, D.J.; CLARK, P.M.; COX, L.J.; FALL, C.; OSMOND, C.; WINTER, P.D. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **British medical journal / British Medical Association**, v.303, p.1019-1022, 1991.

HARDIE, D.G.; SCOTT, J.W.; PAN, D.A.; HUDSON, E.R. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. **FEBS Letters** 546: 113-120, 2003.

HARRIS, A.L. Connexin channel permeability to cytoplasmic molecules. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**. v.94, p.120-143, 2007.

HAYDON, P.G.; CARMIGNOTO, G: Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. **Physiology Review**, v.86, p.1009-1031, 2006.

HEMMATZADEH, M.; MOHAMMADI, H.; JADIDI-NIARAGH, F.; ASGHARI, F.; YOUSEFI, M. The role of oncomirs in the pathogenesis and treatment of breast cancer. **Biomedicine and Pharmacother**. v.78, p.129-139, 2016b.

HEMMATZADEH, M.; MOHAMMADI, H.; KARIMI, M.; MUSAVISHENAS, M.H.; BARADARAN, B. Differential role of microRNAs in the pathogenesis and treatment of Esophageal cancer. **Biomedicine & Pharmacother**. v.82, p.509-519, 2016a.

HIDALGO, J.; FLORIT, S.; GIRALT, M.; FERRER, B.; KELLER, C.; PILEGAARD, H. Transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-6 are resistant to high-fat diet-induced increases in body weight and body fat. **Brain, Behavior, and Immunity**. v.24, 119-126, 2010.

HORVATH TL, SARMAN B, GARCÍA-CÁCERES C, ENRIORI PJ, SOTONYI P, SHANABROUGH M, BOROK E, ARGENTE J, CHOWEN JA, PEREZ-TILVE D, PFLUGER PT, BRÖNNEKE HS, LEVIN BE, DIANO S, COWLEY MA, TSCHÖP MH. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.107(33), p.14875-14880, 2010.

HSUCHOU, H.; HE, Y.; KASTIN, A.J.; TU, H.; MARKADAKIS, E.N.; ROGERS, R.C.; FOSSIER, P.B.; PAN W. Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. **Brain: a Journal of Neurology**. v.132, p.889–902, 2009.

HUANG, Y.; HE, Y.; SUN, X.; HE, Y.; LI, Y.; SUN, C. Maternal high folic acid supplement promotes glucose intolerance and insulin resistance in male mouse

offspring fed a high-fat diet. **International Journal of Molecular Sciences**. v.15, p. 6298-6313, 2014.

INSEL, T.R.; CUTHBERT, B.N. Endophenotypes: Bridging genomic complexity and disorder heterogeneity. **Biological Psychiatry**, v.66, p.988-989, 2009.

ITO, Y.; BANNO, R.; HAGIMOTO, S.; OZAWA, Y.; ARIMA, H.; OISO, Y. TNF α increases hypothalamic PTP1B activity via the NF κ B pathway in rat hypothalamic organotypic cultures. **Regulatory Peptides**. v.174(1-3), p.58-64, 2012.

JANG, P.G.; NAMKOONG, C.; KANG, G.M.; HUR, M.W.; KIM, S.W.; KIM, G.H.; KANG, Y.; JEON, M.J.; KIM, E.H.; LEE, M.S.; KARIN, M.; BAIK, J.H.; PARK, J.Y.; LEE, K.U.; KIM, Y.B.; KIM, M.S. NF-kappaB activation in hypothalamic pro-opiomelanocortin neurons is essential in illness- and leptin-induced anorexia. **Journal of biological chemistry**. v.285, p.9706-9715, 2010.

JAYARAM, B.; PAN, W.; WANG, Y.; HSUCHOU, H.; MACE, A.; CORNELISSEN-GUILLAUME, G.G.; MISHRA, P.K.; KOZA, R.A.; KASTIN, A.J. Astrocytic leptin-receptor knockout mice show partial rescue of leptin resistance in diet-induced obesity. **Journal of Applied Physiology**. v.114(6), p.734-741, 2013.

JONES, P.A.; LIANG, G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p. 805-11, 2009.

JUAN DE SOLIS, A.; BAQUERO, A.F.; BENNETT, C.M.; GROVE, K.L.; ZELTSER, L.M. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. **Molecular Metabolism**. v.5(3), p.198-209, 2016.

KAPPIL, M.; WRIGHT, R.O.; SANDERS, A.P. Developmental Origins of Common Disease: Epigenetic Contributions to Obesity. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v.31, n.17, p.177-92, 2016.

KAWAI, T.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. **Immunity**. v.11, p.115-122, 1999.

KERMACK, W.O.; MCKENDRICK, A.G.; MCKINLAY, P.L. Death-rates in Great Britain and Sweden: expression of specific mortality rates as products of two factors, and some consequences thereof. **The Journal of Hygiene**, v.34, p.433-57, 1934.

KHALYFA, A.; CARRERAS, A.; HAKIM, F.; CUNNINGHAM, J.M.; WANG, Y.; GOZAL, D. Effects of late gestational high-fat diet on body weight, metabolic regulation and adipokine expression in offspring. **International Journal of Obesity**. v.37 (11), p.1481-1489, 2013.

KIM, J.G.; SUYAMA, S.; KOCH, M.; JIN, S.; ARGENTE-ARIZON, P.; ARGENTE, J.; LIU, Z.W.; ZIMMER, M.R.; JEONG, J.K.; SZIGETI-BUCK, K.; GAO, Y.; GARCIA-CACERES, C.; YI, C.X.; SALMASO, N.; VACCARINO, F.M.; CHOWEN, J.; DIANO, S.; DIETRICH, M.O.; TSCHÖP, M.H.; HORVATH, T.L. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. **Nature Neuroscience**. v.17(7), p.908-910, 2014.

KLAMAN, L.D.; BOSS, O.; PERONI, O.D.; KIM, J.K.; MARTINO, J.L.; ZABOLOTNY, J.M.; MOGHAL, N.; LUBKIN, M.; KIM, Y.B.; SHARPE, A.H.; STRICKER-KRONGRAD, A.; SHULMAN, G.I.; NEEL, B.G.; KAHN, B.B. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. **Molecular Cell Biology**.v.20(15), p.5479-5489, 2000.

KLEINRIDDER, A.; SCHENTEN, D.; KONNER, A.C.; BELGARDT, B.F.; MAUER, J.; OKAMURA, T.; WUNDERLICH, F.T.; MEDZHITOV, R.; ANDBRUNING, J.C. MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. **Cellular Metabolism**. v.10(4), p. 249–259, 2009.

KLOSS, C.U., BOHATSCHKE, M., KREUTZBERG, G.W., RAIVICH, G. Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. **Experimental Neurology**. v.168, p. 32–46, 2001.

KOBAYASHI, K.; IMAGAMA, S.; OHGOMORI, T.; HIRANO, K.; UCHIMURA, K.; SAKAMOTO, K.; HIRAKAWA, A.; TAKEUCHI, H.; SUZUMURA, A.; ISHIGURO, N. Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. **Cell Death Discovery**. v.4, p.e525, 2013.

KONNER, A.C.; BRUNING, J.C. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. **Cell Metabolism**. v.16, p.144–152, 2012.

KÖNNER, A.C.; BRÜNING, J.C. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v.22(1), p.16-23, 2011.

KOREN, S.; FANTUS, I.G. Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. **Best Practice and Research Clinical Endocrinology Metabolism**. v.21, p.621–640, 2007.

KRISTENSEN, P.; JUDGE, M.E.; THIM, L.; RIBEL, U.; CHRISTJANSEN, K.N.; WULFF, B.S.; CLAUSEN, J.T.; JENSEN, P.B.; MADSEN, O.D.; VRANG, N.; LARSEN, P.J.; HASTRUP, S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**. v.393, p.72–76, 1998.

LAFRANCE, V.; INOUE, W.; KAN, B.; LUHESHI, G.N. Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. **Brain Behavior and Immunity**. v.24(3), p.358-365, 2010.

LANGER, J.; STEPHAN, J.; THEIS, M.; ROSE, C.R. Gap junctions mediate intercellular spread of sodium between hippocampal astrocytes in situ. **Glia**. v.60, p.239-252, 2012.

LAUF, U.; GIEPMANS, B.N.G.; LOPEZ, P.; BRACONNOT, S.; CHEN, S-C.; FALK, M.M. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.99, p.10446-10451, 2002.

LEE, B.C.; LEE, J. Cellular and molecular players in adipose tissue inflammation in the development of obesity-induced insulin resistance. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1842, p.446-462, 2014.

LEE, J.Y.; SOHN, K.H.; RHEE, S.H.; HWANG, D. Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4. **Journal of biological chemistry**. v.276, p.16683-16689, 2001.

LEE, J.Y.; YE, J.; GAO, Z.; YOUN, H.S.; LEE, W.H.; ZHAO, L.; SIZEMORE, N.; HWANG, D.H. Reciprocal modulation of Toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT by saturated and polyunsaturated fatty acids. **Journal of biological chemistry**. v.278, p.37041-37051, 2003.

LEHNARDT, S.; MASSILLON, L.; FOLLETT, P.; JENSEN, F.E.; RATAN, R.; ROSENBERG, P.A.; VOLPE, J.J.; VARTANIAN, T. Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.100(14), p.8514-8519, 2003.

LEINNINGER, G.M.; OPLAND, D.M.; JO, Y.H.; FAOUZI, M.; CHRISTENSEN, L.; CAPPELLUCCI, L.A.; RHODES, C.J.; GNEGY, M.E.; BECKER, J.B.; POTHOS, E.N.; SEASHOLTZ, A.F.; THOMPSON, R.C.; MYERS, M.G. JR. Leptin action via neurotensin neurons controls orexin, the mesolimbic dopamine system and energy balance. **Cell Metabolism**. v.14(3), p.313-323, 2011.

LELOUP, C.; ALLARD, C.; CARNEIRO, L.; FIORAMONTI, X.; COLLINS, S.; PÉNICAUD, L. Glucose and hypothalamic astrocytes: More than a fueling role? **Neuroscience**. p.323:110-120, 2016.

LI, G.; KOHORST, J.J.; ZHANG, W.; LARITSKY, E.; KUNDE-RAMAMOORTHY, G.; BAKER, M.S.; FIOROTTO, M.L.; WATERLAND, R.A. Early postnatal nutrition determines adult physical activity and energy expenditure in female mice. **Diabetes**. v.62(8), p.2773-2783, 2013.

LI, H.; SPAGNOL, G.; NASLAVSKY, N.; CAPLAN, S.; SORGEN, P.L. TC-PTP directly interacts with connexin43 to regulate gap junction intercellular communication. **Journal Cell Science**. v.127(15), p.3269-3279, 2014.

LI, J.; TANG, Y.; CAI, D. IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. **Nature Cell Biology**. v.14(10), p.999-1012, 2012.

LIEBMANN, M.; STAHR, A.; GUENTHER, M.; WITTE, O.W.; FRAHM, C. Astrocytic Cx43 and Cx30 differentially modulate adult neurogenesis in mice. **Neuroscience Letters**. v.17 (545), p.40-45, 2013.

LIRA, L.A.; ALMEIDA, L.C.; DA SILVA, A.A.; CAVALCANTE, T.C.; DE MELO, D.D.; DE SOUZA, J.A.; CAMPINA, R.C.; DE SOUZA, S.L. Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.38, p.23-29, 2014.

LIU, Z.; LIM, CY; SU, MY-F; SOH, SLY; SHUI, G; WENK, MR; GROVE, KL; RADDA, GK; HAN, W; XIAO, X. Neonatal overnutrition in mice exacerbates high-fat diet-induced metabolic perturbations. **Journal of Endocrinology**, v219, p.131-143, 2013.

LOH, K.; FUKUSHIMA, A.; ZHANG, X.; GALIC, S.; BRIGGS, D.; ENRIORI, P.J.; SIMONDS, S.; WIEDE, F.; REICHENBACH, A.; HAUSER, C.; SIMS, N.A.; BENCE, K.K.; ZHANG, S.; ZHANG, Z.Y.; KAHN, B.B.; NEEL, B.G.; ANDREWS, Z.B.; COWLEY, M.A.; TIGANIS, T. Elevated hypothalamic TCPTP in obesity contributes to cellular leptin resistance. **Cell Metabolism**. v.2;14(5), p.684-699, 2011.

LONGAIR, MH; BAKER DA; ARMSTRONG JD. Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. **Bioinformatics**, v.27(17), p. 2453-2454, 2011.

LÓPEZ, M.; SEOANE, L.M.; TOVAR, S.; GARCÍA, M.C.; NOGUEIRAS, R.; DIÉGUEZ, C.; SEÑARÍS, R.M. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. **Diabetologia**. 2005 v.48(1), p.140-148, 2005.

LÓPEZ, M.; TOVAR, S.; VÁZQUEZ, M.J.; NOGUEIRAS, R.; SEOANE, L.M.; GARCÍA, M.; SEÑARÍS, R.M.; DIÉGUEZ, C. Perinatal overfeeding in rats results in increased levels of plasma leptin but unchanged cerebrospinal leptin in adulthood. **International Journal of Obesity**.v.31(2), p.371-377, 2007.

LUHESHI, G.N.; GARDNER, J.D.; RUSHFORTH, D.A.; LOUDON, A.S.; ROTHWELL, N.J. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.7047-7052, 1999.

MADORE, C.; JOFFRE, C.; DELPECH, J.; DE SMEDT-PEYRUSSE, V.; AUBERT, A.; COSTE, L.; LAYE, S.; NADJAR, A. Early morphofunctional plasticity of microglia in response to acute lipopolysaccharide. **Brain Behavior and Immunity**. v.34, p.151-158, 2013.

MARANGON, P.B. Responsividade hipotalâmica à leptina e ghrelina em modelo de programação nutricional neonatal. **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto**, 170 f. Tese (Doutorado), 2015.

MARSHALL, H.E., HESS, D.T., STAMLER, J.S. S-nitrosylation: physiological regulation of NF-kappaB. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.101, p.8841-8842, 2004.

MARTORELL, R.; STEI, A.D.; SCHOROEDER, D.G. Early Nutrition and Later Adiposity. **American Society for Nutritional Sciences**. v. 131(3), p.874S-880S, 2001.

MANDERS, E.M.M.; VERBEEK, F.J.; ATEN, J.A. Measurement of colocalization of objects in dual-color confocal images. **Journal of Microscopy**. v.169, p.375-382, 1993.

MCCARTHY, K.D.; DE, VELLIS, J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. **Journal Cell Biology**. v.85(3), p.890-902, 1980.

MCNAY, D.E.; BRIANÇON, N.; KOKOEVA, M.V.; MARATOS-FLIER, E.; FLIER, J.S. Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. **Journal of Clinical Investigation**. v.122(1), p.142-152, 2012.

MCPHERSON, N.O.; OWENS, J.A.; FULLSTON, T.; LANE, M. Preconception diet or exercise intervention in obese fathers normalizes sperm microRNA profile and metabolic syndrome in female offspring. **American journal of physiology - Endocrinology and metabolism**. v.308, p. 805-821, 2015.

MENG, Q.; CAI, D. Defective hypothalamic autophagy directs the central pathogenesis of obesity via the IkappaB kinase beta (IKKbeta)/NF-kappaB pathway. **Journal of biological chemistry**. v.286, p.32324-32332, 2011.

MERCER, J.G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L.M.; LAWRENCE, C.B.; HANNAH, L.T.; MORGAN, P.J.; TRAYHURN, P. Coexpression of leptin receptor and prepronoreuropeptide Y mRNA in arcuate nucleus of mouse hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**. v.10, p.733-735, 1996a.

MERCER, J.G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L.M.; LAWRENCE, C.B.; HANNAH, L.T.; TRAYHURN, P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. **FEBS Letters**. v.387(2-3), p.113-116, 1996.

MILANSKI, M.; DEGASPERI, G.; COOPE, A.; MORARI, J.; DENIS, R.; CINTRA, D.E.; TSUKUMO, D.M.; ANHE, G.; AMARAL, M.E.; TAKAHASHI, H.K.; CURI, R.; OLIVEIRA, H.C.; CARVALHEIRA, J.B.; BORDIN, S.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **Journal of Neuroscience**.v.29(2),p.359-370, 2009.

MILLER, A.A.; SPENCER, S.J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. **Brain Behavior Immune**. v.42, p.10-21, 2014.

MILLER, F.D.; GAUTHIER, A.S. Timing is everything: Making neurons versus glia in the developing cortex. **Neuron**, v.54, p.357-369, 2007.

MINOKOSHI, Y.; ALQUIER, T.; FURUKAWA, N.; KIM, Y.B.; LEE, A.; XUE, B.; MU, J.; FOUFELLE, F.; FERRÉ, P.; BIRNBAUM, M.J.; STUCK, B.J.; KAHN, B.B. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. **Nature**. v.428, p.569-574, 2004.

MORLEY, G.E.; TAFFET, S.M, DELMAR, M. Intramolecular interactions mediate pH regulation of connexin43 channels. **Biophysical Journal**. v.70(3), p.1294-302, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunology. Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MÜLLER, M.S. Functional impact of glycogen degradation on astrocytic signalling. **Biochemical Society Transactions**. v.42, p.1311-1315, 2014.

MYERS, M.P.; ANDERSEN, J.N.; CHENG, A.; TREMBLAY, M.L.; HORVATH, C.M.; PARISIEN, J.P.; SALMEEN, A.; BARFORD, D.; TONKS, N.K. TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.47771-47774, 2001.

NAVARRO, E.; FUNTIKOVA, A.N; FÍTO, M.; SCHRÖDER, H. Prenatal nutrition and the risk of adult obesity: Long-term effects of nutrition on epigenetic mechanisms regulating gene expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 39, p. 1-14, 2017.

NISWENDER, K.D.; BASKIN, D.G.; SCHWARTZ, M.W. Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. **Trends Endocrinology Metabolism**. v.15, p.362-369, 2004.

NISWENDER, K.D.; MORTON, G.J.; STEARNS, W.H.; RHODES, C.J.; MYERS, M.G.; JR, SCHWARTZ, M.W. Intracellular signalling. Key enzyme in leptin-induced anorexia. **Nature**. v.413, p.794-795, 2001.

NORDEN, D.M.; TROJANOWSKI, P.J.; VILLANUEVA, E.; NAVARRO, E.; GODBOUT, J.P. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. **Glia**.v.64(2), p.300-316, 2016.

NORTON, W.T.; AQUINO, D.A.; HOZUMI, I.; CHIU, F.C.; BROSNAN, C.F. Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. **Neurochemical Research**. v.17(9), p.877-85, 1992.

OH-I, S.; THALER, J.P.; OGIMOTO, K.; WISSE, B.E.; MORTON, G.J.; SCHWARTZ, M.W. Central administration of interleukin-4 exacerbates hypothalamic inflammation and weight gain during high-fat feeding. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**.v.299(1), p.e47-53, 2010.

PADILLA, S.L.; CARMODY, J.S.; ZELTSER, L.M. Pomc-expressing progenitors give rise to antagonistic neuronal populations in hypothalamic feeding circuits. **Nature Medicine**. v.16(4), p.403-5, 2010.

PANNASCH, U.; FRECHE, D.; DALLÉRAC, G.; GHÉZALI, G.; ESCARTIN, C.; EZAN, P.; COHEN-SALMON, M.; BENCHENANE, K.; ABUDARA, V.; DUFOUR, A.; LÜBKE, J.H.; DÉGLON, N.; KNOTT, G.; HOLCMAN, D.; ROUACH, N. Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. **Nature Neuroscience**. v.17(4), p.549-58, 2014.

PATTERSON, C.M.; BOURET, S.G.; PARK, S.; IRANI, B.G.; DUNN-MEYNELL, A.A.; LEVIN, B.E. Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. **Endocrinology**.v.151(9), p.4270-4279, 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain stereotaxic coordinates**. New York: Academic, 1997.

PELLEYMOUNTER, M.A.; CULLEN, M.J.; BAKER, M.B.; HECHT, R.; WINTERS, D.; BOONE, T.; COLLINS, F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**. v.269(5223), p.540-543, 1995.

PENTINAT, T.; RAMON-KRAUEL, M.; CEBRIA, J.; DIAZ, R.; JIMENEZ-CHILLARON, J.C. Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. **Endocrinology**. v.151(12), p.5617-5623, 2010.

PETERSEN, A.M.; PEDERSEN, B.K. The anti-inflammatory effect of exercise. **Journal of Applied Physiology**. v.98, p.1154–1162, 2005.

PIMENTEL, G.D.; LIRA, F.S.; ROSA, J.C.; OLIVEIRA, J.L.; LOSINSKAS-HACHUL, A.C.; SOUZA, G.I.; DAS GRAÇAS, T.; DO CARMO, M.; SANTOS, R.V.; DE MELLO, M.T.; TUFIK, S.; SEELAENDER, M.; OYAMA, L.M.; OLLER DO NASCIMENTO, C.M.; WATANABE, R.H.; RIBEIRO, E.B.; PISANI, L.P. Intake of trans fatty acids during gestation and lactation leads to hypothalamic inflammation via TLR4/NFκBp65 signaling in adult offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.23(3), p.265-271, 2012.

PIMENTEL, G.D.; ROPELLE, E.R.; ROCHA, G.Z.; CARVALHEIRA, J.B. The role of neuronal AMPK as a mediator of nutritional regulation of food intake and energy homeostasis. **Metabolism**.v.2, p.171-178, 2013.

PINTEAUX E, INOUE W, SCHMIDT L, MOLINA-HOLGADO F, ROTHWELL NJ, LUHESHI GN. Leptin induces interleukin-1beta release from rat microglial cells through a caspase 1 independent mechanism. **Journal of Neurochemistry**.v.102(3), p.826-833, 2007.

PISTELL, P.J.; MORRISON, C.D.; GUPTA, S.; KNIGHT, A.G.; KELLER, J.N.; INGRAM, D.K.; BRUCE-KELLER, A.J. Cognitive impairment following high-fat diet consumption is associated with brain inflammation. **Journal of Neuroimmunology**, v.219, p.25–32, 2010.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; BRUNN, M.; HARDER, A.; ROEPKE, K.; WITTRICK-STAAR, M.; ZISKA, T.; SCHELLONG, K.; RODEKAMP, E.; MELCHIOR, K.; DUDENHAUSEN, J.W. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **Journal of Physiology**.v.15, p.587(20), p4963-76, 2009.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; VOITS, M.; FINK, H.; ROHDE, W.; DÖRNER, G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Research**. v.836, p.146–155, 1999.

PLAGEMANN, A.; ROEPKE, K.; HARDER, T.; BRUNN, M.; HARDER, A.; WITTRICK-STAAR, M.; ZISKA, T.; SCHELLONG, K.; RODEKAMP, E.; MELCHIOR, K.; DUDENHAUSEN, J.W. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **Journal of Perinatal Medicine**.v.38(4),p.393-400, 2010.

POOL, M; THIEMANN, J; BAR-OR, A; FOURNIER, A.E. NeuriteTracer: A novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth. **Journal of Neuroscience Methods**. v.168(1), p.134-139, 2008.

POSEY, K.A.; CLEGG, D.J.; PRINTZ, R.L.; BYUN,J.; MORTON, G.J.; VIVEKANANDAN-GIRI, A.; PENNATHUR, S.; BASKIN, D.G.; HEINECKE, J.W.; WOODS,S.C.; SCHWARTZ, M.W.; NISWENDER, K.D. Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism**. v.296(5), p.E1003–E1012, 2009.

PURKAYASTHA, S.; ZHANG, G.; CAI, D. Uncoupling the mechanisms of obesity and hypertension by targeting hypothalamic IKK- β and NF- κ B. **Nature Medicine**. v.17(7), p.883-887, 2011.

QIN, J.; ZHANG, G.; ZHANG, X.; TAN, B.; Lv, Z.; LIU, M.; REN, H.; QIAN, M.; DU, B. TLR-Activated Gap Junction Channels Protect Mice against Bacterial Infection through Extracellular UDP Release. **Journal of Immunology**. v.196(4), p.1790-1798, 2016.

QU, C.; GARDNER, P.; SCHRIJVER, I. The role of the cytoskeleton in the formation of gap junctions by Connexin 30. **Experimental Cell Research**. v.315, p.1683–1692, 2009.

RANSOHOFF, R.M.; CARDONA, A.E. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. **Nature**. v.468, p.253–262, 2010.

REIS, W.L.; YI, C.X.; GAO, Y.; TSCHOP, M.H.; STERN, J.E. Brain innate immunity regulates hypothalamic arcuate neuronal activity and feeding behavior. **Endocrinology** v.156, p.1303–1315, 2015.

REMMERS, F.; FODOR, M.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H.A. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. **Physiology & Behavior**. v.95, p.208-215, 2008.

REYNAERT, N.L.; CKLESS, K.; KORN, S.H.; VOS, N.; GUALA, A.S.; WOUTERS, E.F.; VAN DER VLIET, A.; JANSSEN-HEININGER, Y.M. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.101, p.8945–8950, 2004.

ROCHA, M.L.; FERNANDES, P.P.; LOTUFO, B.M.; MANHÃES, A.C.; BARRADAS, P.C.; TENORIO, F. Undernutrition during early life alters neuropeptide Y distribution along the arcuate/paraventricular pathway. **Neuroscience**.v.256, p.379-91, 2014.

RODRIGUES, A.L.; DE SOUZA, E.P.; DA SILVA, S.V.; RODRIGUES, D.S.; NASCIMENTO, A.B.; BARJA-FIDALGO, C.; DE FREITAS, M.S. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **Journal of Endocrinology**.v.195(3), p.485-494, 2007.

RODRIGUES, A.L.; DE-MOURA, E.G.; PASSOS, M.C.; TREVENZOLI, I.H.; DA CONCEICAO, E.P.; BONONO, I.T.; NETO, J.F.; LISBOA, P.C. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.22, p.109–17, 2011.

ROMANATTO, T.; CESQUINI, M.; AMARAL, M.E.; ROMAN, E.A.; MORAES, J.C.; TORSONI, M.A.; CRUZ-NETO, A.P.; VELLOSO, L.A. TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient—effects on leptin and insulin signaling pathways. **Peptides**. v.28, p.1050–1058, 2007.

ROPELLE, E.R.; PAULI, J.R.; CINTRA, D.E.; DA SILVA, A.S.; DE SOUZA, C.T.; GUADAGNINI, D.; CARVALHO, B.M.; CARICILLI, A.M.; KATASHIMA, C.K.; CARVALHO-FILHO, M.A.; HIRABARA, S.; CURI, R.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.; CARVALHEIRA, J.B. 2013. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. **Diabetes**. v.62, p.466–470, 2013.

ROPELLE. E.R.; FLORES, M.B.; CINTRA D.E.; ROCHA, G.Z.; PAULI, J.R.; MORARI, J.; DE SOUZA, C.T.; MORAES, J.C.; PRADA, P.O.; GUADAGNINI, D.; MARIN, R.M.; OLIVEIRA, A.G.; AUGUSTO, T.M.; CARVALHO, H.F.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J.; CARVALHEIRA, J.B. IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. **PLoS Biology**.v. 24, p.8(8), 2010.

ROTTKAMP, D.M.; RUDENKO, I.A.; MAIER, M.T.; ROSHANBIN, S.; YULYANINGSIH, E.; PEREZ, L.; VALDEARCOS, M.; CHUA, S.; KOLIWAD, S.K.; XU, A.W. Leptin potentiates astrogenesis in the developing hypothalamus. **Molecular Metabolism**. v.4(11), p.881-889, 2015.

ROUACH, N.; KOULAKOFF, A.; ABUDARA, V.; WILLECKE, K.; GIAUME, C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. **Science**. v.322, p.1551–1555, 2008.

RUSSELL, JA. Milk yield, suckling behaviour and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes. **Journal of Physiology**, v.303, p.403-415, 1980.

SACHOT, C.; POOLE, S.; LUHESHI, G.N. Circulating leptin mediates lipopolysaccharide-induced anorexia and fever in rats. **Journal of Physiology**. v.561, p.263-272, 2004.

SADAGURSKI, M.; NORQUAY, L.; FARHANG, J.; D'AQUINO, K.; COPPS, K.; WHITE, M.F. Human IL6 enhances leptin action in mice. **Diabetologia**. v.53, p.525-535, 2010.

SCEMES, E; GIAUME C. Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. **Glia**, v.54, p.716-725, 2006.

SCHMIDT, I.; FRITZ, A.; SCHÖLCH, C.; SCHNEIDER, D.; SIMON, E.; PLAGEMANN, A. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. **International Journal Obesity Related Metabolic Disorder**. v.8,p.1168-1174, 2001.

SCOTT, M.M.; LACHEY, J.L.; STERNSON, S.M.; LEE, C.E.; ELIAS, C.F.; FRIEDMAN, J.M.; ELMQUIST, J.K. Leptin targets in the mouse brain. **Journal of Comparative Neurology**.v.514(5), p.518-532, 2009.

SHENG, Z.; SANTIAGO, A.M.; THOMAS, M.P.; ROUTH, V.H. Metabolic regulation of lateral hypothalamic glucose-inhibited orexin neurons may influence midbrain reward neurocircuitry. **Molecular Cell Neuroscience**. v.62, p.30–41, 2014.

SHI X, WANG X, LI Q, SU M, CHEW E, WONG ET, LACZA Z, RADDA GK, TERGAONKAR V, HAN W. Nuclear factor κ B (NF- κ B) suppresses food intake and energy expenditure in mice by directly activating the Pomc promoter. **Diabetologia**.v.56(4), p.925-936, 2013.

SHI, H.; KOKOEVA, M.V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; LIER, J.S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **Journal Clinical Investigation**. v.116, p.3015–3025, 2006.

SHIELDS, B.J.; COURT, N.W.; HAUSER, C.; BUKCZYNSKA, P.E.; TIGANIS, T. Cell cycle-dependent regulation of SFK, JAK1 and STAT3 signalling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP. **Cell Cycle**.v.7(21), p.3405-3416, 2008.

SHIMADA, M.; NAKAMURA, T. Time of neuron origin in mouse hypothalamic nuclei. **Experimental Neurology**.v.41(1), p.163-173, 1973.

SIMONCIC, P.D.; LEE-LOY, A.; BARBER, D.L.; TREMBLAY, M.L.; MCGLADE, C.J. The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. **Current Biology**. v12, p.446–453, 2002.

SOFRONIEW M.V.; VINTERS, H.V. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v.119(1), p.7-35, 2010.

SÖHL, G.; WILLECKE, K. Gap junctions and the connexin protein family. **Cardiovascular Research**. v.62(2), p.228-232, 2004.

STAMLER, J.S.; HESS, D.T. Nascent nitrosylases. **Nature Cell Biology**. 12, 1024-1026, 2010.

STENCE, N., WAITE, M., DAILEY, M.E. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. **Glia**. v.33, p.256-266, 2001.

STERNSON, S.M.; SHEPHERD, G.M.; SHEPHERD, J.M. Topographic mapping of VMH → arcuate nucleus microcircuits and their reorganization by fasting. **Nature Neuroscience**. v.8 p.1356-1363, 2005.

STEVENS, A.; BEGUM, G.; WHITE, A. Epigenetic changes in the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene: a mechanism linking maternal undernutrition to obesity in the offspring? **European Journal of Pharmacology**, v.660, p.194-201, 2011.

STREIT, W.J.; WALTER, S.A.; PENNELL, N.A. Reactive microgliosis. **Progress in Neurobiology**. v.57, p.563-581, 1999.

SWEATT, J.D. Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. **Biological Psychiatry**, v.65, p.191-197, 2009.

SZNEJDER-PACHOLEK, A.; JONIEC-MACIEJAK, I.; WAWER, A.; CIESIELSKA, A.; MIROWSKA-GUZEL, D. The effect of α -synuclein on gliosis and IL-1 α , TNF α , IFN γ , TGF β expression in murine brain. **Pharmacological Reports**.v.69(2), p.242-251, 2017.

T.A.; BONI-SCHNETZLER, M.; KONRAD, D.; DONATH, M.Y. Toll-like receptor 2-deficient mice are protected from insulin resistance and beta cell dysfunction induced by a high-fat diet. **Diabetologia**. v.53, p.1795-1806, 2010.

TABERNERO, A.; GANGOSO, E.; JARAÍZ-RODRÍGUEZ, M.; MEDINA, J.M. The role of connexin43-Src interaction in astrocytomas: A molecular puzzle. **Neuroscience**. v.323, p.183-194, 2016.

TAPIA-GONZALEZ, S.; GARCIA-SEGURA, LM.; TENA-SEMPERE, M.; FRAGO, L.M.; CASTELLANO, J.M.; FUENTE-MARTIN, E; GARCÍA-CÁCERES, C.; ARGENTE, J.; CHOWEN, J.A. Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. **Journal of Neuroendocrinology** v.23 (4), p.365-370, 2011.

TEO, J.D.; MORRIS, M.J.; JONES, N.M. Maternal obesity increases inflammation and exacerbates damage following neonatal hypoxic-ischaemic brain injury in rats. **Brain Behavior and Immunity**. v.63, p.186-196, 2016.

THALER, J.P.; YI, C.X.; SCHUR, E.A.; GUYENET, S.J.; HWANG, B.H. DIETRICH, M.O.; ZHAO, X.; SARRUF, D.A.; IZGUR, V.; MARAVILLA, K.R.; NGUYEN, H.T.; FISCHER, J.D.; MATSEN, M.E.; WISSE, B.E.; MORTON, G.J.; HORVATH, T.L.; BASKIN, D.G.; TSCHÖP, M.H.; SCHWARTZ, M.W. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**. v.122(1), p.153-62, 2012.

THEIS, M.; JAUCH, R.; ZHUO, L.; SPEIDEL, D.; WALLRAFF, A.; DÖRING, B.; FRISCH, C.; SÖHL, G.; TEUBNER, B.; EUWENS, C.; HUSTON, J.; STEINHÄUSER, C.; MESSING, A.; HEINEMANN, U.; WILLECKE, K. Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. **Journal of Neuroscience**. v.23(3), p.766-776, 2003.

THERRIEN, M.; DROUIN, J. Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. **Molecular and Cellular Biology**. v.11, p.3492–3503, 1991.

TIGANIS, T.; BENNETT, A.M. Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. **Biochemical Journal**. v.402, p.1–15, 2007.

TSAOUSIDOU, E.; PAEGER, L.; BELGARDT, B.F.; PAL, M.; WUNDERLICH, C.M.; BRONNEKE, H.; COLLIENNE, U.; HAMPEL, B.; WUNDERLICH, F.T.; SCHMIDT- SUPPRIAN, M.; KLOPPENBURG, P.; BRUNING, J.C. Distinct roles for

JNK and IKK activation in agouti-related peptide neurons in the development of obesity and insulin resistance. **Cell Reports**. v.9, p.1495-1506, 2014.

TSOU, R.C.; BENCE, K.K. Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. **Frontiers Neuroscience**, v.6,p.192, 2012.

TSUKUMO, D.M.; CARVALHO-FILHO, M.A.; CARVALHEIRA, J.B.; PRADA, P.O.; HIRABARA, S.M.; SCHENKA, A.A.; ARAUJO, E.P.; VASSALLO, J.; CURI, R.; VELLOSO, L.A.; SAAD, M.J. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**. v.56, p.1986-1998, 2007.

TUPS, A. Physiological models of leptin resistance. **Journal of Neuroendocrinology**, v.21, p.961-971, 2009.

UNICEF-WHO-The World Bank. Joint child malnutrition estimates, 2014.

VALDEARCOS, M.; ROBBLEE, M.M.; BENJAMIN, D.I.; NOMURA, D.K.; XU, A.W.; KOLIWAD, S.K. Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. **Cell Reports**. v.9(6), p. 2124-2138, 2014.

VAN SWIETEN, M.M.; PANDIT, R.; ADAN, R.A.; VAN DER PLASSE, G. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. **Journal Chemical Neuroanatomy**. v.61-62, p.207-20, 2014.

VAN VLIET, C.; BUKCZYNSKA, P.E.; PURYER, M.A.; SADEK, C.M.; SHIELDS, B.J.; TREMBLAY, M.L.; TIGANIS, T. Selective regulation of tumor necrosis factor-induced Erk signaling by Src family kinases and the T cell protein tyrosine phosphatase. **Nature Immunology**. v.6(3), p.253-260, 2005.

VENDAÑO, B.C.; MONTERO, T.D.; CHÁVEZ, C.E.; VON BERNHARDI, R., ORELLANA, J.A. Prenatal exposure to inflammatory conditions increases Cx43 and Panx1 unopposed channel opening and activation of astrocytes in the offspring effect on neuronal survival. **Glia**. 2015.

VERSELIS, V.K.; SRINIVAS, M. Connexin channel modulators and their mechanisms of action. **Neuropharmacology**. v.75, p.517-524, 2013.

VIANA, L.C.; LIMA, C.M.; OLIVEIRA, M.A.; BORGES, R.P.; CARDOSO, T.T.; ALMEIDA, I.N.; DINIZ, D.G.; BENTO-TORRES, J.; PEREIRA, A.; BATISTA-DE-OLIVEIRA, M.; LOPES, A.A.; SILVA, R.F.; ABADIE-GUEDES, R.; AMÂNCIO DOS SANTOS, A.; LIMA, D.S.; VASCONCELOS, P.F.; CUNNINGHAM, C.; GUEDES, R.C.; PICANÇO-DINIZ, C.W. Litter size, age-related memory impairments, and microglial changes in rat dentate gyrus: stereological analysis and three dimensional morphometry. **Neuroscience**. v.238, p.280-296, 2013.

VICKERS, M.H.; BREIER, B.H.; CUTFIELD, W.S.; HOFMAN, P.L.; GLUCKMAN, P.D. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American journal of physiology - Endocrinology and metabolism**. v.279, p. 83–87, 2000.

WALKER, F.R.; BEYNON, S.B.; JONES, K.A.; ZHAO, Z.; KONGSUI, R.; CAIRNS, M.; NILSSON, M. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. **Brain Behavior Immunity**. v.37, p.1-14, 2014.

WALLENIOUS, K.; WALLENIOUS, V.; SUNTER, D.; DICKSON, S.L.; JANSSEN, J.O. Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.293, p.560–565, 2002a.

WALLENIOUS, V.; WALLENIOUS, K.; AHRÉN, B.; RUDLING, M.; CARLSTEN, H.; DICKSON, S.L.; OHLSSON, C.; JANSSEN, J.O. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature Medicine*. v.8, p.75-79, 2002b.

WALLRAFF, A.; KOHLING, R.; HEINEMANN, U.; THEIS, M.; WILLECKE, K.; STEINHÄUSER, C. The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. **Journal of Neuroscience**. v.26, p.5438-5447, 2006.

WANG, Y.; HSUCHOU, H.; HE, Y.; KASTIN, A.J.; PAN, W. Role of Astrocytes in Leptin Signaling. **Journal of Molecular Neuroscience**. v.56(4), p.829-39, 2015.

WEISSMANN, L.; QUARESMA, P.G.; SANTOS, A.C.; DE MATOS, A.H.; PASCOAL, V.D.; ZANOTTO, T.M.; CASTRO, G.; GUADAGNINI, D.; DA SILVA, J.M.; VELLOSO, L.A.; BITTENCOURT, J.C.; LOPES-CENDES, I.; SAAD, M.J.; PRADA, P.O. IKKepsilon is key to induction of insulin resistance in the hypothalamus, and its inhibition reverses obesity. **Diabetes**. v.63, p.3334-3345, 2014.

WIENCKEN-BARGER, A.E.; DJUKIC, B.; CASPER, K.B.; MCCARTHY, K.D. A role for Connexin43 during neurodevelopment. **Glia**. v.55(7), p.675-686, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases. Attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility. 2014.

XU, A.W.; KAEHLIN, C.B.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SCHWARTZ, M.W.; BARSH, G.S. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. **Journal Clinical Investigation**. v.115, p.951-958, 2005.

YAMADA, J.; JINNO, S. Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. **Journal Comparative Neurology**. v.521, p.1184-1201, 2013.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUGIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science**. v.301(5633), p.640-643, 2003.

YAMAMOTO, T.; SEKINE, Y.; KASHIMA, K.; KUBOTA, A.; SATO, N.; AOKI, N.; MATSUDA, T. The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.297(4), p.8117, 2002.

YANG, G.; LIM, C.Y.; LI, C.; XIAO, X.; RADDA, G.K.; LI, C.; CAO X & HAN, W. FOXO1 inhibits leptin regulation of POMC promoter activity by blocking STAT3 interaction with specific protein 1. **Journal of Biological Chemistry**. v.284, p.3719-3727, 2009.

YANG, L.; QI, Y.; YANG, Y. Astrocytes control food intake by inhibiting AGRP neuron activity via adenosine A1 receptors. **Cell**, v.11(5), p.798-807, 2015.

YANG, Q.Y.; LIANG, J.F.; ROGERS, C.J.; ZHAO, J.X.; ZHU, M.J.; DU, M. Maternal obesity induces epigenetic modifications to facilitate *Zfp423* expression and enhance adipogenic differentiation in fetal mice. **Diabetes**, v.62, p.3727-3735, 2013.

YI, C.X.; HABEGGER, K.M.; CHOWEN, J.A.; STERN, J.; TSCHÖP, M.H. A role for astrocytes in the central control of metabolism. **Neuroendocrinology**. v.93, p.143-149, 2011.

YOU-TEN, K.E.; MUISE, E.S.; ITIÉ, A.; MICHALISZYN, E.; WAGNER, J.; JOTHY, S.; LAPP, W.S.; TREMBLAY, M.L. Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. **Journal of Experimental Medicine**. v.186(5), p.683-693, 1997.

ZABOLOTNY, J.M.; BENCE-HANULEC, K.K.; STRICKER-KRONGRAD, A.; HAJ, F.; WANG, Y.; MINOKOSHI, Y.; KIM, Y.B.; ELMQUIST, J.K.; TARTAGLIA, L.A.; KAHN, B.B.; NEEL, B.G. PTP1B regulates leptin signal transduction in vivo. **Developmental Cell**. v.2, p.489-495, 2002.

ZABOLOTNY, J.M.; KIM, Y.B.; WELSH, L.A.; KERSHAW, E.E.; NEEL, B.G.; KAHN, B.B. Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. **Journal of Biological Chemistry**.v.283(21), p.14230-14241, 2008.

ZHANG, G.; LI, J.; PURKAYASTHA, S.; TANG, Y.; ZHANG, H.; YIN, Y.; LI, B.; LIU, G.; CAI, D. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. **Nature**. v.497(7448), p.211-216, 2013.

ZHANG, P.; GUO, Z.; WU, Y.; HU, R.; DU, J.; HE, X.; JIAO, X.; ZHU, X. Histone Deacetylase Inhibitors Inhibit the Proliferation of Gallbladder Carcinoma Cells by Suppressing AKT/mTOR Signaling. **PLoS One**. v.10(8), p.e0136193, 2015.

ZHANG, X.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; KARIN, M.; BAI, H.; CAI, D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**. v.135(1), p.61-73, 2008.

ZHANG, X-Y.; ZHANG, Q.; WANG, D-H. Litter size variation in hypothalamic gene expression determines adult metabolic phenotype in brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). **PLoS ONE**, v.6, p.19913, 2011.

ZHOU, J.Z.; JIANG, J.X. Gap junction and hemichannel independent actions of connexins on cell and tissue functions an update. **FEBS Letters**, v.588, p.1186–1192, 2014.

ZIKO, I.; DE LUCA, S.; DINAN, T.; BARWOOD, J.M.; SOMINSKY, L.; CAI, G.; KENNY, R.; STOKES, L.; JENKINS, T.A.; SPENCER, S.J. Neonatal overfeeding

alters hypothalamic microglial profiles and central responses to immune challenge long-term. **Brain Behavior Immune**, v.41, p.32-43, 2014.

ZINCHUK, V.; GROSSENBACHER-ZINCHUK, O. Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44 (3), p. 125-172, 2009.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

NEONATAL NUTRITIONAL PROGRAMMING AND HYPOTHALAMIC GLIAL CELL MORPHOLOGY: THE ROLE OF LEPTIN IN THE MODULATION OF TCPTP AND CONEXINS.

Kniess-Debarba L¹; Marangon PB¹; Vechiato FMV¹; Silva HVP¹; Borges, BC¹; Venancio JC¹; Almeida-Pereira G¹; Jamur MC²; Antunes-Rodrigues J¹; Elias, LLK¹.

Department of Physiology¹, Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents², Ribeirao Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Correspondence:

Lucila Leico Kagohara Elias
3900 Avenida Bandeitantes
Ribeirao Preto Medical School
University of Sao Paulo
14049-900
Ribeirao Preto – SP
Brazil

Abstract

Nutritional changes in the neonatal period promotes to impairment in the energy balance of the individual in later stages of development. Astrocytes provide energetic substrate for the neurons through connexin 30 (CX30) and 43 (CX43). CX30, in turn, exerts a role in the astrocyte morphological maintenance. The T-cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) a counter-regulatory of leptin signaling and modulate action on CX43. We used the model of neonatal nutritional programming by litter size change in Wistar rats, offspring / dam: 3 - small litter - SL, 10 - normal litter -NL and 16 - large litter - LL. The SL animals showed a higher body weight until the 60° day (PN60). However, LL animals had a reduced weight gain at weaning, reaching the body weight gain of NL animals in PN35, this was associated with the hyperphagic behavior. In PN21, was observed an increase in plasma concentrations of leptin and insulin, in the mRNA expression of *Ptpn2* (gene encoding TCPTP), TCPTP protein, GFAP and IBA-1 immunoreactivity (IR) and the overlap of TCPTP with GFAP, in the arcuate nucleus (ARC) in the SL group and in the PN60 both the groups, SL and LL. In PN21 was observed an increase in the IR of CX43 in the SL group and in PN60 was observed a reduction of CX30 IR in both groups, SL and LL. In PN21, mRNA expression of the *Il1b* increase in the ARC in both SL and LL groups, however, in PN60, only the LL group showed these increase. In the PN60 both SL and LL groups showed an increase in mRNA expression of the *Tnf* in the ARC. In PN21 was observed an increase in the soma IR and process extension of the microglia and astrocyte in the SL group. In the PN60, both groups showed an increase in soma IR and processes extension of astrocyte, however, the only SL group showed an increase in the soma IR of the microglia. We observed that the leptin [5000ng / ml] and LPS [500ng / ml] promotes increase in mRNA expression of the *Ptpn2* in the primary culture of hypothalamic astrocytes, as well as, the IR of TCPTP, CX43, the astrocyte area and reduction of the IR of CX30. The silencing of *Ptpn2* (siRNA *Ptpn2*) was able to reverse all these results promoted by LPS and leptin. The stimulation with LPS increased the mRNA expression of the *Il6*, *Il1b*, *Tnf* and *Ptpn1*. The siRNA *Ptpn2* was able to intensify these results, demonstrating that *Ptpn2* is a counter regulatory action on the expression of these cytokines and the *Ptpn1*. The data demonstrates that the neonatal nutritional alteration is able to promote alteration in the energy balance in the juvenile and adult life, associated with morphological changes in glial cells and the increase of proinflammatory cytokines. We also demonstrate that leptin alters the astrocyte morphology by modulation of TCPTP in the CX30.

Key-words: nutritional programming, hypothalamus, glia, leptin, TCPTP, CX30, CX43.

Introduction

According to the World Health Organization, the prevalence of overweight and obesity is increasing worldwide affecting 39% and 13% of adults aged 18 years or older, respectively (WHO, 2014), and 6.3% of overweight and obesity in children aged under 5 years (UNICEF-WHO-WB, 2014; WHO, 2014). Nutritional alterations and other adverse events during pre-conception, peri-conception and in neonatal period can induce diseases in adult life (De Boo and Harding, 2006). Evidence suggests that overweight, increased blood pressure and changes in glucose metabolism may be related to exposure to events during early life, a process named programming (Harding, 2001). Therefore, nutritional changes imposed during critical neonatal window may affect the development of the brain and program for long-lasting metabolic alterations. Undernutrition and overnutrition during neonatal life can be induced, respectively, by a large or small litter size during lactation (Remmers et al., 2008; Zhang et al., 2011; Glavas et al., 2010; Liu et al., 2013). Offspring raised in large litter shows reduced body weight gain during lactation with a growth catch up and hyperphagia after weaning (Remmers et al., 2008). On the other hand, offspring raised in small litter was shown to have increased susceptibility to obesity and central leptin resistance in the hypothalamus (Rodrigues 2011; Zhang et al., 2011; Glavas et al., 2010; Liu et al., 2013).

The hypothalamus orchestrates the control of energy homeostasis and it is a target of nutritional programming (Vogt et al., 2014; Dearden and Ozzane, 2015). The hypothalamus in rodents is immature at birth and its development continues during the first three weeks of postnatal life (Grove et al., 2005). The neurodevelopment arise from multipotent neural stem cells that differentiate into neurons and non-neuronal cells, like astrocytes and oligodendrocytes (Grandbarbe et al., 2003; Miller and Gauthier, 2007). The function of non-neuronal cells upon neurogenesis, synaptogenesis and neuronal function not only during brain development but also in adults has been well recognized (Li et al., 2012; Haydon and Carmignoto, 2006; Miller and Spencer et al., 2014). The obesity-related neurodegeneration has been attributed to excessive production of IKK β /NF- κ B-dependent cytokines such as TNF- α and IL-1 β from microglial cells (Li et al., 2012). Indeed, microglia-specific IKK β ablation showed that breaking the inflammatory crosstalk between microglia and neural stem cells can promote hypothalamic neural stem cell survival and neurogenesis (Li et al., 2012). Recently,

IKK β /NF- κ B signaling in astrocytes cells was shown to be required for the astrogliosis and hypothalamic inflammation induced by HFD (Douglass et al., 2017).

Several reports have been demonstrated that glial cells are involved in the development of leptin and insulin resistance in the hypothalamus (Jayaram et al., 2013; Djogo et al. 2016; Douglass et al., 2017). Leptin receptor (LepR) is expressed in hypothalamic astrocytes and its conditional deletion in these cells alters astroglial morphology and synaptic inputs to hypothalamic neurons involved in the feeding control (Kim et al., 2014). Leptin enhances the proliferation of astrocytes in the postnatal hypothalamus as shown by the decrease of astrogenesis in mice with conditional deletion of LepR in GFAP-expressing cells during early postnatal period (Rottkamp et al., 2015).

Leptin signaling in obesity is attenuated by upregulation of counter regulatory proteins, including PTP1B (Banno et al., 2010; Loh et al., 2011), TCPTP (Loh et al., 2011) and SOCS3 (Howard et al., 2004; Loh et al., 2011) in the hypothalamus, which contributes to the development of leptin resistance. The PTP1B (Song et al., 2016b) and TCPTP (Song et al., 2016a) can be induced by inflammation, for e.g. LPS.

Besides its action on leptin and insulin signaling, TCPTP is also shown to regulate intracellular vesicular traffic (Muppirala et al., 2013), inflammatory response (You-Ten et al., 1997; Myers et al., 2001, Simoncic et al., 2002; Van Vliet et al., 2005) by control of JAK1, JAK3 (Myers et al., 2001, Simoncic et al., 2002) and TRAF2 and Src tyrosine kinase (Van Vliet et al., 2005). TCPTP also modulate leptin signaling by dephosphorylation of p-STAT3 in the cytoplasm and also in the nucleus (Loh et al., 2011). In vitro studies have shown that the TCPTP is able to dephosphorylate Connexin 43 (CX43) and increase its expression in the renal cell membrane (Li et al., 2014). Connexins 43 and 30 among glial cells play a critical role in cellular communication (Abudara et al., 2014; De Bock et al., 2014; Allard et al., 2013a,b) and astroglial morphology (Pannasch et al., 2014).

The present study aimed to investigate the effect of neonatal nutritional changes, known to affect energy homeostasis in adult life, on glial cells in the hypothalamus. To attain this purpose, overnutrition and undernutrition were induced by litter size variation during lactation to assess the changes in glial cell morphology and the role of leptin in this process. We also used in vitro study and found that leptin induces changes in the astrocyte morphology and these effects appear to be mediated by TCPTP and CX30 gap junction protein.

MATERIAL AND METHODS

Neonatal nutritional programming in rats

One day old male Wistar rats and their dams were obtained from Central Animal Facility of the University of São Paulo, Ribeirao Preto Campus, and divided as described below. The rats were maintained under controlled temperature (23 ± 1 °C) with at 12h:12h light/dark cycle, (light on at 6:00-18:00) and water and food *ad libitum*. All experiments were approved by Ethics Committee for Animal Use of the Ribeirao Preto Medical School (N. 53/2013 and 58/2016).

Three days after birth, pups were divided according to the litter size: 3 pups (small litter- SL), 10 pups (normal litter - NL) or 16 pups (large litter - LL). At PN21 (post natal day 21), the pups were weaned and after wards they were maintained in cages with 5 animals from the same experimental group. Body weight of the litter was determined at weaning and thereafter individual body weight was obtained every 5 days until PN60. Between PN50 and PN60 rats were placed in individual cages and the daily food intake was determined. At PN21 and PN60, one set of rats was euthanized by decapitation for plasma sample and brain collection in RNase free conditions and another set of rats was anesthetized and perfused for brain collection.

Primary culture of hypothalamic astrocytes

The primary culture of astrocytes was performed based on the protocol reported by McCarthy and Vellis (1980). After collection of medial basal hypothalamus (MBH) from 1-day neonatal Wistar rats, preceded by removal of the meninges, in dissecting HBSS modified medium [without calcium and magnesium, Gibco 14190144], The MBHs were transferred to a tube and proceeded according to the manufacturer (Miltenyi Biotech). The supernatant was discarded and the pellet was resuspended in 1 to 2 ml of Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) enriched with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin [10,000 IU/ml]-streptomycin [10,000 µg/ml] (PS, Mediatech). After the homogenization, the cells were grown in P75 bottles (75 cm²), containing 10 mL of medium [DMEM; 10% FBS; 1% PS] in a 5% CO₂ incubator (Galaxy 170R, Eppendorf) at 37°C. After 1 hour, the cells in suspension were reattached in a new P75 bottle. This procedure was performed twice to avoid fibroblasts (that adhere in the cell culture flask) in the astrocyte cell culture (Couchman et al.,

1983). After the seeding procedures were completed, the cells were maintained in culture for a period of 8-10 days, with partial replacement of the incubation medium (70%) every 48-72 hours. At 80% confluence, the cells were incubated in a shaker at 200 rpm for 2 h at 37° C in order to separate the oligodendrocytes, microglia and neurons from the astrocyte cell culture. The cells in suspension were discarded and the adhered cells were washed with 1mL of PBS without calcium or magnesium. Then, 5mL of trypsin was added and the cells were maintained for 15 minutes in the incubator (5% CO₂ at 37 ° C). After this step, the same amount of complete medium was added to stop the trypsin action and the cells were centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes at room temperature. Cells were then cultured in 24-well or 96-well plates, with or without coverslip, pre-treated with cell-tak, depending on the experimental protocol. The experiments were performed at 80% of cell confluence, usually 2 days after the splitting. All experiments were performed at least 3 times.

Silencing of *Ptpn2* and leptin stimulation of hypothalamic astrocytes

Hypothalamic astrocytes cells cultured in 24-well plates as described above were stimulated for 24 hours with leptin (0, 100, 1000, 5000 ng/mL). The lipopolysaccharide (LPS) is known to stimulate astrocytes (Song et al., 2016a), thus treatment with LPS (500 ng/mL) was used as a positive control. Immunofluorescent labeling for GFAP, TCPTP and DAPI and expression of *Ptpn1*, *Ptpn2*, *Il6*, *Il1b* and *Tnf* mRNA by real-time PCR were determined after leptin or LPS treatment.

To assess the role of TCPTP in leptin effects on hypothalamic astrocytes, knockdown of *Ptpn2* induced by siRNA was carried on before the treatment of the cells with leptin. Primary culture of hypothalamic astrocytes, prepared as above, was incubated with complete medium without antibiotic (40,000 cells / well, 24-well plate). After two days, the cells were transfected with 25nM of each *Ptpn2* siRNA (Thermofisher, 4390771-s138533; s138532; s138531) with 0.25% DharmaFECT (GE Healthcare) and DMEN without antibiotic in a final volume of 500µL for immunofluorescent labeling or 1000µL for real time PCR. Negative (Silencer® Select Negative Control No. 1 siRNA) and positive (GAPDH Positive Control siRNA) transfection controls were used following the provider instructions. After 24 hours of transfection, the cells were stimulated with leptin (5000ng/mL) or LPS (500ng/mL) for further 24 hours. At the end of incubation, the cells were used as described above for immunofluorescence and gene expression analysis.

Hormone measurement

Blood samples collected at PN21 and PN60 were centrifuged and the plasma was stored in a freezer at -20°C until the assay. Plasma leptin and insulin concentrations were determined in duplicate by commercial Elisa kit (Edm Millipore Corporation EZRL-83K and EZRMI-13K, respectively).

Western blotting

The hypothalamic fragments were dissected out (thickness: 2.7 mm) from an area 1.0 mm lateral to the midline at the anterior border of the optic chiasm and the anterior border of the mammillary bodies. Total hypothalamic protein was extracted using specific solution (100mM Tri-HCl [pH 7.4], 1% Triton-X 100, 2mM EDTA, 1% halt protease and phosphatase inhibitor Single-Use Cocktail, EDTA-Free [Thermo Scientific, 78443], pH 7.2) and centrifuged at 4°C and 15,000g for 50 min. Aliquots of the lysates containing 30µg of protein were denatured in Laemmli sample buffer, pH6.8 (4% SDS, 20% glycerol, 0.02% bromophenol blue, Tris·1M [pH 6.8], and DTT 0,1M) at 95°C for 5 min. The samples were blotted onto nitrocellulose membranes. Nonspecific binding was prevented by immersing the membranes in blocking buffer (5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline-Tween [TBS-T]) for 1 h at room temperature. The membranes were then exposed overnight to the primary antibody rabbit anti-TCPTP [1:3000] (AB180714-Abcam). The blots were rinsed in TBS-T and then incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit-IgG antibody [1:10000] (Cell Signaling, CST7074) for 1 h at room temperature. Antibody-antigen complexes were visualized by detecting enhanced chemiluminescence using an ECL detection system (Amersham Biosciences) and digital images with *Quantity One* 4.5.0 software (Bio-Rad).

Microdissection, total RNA isolation, and quantitative real-time PCR.

Using a stainless-steel punch needle of 1.5mm in diameter, microdissections (1500µm) were obtained in a cryostat according to the coordinates from the Paxinos and Watson atlas: ARC, -2.3 to -3.5 mm from bregma. Tissue samples were transferred to a microtube with RNA later reagent (Ambion) and stored at -80°C for a maximum of 24 h until RNA isolation. Total RNA of tissue and primary culture cell was isolated from each sample using Trizol reagent (Invitrogen), and 500ng of RNA was used for cDNA

synthesis, using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Quantitative real-time PCR was performed using Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. The following TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) were used in this study: Rn01423685_m1 (*Ptpn1* – PTP1B), Rn00588846_m1 (*Ptpn2* - TCPTP), Rn00584528_m1- (*Gjb6* - CX30), Rn01433957_m1 – (*Gjal* - CX43), Rn01410330_m1 (*Il6*), Rn00580432_m1 (*Il1b*), Rn99999017_m1- (*Tnf*) and 4352340E (*Actb* - β -actin). Each PCR reaction was performed in triplicate. Water instead of cDNA was used as a negative control and housekeeping genes (β -actin) were run for each cDNA sample. Determination of gene transcript in each sample was obtained by the $\Delta\Delta CT$ method. For each sample, the threshold cycle (CT) was measured and normalized to the average of the housekeeping genes ($\Delta CT = CT_{\text{unknown}} - CT_{\text{housekeeping genes}}$). The fold change of mRNA in the unknown sample relative to the control group was determined by $2^{-\Delta\Delta CT}$, where $\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{Unknown}} - \Delta CT_{\text{control}}$. Data are shown as a relative mRNA expression to the calibrator control group NL for litter size data, without treatment in primary culture or respective scrambled transfection group for siRNA protocols.

Perfusion and immunofluorescence

The animals were anesthetized with 2.5% tribromoethanol (1mL/100g body wt ip), and perfused through the heart with 150ml of 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) followed by 350ml of 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Brains were collected and post fixed in the same fixative for 1 h and then, placed in PBS containing 30% sucrose and stored at -20° C.

Brain coronal sections were cut according to the the coordinates from Paxinos and Watson atlas, ARC, -1.80 to 2.04 mm from the bregma with a 30 μ m thickness and preserved in cryoprotectant at 20°C. One in every three sections was used for the immunofluorescence staining. Sections were washed with 1X Tris buffer and incubated for 48 hours at 4°C with the primary antibody, rabbit anti-TCPTP [1: 500] (AB180714); rabbit anti-connexin30 [1:500] (Life Technologies, 712200); anti-conexin43 [1:500] (Pharmingen-610062; goat anti-IBA-1 [1:1000] (AB5076); mouse anti-GFAP [1: 400] (Sigma,G3893) or rabbit anti-GFAP [1:400] (Sigma-G9269). To react properly with these antibodies, the following secondary antibodies were used: alexa fluor 488 donkey anti rabbit (A21206), alexa fluor 488 donkey anti-goat (A11055), from Molecular

Probes; alexa fluor 594 donkey anti mouse (715587003), alexa fluor 594 donkey anti-rabbit (711585152), alexa fluor 647 donkey anti-mouse (715605151), biotinylated donkey anti-goat (705065147) from Jackson ImmunoResearch and [streptavidin, Alexa fluorine 350-Tyramide, buffer with H₂O₂ (T20935)] from Life Technologies.

For the immunostaining of cells from the primary culture, 200µl of blocking solution (0.1 M PBS, 5% NHS, 0.3% triton or 0.01% sapopin for CX30 labeling) was added to the wells and incubated for 1 hour at room temperature. Following primary antibodies were used: rabbit anti TCPTP [1: 500] (Abcam-AB180714); mouse anti GFAP [1: 400]; rabbit anti-connexin 30 [1: 200] (Life Technologies 712200); mouse anti-connexin 43 [1: 250] (Pharmingen-610062); rabbit anti-GFAP [1:400] (Sigma-G9269); goat anti-IBA-1 [1: 1000] antibody (Abcam-AB5076) or anti-NeuN mouse [1: 500] (Milipore, MAB377). To react properly with these antibodies, the following secondary antibodies were used: alexa fluor 488 donkey anti-rabbit (711547003), alexa fluor 488 donkey anti-mouse (715545151), alexa fluor 594 donkey anti-mouse (715585150), alexa fluor 594 donkey anti-rabbit (711585152), alexa fluor 647 donkey anti-mouse (715605151), from Jackson ImmunoResearch and alexa fluor 488 donkey anti-goat (A11055) from Molecular Probes. After incubation with the secondary antibody, cells were incubated with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) a nuclear marker [15 mM], for 2 minutes

Image processing

The images of the immunofluorescence were taken using a multiphoton laser-scanning microscope (LSM 780 – AxioObserver - ZEISS) equipped with a 63X objective for hypothalamic tissue and 40x for astrocyte primary culture. Stacks of consecutive images taken at 0.4 µm intervals were sequentially acquired and Z projections were reconstructed using Fiji-ImageJ. The measurement of immunoreactivity of the soma and process extension was analyzed using Fiji-ImageJ software, (Plugin – Sample Neurite Tracer) (Pool et al., 2007; Longair et al., 2011). The colocalization of TCPTP, CX30, CX43 and GFAP or IBA-1, was examined in a series of 35 individual optical planes of the ARC by calculating Manders colocalization coefficients (Manders et al., 1993) using NIH ImageJ software (version 2.0). This coefficient has been widely used in microscopic analyses, and it provides an objective metric parameter for most biological colocalization studies (Dunn et al., 2011). The

Manders coefficient for TCPTP, CX30, CX30/GFAP and TCPTP, CX30, CX43 /IBA-1 colocalization represents the fraction of pixels in the green channel (TCPTP, CX30, CX43) that overlaps with pixels in the blue channel (IBA-1) or red channel (GFAP). Moreover, the Manders coefficient for TCPTP, CX30, CX43/ IBA-1 and TCPTP, CX30, CX43/ GFAP colocalization represents the fraction of pixels that overlaps in the blue and red channels. The Manders coefficient ranges from 0 to 1, and it is independent of the pixel intensity in the individual channels (Zinchuk and Grossenbacher-Zinchuk, 2009). A constant area at similar hypothalamic levels was used to calculate the Manders colocalization coefficients, M1 and M2, for channels 1 and 2, respectively. The Manders M1 coefficient represents the fraction of green fluorescence (TCPTP, CX30, CX43) that overlaps spatially with the immunostaining of IBA-1 or GFAP, representing TCPTP, CX30, CX43/IBA-1 or TCPTP, CX30, CX43/GFAP. The Manders M2 coefficient is the fraction of IBA-1 or GFAP immunostaining, in blue or red, respectively, that overlaps spatially with the green fluorescence (TCPTP, CX30, CX43), and it represents IBA-1/TCPTP, GFAP, IBA-1 or GFAP/ TCPTP, GFAP, IBA-1.

Statistical analysis

The results are expressed as mean $\pm$ standard error and were analyzed using the Statistica software (version 10). Analysis of variance (ANOVA) with repeated measurements was used to analyze body weight and food intake and the other parameters were analyzed by one-way ANOVA. The two-way ANOVA followed by Newman-Keuls post hoc test was used for the astrocytic primary culture experiments with silencing and subsequent stimulation for astrocyte area analysis and immunoreactivity. Mann Whitney test was used to analyze the data from real time PCR in the siRNA *Ptpn2* protocols. Estimates of effect size are reported as partial eta squared (η_p^2). The level of significance (α) was set at 5%.

Results

In vivo protocols

Effects of litter size on body weight gain and food intake.

We observed an effect of litter size ($F_{2,29} = 35.82, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.71$) and age ($F_{4,116} = 907.58, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.97$) on the body weight gain during lactation. We also observed an interaction between litter size and age ($F_{8,116} = 51.29, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.78$). Between PN14 and PN21, the SL group showed an increase and LL group showed a decrease ($p < 0.01$; Fig. 1A) of body weight gain, compared with NL group. After weaning, there was also an effect of litter size ($F_{2,53} = 95.03, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.78$) and age ($F_{8,424} = 1501.93, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.96$). We also observed an interaction between litter size and age ($F_{16,428} = 4.92, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.16$). The SL group showed an increase (Fig. 1B; $p < 0.01$) of body weight gain, between PN21 to PN60, compared with the NL group. However, between PN21 and PN30, the LL group showed a decrease ($p < 0.01$) of body weight gain (Fig. 1B), after this period, this group showed similar body weight gain compared with the NL group. There was an effect of litter size ($F_{2,61} = 188.56, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.86$) and age ($F_{10,610} = 3.44, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.05$) on food intake. The LL group showed an increase ($p < 0.01$) in the food intake, compared with NL group (Fig. 1C).

Effects of litter size on leptin and insulin plasma concentration

There was an effect of litter size, at PN21, on plasma leptin ($F_{2,17} = 18.54, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.68$) and insulin ($F_{2,17} = 10.72, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.56$) concentrations. The SL group showed an increase ($p < 0.01$) in plasma leptin (Fig. 1D) and insulin (Fig. 1E) concentrations, compared with NL and LL group. On the other hand, the LL group had a decrease ($p < 0.01$) in plasma leptin concentration, compared with NL group. At PN60, we observed an effect of litter size on plasma leptin ($F_{2,17} = 5.34, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.38$) and insulin ($F_{2,16} = 11.62, p < 0.01, \eta_p^2 = 0.59$) concentrations. There was an increase in plasma leptin ($p < 0.05$) and insulin ($p < 0.01$) concentrations in both SL and LL groups, compared with NL group.

Effects of litter size on proinflammatory cytokines gene expression in the ARC.

The litter size did not affect the mRNA expression of *Il6* in the ARC at PN21 and PN60 (Fig. 1F). We observed an effect of litter size on mRNA expression of *Il1b* at PN21 ($F_{2,24} = 4.95$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.29$) and at PN60 ($F_{2,21} = 6.24$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.37$). At PN21, both the groups, SL and LL, showed an increase of *Il1b* mRNA expression ($p < 0.05$), compared with NL group. Nonetheless, at PN60 only the LL group showed an increase of *Il1b* mRNA expression, compared with NL group. At PN21, the mRNA expression of *Tnf* was not changed in the ARC. However, at PN60, there was an effect of litter size on mRNA expression of *Tnf* ($F_{2,21} = 4.39$, $p < 0.05$, $\eta_p^2 = 0.29$). Both the groups, SL and LL showed an increase ($p < 0.05$; Fig. 1H) of *Tnf* mRNA expression, compared with NL group.

Effects of litter size on PTPs gene expression in the ARC and TCPTP protein expression in the HMB.

We observed an effect of litter size on mRNA expression of *Ptpn2* in the ARC at PN21 ($F_{2,15} = 5.34$, $p < 0.05$, $\eta_p^2 = 0.41$) and PN60 ($F_{2,23} = 9.38$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.44$). On the other hand, the litter size did not affect the *Ptpn1* mRNA expression in the ARC at PN21 and PN60 (Fig. 1I). We also observed an effect of litter size on TCPTP protein expression at PN21 ($F_{2,17} = 3.72$, $p < 0.05$, $\eta_p^2 = 0.30$) and at PN60 ($F_{2,12} = 4.45$, $p < 0.05$, $\eta_p^2 = 0.43$). At PN21, SL group showed an increase in the mRNA expression of *Ptpn2* (Fig. 1J; $p < 0.01$,) and TCPTP ($p < 0.05$) protein expression, compared with NL group. On the other hand, at PN60, both the groups SL and LL showed an increase (Fig. 1K; $p < 0.05$) of *Ptpn2* mRNA expression and TCPTP protein expression, compared with the NL group.

Effects of neonatal nutrition programming on TCPTP, GFAP and IBA-1 immunoreactivity in the ARC of juvenile and adult rats.

We observed an effect of litter size on TCPTP immunoreactivity ($F_{2,27} = 53.30$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.79$; $F_{2,30} = 71.30$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.83$), GFAP immunoreactivity ($F_{2,27} = 19.19$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.59$; $F_{2,30} = 177.25$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.92$) and IBA-1 immunoreactivity ($F_{2,27} = 29.30$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.59$; $F_{2,30} = 18.97$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.56$) at PN21 and PN60, respectively. At PN21, the SL showed an increase ($p < 0.01$) in the TCPTP (Fig. 2A and B), GFAP (Fig. 2A and C) and IBA-1 (Fig. 2A and D) immunoreactivity, compared with the NL group. On the other hand, at PN21, LL group

had a decrease ($p < 0.05$) in IBA-1 immunoreactivity, when compared with the NL group. However, at PN60 both of groups, SL and LL, had an increase ($p < 0.01$) in TCPTP, GFAP and IBA-1 immunoreactivity. The Manders' coefficient varies from 0 to 1 and above of 0.6 represents an index of colocalization. We observed an effect of litter size on Manders' coefficient of TCPTP/GFAP immunolabeling overlap at PN21 ($F_{2,27} = 113.01$, $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.89$) and at PN60 ($F_{2,30} = 51.92$, $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.77$). The SL group showed an increase ($p < 0.01$) of Manders' coefficient of TCPTP/GFAP immunolabeling overlap compared with the NL group (SL: $0.94 \pm 0.02^*$; NL: 0.55 ± 0.02 ; LL 0.50 ± 0.03). On the other hand, at PN60, both the groups SL and LL showed an increase ($p < 0.01$) of Manders' coefficient of TCPTP/GFAP immunolabeling overlap compared with the NL group (SL: $0.98 \pm 0.01^*$; NL: 0.79 ± 0.02 ; LL: $0.98 \pm 0.01^*$). Additionally, the Manders' coefficient of TCPTP/IBA-1 did not show an immunolabeling overlap.

Effects of neonatal nutrition programming on CX30, GFAP and IBA-1 immunoreactivity and *Gja6* mRNA expression in the ARC of juvenile and adult rats.

We observed that at PN21 the litter size did not change the CX30 immunoreactivity (Fig. 3A and B), on the other hand, there was an effect of litter size on *Gja6* mRNA expression ($F_{2,21} = 6.11$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.37$). Both the groups, SL and LL had a decrease (Fig. 3C; $p < 0.01$) of *Gja6* mRNA expression compared with the NL group. Additionally, at PN60, there was an effect of litter size on *Gja6* mRNA expression ($F_{2,23} = 4.76$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.29$) and CX30 immunoreactivity ($F_{2,27} = 149.22$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.92$). Both the groups, SL and LL had a decrease of *Gja6* mRNA expression (Fig. 3C; $p < 0.01$) and CX30 immunoreactivity (Fig. 3A and B; $p < 0.05$), when compared with the NL group. Additionally, the SL showed a lower CX30 immunoreactivity ($p < 0.01$) compared with the LL group. Manders' coefficient of CX30/GFAP immunolabeling overlap at PN21 was similar among the three groups (SL: 0.90 ± 0.02 ; NL 0.86 ± 0.03 ; LL: 0.86 ± 0.02). However, there was an effect of litter size, at PN60, on Manders' coefficient of CX30/GFAP immunolabeling overlap ($F_{2,27} = 28.77$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.57$). The SL and LL groups showed a decrease ($p < 0.01$) of the Manders' coefficient of CX30/GFAP immunolabeling overlap compared with the NL group (SL: $0.64 \pm 0.02^*$; NL: 0.89 ± 0.03 ; LL: $0.68 \pm 0.02^*$). There was no difference of Manders' coefficient of

CX30/IBA-1 immunolabeling overlap at PN21 (SL: 0.79 ± 0.02 ; NL: 0.79 ± 0.03 ; LL: 0.74 ± 0.02) and PN60 (SL: 0.67 ± 0.01 ; NL: 0.64 ± 0.02 ; LL: 0.70 ± 0.05).

Effects of neonatal nutrition programming on CX43, GFAP and IBA-1 immunoreactivity and *Gjal* mRNA expression in the ARC of juvenile and adult rats.

There was an effect of litter size on *Gjal* mRNA expression ($F_{2,22} = 7.75$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.41$) and CX43 immunoreactivity ($F_{2,27} = 21.81$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.61$) at PN21. The SL group showed an increase of *Gjal* mRNA expression ($p < 0.05$; Fig. 4C) and CX43 immunoreactivity ($p < 0.01$; Fig. 4B). However, the litter size did not change the *Gjal* mRNA expression and the CX43 immunoreactivity at PN60. There was an effect of litter size, at PN21, on Manders' coefficient of CX43/GFAP an immunolabeling overlap ($F_{2,18} = 18.53$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.67$). The SL group showed an increase ($p < 0.01$) in the Manders' coefficient of CX43/GFAP immunolabeling overlap (SL: $0.93 \pm 0.01^*$; NL: 0.78 ± 0.22 ; LL: 0.74 ± 0.03). At PN60, there was no difference of Manders' coefficient of CX43/GFAP immunolabeling overlap. There was no difference also in the CX43/IBA-1 immunolabeling overlap at PN21 and PN60.

Effects of neonatal nutrition programming on glial cell morphology in the ARC of juvenile and adult rats.

There was an effect of litter size, at PN21, on astrocytes soma ($F_{2,27} = 44.22$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.76$) and process extension ($F_{2,24} = 4.85$, $p < 0.05$, $\eta_p^2 = 0.29$) in the ARC and also at PN60 ($F_{2,27} = 18.80$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.58$; $F_{2,27} = 15.87$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.54$, respectively). At PN21, the SL group showed an increase in astrocyte soma ($p < 0.01$; Fig. 5B) and process extension ($p < 0.05$; Fig. 5C) compared with the NL group. At PN60, both the groups, SL and LL showed an increase ($p < 0.01$) in astrocyte soma and process extension compared with the NL group. We also observed, at PN21, an effect of litter size on microglia soma ($F_{2,21} = 13.13$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.55$), and process extension ($F_{2,21} = 9.50$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.47$) in the ARC. On the other hand, at PN60, the litter size promoted an effect only on the microglia soma ($F_{2,29} = 13.18$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.48$). At PN21, the SL group showed an increase ($p < 0.01$; Fig. 5D) in microglia soma and process extension compared with the NL group. However, at PN60 the SL had an increase ($p < 0.01$; Fig. 5E) only in the microglia soma compared with the NL group.

***In vitro* protocols**

Effects of treatment with LEP and LPS in the hypothalamic astrocyte morphology, *Ptpn1* and *Ptpn2* mRNA expression and TCPTP immunoreactivity.

The treatment with LEP and LPS in the primary culture of hypothalamic astrocytes after 24 hours promoted an effect on *Ptpn1* mRNA expression ($F_{2,29} = 6.71$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.41$), *Ptpn2* ($F_{4,39} = 16.77$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.63$), TCPTP immunoreactivity ($F_{4,151} = 797.07$, $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.95$), and the astrocyte area ($F_{4,417} = 91.04$, $p < 0.01$, $\eta^2 = 0.71$). The LPS treatment [500ng/mL] increased ($p < 0.01$) the *Ptpn1* (Fig. 6B) and *Ptpn2* (Fig. 6C) mRNA expression and TCPTP immunoreactivity (Fig. 6D) compared with the control. The LEP [1000ng/mL] and [5000ng/mL] treatments also increased ($p < 0.01$) the *Ptpn2* mRNA expression and TCPTP immunoreactivity compared with the control. Remarkably, both LPS [500ng/mL] and LEP [5000ng/mL] and [1000ng/mL] treatment increased the astrocyte area ($p < 0.01$), compared with the control (Fig. 6A and E). Additionally, LPS [500ng/mL] increased ($p < 0.01$) it more than LEP [5000ng/mL], which, in turn, was also higher ($p < 0.01$) than LEP [1000ng/mL].

Effects of *Ptpn2* knockdown on the LEP- and LPS- induced changes in the *Ptpn1*, *Ptpn2* mRNA expression of hypothalamic astrocytes.

There was an effect of LEP and LPS treatment in the primary culture of hypothalamic astrocytes on *Ptpn1* ($F_{2,24} = 27.53$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.70$) and *Ptpn2* ($F_{2,25} = 26.26$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.68$) mRNA expression. Treatment with LPS increased ($p < 0.01$) the mRNA expression of *Ptpn1* (Fig. 7B) and *Ptpn2* (Fig. 7C), compared with the CTL group. The silencing of *Ptpn2* *per se* did not change the *Ptpn1* mRNA expression (Fig. 7D), however, as expected it reduced the ($p < 0.01$; Mann-Whitney) *Ptpn2* mRNA expression (Fig. 7G). Interestingly, *Ptpn2* silencing increased the *Ptpn1* mRNA expression after LEP and LPS stimulation, compared with the respective scrambled transfection group ($p < 0.01$; Mann-Whitney; Fig. 7E and F). Additionally, the silencing of *Ptpn2*, as expected it reduced the *Ptpn2* mRNA expression after LEP and LPS stimulation, compared with the respective scrambled transfection group ($p < 0.01$; Mann-Whitney; Fig. 7H).

Effects *Ptpn2* knockdown on the LEP- and LPS- induced changes in the TCPTP immunoreactivity of hypothalamic astrocytes.

There was an effect of LEP and LPS treatment ($F_{2,108} = 553.15$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.91$; $F_{2,90} = 101.37$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.69$, respectively) and the silencing of *Ptpn2* ($F_{1,108} = 528.45$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.94$; $F_{1,90} = 434.65$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.83$, respectively) on the TCPTP immunoreactivity and astrocyte area. We also observed an interaction between LEP and LPS treatment and the silencing of *Ptpn2* ($F_{2,108} = 528.45$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.91$; $F_{2,90} = 101.35$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.69$, respectively). The LEP treatment and LPS increased ($p < 0.01$) the TCPTP immunoreactivity (Fig. 7J) and astrocyte area (Fig. 7H), compared with the CTL group. Additionally, LPS treatment induced a higher ($p < 0.05$) TCPTP immunoreactivity and astrocyte area, compared with the LEP treatment. On the other hand, *Ptpn2* silencing decreased the TCPTP immunoreactivity in the control group and remarkably it prevented ($p < 0.01$) the effects of LEP and LPS on TCPTP immunoreactivity and astrocyte area.

Effects of *Ptpn2* knockdown on the LEP- and LPS- induced changes in the *Gja6* mRNA expression and CX30 immunoreactivity of hypothalamic astrocytes.

There was an effect of LEP and LPS treatment on *Gja6* mRNA expression ($F_{2,20} = 5.74$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.36$) and CX30 immunoreactivity ($F_{2,108} = 7.65$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.23$). There was also an effect of *Ptpn2* silencing ($F_{1,108} = 82.16$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.23$) on CX30 immunoreactivity. There was an interaction between the treatment and *Ptpn2* silencing on CX30 immunoreactivity ($F_{2,108} = 16.32$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.23$). The LEP treatment decreased ($p < 0.01$) CX30 immunoreactivity, compared with the control culture (Fig 8F). The LPS treatment decreased ($p < 0.01$) *Gja6* mRNA expression (Fig. 8A) and CX30 immunoreactivity, compared with control. Additionally, the LPS treatment showed a lower ($p < 0.01$) CX30 immunoreactivity, compared with the LEP treatment. The *Ptpn2* silencing increased ($p < 0.01$) the CX30 immunoreactivity after LEP and LPS treatment, compared with its respective scrambled control (Fig. 8F). The *Ptpn2* silencing also increased ($p < 0.01$; Mann-Whitney; Fig. 9C) the *Gja6* mRNA expression after LPS, but not LEP treatment.

Effects of *Ptpn2* knockdown on the LEP- and LPS- induced changes in the *Gjal* mRNA expression and CX43 immunoreactivity of hypothalamic astrocytes.

There was an effect of LEP and LPS treatment on *Gjal* mRNA expression ($F_{2,25} = 16.01$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.56$). Additionally, there was an effect of LEP and LPS treatment

($F_{2,186} = 29.50$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.24$) and the silencing of *Ptpn2* ($F_{1,186} = 45.08$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.19$) on CX43 immunoreactivity. There was an interaction between treatment and *Ptpn2* silencing ($F_{2,186} = 12.18$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.11$). The LEP treatment increased (Fig 9F; $p < 0.01$) CX43 immunoreactivity compared with the scrambled. However, the LPS treatment increased ($p < 0.01$) both *Gjal* mRNA expression (Fig. 9A) and CX43 immunoreactivity compared with the scrambled. Additionally, the LPS treatment showed higher ($p < 0.01$) CX43 immunoreactivity compared with the LEP treatment. *Ptpn2* silencing blunted the LEP and LPS effect ($p < 0.01$; Fig. 9F) on CX43 immunoreactivity and it reduced ($p < 0.01$; Mann-Whitney; Fig. 9C) *Gjal* mRNA expression after LPS stimulation, compared with respective scrambled control.

Effects of *Ptpn2* knockdown on the LEP- and LPS- induced changes in the *Il6*, *Il1b* and *Tnf* mRNA expression of hypothalamic astrocytes.

There was an effect of LEP and LPS treatment on *Il6* ($F_{2,21} = 15.80$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.60$), *Il1b* ($F_{2,22} = 25.53$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.70$) and *Tnf* ($F_{2,22} = 25.35$, $p < 0.01$, $\eta_p^2 = 0.70$) mRNA expression. The treatment with LPS increased ($p < 0.01$) the mRNA expression of *Il6* (Fig 10A), *Il1b* (Fig. 10B) and *Tnf* (Fig. 10C) compared with the control group. *Ptpn2* silencing increased ($p < 0.01$; Mann-Whitney) the *Il6* and *Tnf* mRNA expression compared with the scrambled group. Similarly, *Ptpn2* silencing increased *Il6*, *Il1b* and *Tnf* mRNA expression (Fig. 10) after LEP and LPS stimulation.

Discussion

In the present study we observed that both subnutrition and overnutrition in neonatal life induced changes in body weight gain in adult life. These effects were associated with high plasma leptin levels, high expression of TCPTP and changes in the glial cell morphology in the hypothalamus.

At weaning, SL rats showed a significant increase in body weight, while LL rats presented lower body weight. Since milk production by the dams was shown to be similar, irrespective to the litter size (Russell, 1980), the marked difference in the body weight at weaning is attributed to the milk availability and the competition among the pups. After weaning, SL rats were heavier than controls despite similar food intake. This result confirms that neonatal overnutrition induces a programming of alterations in energy homeostasis later in life, reducing energy expenditure (Li et al., 2013). The lactation period may influence brain development and nutritional changes in this period, promoting changes in central metabolic control in adult life (Rodrigues et al., 2011; Glavas et al., 2010). Epigenetic mechanisms have been implicated in the nutritional programming, such as hypermethylation of the gene that encodes proopiomelanocortin (POMC), the precursor of α MSH, an anorexigenic neuropeptide (Plagemann et al., 2010).

After weaning, with free access to diet, LL rats showed hyperphagia and a catch-up of body weight, being it in accordance with the results from Remmers and Col. (2008) who found an increased feed efficiency in adult rats raised in large litter (20 pups). Using a sheep model of maternal undernutrition there are data showing hypomethylation of POMC and GR (Glucocorticoids receptor) gene in the hypothalamus, the transcription of the hypothalamic POMC gene was not increased, however, it was observed an increase in GR gene expression (Stevens et al., 2011).

The neonatal subnutrition is associated with an increase in activity and projections of hypothalamic orexinergic system (Plagemann et al., 1999; Patterson et al., 2010; López et al., 2005; Cripps et al., 2009). In this model, it was showed an increase in the percentage of NPY, AgRP and GABA in the ARC, as well as, in the number of the AgRP projections from ARC to PVN and in the synapses of NPY/AgRP in the PVN between 3rd and 4th postnatal week (Plagemann et al., 1999; patterson et al., 2010; lópez et al., 2005; cripps et al., 2009). Also, it was observed an increase in neurons activity in the NTS at adult life (Lira et al., 2014). Additionally, it was related a reduction in the expression of K_{ATP} channel that is, in turn, important to hyperpolarize

NPY, AgRP e GABA neurons through the leptin action (Juan De Solis et al., 2016). In similar model of protein or caloric restriction, it was observed a delay in the neurodevelopment of NPY projections to PVN (Rocha et al., 2014). These data showed that the neuronal plasticity can be modulated by neonatal subnutrition, inducing a hyperphagic behavior observed in adult life in these animals.

In adult life, we observed that both SL and LL groups showed an increased expression of *Tnf* mRNA and increased *Il1b* only in the LL group. The differentiated expression of these cytokines could contribute to the hyperphagia of the LL group, considering their important role in the inflammation of the hypothalamus associated with obesity (Milanski et al., 2009; Posey et al., 2009, Kleinridders et al., 2009; Pistell et al., 2010). Although the LL group did not show an increase in *Il6* mRNA expression at PN60, a recent work showed that the increase in *Il1b* and *Il6*, but not *Tnf* mRNA expression was associated with an increase in food intake promoted by IKK β /NF- κ B signaling (Douglass et al., 2017). In addition, an intracerebroventricular injection (ICV) of TNF α blocked the anorexigenic effect of leptin by inhibition of PI3K–Akt–FoxO1 pathway (Romanatto et al., 2007). However, another hypothesis is that the LL group hyperphagia could be inducing inflammation. Interestingly, in rats treated with HFD, it was observed an increase in N-terminal C-Jun kinase (Jnk) (Milanski et al., 2009; Posey et al., 2009, Kleinridders et al., 2009; Pistell et al., 2010) and nuclear factor κ B (NF κ B) expression in the hypothalamus and consequently an increase in *Tnf*, *Il β* and *Il6*, that was, in turn, associated with the impairment of insulin and leptin signaling (Milanski et al., 2009; Posey, et al., 2009, Kleinridders, et al., 2009; Pistell et al., 2010; Valdearcos et al., 2014; Li et al., 2012). The release of cytokines from microglial cells (Valdearcos et al., 2014; Li et al., 2012) supports an inflammatory status by IKK β actions (Li et al., 2012). The inhibition of IKK activity reduces the resistance to leptin, reactivating the signaling of JAK2-STAT3 and IRS-PI3K-Akt in the hypothalamus of HFD-treated mice (Weissmann et al., 2014).

Excessive neonatal nutrition induced changes in microglial morphology in the ARC at PN21 and PN60 in the SL group. This effect may be related to the increase in cytokines and the level of leptin promoted by overfeeding during lactation in this group. In fact, leptin treatment increases the numbers of microglial cells and their branching in *ob/ob* mice, even in the presence of body weight loss (Gao et al., 2014). In addition, leptin-treated microglial cells have a bipolar shape, with increased branching (Lafrance et al., 2010). The increase of microglial cells in adult LL rats may be related to the

hyperphagia observed in this group after weaning. The obesity model in rats and adult mice induces and increased number and higher activation of microglia in the ARC (Thaler et al., 2012). Adult rats submitted to neonatal overnutrition were shown to present an increase in microglial cells number in the VMH (Tapia-González et al., 2011) and PVN (Ziko et al., 2014) too. Additionally, mice fed with HFD for 3 weeks have an increase in microglia in the ARC (André et al., 2016). Therefore, it is probable that the neonatal nutritional programming may affect the microglia morphology of different regions of the hypothalamus, however, in the PVN we did not observe significant alterations.

TCPTP, induced by inflammatory stimulus, for instance, LPS (Song et al., 2016a), is a counterregulatory protein of the leptin signaling pathway, as it causes dephosphorylation of p-STAT3 in the nucleus (Shields et al., 2008; Tiganis e Bennett, 2007; Yamamoto et al., 2002; Loh et al., 2011). We demonstrated in this work, for the first time, an increase in the expression of the *Ptpn2* mRNA, the TCPTP encoding gene, and the expression of this protein in the ARC in the SL mice at PN21 and in both SL and LL groups at PN60. Similar results were reported in adult rats fed with a hyperlipidic diet (Loh et al., 2011). It has also been shown that TCPTP acts negatively on insulin signaling via IRS dephosphorylation in Y1162/Y1163 (Galic et al, 2003; Tsou and Bence, 2013). Due to its action in the counterregulation of leptin signaling (Loh et al, 2011) and insulin (Galic et al, 2003; Tsou and Bence 2013), TCPTP has been associated, together with PTP1B and SOCS3, with a resistance to leptin in the hypothalamus in obese individuals.

The increase in fatty acids response (De Souza et al., 2005; Lehnardt et al., 2003; Milanski et al., 2009, Posey et al., 2009, Kleinridders et al. 2009), present in HFD, is able to activate an inflammatory response, which, in turn, induces an astrogliosis morphology (Horvath et al., 2010; Yi et al., 2011; Thaler et al., 2012). Recently, it was observed that IKK β /NF- κ B signaling in the astrocytes is required for obesogenic diet-induced astrogliosis, hypothalamic inflammation and consequent increase in food intake, reduction in energy expenditure, glucose intolerance and insulin resistance (Douglass et al., 2017). Glial cells in the hypothalamus are known to participate in the control of energy homeostasis, expressing leptin receptors (Kim et al., 2014; Rottkamp et al., 2015). Mice with specific deletion of *LepRb* in astrocyte, and exposed to HFD during 2 months, showed morphology characteristic of astrogliosis,

associated with an increase in adipose tissue and hiperleptinemia (Wang et al., 2015). We observed alterations in the morphology of astrocytes in the SL group at weaning and such phenomena may be related to the increased leptin secretion in rodents. In rodents, elevation of leptin in the second week after birth is crucial for the development of hypothalamic circuits related to energy homeostasis (Bouret et al., 2004). In fact, leptin infusion during the first days of life showed an increase in fiber density and in the development of neural projections from ARC in ob/ob mice, deficient in leptin production (Bouret et al., 2004). The effect of leptin on astrocyte morphology was also reported in mice with conditioned LepR ablation in adult life, in which the authors observed that these mice had a reduction in the number of astrocytes and their processes (Kim et al., 2014). We observed in our work an increase in the amount of astrocyte cells, in the size of the soma and extension processes of these cells associated with a decrease in the expression of CX30 in adult SL and LL rats. The participation of CX30 in the morphological integrity of astrocyte cells has been demonstrated in CX30 knockout mice that show an increase in the astrocytic processes in the hippocampus (Pannasch et al., 2014). Therefore, a reduction in CX30 may contribute to the marked changes in the astrocyte morphology observed in both SL and adult LL rats in the present study.

We observed *in vitro* that LPS (Norden et al., 2015) and leptin can induce an increase in the astrocyte area, as well as, an increase in TCPTP. TCPTP was shown *in vitro* to be able to dephosphorylate CX43 and increase its expression in NRK normal rat kidney cell plasma membrane (Li et al., 2014). There was on SL group an increase in CX43 immunoreactivity after lactation; this connexin has been considered to play a role as a sensor of glucose metabolism in astrocytes (Allard, et al., 2013, 2014; Gandhi et al., 2010; Ball et al., 2011). Additionally, in the adult life, the SL and LL groups showed reduction in CX30 immunoreactivity. Therefore, we investigated the effect of treatment of leptin and the knockdown of *Ptpn2* on CX30 and CX43 and astrocyte morphology. We observed that the silencing of *Ptpn2* after leptin treatment interferes with the expression and immunoreactivity of CX30 and the morphology of hypothalamic astrocytes. We demonstrated that TCPTP has an opposite effect on connexins, reducing CX30 and increasing CX43 gene expression and immunoreactivity. In the programming study with intrauterine exposure to LPS, it was observed an increase in the activity and expression of CX43 on the surface of offspring astrocyte cells (Avendaño et al., 2015).

Similar results were observed in murine macrophage cell culture (RAW 264.7), in which LPS stimulation promoted an increase in the CX43 gene and protein expression (Qin et al., 2016). An inverse relationship has been demonstrated in the expression of CX43 and CX30, the specific astrocyte deletion of CX43 is associated with an increase in CX30 expression (Theis et al., 2003). We observed that the silencing of *Ptpn2* abolished the effects of LPS and leptin on the astrocyte morphology in culture. For the first time, it was showed that TCPTP expressed in astrocytes with morphological gliosis is increased in both SL and LL groups in adult life and that TCPTP in astrocyte primary culture showed participation in the astrocyte morphology by negative modulation of CX30.

LPS stimulation was, as known, able to promote an increase in the mRNA expression of proinflammatory cytokines *Il6*, *Il1b* and *Tnfa* in astrocytic cells, and TCPTP, in turn, promotes a negative feedback mechanism. TCPTP deficient mouse model presents a severe and broad inflammatory profile, leading to lethality at 3-4 weeks old (You-Ten et al., 1997). Indeed, TCPTP is an important negative regulator of cytokine signaling, and TCPTP acts by dephosphorylating Jak1 and Jak3 (Myers et al., 2001; Simoncic et al., 2002). In addition, it reduces TNF- α -induced IL-6 expression in cells of the immune system through interaction with TRAF2 adapter protein, and dephosphorylates Src tyrosine kinase protein, leading to the inactivation of ERK pathway (Van Vliet et al., 2005). Considering that TCPTP was stimulated by LPS and that, in turn, has negative feedback function in the expression of proinflammatory cytokines, these results indicate an adaptive role of TCPTP in obesity induction models, thereby regulating the inflammatory status.

In conclusion, this work confirms the effects of sub- and overnutrition in the neonatal period on body weight control in adult life. We also show for the first time that changes in neonatal nutrition promote changes in glial cell morphology in the arcuate nucleus of the hypothalamus, which is associated with a reduction in CX30. The expression of TCPTP increased in astrocytes contributes to these glial morphological changes by reduction of the CX30 gene and protein expression. These data reinforce the importance of the role of glial cells in regulating energy balance and it further enhances the notion that non-neuronal cells participate in neonatal nutrition programming and impact the metabolic status in adult life.

References

- Abudara V, Bechberger J, Freitas-Andrade M, De Bock M, Wang N, Bultynck G, Naus CC, Leybaert L, Giaume C (2014) The connexin43 mimetic peptide Gap19 inhibits hemichannels without altering gap junctional communication in astrocytes. *Front Cell Neurosci* 8:306.
- Allard C, Carneiro L, Collins SC, Chrétien C, Grall S, Pénicaud L, Leloup C (2013) Alteration of hypothalamic glucose and lactate sensing in 48 h hyperglycemic rats. *Neurosci Lett* 534:75–79.
- Allard C, Carneiro L, Grall S, Cline BH, Fioramonti X, Chrétien C, Baba-Aissa F, Giaume C, Pénicaud L, Leloup C (2014) Hypothalamic astroglial connexins are required for brain glucose sensing-induced insulin secretion. *J Cereb Blood Flow Metab* 34 (2):339–46.
- André C, Guzman-Quevedo O, Rey C, Rémus-Borel J, Clark S, Castellanos-Jankiewicz A, Ladeveze E, Leste-Lasserre T, Nadjar A, Abrous DN, Laye S, Cota D (2017) Inhibiting Microglia Expansion Prevents Diet-Induced Hypothalamic and Peripheral Inflammation. *Diabetes* 66(4):908–919.
- Avendaño BC, Montero TD, Chávez CE, Von Bernhardt R, Orellana JA (2015) Prenatal exposure to inflammatory conditions increases Cx43 and Panx1 unopposed channel opening and activation of astrocytes in the offspring effect on neuronal survival. *Glia*.
- Bale TL, Baram TZ, Brown AS, Goldstein JM, Insel TR, McCarthy MM, Nemeroff CB, Reyes TM, Simerly RB, Susser ES, Nestler EJ (2010) Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry* 68(4):314–9.
- Ball KK, Harik L, Gandhi GK, Cruz NF, Dienel GA (2011) Reduced gap junctional communication among astrocytes in experimental diabetes: contributions of altered connexin protein levels and oxidative-nitrosative modifications. *J Neurosci Research* 89 (12):2052–2067.
- Banno R, Zimmer D, De Jonghe BC, Atienza M, Rak K, Yang W, Bence KK (2010) PTP1B and SHP2 in POMC neurons reciprocally regulate energy balance in mice. *J Clin Invest* 120(3):720–34.
- Barker DJP (1998) In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 95(2):115–128.
- Bird, A (2007) Perceptions of epigenetics. *Nature* 447:396–398.
- Borges BC, Rorato R, Avraham Y, Da Silva LE, Castro M, Vorobiov L, Berry E, Antunes-Rodrigues J, Elias LL (2011). Leptin resistance and desensitization of hypophagia during prolonged inflammatory challenge. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 300(5), p.E858–69.
- Borrelli E, Nestler EJ, Allis CD, Sassone-Corsi P (2008) Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron* 60:961–974.

Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB (2004). Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. *Science* 304:108-110.

Ciofi P, Garret M, Lapirot O, Lafon P, Loyens A, Prévot V, Levine JE (2009) Brain-endocrine interactions: a microvascular route in the mediobasal hypothalamus. *Endocrinol* 150 (12): 5509-19.

Clasadonte J, Haydon PG (2014) Connexin 30 controls the extension of astrocytic processes into the synaptic cleft through an unconventional non-channel function. *Neurosci Bull* 30(6):1045-8, 2014.

Couchman JR, Höök M, Rees DA, Timpl R (1983) Adhesion, growth, and matrix production by fibroblasts on laminin substrates. *J Cell Biol.* 96(1):177-83.

Cripps RL, Martin-Gronert MS, Archer ZA, Hales CN, Mercer JG, Ozanne SE (2009) Programming of hypothalamic neuropeptide gene expression in rats by maternal dietary protein content during pregnancy and lactation. *Clinical Science* 117(2):85-93.

Day JJ, Kennedy AJ, Sweatt JD (2015) DNA methylation and its implications and accessibility for neuropsychiatric therapeutics. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 55:591-611.

Day JJ, Sweatt JD (2010) DNA methylation and Memory Formation. *Nat neurosci* v.13, p.1319-1323.

Day JJ, Sweatt JD (2011). Epigenetic mechanisms in cognition. *Neuron* 70:813-29.

De Bock M, Decrock E, Wang N, Bol M, Vinken M, Bultynck G, Leybaert L (2014) The dual face of connexin-based astroglial Ca(2+): a key player in brain physiology and a prime target in pathology. *Biochim Biophys Acta* 1843:2211–2232.

De Boo HA, Harding JE (2006) The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 46:4–14.

De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA (2005) Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* 146,4192–4199.

Dearden L, Ozanne SF (2015) Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Front Neuroendocrinol* 2:0091-3022.

Djogo T, Robins SC, Schneider S, Kryzskaya D, Liu X, Mingay A, Gillon CJ, Kim JH, Storch KF, Boehm U, Bourque CW, Stroh T, Dimou L, Kokoeva MV (2016) Adult NG2-Glia Are Required for Median Eminence-Mediated Leptin Sensing and Body Weight Control. *Cell Metab* 23(5):797-810.

Douglass JD, Dorfman MD, Fasnacht R, Shaffer LD, Thaler JP (2017) Astrocyte IKKb/NF-kB signaling is required for diet-induced obesity and hypothalamic inflammation. *Molecular Metabolism* 6 (4):366-373.

Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH (2011) A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol Cell Physiol* 300(4):C723-42.

Eyo UB, Dailey ME (2013) Microglia: key elements in neural development, plasticity, and pathology. *J Neuroimmune Pharmacol* 1–16.

Franciosi S, Ryu JK, Shim Y, Hill A, Connolly C, Hayden MR, McLarnon JG, Leavitt BR (2012). Age-dependent neurovascular abnormalities and altered microglial morphology in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Neurobiology of Diseases* 45:438–449.

Galic S, Klingler-Hoffmann M, Fodero-Tavoletti MT, Puryer MA, Meng T-C, Tonks N. K, Tiganis T (2003) Regulation of Insulin Receptor Signaling by the Protein Tyrosine Phosphatase TCPTP. *Mol Cell Bio* 23(6):2096–2108.

Gandhi GK, Ball KK, Cruz NF, Dienel GA (2010) Hyperglycaemia and diabetes impair gap junctional communication among astrocytes. *ASN Neuro* 2:e30.

Gao Y, Ottaway N, Schriever SC, Legutko B, García-Cáceres C, De La Fuente E, Mergen C, Bour S, Thaler JP, Seeley RJ, Filosa J, Stern JE, Perez-Tilve D, Schwartz MW, Tschöp MH, Yi CX (2014) Hormones and diet, but not body weight, control hypothalamic microglial activity. *Glia* 62(1):17-25.

Giaume C, Liu X (2012) From a glial syncytium to a more restricted and specific glial networking. *J Physiol* 106(1-2):34-9.

Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, Enriori PJ, Fisher SK, Evans AE, Grayson BE, Cowley MA, Smith MS, Grove KL (2010) Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinol* 151:1598–1610.

Grandbarbe L, Bouissac J, Rand M, Hrabé de Angelis M, Artavanis-Tsakonas S, Mohier E (2003). Delta-Notch signaling controls the generation of neurons/glia from neural stem cells in a stepwise process. *Development* 130(7):1391-402.

Grove KL, Grayson BE, Glavas MM, Xiao XQ, Smith MS (2005) Development of metabolic systems. *Physiol Behav* 86:646–660, 2005.

Harding JE (2001) The nutritional basis of the foetal origins of adult disease 2001. *Int J Epidemiol*. 30: 15–23.

Haydon PG, Carmignoto G (2006) Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol Rev* 86:1009–1031, 2006.

Horvath TL, Sarman B, García-Cáceres C, Enriori Pj, Sotonyi P, Shanabrough M, Borok E, Argente J, Chowen Ja, Perez-Tilve D, Pfluger Pt, Brönneke Hs, Levin Be, Diano S, Cowley MA, Tschöp MH (2010) Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(33):14875-80.

Howard JK, Cave BJ, Oksanen LJ, Tzamelis I, Bjørbaek C, Flier JS (2004) Enhanced leptin sensitivity and attenuation of diet-induced obesity in mice with haploinsufficiency of Socs3. *Nat Med* 10(7):734-8.

Insel TR, Cuthbert BN (2009) Endophenotypes: Bridging genomic complexity and disorder heterogeneity. *Biol Psychiatry* 66:988–989.

Ito Y, Banno R, Hagimoto S, Ozawa Y, Arima H, Oiso Y (2012) TNF α increases hypothalamic PTP1B activity via the NF κ B pathway in rat hypothalamic organotypic cultures. *Regul Pept* 174(1-3):58-64.

Jayaram B, Pan W, Wang Y, Hsueh H, Mace A, Cornelissen-Guillaume GG, Mishra PK, Koza RA, Kastin AJ (2013) Astrocytic leptin-receptor knockout mice show partial rescue of leptin resistance in diet-induced obesity. *J Appl Physiol* 114(6):734-41.

Jones PA, Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10:805-11.

Juan De Solis A, Baquero AF, Bennett CM, Grove KL, Zeltser LM (2016) Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. *Mol Metab* 5(3):198-209.

Kim JG, Suyama S, Koch M, Jin S, Argente-Arizon P, Argente J, Liu ZW, Zimmer MR, Jeong JK, Sziget-Buck K, Gao Y, Garcia-Caceres C, Yi CX, Salmaso N, Vaccarino FM, Chowen J, Diano S, Dietrich MO, Tschöp MH, Horvath TL (2014) Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci* 17(7):908-10.

Kleinridders A, Schenten D, Konner AC, Belgardt BF, Mauer J, Okamura T, Wunderlich FT, Medzhitov R, Andbrunig JC (2009) MyD88 signaling in the CNS is required for development of fatty acid-induced leptin resistance and diet-induced obesity. *Cell Metab* 10(4):249–259.

Kloss CU, Bohatschek M, Kreutzberg GW, Raivich G (2001) Effect of lipopolysaccharide on the morphology and integrin immunoreactivity of ramified microglia in the mouse brain and in cell culture. *Exp Neurol* 168:32–46.

Lafrance V, Inoue W, Kan B, Luheshi GN (2010) Leptin modulates cell morphology and cytokine release in microglia. *Brain Behav Immun* 24(3):358-65.

Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 100(14):8514-9.

Li G, Kohorst JJ, Zhang W, Laritsky E, Kunde-Ramamoorthy G, Baker MS, Fiorotto ML, Waterland RA (2013) Early postnatal nutrition determines adult physical activity and energy expenditure in female mice. *Diabetes* 62(8):2773-83.

- Li H, Spagnol G, Naslavsky N, Caplan S, Sorgen PL (2014) TC-PTP directly interacts with connexin43 to regulate gap junction intercellular communication. *Journal Cell Science* 127(15):3269-79.
- Li J, Tang Y, Cai D (2012) IKK β /NF- κ B disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol* 14(10):999-1012.
- Lira LA, Almeida LC, Da Silva AA, Cavalcante TC, De Melo DD, De Souza JÁ, Campina RC, De Souza SL (2014) Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. *Int J of Dev Neurosci* 38:23-9.
- Liu Z, Lim, CY, SU My-F, So SLY, Shui G, Wenk Mr, Grove, KL, Radda GK, Han W, Xiao X (2013) Neonatal overnutrition in mice exacerbates high-fat diet-induced metabolic perturbations. *J Endocrinol* 219:131–143.
- Loh K, Fukushima A, Zhang X, Galic S, Briggs D, Enriori PJ, Simonds S, Wiede F, Reichenbach A, Hauser C, Sims NA, Bence KK, Zhang S, Zhang ZY, Kahn BB, Neel B.G.; Andrews, Z.B.; Cowley, M.A.; Tiganis, T (2011) Elevated hypothalamic TCPTP in obesity contributes to cellular leptin resistance. *Cell Metab* 14(5):684-99.
- Longair MH, Baker DA, Armstrong JD (2011) Simple Neurite Tracer: open source software for reconstruction, visualization and analysis of neuronal processes. *Bioinformatics* 27(17):2453-4.
- López M, Seoane LM, Tovar S, García MC, Nogueiras R, Diéguez C, Señarís RM (2005) A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia* 48(1):140-8, 2005.
- Madore C, Joffre C, Delpech J, De Smedt-Peyrusse V, Aubert A, Coste L, Laye S, Nadjar A (2013) Early morphofunctional plasticity of microglia in response to acute lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 34:151–158.
- Manders E M, Verbeek F J, Aten J A. (1993) Measurement of colocalization of objects in dual-color confocal images. *J Microsc* 169:375–382.
- Mccarthy KD, De Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85(3):890-902.
- Mcnay DE, Briançon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E, Flier JS (2012) Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* 122(1):142-52, 2012.
- Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, Tsukumo DM, Anhe G, Amaral ME, Takahashi HK, Curi R, Oliveira HC, Carvalheira JB, Bordin S, Saad MJ, Velloso LA (2009) Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 29(2):359-70.

Miller AA, Spencer SJ (2014) Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 42:10-21.

Miller FD, Gauthier AS (2007). Timing is everything: Making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron* 54, 357–369.

]Muppirala M, Gupta V, Swarup G (2013) Emerging role of tyrosine phosphatase, TCPTP, in the organelles of the early secretory pathway *Biochim Biophys Acta*. 1833(5):1125-32.

Myers MP, Andersen JN, Cheng A, Tremblay ML, Horvath CM, Parisien JP, Salmeen A, Barford D, Tonks NK (2001) TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 276:47771–47774.

Norden DM, Trojanowski PJ, Villanueva E, Navarro E, Godbout JP (2016) Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge. *Glia* 64(2):300-16.

Pannasch U, Freche D, Dallérac G, Ghézali G, Escartin C, Ezan P, Cohen-Salmon M, Benchenane K, Abudara V, Dufour A, Lübke JH, Déglon N, Knott G, Holcman D, Rouach N (2014) Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nat Neurosci* 17(4):549-58.

Patterson CM, Bouret SG, Park S, Irani BG, Dunn-Meynell A.A Levin BE (2010) Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. *Endocrinol* 151(9):4270-9.

Paxinos G, Watson C (1997) The rat brain stereotaxic coordinates. New York: Academic.

Petersen AM, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98:1154–1162.

Pistell PJ, Morrison CD, Gupta S, Knight AG, Keller JN, Ingram DK, Bruce-Keller AJ (2010) Cognitive impairment following high-fat diet consumption is associated with brain inflammation. *J Neuroimmun* 219:25–32.

Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, Dörner G (1999) Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Research* 836:146–155, 1999.

Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, Ziska T, Schellong K, Rodekamp E, Melchior K, Dudenhausen JW (2010) Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med* 38(4):393-400.

Pool M, Thiemann J, Bar-Or A, Fournier AE (2007) NeuriteTracer: A novel ImageJ plugin for automated quantification of neurite outgrowth. *J Neurosci Methods*. 168(1):134-9.

- Posey KA, Clegg DJ, Printz RL, Byun J, Morton GJ, Vivekanandan-Giri A, Pennathur S, Baskin DG, Heinecke JW, Woods SC, Schwartz MW, Niswender KD (2009) Hypothalamic proinflammatory lipid accumulation, inflammation, and insulin resistance in rats fed a high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(5):E1003–E1012.
- Qin J, Zhang G, Zhang X, Tan B, Lv Z, Liu M, Ren H, Qian M, Du B (2016) TLR-Activated Gap Junction Channels Protect Mice against Bacterial Infection through Extracellular UDP Release. *J Immun* 196(4):1790-8.
- Remmers F, Fodor M, Delemarre-Van De Waal HA (2008) Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. *Physiol Behav* 95, p.208-15.
- Rocha ML, Fernandes PP, Lotufo BM, Manhães AC, Barradas PC, Tenorio F (2014) Undernutrition during early life alters neuropeptide Y distribution along the arcuate/paraventricular pathway. *Neuroscience* 256:379-91.
- Rodrigues AL, De-Moura EG, Passos MC, Trevenzoli IH, DA Conceicao EP, Bonono IT, Neto JF, Lisboa PC (2011) Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem* 22:109–17.
- Romanatto T, Cesquini M, Amaral ME, Roman EA, Moraes JC, Torsoni MA, Cruz-Neto AP, Velloso LA. (2007) TNF-alpha acts in the hypothalamus inhibiting food intake and increasing the respiratory quotient—effects on leptin and insulin signaling pathways. *Peptides* 28:1050–1058.
- Ropelle ER, Flores MB, Cintra De Rocha GZ, Pauli JR, Morari J, De Souza CT, Moraes JC, Prada PO, Guadagnini D, Marin RM, Oliveira AG, Augusto TM, Carvalho HF, Velloso LA, Saad MJ, Carvalheira JB (2010) IL-6 and IL-10 anti-inflammatory activity links exercise to hypothalamic insulin and leptin sensitivity through IKKbeta and ER stress inhibition. *PLoS Biol* 24:8(8).
- Rottkamp DM, Rudenko IA, Maier MT, Roshanbin S, Yulyaningsih E, Perez L, Valdearcos M, Chua S, Koliwad SK, Xu AW (2015). Leptin potentiates astrogenesis in the developing hypothalamus. *Mol Metab* 4(11):881-9.
- Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C (2008) Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science* 322:1551–1555.
- Russell JA (1980) Milk yield, suckling behaviour and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes. *J Physiol* 303:403–415.
- Schipper L, Bouyer K, Oosting A, Simerly RB, Van Der Beek EM (2013) Postnatal dietary fatty acid composition permanently affects the structure of hypothalamic pathways controlling energy balance in mice. *Am J Clin Nutr* 98(6):1395–1401.
- Shields BJ, Court NW, Hauser C, Bukczynska PE, Tiganis T (2008) Cell cycle-dependent regulation of SFK, JAK1 and STAT3 signalling by the protein tyrosine phosphatase TCPTP. *Cell Cycle* 7(21):3405-16.

Simoncic PD, Lee-Loy A, Barber DL, Tremblay ML, Mcglade CJ (2002) The T cell protein tyrosine phosphatase is a negative regulator of janus family kinases 1 and 3. *Curr Biol* 12:446–453.

Song GJ, Jung M, Kim JH, Park H, Rahman MH, Zhang S, Zhang ZY, Park DH, Kook H, Lee IK, Suk K (2016b). A novel role for protein tyrosine phosphatase 1B as a positive regulator of neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 13(1):86.

Song GJ, Kim J, Kim J-H, Song S, Park H, Zhang Z-Y, Suk K. (2016a). Comparative Analysis of Protein Tyrosine Phosphatases Regulating Microglial Activation. *Experimental Neurobiology* 25(5):252–26.

Stevens A, Begum G, White A (2011) Epigenetic changes in the hypothalamic pro-opiomelanocortin gene: a mechanism linking maternal undernutrition to obesity in the offspring? *Eur J Pharmacol* 660:194-201.

Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro KL (2012). Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes* 61:2833–2841.

Sweatt JD (2009) Experience-dependent epigenetic modifications in the central nervous system. *Biol Psychiatry* 65:191–197.

Tabernero, A.; Gangoso, E.; Jaraíz-Rodríguez, M.; Medina, J.M (2016) The role of connexin43-Src interaction in astrocytomas: A molecular puzzle. *Neuroscience* 323:183-94.

Tapia-Gonzalez S, Garcia-Segura LM, Tena-Sempere M, Frago LM, Castellano JM, Fuente-Martin E, García-Cáceres C, Argente J, Chowen JÁ (2011) Activation of microglia in specific hypothalamic nuclei and the cerebellum of adult rats exposed to neonatal overnutrition. *J Neuroendocrinol* 23 (4):365–370.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO, Zhao X, Sarruf DA, Izgur V, Maravilla KR, Nguyen HT, Fische JD, Matsen ME, Wisse BE, Morton GJ, Horvath TL, Baskin DG, Tschöp MH, Schwartz MW (2012) Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest* 122(1):153-62.

Theis M, Jauch R, Zhuo L, Speidel D, Wallraff A, Döring B, Frisch C, Söhl G, Teubner B, Euwens C, Huston J, Steinhäuser C, Messing A, Heinemann U, Willecke K (2003) Accelerated hippocampal spreading depression and enhanced locomotory activity in mice with astrocyte-directed inactivation of connexin43. *J Neurosci* 23(3):766-76.

Therrien M, Drouin J (1991) Pituitary pro-opiomelanocortin gene expression requires synergistic interactions of several regulatory elements. *Mol Cell Biol* 11:3492–3503.

Tiganis T, Bennett AM (2007) Protein tyrosine phosphatase function: the substrate perspective. *Biochemical Journal*. 402, 1–15.

Tsou RC, Bence KK (2012) Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. *Front Neurosci* 6,1:92, 2012.

UNICEF-WHO-The World Bank (2014). Joint child malnutrition estimates.

Valdearcos M, Robblee MM, Benjamin DI, Nomura DK, Xu AW, Koliwad SK (2014) Microglia dictate the impact of saturated fat consumption on hypothalamic inflammation and neuronal function. *Cell Rep* 9(6):2124-38.

Van Vliet C, Bukczynska PE, Puryer MA, Sadek CM, Shields BJ, Tremblay ML, Tiganis T (2005) Selective regulation of tumor necrosis factor-induced Erk signaling by Src family kinases and the T cell protein tyrosine phosphatase. *Nat Immun* 6(3):253-60.

Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, Neupert S, Nicholls HT, Mauer J, Hausen AC, Predel R, Kloppenburg P, Horvath TL, Brüning JC (2014) Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell* 156(3):495-509.

Wallenius K, Wallenius V, Sunter D, Dickson SL, Jansson JO (2002a) Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 560–565.

Wallenius V, Wallenius K, Ahrén B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, Jansson JO (2002b) Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 8:75–79.

Wang Y, Hsueh H, He Y, Kastin AJ, Pan W (2015) Role of Astrocytes in Leptin Signaling. *J Mol Neurosci* 56:829-39, 2015.

Weissmann L, Quaresma PG, Santos AC, De Matos AH, Pascoal VD, Zanotto TM, Castro G, Guadagnini D, Da Silva JM, Velloso LA, Bittencourt JC, Lopes-Cendes I, Saad MJ, Prada PO (2014) IKKepsilon is key to induction of insulin resistance in the hypothalamus, and its inhibition reverses obesity. *Diabetes* 63:3334–3345.

World Health Organization (2014). Global status report on noncommunicable diseases. Attaining the nine global noncommunicable diseases targets; a shared responsibility.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301(5633):640-3.

Yang G, Lim CY, Li C, Xiao X, Radda GK, Li C, Cao X, Han W (2009) FOXO1 inhibits leptin regulation of POMC promoter activity by blocking STAT3 interaction with specific protein 1. *J Biol Chem* 284:3719–3727.

Yi CX, Habegger KM, Chowen JA, Stern J, Tschöp MH (2011) A role for astrocytes in the central control of metabolism. *Neuroendocrinology* 93,143–149.

You-Ten KE, Muise ES, Itié A, Michaliszyn E, Wagner J, Jothy S, Lapp WS, Tremblay ML (1997) Impaired bone marrow microenvironment and immune function in T cell protein tyrosine phosphatase-deficient mice. *J Exp Med* 186(5):683-93.

Zabolotny JM, Kim YB, Welsh LA, Kershaw EE, Neel BG, Kahn BB (2008) Protein-tyrosine phosphatase 1B expression is induced by inflammation in vivo. *J Biol Chem* 283(21):14230-41.

Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D (2008). Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell* 135(1):61-73.

Zhang X-Y, Zhang Q, Wang D-H (2011). Litter size variation in hypothalamic gene expression determines adult metabolic phenotype in brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *PLoS ONE* 6:19913.

Ziko I, De Luca S, Dinan T, Barwood JM, Sominsky L, Cai G, Kenny R, Stokes L, Jenkins T, Spencer SJ (2014) Neonatal overfeeding alters hypothalamic microglial profiles and central responses to immune challenge long-term. *Brain Behav Immun* 41:32-43.

Zinchuk V, Grossenbacher-Zinchuk O (2009) Recent advances in quantitative colocalization analysis: Focus on neuroscience. *Prog Histochem Cytochem* 44 (3):125–172.

Figure 1

Figure 2 **Figure 3.**

Figure 4.

Figure 5.

Figure 6.

Figure 7.

Figure 8.

Figure 9.

Figure 10.

Figures Subtitles

Figure 1. Body weight (A); individual body weight after weaning (B); food intake (g / 100g body weight) during PN50 to PN60; plasma leptin (D) and insulin (E) concentrations; relative expression of *Il6*, *Il1b*, *Tnfa*, *Ptpn1* and *Ptpn2* mRNAs in the ARC (F, G, H, I and J, respectively); protein expression of T-cell protein tyrosine phosphatase (TCPTP) in the median basal hypothalamus of the small litter (SL), normal litter (NL), and large litter (LL) groups. Values are expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the one-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 2. Representative photomicrographs of the triple Immunofluorescence for TCPTP (green), GFAP (red) for astrocyte and IBA-1 (blue) for microglia in the arcuate nucleus (ARC) of the SL, NL and LL groups at PN60 (A). ARC scale: 200 μ m; TCPTP, GFAP and IBA-1: 25 μ m Magnification: 63x. Immunoreactivity for TCPTP (B), GFAP (C) and IBA-1 (D) at PN21 and PN60. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the one-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 3. Representative photomicrographs of the triple immunofluorescence for CX30 (green), GFAP (red) and IBA-1 (blue) in the ARC of the SL, NL and LL groups at PN60 (A). Quantification of immunoreactivity for CX30 (B) and relative expression of *Gja6* mRNA in ARC (C). ARC scale: 200 μ m; CX30, GFAP and IBA-1: 25 μ m. Magnification: 63x. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the one-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 4. Representative photomicrographs of the triple immunofluorescence for CX43 (green), GFAP (red) and IBA-1 (blue) in the ARC of the SL, NL and LL groups at PN60 (A). Quantification of immunoreactivity for CX43 (B) and relative expression of *Gja1* mRNA in ARC (C). ARC scale: 200 μ m; CX43, GFAP and IBA-1: Magnification: 63x. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the one-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 5. Representative photomicrographs of the GFAP (red) and IBA-1 (blue) immunofluorescence in the arcuate nucleus (ARC) of the SL and NL groups at PN60 (A). Quantification of soma immunoreactivity for GFAP (B) and IBA-1 (C). Extension processes for GFAP (D) and IBA-1 (E). Arrows indicating the soma of astrocytes and microglia, labeled with GFAP or IBA-1, respectively. Scale of 10 μ m. Magnification: 63x. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the one-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 6. Representative photomicrographs of the triple immunofluorescence for TCPTP (green), GFAP (red) and DAPI (blue) in astrocyte primary culture treated with LPS [500 ng/ mL] and different concentrations of leptin (LEP) [100ng/mL; 1000 ng/mL; 5000 ng/mL] (A). Relative expression of mRNA of *Ptpn1* (B) and *Ptpn2* (C). Quantification of immunoreactivity for TCPTP (D). Area (μ m²) of astrocyte cell. Scale of 50 μ m. Magnification: 40x. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the one-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 7. Representative photomicrographs of the triple immunofluorescence for TCPTP (green), GFAP (red) and DAPI (blue), in astrocyte primary culture with silencing of

Ptpn2 mRNA expression (siRNA *Ptpn2*) with treatment with LPS [500ng/mL] or leptin [5000 ng/mL] (A). Relative expression of mRNA of *Ptpn1* (B, D, E and F) and *Ptpn2* (C, G, H and I). Quantification of immunoreactivity for TCPTP (J). Area (μm^2) of astrocyte cell (K). Scale of 50 μm . Magnificence: 40x. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the two-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 8. Representative photomicrographs of triple immunofluorescence for CX30 (green), GFAP (red) and DAPI (blue), in astrocyte primary culture with silencing of *Ptpn2* mRNA expression (siRNA *Ptpn2*) with treatment with LPS [500ng/mL] or leptin [5000 ng/mL] (A). Relative expression of *Gja6* mRNA (B, C,D and E). Quantification of immunoreactivity for CX30 (C). 50 μm scale. Magnificence: 40x. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the two-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 9. Representative photomicrographs of the triple immunofluorescence for CX43 (green), GFAP (red) and DAPI (blue), in astrocyte primary culture with silencing of *Ptpn2* mRNA expression (siRNA *Ptpn2*) with treatment with LPS [500ng/mL] or leptin [5000 ng/mL] (A). Relative expression of *Gja1* mRNA (B, C, D and E). Quantification of immunoreactivity for CX43 (F). Scale of 50 μm . Magnificence: 40x. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the two-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.

Figure 10. *Il6* (A,D,E and F) *Il1b* (B, G, H and I), *Tnfa* (C, J, K and L) mRNA expression in astrocyte primary culture with silencing of *Ptpn2* mRNA expression (siRNA *Ptpn2*) with treatment with LPS [500ng/mL] or leptin [5000 ng/mL]. Values expressed as mean $\pm$ SEM. Data analyzed by the two-way ANOVA test, followed by Newman Keuls post-test. * $p < 0.05$ vs NL group.