

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL-MG

ANA LAURA DE OLIVEIRA CARVALHO TRIGO

**RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIAS
EM RATOS COM SOBREALIMENTAÇÃO NEONATAL**

ALFENAS/MG
2016

ANA LAURA DE OLIVEIRA CARVALHO TRIGO

**RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIAS
EM RATOS COM SOBREALIMENTAÇÃO NEONATAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.

Área de concentração: Neuroendocrinologia.
Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

ALFENAS/MG
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Trigo, Ana Laura de Oliveira Carvalho.
Respostas comportamentais e inflamatórias em ratos com
sobrealimentação neonatal / Ana Laura de Oliveira Carvalho Trigo. --
Alfenas, MG, 2016.
131 f.

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.
Tese (Doutorado em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico) -
Universidade Federal de Alfenas, 2016.
Bibliografia.

1. Programação. 2. Sobrepeso. 3. Comportamento. 4. Inflamação
I. Giusti-Paiva, Alexandre. II. Título.

CDD-571.9646

ANA LAURA DE OLIVEIRA CARVALHO TRIGO

**RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIAS
EM RATOS COM SOBREALIMENTAÇÃO NEONATAL**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG. Área de concentração: Neuroimunoendocrinologia.

Aprovada em: 01 / 12 / 2016

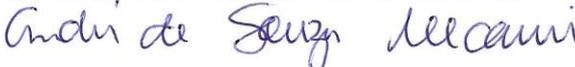
Prof. Dr.: Alexandre Giusti-Paiva

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL - MG

Assinatura: 

Prof. Dr.: André de Souza Mecawi

Instituição: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ - RJ

Assinatura: 

Prof. Dr. Rodrigo César Rorato:

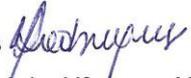
Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP - USP

Assinatura: 

Prof^a. Dr^a. Eveline Monteiro Cordeiro de Azeredo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG

Assinatura: 

Prof^a. Dr^a: Maria Rita Rodrigues 

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL - MG

Assinatura:

*Dedico este trabalho a minha mãe,
a minha filha e à memória do meu pai.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A minha filha, minha maior riqueza e apoiadora incondicional.

À memória do meu pai, que sempre me incentivou ao estudo e a leitura e a minha mãe, meu exemplo de força e resiliência, pelo amor e apoio.

Aos meus irmãos, Joel, Patrícia e Valéria por sempre torcerem por mim.

Ao meu orientador, Dr. Alexandre Giusti-Paiva, por me aceitar em seu grupo de pesquisa e pela imensa oportunidade deste aprendizado.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa, por gentilmente aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições.

Aos queridos amigos do laboratório de Fisiologia da UNIFAL Layla Cabral, Mara Ávila, Ana Cláudia Freire, Tatiane Helena, Jadina Viera, Fabiana Cardoso Vilela Giusti, Sílvia Enes, Luciana Costa, Merelym Oliveira, Vanessa Veronesi e Wesley Fernandes, pela amizade e confiança.

À querida amiga Vanessa Cardoso, minha gratidão pelo apoio e por ter compartilhado comigo grande parte deste caminho.

Aos funcionários José Reis, Marina Venâncio, Marília Ramos de Souza e Marta Costa Aguiar pela ajuda com os animais.

Ao bioterista da UNIFAL João Vitório pela disponibilização dos animais.

Ao Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, especialmente ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues.

Às graduandas Bárbara Garcia e Francielly Lopes pela ajuda e experimentos que realizamos juntas e por participarem desta caminhada científica.

Aos roedores, sem os quais este trabalho não seria possível.

À UNIFAL, CAPES e FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

“Não há fatos eternos, como não
há verdades absolutas”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

O ambiente perinatal é crucial para a programação metabólica e hormonal e a qualidade deste ambiente em roedores tem consequências fisiológicas e comportamentais em longo prazo. Condições desfavoráveis no período perinatal, época em que ocorre o desenvolvimento do sistema regulador do balanço energético podem reprogramar o metabolismo e ajustá-lo nesta condição por toda a vida. Um dos modelos experimentais de programação neonatal é obtido por meio da redução de ninhada, em que ninhadas são padronizadas para três ou quatro filhotes por mãe. O maior aporte nutricional em períodos precoces de desenvolvimento promove uma programação metabólica e os efeitos desta programação podem se estender durante toda a vida, com a sobrenutrição pós-natal levando à obesidade na vida adulta. Uma vez que os tecidos adiposos subcutâneo e abdominal são descritos como tecidos ativos na regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo imunidade e inflamação torna-se importante avaliar se a sobrealimentação e o sobrepeso advindos da redução do tamanho da ninhada levam a alterações nas respostas comportamentais e inflamatórias em filhotes adultos. Em resposta ao lipopolissacarídeo, ratos machos adultos com sobrepeso de nosso estudo exibiram uma exacerbação das respostas comportamentais e aumento da febre, além de aumento nos níveis plasmáticos de corticosterona e de citocina pró-inflamatória IL-1 β . Em conclusão, nossos resultados demonstram que o sobrepeso e suas consequências interferem na capacidade destes animais de reagirem ao desafio imunológico. Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas.

Palavras-chave: Programação metabólica. Sobrepeso. Obesidade. Lipopolissacarídeo. Resposta comportamental. Resposta inflamatória.

ABSTRACT

The perinatal environment is crucial for metabolic and hormonal programming and the quality of the environment in rodents have physiological and behavioral consequences in long-term. Adverse conditions in the perinatal period, a time when there is the development of the regulatory system of energy balance can reprogram metabolism and adjust it in this condition for life. One of the experimental models of neonatal programming is obtained by reducing litter, where litters are standardized for three or four pups per mother. The largest nutritional supply in early periods of development promotes a metabolic programming and the effects of this program can extend throughout life, with the postnatal overnutrition leading to obesity in adulthood. Since subcutaneous and abdominal adipose tissues are described as active tissues in the regulation of physiological and pathological processes including immunity and inflammation it becomes important to evaluate if the overfeeding and overweight arising from reduction in litter size lead to changes in the behavioral and inflammatory responses in adult offspring. In response to lipopolysaccharide, overweight adult male rats of this study exhibited an exacerbation of behavioral responses and increase of fever besides an increased plasma levels of corticosterone and IL-1 β proinflammatory cytokine. In conclusion, our results show that overweight and its consequences interfere with the ability of these animals to respond to immune challenge. The experiments were developed in the Biomedical Sciences Laboratory of the Federal University of Alfenas.

Keywords: Metabolic programming. Overweight. Obesity. Lipopolysaccharide. Behavioral response. Inflammatory response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Modelo de redução de ninhadas.....	22
Figura 2	Representação esquemática dos parâmetros do comportamento maternal e não-maternal em roedores.....	26
Figura 3	Estrutura de lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias Gram-negativas.....	31
Figura 4	Resposta imune inata evocada por LPS endotóxico	32
Figura 5	Delineamento experimental em ratas lactantes.....	44
Figura 6	Avaliação de ratas lactantes de ninhada normal e ninhada reduzida durante a primeira semana de lactação.....	55
Figura 7	Avaliação dos parâmetros maternais de ninhada normal e ninhada reduzida durante a primeira semana de lactação.....	57
Figura 8	Avaliação dos parâmetros não-maternais de ninhada normal e ninhada reduzida durante a primeira semana de lactação.....	59
Figura 9	Gráfico de colunas da avaliação dos parâmetros maternais na primeira semana de lactação em fêmeas de ninhada normal e ninhada reduzida.....	60
Figura 10	Gráfico de colunas da avaliação dos parâmetros não-maternais na primeira semana de lactação em fêmeas de ninhada normal e ninhada reduzida.....	61
Figura 11	Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo de mães de ninhada normal (A) e reduzida (B). Efeitos da redução de ninhadas sobre a expressão de c-Fos no SON de ratas lactantes no DL 7.....	62
Figura 12	Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo de mães de ninhada normal (A) e reduzida (B). Efeitos da redução de ninhadas sobre a expressão de c-Fos no PVN de ratas lactantes no DL 7.....	63
Figura 13	Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo de mães de ninhada normal (A) e reduzida (B). Efeitos da redução de ninhadas sobre a expressão de c-Fos na MPOA em ratas lactantes no DL 7..	64

Figura 14	Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo de mães de ninhada normal (A) e reduzida (B). Efeitos da redução de ninhadas sobre a expressão de c-Fos na BNST em ratas lactantes no DL 7...	65
Figura 15	Ganho de peso corporal de filhotes machos (A) e fêmeas (B) de NN e NR nos DLs 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e peso corporal em machos adultos com 60 dias de vida (C).....	66
Figura 16	Comprimento naso-anal (cm) em filhotes machos (A) e fêmeas (B) de NN e NR nos DLs 2, 10 e 21.....	67
Figura 17	Distância anogenital (mm) em filhotes machos (A) e fêmeas (B) de NN e NR nos DLs 2, 10 e 21.....	68
Figura 18	Índice anogenital (mm) em filhotes machos (A) e fêmeas (B) de NN e NR nos DLs 2, 10 e 21.....	68
Figura 19	Índice de Lee no DL 21 em filhotes machos (A) e fêmeas (B) de NN e NR.....	69
Figura 20	Desenvolvimento físico de filhotes machos (A) e fêmeas (B) de NN e NR dos DLs 2 ao 21.....	70
Figura 21	Tempo de permanência sobre a área com odor maternal no TPOM em filhotes machos e fêmeas de NN e NR no DL7 em 5 tentativas e no tempo total em segundos.....	70
Figura 22	Desenvolvimento reflexivo de filhotes machos (A) e fêmeas (B) de NN e NR dos DLs 2 ao 21.	71
Figura 23	Desenvolvimento sexual de filhotes machos e fêmeas de NN e NR.....	72
Figura 24	Comportamento juvenil de brincadeira em filhotes machos de NN e NR	73
Figura 25	Comportamento juvenil de brincadeira em filhotes fêmeas de NN e NR.....	75
Figura 26	Ingestão alimentar em filhotes machos de NN e NR 2, 4, 6, 8 e 24h após injeções de salina ou LPS.....	77
Figura 27	Porcentagem de preferência à sacarose em filhotes machos de NN e NR, 2h após injeções de salina ou LPS.....	78
Figura 28	Efeitos da aplicação de salina ou LPS sobre o comportamento no aparato de Campo Aberto em machos adultos de NN e NR.....	80

Figura 29	Efeitos da administração de salina ou LPS sobre a variação da temperatura corporal em animais de NN e NR.....	81
Figura 30	Efeitos da administração de salina ou LPS sobre o índice térmico no intervalo de 2-5h após administração em animais de NN e NR...	82
Figura 31	Níveis plasmáticos de CT ($\mu\text{g/dL}$) na 1 ^a , 2 ^a e 4 ^a horas após injeções i.p. de salina ou LPS em filhotes machos adultos de NN e NR.....	83
Figura 32	Níveis plasmáticos de citocinas (pg/mL) 2h após injeções i.p. de salina ou LPS em filhotes machos adultos de NN e NR.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Cronograma das avaliações realizadas em filhotes de ninhada normal e ninhada reduzida.....	48
Tabela 2	Análises de variância de duas vias do CMT e do CNMT de ratas lactantes com ninhada normal e ninhada reduzida na primeira semana de lactação.....	56
Tabela 3	Análises de variância de duas vias do CMT analisado individualmente em ratas lactantes com ninhada normal e ninhada reduzida na primeira semana de lactação.....	58
Tabela 4	Análises de variância de duas vias do CNMT analisado individualmente em ratas lactantes com ninhada normal e ninhada reduzida na primeira semana de lactação.....	59
Tabela 5	Análises de variância de duas vias do ganho de peso corporal de filhotes de ninhada normal e ninhada reduzida do DL 2 ao desmame.....	67
Tabela 6	Análises de variância de duas vias do Comportamento juvenil de brincadeira em machos de ninhada normal e ninhada reduzida.....	74
Tabela 7	Análises de variância de duas vias do Comportamento juvenil de brincadeira em fêmeas de ninhada normal e ninhada reduzida.....	76
Tabela 8	Análises de variância de duas vias da ingestão alimentar em ratos machos adultos após salina ou LPS.....	77
Tabela 9	Análises de variância de duas vias da preferência à sacarose em ratos machos adultos após salina ou LPS.....	79
Tabela 10	Análises de variância de duas vias do teste de Campo aberto em ratos machos adultos após salina ou LPS.....	80
Tabela 11	Análises de variância de duas vias do índice térmico (2-5h) em ratos machos adultos após salina ou LPS.....	82
Tabela 12	Análises de variância de duas vias das dosagens de corticosterona em ratos machos adultos após salina ou LPS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	- hormônio adrenocorticotrófico
AgRP	- peptídeo agouti
AP-1	- proteína ativadora 1
ARC	- núcleo arqueado
AUC	- área sob a curva
BHE	- barreira hematoencefálica
BNST	- bed núcleo da estria terminal
CA	- campo aberto
CART	- fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente
CD 14	- conjunto de diferenciação 14
CJB	- comportamento juvenil de brincadeira
CM	- comportamento maternal
CMT	- comportamento maternal total
CNA	- comprimento nasoanal
CNMT	- comportamento não-maternal total
CO	- monóxido de carbono
COX2	- cicloxigenase 2
CRH	- hormônio liberador de corticotrofina
CT	- corticosterona
CVOs	- órgãos circunventriculares
DAB	- diaminobenzidina
DAG	- distância anogenital
DG	- dia gestacional
DL	- dia lactacional
DPN	- dia pós-natal
EPM	- erro padrão da média
GR	- receptor de glicocorticoide
GPI	- glicosil-fosfatidilinositol
H2O2	- peróxido de hidrogênio

HFD	- <i>high fat diet</i>
HHA	- hipotálamo-hipófise-adrenais
HL	- <i>high licking</i>
5-HT2a	- receptor de serotonina 2a
5-HT2c	- receptor de serotonina 2c
IAG	- índice anogenital
IκB	- inibidor de kappa B
IL	- índice de Lee
IL-1ra	- antagonista de receptor de interleucina 1
IL-1β	- interleucina 1 beta
IL-6	- interleucina 6
iNOS	- óxido nítrico sintetase induzido
IPP	- inibição pré-pulso
IRF3	- fator regulatório 3 de interferon
Kg	- quilograma
LAS	- leptina anti-soro
LBP	- proteína ligadora de lipopolissacarídeo
LFD	- <i>low fat diet</i>
LL	- <i>low licking</i>
LPS	- lipopolissacarídeo
MC2R	- receptor de melanocortina 2
MAPK	- proteínas quinases ativadas por mitógenos
MD-2	- proteína mielóide diferenciadora 2
MPOA	- área pré-óptica medial do prosencéfalo
NA	- núcleo accumbens
NFκB	- fator nuclear kappa B
nm	- nanômetro
nM	- nanomolar
NN	- ninhada normal
NO	- óxido nítrico
NPY	- neuropeptídeo Y
NR	- ninhada reduzida
NTS	- núcleo do trato solitário

OT	- ocitocina
PMAM	- padrões moleculares associados à micróbios
PBS	- tampão fosfato
PG	- prostaglandina
PGE2	- prostaglandina E2
POA	- área pré-óptica
POMC	- pró-opiomelanocorticotropina
PRL	- prolactina
PS	- preferência à sacarose
PVN	- núcleo paraventricular
QO	- quiasma óptico
RIE	- radioimunoensaio
RPM	- rotações por minuto
SG	- <i>self-grooming</i>
SNC	- sistema nervoso central
STAT	- sinal transdutor e ativador da transcrição
SON	- núcleo supra-óptico
VHM	- núcleo hipotalâmico ventromedial
VL	- ventrículo lateral
VTA	- área tegmental ventral
TAB	- tecido adiposo branco
TBE	- tribromoetanol
TNF	- fator de necrose tumoral
TPOM	- teste de preferência ao odor maternal
TLR	- receptor <i>toll- like</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

- °C - graus celsius
- h - hora
- = - igual
- ± - mais ou menos
- < - menor
- / - por
- % - porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3	JUSTIFICATIVA.....	39
4	OBJETIVOS.....	40
4.1	GERAL.....	40
4.2	ESPECÍFICOS.....	40
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.1	ANIMAIS	41
5.2	GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
5.3	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAL.....	42
5.4	AVALIAÇÃO NEURONAL POR IMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-Fos DURANTE A LACTAÇÃO.....	43
5.5	DESENVOLVIMENTOS FÍSICO E REFLEXIVO DOS FILHOTES.	44
5.6	DESENVOLVIMENTOS SEXUAL DOS FILHOTES.....	46
5.7	COMPORTAMENTO JUVENIL DE BRINCADEIRA	47
5.8	TESTES COMPORTAMENTAIS APÓS INDUÇÃO DE COMPORTAMENTO DOENTIO COM LPS.....	48
5.8.1	Ingestão alimentar.....	49
5.8.2	Preferência à sacarose.....	49
5.8.3	Campo aberto.....	50
5.9	MONITORAMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL.....	51
5.10	DOSAGEM DE CORTICOSTERONA.....	52
5.11	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	53
5.12	DROGAS.....	53
5.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
6	RESULTADOS.....	55
6.1	COMPORTAMENTO MATERNAL.....	55
6.2	AVALIAÇÃO NEURONAL POR IMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-Fos DURANTE A LACTAÇÃO.....	61
6.4	COMPORTAMENTO JUVENIL DE BRINCADEIRA	72

6.5	TESTES COMPORTAMENTAIS APÓS INDUÇÃO DE COMPORTAMENTO DOENTIO COM LPS.....	76
6.5.1	Ingestão alimentar.....	76
6.5.2	Preferência à sacarose.....	78
6.5.3	Campo aberto.....	79
6.5.4	Monitoramento da temperatura corporal.....	81
6.6	DOSAGENS DE CORTICOSTERONA.....	82
6.7	DOSAGENS DE CITOCINAS.....	84
7	DISCUSSÃO.....	85
8	CONCLUSÃO.....	95
	REFERÊNCIAS.....	96
	ANEXO A.....	123
	ANEXO B.....	124

1 INTRODUÇÃO

A programação constitui-se em fenômeno epigenético que fundamenta as relações entre nutrição, ambiente e estresse, os quais agindo em um período precoce e crítico na vida podem mudar o desenvolvimento do organismo (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; DE MOURA; PASSOS, 2005). Condições desfavoráveis no período perinatal, época em que ocorre o desenvolvimento do sistema regulador do balanço energético podem reprogramar o metabolismo e ajustá-lo nesta condição por toda a vida (BRUNTON et al., 2013; BRUNTON; RUSSELL, 2010).

A programação é considerada um fenômeno adaptável para a sobrevivência, tanto dos que vivem em áreas nutricionalmente deficientes e em condições de estresse quanto em condições de oferta abundante de nutrientes, no qual esses organismos podem estar em risco de desenvolver doenças metabólicas, como obesidade, dislipidemia, diabetes e hipertensão (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; DE MOURA; PASSOS, 2005).

Um dos modelos experimentais de programação neonatal e obesidade é obtido por meio da redução de ninhada, em que ninhadas são padronizadas para três ou quatro filhotes por mãe. O maior aporte nutricional em períodos precoces de desenvolvimento promove uma programação metabólica (PLAGEMANN et al., 1999) e os efeitos desta programação podem se estender durante toda a vida, com a sobrenutrição pós-natal levando à obesidade na vida adulta (BOULLU-CIOCCA et al., 2005; SPENCER; TILBROOK, 2009).

Entre os fatores não nutricionais relacionados ao ambiente neonatal estão aqueles que dizem respeito ao comportamento materno. Um ambiente materno adequado é capaz de prover aos filhotes condições essenciais à sobrevivência dos mesmos e modificações no ambiente neonatal afetam a qualidade e a quantidade do comportamento materno em relação aos filhotes, com consequências no desenvolvimento e comportamento (DIMITSANTOS et al., 2007).

Neste estudo, avaliamos os efeitos das mudanças no ambiente materno neonatal sobre o comportamento materno e o desenvolvimento da prole. Estudamos também os efeitos das mudanças neonatais pela redução de ninhadas sobre o

comportamento de brincar em filhotes na fase juvenil, através do comportamento juvenil de brincadeira. A brincadeira é um comportamento bastante frequente na vida de animais jovens, principalmente mamíferos e seu estudo pode ser considerado um meio pelo qual é possível compreender como ocorre o desenvolvimento comportamental e social nestes animais. Esta habilidade social é um dos principais indicadores de desenvolvimento saudável em animais e humanos e a maioria dos mamíferos gasta uma substancial parte de sua maturação engajados em brincadeira com parceiros (TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2010).

Uma vez que os efeitos da programação nutricional neonatal podem perpetuar-se durante toda a vida, avaliamos e discutimos algumas das modificações comportamentais, endócrinas e inflamatórias que ocorrem em ratos adultos em razão do sobrepeso / obesidade.

A obesidade é uma doença muito comum que tem alcançado status de epidemia em muitos países desenvolvidos (BESSESEN, 2008), estando associada ao aumento na susceptibilidade e morbidade a infecções (FALAGAS; KOMPOTI, 2006), entre elas as infecções cutâneas, periodontais e respiratórias (GARCIA, 2002; WOOD; JOHNSON; STRECKFUS, 2003; SALERNO et al., 2004). Alterações na resposta imune à infecção foram observadas em vários modelos genéticos animais de obesidade (IKEJIMA et al., 2005; IVANOV; KULCHITSKY; ROMANOVSKY, 2001; IVANOV; ROMANOVSKY, 2002; LUGARINI et al., 2005; O'CONNOR et al., 2005; PARK et al., 2009) e camundongos obesos mostraram alterações na resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo (LPS), com aumento na expressão e liberação de citocinas no plasma, baço, fígado e macrófagos peritonias (LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012). Além disso, aumentos na expressão de citocinas no hipotálamo e tecido adiposo em resposta ao LPS foram observados em ratos obesos após dieta com frutose (ORLANDI et al., 2015).

Nesse contexto são escassos os trabalhos que investigaram os efeitos dos distúrbios metabólicos induzidos pela redução de ninhadas sobre as respostas inflamatórias e comportamentais na prole adulta. Considerando que essas respostas podem se modificar em razão da programação e das modificações metabólicas ocorridas no período neonatal, nossos estudos tiveram por objetivo avaliar as respostas de comportamento doentio induzido por LPS em ratos machos adultos com sobrepeso pela redução de ninhadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A gestação e a lactação são um período crítico para o futuro estado nutricional e hormonal da progênie, uma relação que é denominada de programação. A definição de “programação” é a resposta adaptativa, em fetos, a um ambiente intrauterino adverso (LUCAS, 1991). Segundo a hipótese do fenótipo econômico, o desenvolvimento fetal é sensível ao ambiente nutricional (HALES; BARKER, 1992).

A programação atua de forma a aumentar as chances de sobrevivência do feto em condições precárias de nutrição e promover modificações no metabolismo pós-natal (GOTTLIEB; DA CRUZ; BODANESE, 2008). Condições desfavoráveis no período perinatal, época em que ocorre o desenvolvimento do sistema regulador do balanço energético podem reprogramar o metabolismo e ajustá-lo nesta condição por toda a vida (BRUNTON et al., 2013; BRUNTON; RUSSELL, 2010). Um ambiente prejudicial durante um período crítico de desenvolvimento tem efeitos persistentes, enquanto que este mesmo ambiente fora deste período crítico somente induz mudanças reversíveis (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). Entre os fatores de programação estão: nutrição, hormônios, estímulos físicos, como temperatura, ciclo claro-escuro e agentes estressores (DE MOURA; LISBOA; PASSOS, 2008; DE MOURA; PASSOS, 2005).

A importância do estado nutricional no feto estende-se ao período logo após o nascimento, uma vez que é neste período que ocorrem os eventos de plasticidade fisiológica (BUCKLEY; JAQUIERY; HARDING, 2005) e manipulações dietéticas em idade prematura podem afetar o desenvolvimento dos circuitos hipotalâmicos ligados à regulação da ingestão alimentar (VELKOSKA et al., 2008). A melhora do aporte nutricional e o ambiente mais favorável podem tornar os efeitos da programação ocorrida neonatalmente prejudiciais, dando origem a doenças metabólicas, cardiovasculares e renais no início da vida adulta (BARKER, 2007).

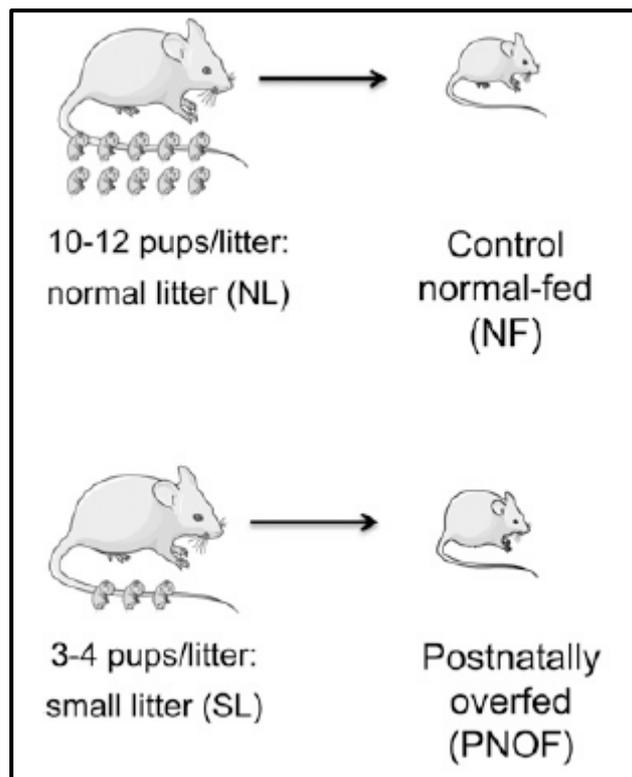
Durante o período de amamentação, a diminuição ou o aumento da ingestão de leite, através dos ajustes padronizados no tamanho das ninhadas são capazes de programar mudanças adaptativas que persistem na vida adulta do animal. Estes ajustes no tamanho das ninhadas possibilitam que neonatos de ninhadas maiores sejam utilizados como modelo de estudo da subnutrição (LORANCA; TORRERO; SALAS, 1999; WILLIAMS et al, 2003), enquanto que os de

ninhadas menores o sejam como modelo de sobrenutrição (DAVIDOWA; YUZHEN; PLAGEMANN, 2003; HABBOUT et al., 2013; HOU et al., 2011; MARTINS et al., 2008; PLAGEMANN et al., 1999a; PLAGEMANN et al., 2010; RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2011).

O modelo experimental de redução de ninhadas é utilizado para se estudar os efeitos da programação nutricional neonatal sobre a vida futura do animal (PLAGEMANN et al., 1999; PLAGEMANN et al., 1999a; VELKOSKA; COLE, MORRIS, 2005)

A Figura 1 mostra a representação esquemática da ninhada normal (10/12 filhotes), com padrão de alimentação pós-natal regular e da ninhada reduzida (3/4 filhotes), com padrão de sobrealimentação pós-natal.

Figura 1 - Modelo de redução de ninhada.



Fonte: Adaptado de Habbout et al., 2013.

A sobrealimentação neonatal em razão da redução no tamanho das ninhadas leva à hiperfagia e maior adiposidade visceral (CONCEIÇÃO et al., 2011), aumento nos níveis de glicose, insulina, triglicerídeos e leptina ao desmame e na vida adulta

(BOULLU-CIOCCA et al., 2005, HOU et al., 2011; LOPEZ et al., 2005, RAJIA; CHEN; MORRIS, 2010; RODRIGUES et al., 2011), maiores níveis plasmáticos de corticosterona ao desmame e no período juvenil (RÖDEL et al., 2010) e prejuízo no metabolismo de glicocorticoides (HOU et al., 2011), hipertensão e disfunção renal (BOUBRED et al., 2007; PLAGEMANN et al., 1999a; YIM et al., 2013), hipertrofia cardíaca (MOREIRA, 2009), aumento do estresse oxidativo e da resistência à insulina no fígado, levando à disfunção hepática quando adultos (CONCEIÇÃO et al., 2013). Outras anormalidades advindas do modelo de sobrealimentação neonatal incluem hiperinsulinemia, resistência insulínica e aumento da sensibilidade à insulina no coração (PEREIRA et al., 2006; PLAGEMANN et al., 2010), menor sensibilidade à insulina no tecido adiposo epididimal (RODRIGUES et al., 2007), no coração (MARTINS et al., 2008) e nas células beta-pancreáticas (CUNHA et al., 2009).

A leptina tem sido estudada em modelos de sobrealimentação neonatal, uma vez que este hormônio tem como principal função a inibição da ingestão alimentar (CUMMINGS et al., 2004), atuando na redução do apetite ao informar o cérebro que os estoques de energia em forma de gordura estão adequados através da inibição da formação de neuropeptídeos relacionados ao apetite (VILLANUEVA; MYERS JR., 2008). É produzida na placenta e principalmente no tecido adiposo, tendo como reguladores a massa de tecido adiposo e hormônios que agem na regulação do metabolismo energético, como a insulina e os glicocorticoides (EHRHARDT et al., 2001).

A interação da leptina com seu receptor se dá no contexto dos neurônios produtores de neuropeptídeos e neurotransmissores que aumentam (orexígenos) ou diminuem (anorexígenos) a ingestão alimentar. Assim, a leptina tem ação em quatro peptídeos produzidos em neurônios do núcleo arqueado (ARC): o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo agouti (AgRP), a pró-opiomelanocorticotropina (POMC) e o fator de transcrição cocaína-anfetamina dependente (CART). Embora seja um modelo incompleto, postula-se que a leptina suprima a atividade dos neurônios que produzem NPY/AGRP (efeito orexígeno) e que ela estimule a atividade de neurônios produtores de POMC ou CART (efeito anorexígeno) (SCHWARTZ et al., 2000).

Modificações nas ações da leptina e da insulina em neurônios hipotalâmicos ocorrem em animais com sobrepeso por redução de ninhadas, indicando uma resistência aos sinais circulantes de adiposidade. O NPY tem relevante função na regulação da ingestão alimentar e no controle do peso corporal, através da ação

orexígena no ARC e no núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo. A hiperinsulinemia e hiperleptinemia em animais neonatos sobrealimentados não aumentam os níveis de NPY, embora haja um aumento na expressão de neurônios NPY no ARC e na concentração deles no PVN, mostrando claramente a desorganização e má-programação do sistema hipotalâmico nestes animais (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000; DAVIDOWA; YUZHEN; PLAGEMANN, 2003; PLAGEMANN et al., 2006).

A relação entre eventos precoces da vida e saúde na idade adulta parece ser em parte, mediada pela influência do cuidado maternal sobre o desenvolvimento de sistemas neuronais que fundamentam a expressão comportamental e as respostas neuroendócrinas ao estresse na prole. Assim, a manipulação neonatal pode afetar o comportamento da mãe e a relação mãe-filhote induzindo mudanças fisiológicas e comportamentais em resposta aos estímulos externos, as quais perduram durante toda a vida do animal (MEANEY, 2001).

O conjunto de cuidados que as fêmeas lactantes oferecem aos seus filhotes, desde o nascimento até que eles desenvolvam características e habilidades para garantirem a própria sobrevivência é chamado de comportamento maternal (CM) (ANGO-PEREZ et al., 2014; CROWELL-DAVIS; HOUP, 1986; FERREIRA et al., 2002; PIRES et al., 2013; VILELA, 2011). O CM em mamíferos e roedores assegura a sobrevivência dos filhotes e provê nutrição, calor, estimulação sensorial, limpeza e proteção (CUMMINGS; CLEMENS; NUNEZ, 2010), regulando o desenvolvimento dos sistemas fisiológico, social, emocional, cognitivo e comportamental da prole (FLEMING; DAY; KRAEMER, 1999; FLEMING et al., 2002).

O CM é modulado pela experiência derivada do parto (ROSENBLATT, 1992) e pela estimulação somatossensorial que a fêmea recebe dos filhotes (ROSENBLATT et al, 1979; STERN, 1989).

Perto da data do parto, a mãe inicia uma série de mudanças comportamentais que visam receber adequadamente os filhotes, as quais incluem mudanças no padrão de limpeza corporal, levando mais tempo na limpeza da região mamária e construção de um ninho com o substrato disponível (NUMAN, 1988).

Em ratos, o CM ocorre com maior frequência nos primeiros dez dias após o parto e diminui a partir daí (GROTA; ADER, 1969). A motivação maternal é estruturada neste período, no qual a mãe adquire experiência interagindo com o recém-nascido (POINDRON, 2005).

O CM tem seu auge nas duas primeiras semanas após o parto, diminuindo gradativamente durante o crescimento dos filhotes, até que eles se tornem mais independentes na autorregulação térmica e na procura de alimento e a mãe torne-se menos responsiva às demandas da prole (NUMAN, 1994). Depois de duas semanas do nascimento há um declínio gradual dos cuidados maternos, até que ocorra a rejeição dos filhotes pela mãe ao desmame, o qual ocorre aproximadamente aos 28 dias de vida (REISBICK; ROSENBLATT; MAYER, 1975)

O rápido aparecimento do CM é decorrente das mudanças endócrinas maternas no período perinatal, como modificações nos níveis de estrogênio e progesterona. Os níveis circulantes de estrogênios permanecem baixos até a metade da gravidez e os níveis de progesterona aumentam (MANN, 2006; NOVAKOV; FLEMING, 2005). A queda brusca da progesterona e aumento nos níveis de estrógeno e prolactina (PRL) são essenciais para o início imediato do CM junto ao parto (NUMAN, 1994).

As ações de ratas lactantes para com seus filhotes podem ser diretas ou indiretas. As ações diretas incluem a construção do ninho, o recolhimento dos filhotes, a estimulação à micção através da lambida anogenital e o posicionamento da mãe sobre os filhotes (MANN, 2006). Além destas, a postura arqueada de ratas lactantes expõe as mamas e facilita a ejeção do leite pela sucção (STERN; JOHNSON, 1990).

Quanto às ações indiretas de lactantes em relação aos filhotes temos o comportamento agressivo contra o intruso (defesa própria e da ninhada) e comportamentos preditivos de ansiedade reduzida, denominado de ansiólise maternal (BOSCH et al., 2005; FLEMING; LUEBKE, 1981; VILELA, GIUSTI-PAIVA, 2011).

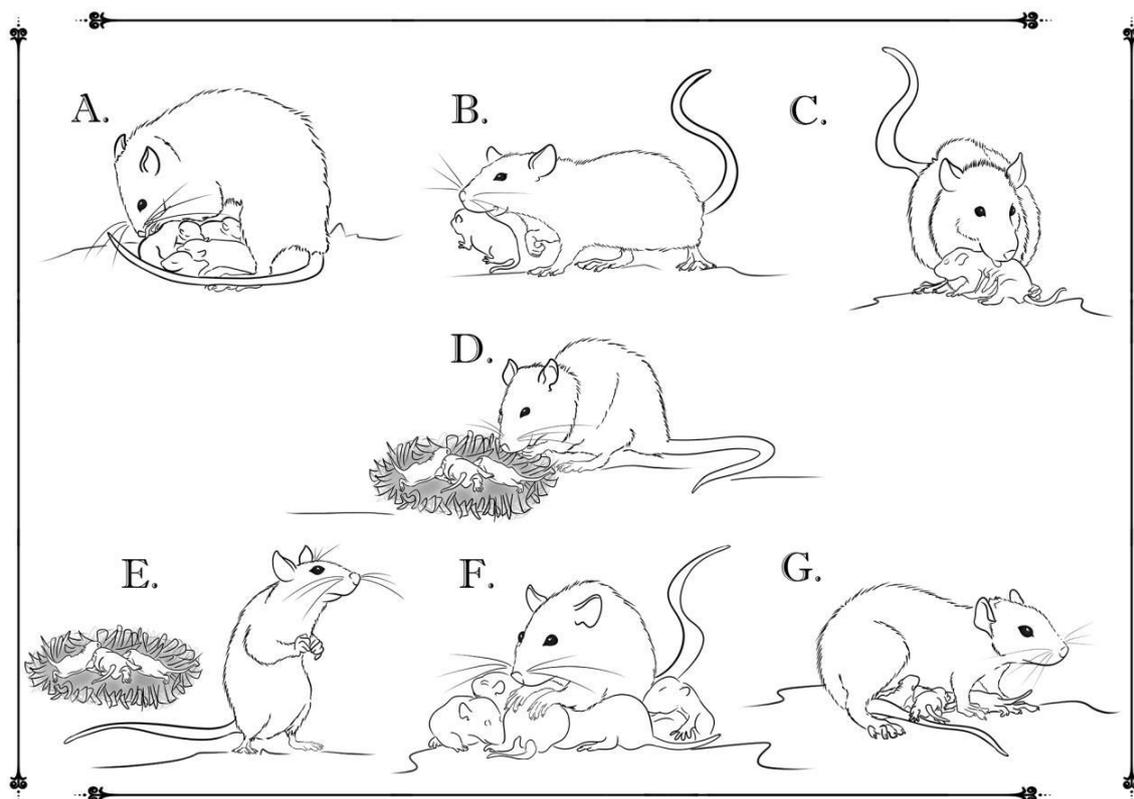
A lambida constitui-se em importante medida da qualidade dos cuidados maternos, pois além de manter os filhotes limpos e promover a micção e defecção, tem alto impacto sobre o desenvolvimento emocional e social da prole (BOSCH; NEUMANN, 2012).

Variações nos parâmetros de lambidas durante os primeiros dez dias de vida da prole mostram repercussões na fase adulta. Filhotes de mães consideradas altamente lambedoras - HL (*high licking*) exibem respostas atenuadas ao estresse (LIU et al., 1997), além de apresentarem abertura dos olhos mais precocemente e comportamento de medo reduzido quando avaliados no teste de campo aberto

comparados aos filhotes de mães pouco lambedoras – LL (*low licking*) (URIARTE et al.; 2007).

Na Figura 2 estão representados alguns parâmetros maternos e não-maternais em roedores que são observados durante a análise do comportamento maternal.

Figura 2 - Representação esquemática dos parâmetros do comportamento maternal e não-maternal em roedores.



Nota: Cifose (A), Carregando filhote (B), Lambendo filhote (*pup-grooming/licking pups*) (C), Construindo ninho (D), Fora do ninho (E), Agrupando os filhotes (F), Sobre os filhotes (G).

Fonte: Veronesi, V. B., 2016.

O comportamento maternal pode modular as respostas ao estresse, com impacto substancial sobre o desenvolvimento comportamental, endócrino e neural da prole (DIMITSANTOS et al., 2007; KAFFMAN; MEANEY, 2007).

Diferenças individuais na frequência de lambidas e cifose em ratas lactantes contribuem para o desenvolvimento de diferenças na responsividade ao estresse na prole adulta (CALDJI et al., 1998). A deficiência no cuidado maternal torna os filhotes hiperresponsivos ao estresse e mais suscetíveis a doenças e problemas comportamentais na vida adulta (CIRULLI; BERRY; ALLEVA, 2003; NEWPORT;

STOWE; NEMEROFF, 2002; SEIPP; JOHNSTON, 2005; WEAVER et al., 2004), enquanto que respostas atenuadas ao estresse foram observadas com o aumento do cuidado maternal, mostrando ser o eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (HHA) sensível aos eventos de programação neonatal em ratos (CHAMPAGNE et al., 2003; LIU et al, 1997; WEAVER et al., 2004; ZHANG et al., 2013).

O estudo do sistema neuroendócrino em ratos durante o período peripuberal envolve uma cascata, em que as condições ambientais em um estágio do desenvolvimento podem modificar experiências em estágios posteriores. Em apoio a esta ideia, estudos prévios mostraram que manipulações durante o período pré-natal ou neonatal afetam a frequência da brincadeira na fase juvenil (PARENT; MEANEY, 2008). Desta forma, o estresse pré-natal da mãe feminiliza a brincadeira juvenil causando diminuição da mesma em ratos machos, mostrando que a diferenciação sexual da brincadeira social começa durante o período pré-natal (WARD; STEHM, 1991). Além disso, a administração de estradiol ou testosterona durante o período neonatal masculiniza comportamentos sociais em fêmeas (OLESEN et al, 2005; PELLIS; PELLIS; KOLB, 1992; PELLIS et al., 1997).

O comportamento juvenil de brincadeira (CJB) é considerado uma das mais precoces formas de comportamento social não diretamente relacionado à mãe em roedores e é considerada uma vigorosa forma de interação social em mamíferos jovens (SPEAR, 2000; VANDERSCHUREN; NIESINK; VAN REE, 1997). Esta habilidade social é um dos principais indicadores de desenvolvimento saudável em animais e humanos e a maioria dos mamíferos gasta uma substancial parte de sua maturação engajados em brincadeira com parceiros (TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2010).

A brincadeira é um comportamento bastante frequente na vida de animais jovens e ocorre em muitas espécies animais, principalmente primatas, roedores, carnívoros, ungulados, elefantes e cetáceos (GRAHAM; BURGHARDT, 2010). Em ratos, a brincadeira juvenil é crítica para o desenvolvimento de comportamentos sociais normais, incluindo o reconhecimento familiar de coespecíficos e a expressão apropriada de comportamentos agressivos e reprodutivos (NORTHCUTT; NGUYEN, 2014).

O estudo da brincadeira pode ser um meio pelo qual é possível compreender como ocorre o desenvolvimento comportamental e social em animais. As investigações do comportamento social de brincadeira abrangem aspectos como

característica do mesmo, diferenças sexuais, áreas cerebrais e neurotransmissores envolvidos e alterações no ambiente social, os quais poderiam influenciar a organização deste comportamento.(VIEIRA; SARTORIO, 2002). Além disso, a idade interfere decisivamente neste comportamento lúdico e é fator relevante para que a brincadeira ocorra. É, portanto, característica de animais jovens que estão em desenvolvimento, tendo seu início por volta do 18º dia de vida, com picos durante o período pré-puberal (dias 30-40), diminuindo após a puberdade (AUGER; OLESEN, 2009). A brincadeira social é observada como mordida, luta, investida e imobilização (*bite, wrestling/boxing, pouncing, pinning*) (VANDERSCHUREN; NIESINK; VAN REE, 1997; THOR; HOLLOWAY, 1984). *Pouncing* é o ato de pular ou avançar sobre a nuca do companheiro, é considerado uma iniciação ou solicitação de brincadeira, enquanto que *pinning* é usado para determinar o “status” de dominância entre juvenis (MEANEY; STEWART, 1981). Durante o encontro social, *pinning* é considerado a postura mais óbvia do comportamento social de brincadeira e funciona como uma libertação de uma luta prolongada (PANKSEPP, SIVIY; NORMANSELL, 1984; PELLIS; PELLIS, 1987). Após um período variável de isolamento social, os animais apresentam maiores frequências de parâmetros de comportamento de brincar (AUGER; OLESEN, 2009; PANKSEPP; BEATTY, 1980). Além disso, a brincadeira decai com o passar do tempo (HOLE, 1991).

O CJB é considerado sexualmente dimórfico, com machos exibindo maiores níveis de brincadeira social que as fêmeas em razão dos maiores níveis circulantes de testosterona em machos (AUGER; OLESEN, 2009; MEANEY et al, 1983; MEANEY; STEWART,1981a; OLIOFF; STEWART, 1978). Fêmeas de roedores interrompem mais frequentemente um episódio de brincadeira do que os machos. (MEANEY; STEWART; BEATTY, 1985) e eventos de interação social entre elas tendem a ser mais curtos (HOLE, 1988). Além disso, são mais prováveis de serem imobilizadas pelo parceiro de brincadeira, enquanto que machos adotam táticas defensivas que levam mais frequentemente à luta (PELLIS; PELLIS, 1990).

O estudo de comportamentos sociais tem crescido nos últimos anos. Desordens psiquiátricas como a esquizofrenia podem levar ao afastamento e isolamento social em humanos e roedores (CANNON et al, 2008; SCHNEIDER; KOCH, 2005) e déficits no CJB e em outros tipos de interação social após infecção neonatal e injúria cerebral em ratos foram descritos como modelo de autismo (KIRSTEN et al., 2012; LANCASTER, 2007; PLETNIKOV et al., 1999).

A compreensão do desenvolvimento do CJB continua a ser extremamente difícil devido à incoerência metodológica entre os estudos, havendo necessidade de padronização na coleta e análise deste comportamento, o que aumentará a habilidade de comparações com futuros estudos e facilitará a translação para a saúde humana (BLAKE; MCCOY, 2015).

O impacto duradouro que modificações nutricionais, metabólicas e hormonais no ambiente intrauterino e no período pós-natal exercem sobre a determinação de processos vitais futuros está bem consolidado na literatura (PLAGEMANN, 2006). O modelo de redução de ninhadas em roedores é um modelo experimental bastante útil para se estudar os efeitos da programação neonatal sobre eixos metabólicos na vida adulta, uma vez que a maturação neuroendócrina em roedores ocorre principalmente durante o período pós-natal (MATTHEWS, 2002). O maior aporte nutricional em ninhadas menores, através do modelo de redução de ninhadas tem sido estudado por pesquisadores tanto em ratos quanto em camundongos (HABBOU et al., 2013; HOU et al., 2011; MARTINS et al., 2008; PLAGEMANN et al., 1999; PLAGEMANN et al., 2010; RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2011) e suas consequências mais relevantes envolvem o sobrepeso e a obesidade.

A obesidade é uma doença muito comum que tem alcançado status de epidemia em muitos países desenvolvidos (BESSESEN, 2008) e está associada ao desenvolvimento de comorbidades como doenças cardiovasculares, dislipidemias, diabetes e disfunção hepática, entre outras (CONCEIÇÃO et al., 2013).

Uma das mais importantes descobertas das pesquisas em obesidade é o conceito de que ela é caracterizada por uma inflamação crônica de baixo grau. Novo enfoque tem sido dado à resposta inflamatória do tecido adiposo branco (TAB), o qual é considerado um importante órgão endócrino metabolicamente ativo (RITCHIE; CONNELL, 2007; ANTUNA-PUENTE et al., 2008).

A ligação entre o acúmulo de tecido adiposo e mudanças em marcadores inflamatórios tem sido descrita na literatura (BULLO et al., 2007; FANTUZZI, 2005; JUGE-AUBRY; HENRICHOT; MEIER, 2005). Indivíduos obesos têm aumento em marcadores inflamatórios como a proteína C-reativa e a interleucina 6 (IL-6), com o TAB contribuindo com aproximadamente 30% da IL-6 circulante (FANTUZZI, 2005). A inflamação sistêmica de baixo grau na obesidade leva a um aumento na concentração das adipocinas pró-inflamatórias, entre elas a IL-6, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a leptina e a adiponectina (anti-inflamatória), as quais exercem

grande impacto em diversas funções corporais que estão fortemente correlacionadas com doenças cardiovasculares (SOUZA et al., 2008).

Mas o processo inflamatório no tecido adiposo é diverso da inflamação resultante da ativação do sistema imune pela invasão de microorganismos.

A inflamação é descrita na literatura como uma resposta recrutada pelo organismo diante de lesões, apresentando características como edema, vermelhidão, dor e febre, os quais determinam os sinais cardinais da inflamação como tumor, rubor, dor e calor (LARSEN; HENSON, 1983). A inflamação constitui-se em mecanismo de defesa para combater os estímulos nocivos e iniciar o processo de reparação tecidual, caracterizando-se por uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares a estímulos lesivos como danos celulares, irritantes físicos ou químicos e patógenos (GALLIN; GOLDSTEIN; SNYDERMAN, 1992).

A resposta inflamatória frente a um microorganismo decorre do reconhecimento desses agressores através dos sistemas de reconhecimento de agentes patogênicos como os receptores do tipo *toll-like* (TLR) do sistema imune do organismo. Diversas células como as células musculares, enterócitos, adipócitos e macrófagos expressam os receptores TLR, o que estabelece uma integração entre o sistema imune e metabólico (BEUTLER, 2004; SONG et al., 2006). Estes receptores têm como seus ligantes o lipopolissacarídeo e os ácidos graxos saturados. A ligação entre esses ligantes e o receptor estimula a síntese de citocinas pró-inflamatórias, as quais atuam como mediadores da inflamação patogênica e da inflamação decorrente da obesidade.

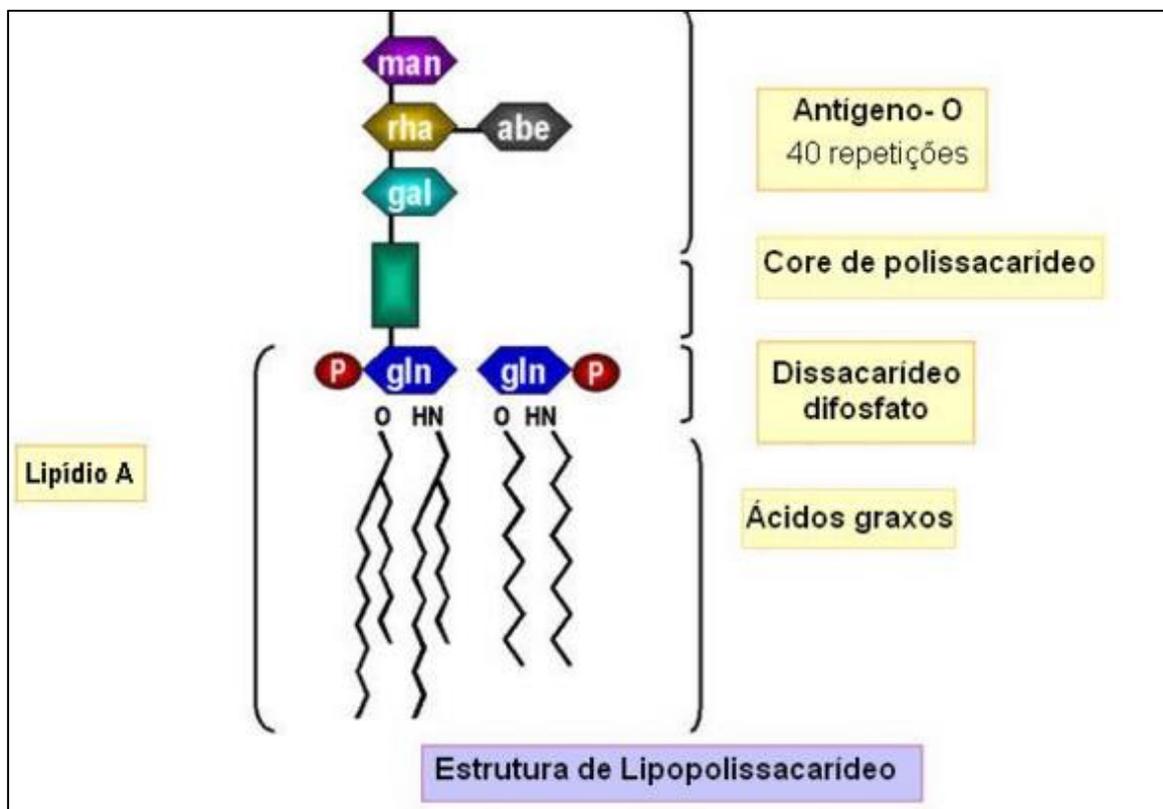
A ativação do sistema imune a partir de estressores biológicos é frequente em modelos experimentais e consiste na aplicação de LPS ou endotoxina (KELMER, 2009). O LPS é uma molécula altamente tóxica derivada da membrana celular externa de bactérias gram-negativas e sua liberação ocorre quando a bactéria se multiplica ou quando é fagocitada e degradada pelas células de defesa (TUIN et al., 2006).

A endotoxina é considerada o principal fator responsável pelas manifestações tóxicas de infecções por bactérias gram-negativas e também pela inflamação sistêmica (RIETSCHEL et al., 1994), sendo extremamente tóxica para animais, apresentando efeito em concentrações menores que 1 nM (ADEREM; ULEVITCH, 2000).

Sua estrutura consiste em duas camadas de açúcar e uma camada lipídica, uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, respectivamente, sendo a porção lipídica, chamada de Lipídeo A, considerada a principal responsável pela ação antigênica do LPS (RAETZ; WHITFIELD, 2002) (Figura 3).

O organismo está preparado para detectar pequenas quantidades de LPS circulante de forma a combater o foco infeccioso. Conforme já descrito, o LPS desencadeia vias de sinalização intracelular através de sua ligação a receptores localizados na membrana celular, denominados receptores *Toll-like 4* (TLR4), considerados sensores primários de infecções microbianas (POLTORAK et al., 1998).

Figura 3 – Estrutura de lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas

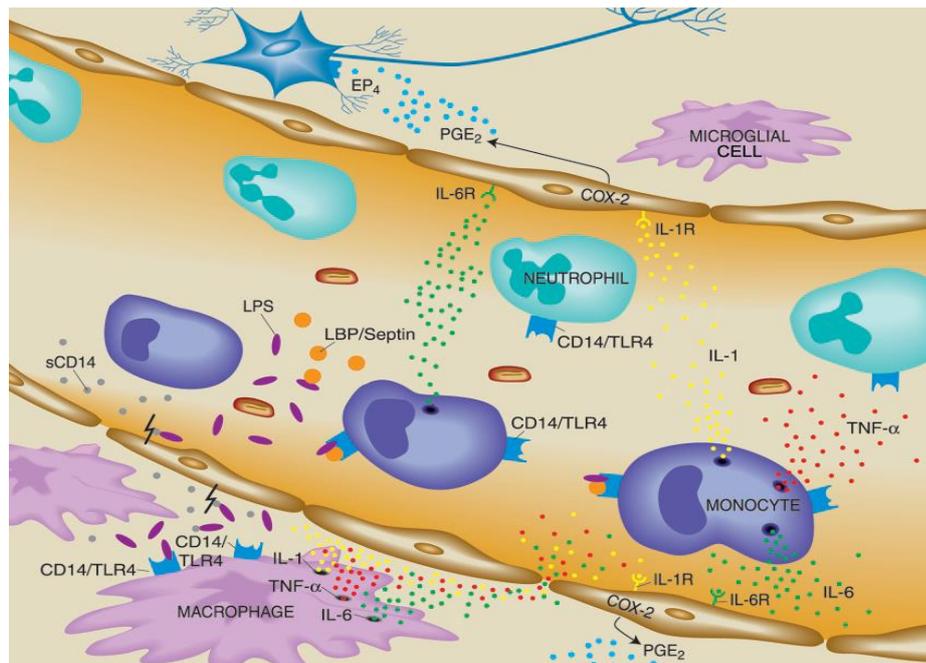


Fonte: <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/lipo-portuguese.jpg>

O reconhecimento do LPS pode ser mediado por outras moléculas como a LBP (*Lipopolysaccharide Binding Protein*), proteína ligadora de LPS, a proteína CD14 (*Cluster of Differentiation*), conjunto de diferenciação 14 em sua forma solúvel ou ancorada à membrana celular (sCD14 e mCD14, respectivamente) e ainda a proteína mielóide diferenciadora 2 (MD-2) que também pode ser encontrada nas

duas formas. As proteínas LBP, MD-2 e sCD14 agem como proteínas auxiliares, com a função de transferir LPS para o receptor TLR4 ou para o complexo formado entre o receptor TLR4 e a proteína MD-2, sendo esse complexo considerado como a principal forma de reconhecimento do LPS (SHIMAZU et al., 1999; AKIRA; TAKEDA, 2004) (Figura 4).

Figura 4 - Resposta imune inata evocada por lipopolissacarídeo endotóxico (LPS).



Nota: Secreção de citocinas por monócito/neutrófilos e macrófagos teciduais circulantes por LPS. Ligação do LPS com a LBP ou septinas. O complexo recém-formado ativa diferentes células por ligação ao seu receptor CD14 e receptor toll-like 4 (TLR4). Duas formas de receptores CD14 podem ser encontrados. O primeiro está presente na superfície das células mielóides (mCD14) e atua como uma glicosil-fosfatidilinositol (GPI)-glicoproteína de membrana ancorada, a outra forma é solúvel no soro (sCD14) e tem as propriedades de GPI, embora possa se ligar ao LPS para ativar as células desprovidas de mCD14, tais como células endoteliais. O complexo LPS/LBP é eficaz em ativar células de origem mielóide (neutrófilos, monócitos, macrófagos e micróglia), levando à produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, TNF e IL-6. Estas citocinas podem se ligar aos seus receptores cognatos expressos na superfície de células que formam a BHE (barreira hematoencefálica), mas não são essenciais para a mediação dos efeitos de LPS no SNC.

Fonte: ZHANG, J; RIVEST, S., 2003, modificado.

A ativação dos receptores TLR4 é capaz de desencadear várias vias de sinalização, entre elas a MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos), AP-1 (proteína ativadora 1), STAT (sinal transdutor e ativador da transcrição), IRF3 (fator regulatório 3 de interferon), entre outras. Uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via do fator de transcrição NFκB (fator nuclear kappa B) que ao se translocar ao

núcleo, promove a transcrição de diversos genes que participam de processos fisiológicos e fisiopatológicos (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

Dentre as diversas respostas e atividades fisiológicas controladas pelo NFκB, sua ação sobre processos inflamatórios e imunes, apoptose, diferenciação celular e ativação da proliferação de células tumorais estão entre os mais bem estudados e compreendidos até o momento (CRUZ-MACHADO, 2010). O NFκB age para mediar a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α, IL-6 e a interleucina 1β (IL-1β), enzimas como iNOS (óxido nítrico sintetase induzível), COX-2 (cicloxigenase 2), receptores de bradicinina B1, prostaglandinas, histamina e serotonina e a transcrição da proteína repressora IκB-alfa (inibidor de kappa B), o que resulta na auto-inibição do sistema (CRUZ-MACHADO, 2010; DE PAIVA et al., 2010; GHOSH; HAYDEN, 2008; KELMER, 2009; NISHIO et al., 2013).

A produção dessas proteínas promove uma sinalização variada para outras células do organismo, principalmente células endoteliais e neutrófilos, permitindo o controle das respostas frente ao LPS (DANTZER, 2009; KELLEY et al., 2003; NISHIO et al., 2013). O padrão de expressão multi-mediado do LPS permite a capacidade de gerar diferentes respostas nas células do organismo (BONIZZI; KARIN, 2004).

A exposição à endotoxina, a produção de citocinas e a maior síntese de prostaglandinas levam à ativação do sistema imune e ao aparecimento do conjunto de sintomas conhecidos como comportamento doentio (*sickness behavior*) (BANKS, ERICKSON, 2010; BEUTLER, 2004; DUNN, 2002; LARSON; DUNN, 2001; MARTIN et al., 2013; MCCUSKER, KELLEY, 2013; SERRATS, SAWCHENKO, 2009). O comportamento doentio é comumente avaliado em modelos animais que utilizam o lipopolissacarídeo ou as citocinas pró-inflamatórias (DANTZER, 2001; DANTZER, 2004; DANTZER, 2006).

As citocinas atuam na interação entre os sistemas imune e neuroendócrino, sendo esta atuação bidirecional e crucial para a manutenção da homeostase, regulando a proliferação celular, a secreção de hormônios, o comportamento e a atividade do eixo HHA (DANTZER et al., 1998; HADDAD; SAADE; SAFIEH-GARABEDIANC, 2002).

A ativação do eixo HHA em resposta ao LPS constitui-se em uma importante resposta imunoreguladora para suprimir a resposta inflamatória, diminuindo a

produção de proteínas da fase aguda e de citocinas pró-inflamatórias e prevenindo o choque séptico (BERCZI, 1998).

O LPS aumenta a expressão e liberação de várias citocinas, entre elas a IL-1, IL-6 e TNF- α , as quais agem conjuntamente para regular a liberação de esteroides na adrenal (BEISHUIZEN; THIJIS, 2003; KIRSTEN et al., 2013; KIRSTEN et al., 2015). O tempo e a duração desta ativação podem ser considerados os principais fatores que regulam o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC), influenciando no comportamento doentio (RIVEST, 2003; SHIRAZI et al., 2015).

As modificações comportamentais produzidas por meio da ação de citocinas no encéfalo ocorrem através de duas formas principais: via neural, por meio de neurônios aferentes primários que inervam a região onde ocorre o processo infeccioso; e via humoral, em que citocinas pró-inflamatórias são produzidas por fagócitos nos órgãos circunventriculares (CVOs) e plexo coroide, seguidos pela propagação de sinais imunes no parênquima encefálico (DANTZER, 2009).

A liberação de citocinas e o aparecimento dos sintomas do comportamento doentio constituem-se em estratégias para poupar energia (DANTZER, 2001), sendo considerada uma resposta adaptativa do animal para realocar recursos energéticos e combater a infecção (HART, 1988).

Os sintomas do comportamento doentio incluem febre, anorexia, anedonia, redução da atividade locomotora e do comportamento exploratório, do comportamento social, mal-estar, perda de interesse em atividades próprias da espécie, piloereção e perda do apetite sexual (AUBERT, 1999; DE PAIVA et al., 2010; YIRMIYA, 1996).

Dentre os sintomas do comportamento doentio, a redução na ingestão alimentar e a perda de peso são os mais clássicos, estando a ingestão alimentar sob controle de várias regiões do SNC como ARC, hipotálamo lateral, complexo vagal dorsal e núcleos da rafe, onde ocorre a integração de sinais do estado energético e ingestão calórica (DHILLO, 2007; SCHWARTZ et al., 2000).

A redução na preferência e consumo de soluções açucaradas após a endotoxemia caracterizam a anedonia (YIRMIYA, 1996), a qual tem sido bastante estudada em animais experimentais em seu modelo de preferência à sacarose (DE LA GARZA, 2005; WEIL et al., 2006). A busca pelo estímulo atraente de soluções adocicadas é uma resposta comportamental centralmente controlada pelo hipotálamo e tronco cerebral, áreas envolvidas no controle da homeostase e

ingestão alimentar (AHIMA; ANTWI, 2008; DE ARAUJO et al., 2008; PIZZAGALLI et al., 2009).

Além da redução na ingestão alimentar e da anedonia, outro sintoma do comportamento doentio em animais é caracterizado pela diminuição da atividade locomotora e exploratória no aparato de campo aberto, os quais podem ocorrer após a administração de LPS e da IL-1 (NOROUZI et al., 2016; SWIERGIEL; DUNN, 2007). O campo aberto é frequentemente usado para a avaliação da atividade locomotora e também da ansiedade em roedores. Neste teste, quando o animal passa mais tempo na periferia do aparato é considerado como um marcador de ansiedade (AZIZI-MALEKABADI et al., 2015a; AZIZI-MALEKABADI et al., 2015b).

Dentre as alterações comportamentais presentes na endotoxemia estão ainda as respostas termorregulatórias que levam à febre, as quais produzem um ambiente desfavorável ao patógeno e aumentam a eficácia da resposta imune (KLUGER, 1986; MOLTS, 1993). A regulação da temperatura corporal ocorre em várias estruturas neurais, entre elas o hipotálamo, sistema límbico, troncocerebral, formação reticular, medula espinhal e gânglios simpáticos (BLATTEIS, 1998), mas é a área pré-óptica do hipotálamo anterior (POA) uma das estruturas termorreguladoras de maior importância, exercendo um papel fundamental no controle da temperatura corporal, recebendo informações térmicas dos termorreceptores periféricos e da medula espinhal (MORRISON; NAKAMURA; MADDEN, 2008; ROMANOVSKY, 2007).

O valor aceitável de temperatura corporal em determinadas circunstâncias define o set point termorregulatório. Através deste, os mecanismos de perda ou ganho de calor podem ser regulados e as respostas compensatórias geradas frente às variações de temperatura (KANOSUE et al., 1997). As falhas neste termostato em manter a temperatura homeostática definem os termos hipotermia, hipertermia e febre. Na hipotermia, a temperatura corporal diminui abaixo do valor do set point termorregulador (abaixo dos 35°C). A hipertermia caracteriza-se pela elevação da temperatura corporal acima do valor do set point devido ao calor ambiental ou à sobrecarga metabólica, dependendo da temperatura ambiente. A febre é uma elevação regulada da temperatura corporal com variações do set point termorregulador e não uma consequência da incapacidade dos mecanismos termorreguladores de dissipar o ganho de calor como ocorre na hipertermia. Assim,

a resposta febril não depende da temperatura ambiente, podendo se desenvolver em qualquer temperatura (CABANAC; MASSONNET, 1980).

A resposta febril envolve a participação dos sistemas endócrino, neurológico e imunológico, os quais são estimulados através da ação de agentes pirogênicos endógenos ou exógenos. Dentre os agentes pirogênicos exógenos estão os vírus, bactérias e fungos, os quais atuam indiretamente através da estimulação da produção de agentes pirogênicos endógenos por células do sistema imune. Dentre os endógenos envolvidos na geração da febre estão as citocinas, como IL-1, IL-6 e TNF- α , prostaglandinas e endotelinas (KLUGER, 1991; ROMANOVSKY et al., 2005). O principal eucosanoide envolvido na geração da resposta febril é a prostaglandina E2 (PGE2), além do aumento na síntese de óxido nítrico (NO) e monóxido de carbono (CO) após administração do LPS (GERSTBERGER, 1999; STEINER; COLOMBARI; BRANCO, 1999). O tratamento com LPS ativa a cascata complemento pela estimulação da produção de PGE2 por células sinalizadoras (células de Kupfer), os quais se ligam em seus receptores presentes nos nervos aferentes vagais conduzindo estímulos para o núcleo do trato solitário (NTS) e para a POA no hipotálamo. Dessa maneira, neurônios sensíveis ao calor são inibidos nesta região, determinando a fase inicial ou fase neural da febre. Posteriormente, citocinas pró-inflamatórias estimulam a produção de PGE2 dependente de COX-2, causando a inibição dos neurônios sensíveis ao calor, caracterizando, assim, a fase tardia da febre ou fase humoral. A manifestação destas duas fases após a administração de LPS determina a resposta febril bifásica (ROTH; BLATTEIS, 2014; ROTH; SOUZA, 2001).

A desregulação do sistema imune frente à infecção bacteriana na obesidade mostra o relevante papel modulador do tecido adiposo na interação entre o sistema imune e metabólico.

Estudos prévios observaram um aumento na susceptibilidade e morbidade a infecções em indivíduos obesos (FALAGAS; KOMPOTI, 2006), entre elas as infecções cutâneas, periodontais e respiratórias (GARCIA, 2002; WOOD; JOHNSON; STRECKFUS, 2003; SALERNO et al., 2004). Além disso, modificações na resposta imunológica à infecção foram observadas em vários modelos genéticos animais de obesidade (IKEJIMA et al., 2005; IVANOV; KULCHITSKY; ROMANOVSKY, 2001; IVANOV; ROMANOVSKY, 2002; LUGARINI et al., 2005; O'CONNOR et al., 2005; PARK et al., 2009) e em modelos de obesidade induzida

por dieta (AMAR et al., 2007; ASTIZ et al., 2016; LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012; MARISSAL-ARVY et al., 2014; ORLANDI et al., 2015; POHL; WOODSIDE; LUHESHI, 2009; SMITH et al., 2007) após o sistema imune ser estimulado por tratamento com LPS ou outros padrões moleculares associados a micróbios (PMAM).

Dentre outros efeitos observados após desafio imune agudo com LPS, ratos obesos apresentaram maior febre, maiores níveis circulantes e maior secreção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo (POHL; WOODSIDE; LUHESHI, 2009), enquanto que ratos com síndrome metabólica em razão de dieta rica em frutose exibiram exacerbação das respostas comportamentais e febris, com aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e da imunoreatividade de c-Fos no hipotálamo (ORLANDI, 2015). Além disso, camundongos obesos por dieta também exibiram maior resposta inflamatória e maior temperatura corporal após administração de LPS (LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012).

O aumento de 11% no peso corporal em ratos foi suficiente para aumentar o número e a duração dos sintomas doentios após injeções de LPS, estando a severidade dos sintomas doentios relacionada ao aumento de peso corporal (POHL et al, 2013).

Estudos prévios têm investigado o papel da leptina como mediadora neuroimunológica da resposta inflamatória frente ao LPS (GUZIK et al., 2007; INOUE; LUHESHI, 2010; SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004), uma vez que sua transcrição e tradução estão aumentadas frente a estímulos inflamatórios como o LPS, a IL-1 β e a IL-6 (LANDMAN et al., 2003). Ações da leptina no sistema imune incluem a modulação de monócitos e macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, células *natural killer*, células dendríticas e linfócitos (BUSSO et al., 2002; MACIA et al., 2006; LI et al., 2007).

Como a obesidade está associada aos maiores níveis de leptina, esta parece ser capaz de promover ao menos em parte, um agravamento nos sintomas de comportamento doentio em animais obesos. O LPS levou a um aumento tardio nos níveis circulantes de leptina em ratos obesos, demonstrando ser esta adipocina uma importante mediadora da resposta imune inata na manutenção da resposta febril observada em ratos obesos (POHL; WOODSIDE; LUHESHI, 2014).

A exacerbação da resposta febril e maior ativação do eixo HHA após administração de LPS, tanto em ratos com obesidade induzida por dieta quanto

naqueles que sofreram sobrealimentação neonatal pela redução de ninhadas evidenciam que o aumento da massa corporal é fator relevante no agravamento dos sintomas do comportamento doentio (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2011).

Mais recentemente, foi descrito o envolvimento da adrenal e do seu receptor de melanocortina 2 (MC2R) na ativação do eixo HHA após desafio imunológico com LPS em ratos com sobrealimentação neonatal (CAI et al., 2016).

Evidências epidemiológicas mostram estar a obesidade associada às respostas alteradas do sistema imunológico frente à infecção e modelos animais em roedores procuram compreender os mecanismos envolvidos nesta associação.

Os efeitos da programação metabólica neonatal têm sido investigados em seus diversos aspectos, mas a literatura ainda é escassa sobre as respostas inflamatórias e comportamentais em animais submetidos à redução de ninhadas. Em razão disto, decidiu-se avaliar as respostas inflamatórias e comportamentais em animais com sobrealimentação neonatal. Maiores investigações e considerações sobre o impacto do sobrepeso e da obesidade nas respostas comportamentais e inflamatórias podem ajudar a salvar milhares de vida.

3 JUSTIFICATIVA

O ambiente maternal constitui-se em um dos mais significativos ambientes que um mamífero encontrará ao longo de toda a sua vida (PRYCE; BETTSCHEN; FELDON, 2003), o que torna este comportamento crucial para o desenvolvimento adequado dos filhotes. Modificações precoces neste ambiente podem levar a futuras alterações neuroendócrinas, desequilíbrio das funções cognitivas e na reatividade ao estresse, bem como nos comportamentos social e reprodutivo (MEANEY, 2001).

Assim, o ambiente perinatal parece ser crucial para a programação metabólica e hormonal em curto e em longo prazos e o modelo de redução de ninhadas tem se mostrado um modelo experimental bastante útil para se estudar as consequências da sobrealimentação neonatal (HABBOUT et al., 2013), em que a maior disponibilidade de leite em ninhadas menores leva ao sobrepeso e obesidade quando adultos (PLAGEMANN et al., 1999).

Além disso, os tecidos adiposos subcutâneo e abdominal são descritos como tecidos ativos na regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo imunidade e inflamação (SUN; KARIN, 2012; TOUBAL et al., 2013; LEE; LEE; CHOU, 2013) e a obesidade induzida por dieta está associada à desregulação da função imune em humanos e ratos (PALMER; CORPUZ; GUIRGUIS, 2010; POHL; WOODSIDE; LUHESHI, 2014).

Por estas razões, torna-se importante avaliar se o modelo de redução de ninhadas é capaz de causar modificações no ambiente maternal e no desenvolvimento dos filhotes, afetando as respostas comportamentais e inflamatórias na prole adulta.

4 OBJETIVOS

A seguir estão descritos o objetivo geral e os específicos do presente estudo.

4.1 GERAL

Avaliar o comportamento maternal em ratas lactantes e as respostas comportamentais e inflamatórias em filhotes de ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR).

4.2 ESPECÍFICOS

Avaliar em lactantes e filhotes de NN e NR:

- I – O comportamento maternal e a ativação neuronal em fêmeas lactantes;
- II – Os desenvolvimentos físico, reflexivo e sexual em filhotes machos e fêmeas;
- III – O comportamento juvenil de brincadeira em filhotes machos e fêmeas;
- IV – As respostas comportamentais e inflamatórias em ratos machos adultos após desafio imunológico com lipopolissacarídeo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados neste trabalho estão descritos a seguir.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 120 ratos machos e 240 fêmeas *Wistars*, provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas, mantidos em temperaturas de 22 ± 2 °C, sob ciclo claro/escuro de 12h (7h – 19h). Todos os animais receberam ração comercial (NUVILAB-CR-1) e água *ad libitum*. O acasalamento foi realizado por 21 dias na proporção de 2 fêmeas para 1 macho sexualmente experiente. Após a constatação da prenhez, através da análise do lavado vaginal (presença de espermatozoides) foi considerado dia gestacional zero (DG 0). As ratas foram então separadas individualmente em caixas até o nascimento dos filhotes. O dia do nascimento dos filhotes foi considerado como dia lactacional 1 (DL 1). No DL 2 as ninhadas foram padronizadas em ninhada normal (NN - 12 filhotes) e ninhada reduzida (NR - 3 filhotes). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da Universidade Federal de Alfenas, sob o número de protocolo 468/2012.

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

No dia do nascimento (DL 1), os animais não foram manipulados; no dia seguinte (DL 2) os filhotes foram distribuídos na proporção de 12 animais (6 machos e 6 fêmeas) por fêmea lactante, formando a ninhada normal e no segundo grupo, as ninhadas foram padronizadas com 3 filhotes (2 machos e 1 fêmea), formando a ninhada reduzida (adaptação do método proposto por PLAGEMANN et al., 1999a). O remanejamento de filhotes para a formação das ninhadas ocorreu somente para ninhadas que nasceram no mesmo dia. Os animais foram mantidos com as mães

até o desmame (DL 21). A avaliação do CM foi feita em ninhadas diferentes da avaliação do desenvolvimento dos filhotes.

5.3 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNAIS

O CM de ratas lactantes de ninhada normal e ninhada reduzida (n= 8 a 9 por grupo) foi registrado diariamente do 2º ao 8º dia de lactação. Foram estabelecidas quatro sessões diárias de observações, cada uma consistindo de 72 minutos, as quais ocorreram em horários regulares: três análises durante a fase clara, nos horários de 8h, 12h e 16h, e uma análise durante a fase escura às 20h do ciclo claro-escuro. Em cada sessão, o comportamento das ratas lactantes foi registrado a cada três minutos, contabilizando um total de 25 observações por período, totalizando assim 100 observações ao dia (COSTA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2013).

Os comportamentos registrados foram classificados em maternais e não-maternais, da seguinte forma:

Comportamentos maternais:

- ✓ Rata lambendo os filhotes;
- ✓ Rata sobre os filhotes em posição arqueada (cifose);
- ✓ Rata sobre os filhotes em posição não arqueada;
- ✓ Rata em posição passiva, deitada de costas ou de lado;
- ✓ Rata forrageando (levando serragem ou filhotes para o ninho).
- ✓ Rata em *self-grooming* na região mamária.

Comportamentos não-maternais:

- ✓ Rata alimentando-se;
- ✓ Rata não explorando, quando a mesma se encontrava longe do ninho sem contato físico com os filhotes ou dormindo;
- ✓ Rata explorando o ambiente longe dos filhotes;
- ✓ Rata em *self-grooming*, exceto das mamas.

5.4 AVALIAÇÃO NEURONAL POR IMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-Fos DURANTE A LACTAÇÃO

A avaliação da expressão de c-Fos em ratas lactantes foi realizada em um novo grupo de fêmeas não avaliadas em nenhum outro teste (n=4). No 6º dia de lactação, no período da noite, os filhotes de NN e NR foram separados das mães por 12h e, no dia seguinte foram recolocados na caixa moradia por 1h e meia (Figura 5). Após este período, os filhotes foram sacrificados com gás halotano e as mães anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/kg) e perfundidas através de uma punção intracardíaca com salina (250 ml) contendo 5000 U/I de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PBS 0,1M; 500 ml) sendo posteriormente os encéfalos submetidos aos procedimentos imunohistoquímicos detalhados a seguir.

Após sua remoção, os cérebros foram mergulhados em fixador durante 4h e em seguida colocados em solução de sacarose a 30% em PBS (0,1M) a 4°C. Após 48h, os encéfalos foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura utilizando um criostato e coletados em tampão fosfato (0,01 M). Imediatamente após, foram realizados o bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 1%) por 30 minutos e os cortes lavados com tampão fosfato (0,01M) 3 vezes por 5 minutos. Posteriormente, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina 5% em 0,1M de tampão fosfato durante uma hora.

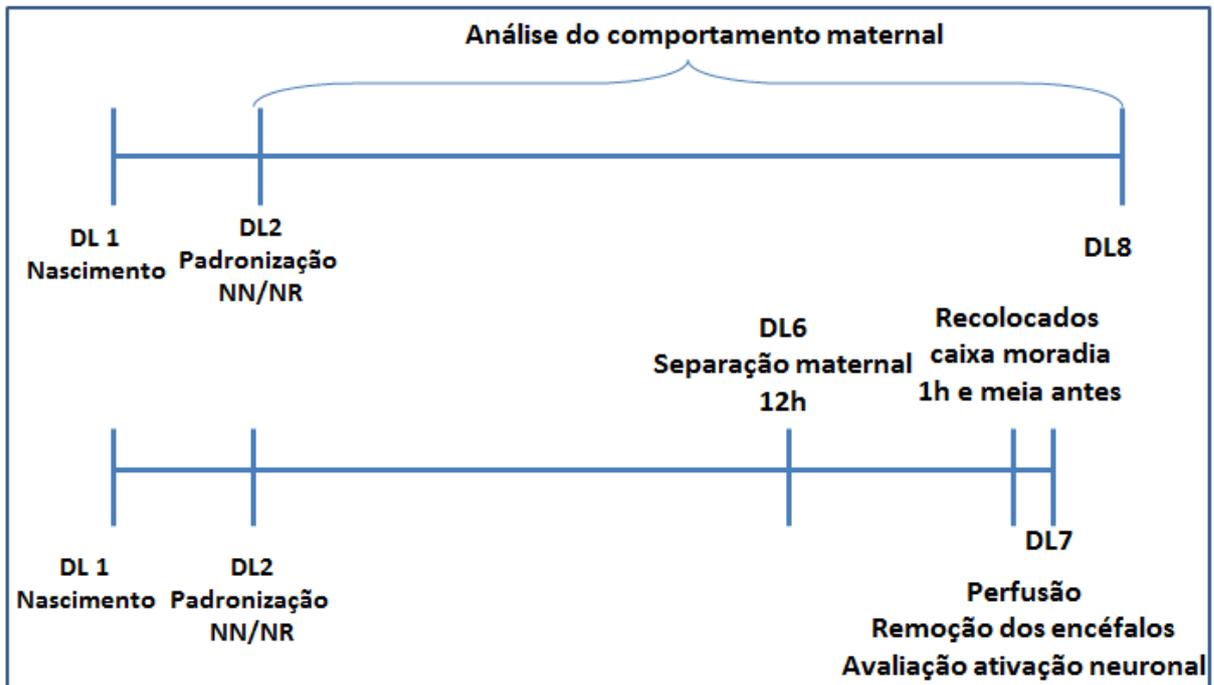
Para a realização de imunohistoquímica para c-Fos, os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 12h, com o anticorpo primário anti-Fos (Santa Cruz, diluição 1:4000), e em seguida incubados com segundo anticorpo biotilado (1:200). Para a coloração, foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector), empregando diaminobenzidina (DAB) e níquel como cromógenos. O produto da reação confere uma coloração violeta escuro – preto ao núcleo (FLEMING; WALSH, 1994).

Por último, os cortes foram montados utilizando Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%), secadas a temperatura ambiente, desidratada com xileno e cobertas com o meio de montagem (Permount).

As áreas hipotalâmicas em estudo, bed núcleo da estria terminal (BNST), área pré-óptica medial (MPOA), núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supra-óptico

(SON) foram identificadas e delimitadas de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1997). As imagens foram capturadas e as células imunorreativas para c-Fos foram contadas nas referidas áreas hipotalâmicas com auxílio de um microscópio Nikon modelo H55L.

Figura 5 - Delineamento experimental em ratas lactantes.



Nota: DL: dia lactacional; NN: ninhada normal; NR: ninhada reduzida.

Fonte: Da autora

5.5 DESENVOLVIMENTOS FÍSICO E REFLEXIVO DOS FILHOTES

O peso dos animais foi avaliado individualmente nos DLs 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 em machos e fêmeas. Foram realizadas as medidas do comprimento nasoanal (CNA), tomando-se a medida do focinho até o início da cauda (em centímetros), a distância anogenital (DAG) e o índice anogenital (IAG), o qual consiste na razão entre a DAG e o peso corporal do animal. Estas medidas foram feitas com uso de um paquímetro nos dias lactacionais 2, 10 e 21, também separadamente em machos e fêmeas (n=12 a 16). O Índice de Lee (IL) foi calculado no DL 21 em filhotes machos e fêmeas e consiste na relação entre a raiz cúbica do peso corporal

em gramas e o CNA (DE MOURA et al., 2009) (n=10). Para evitar o efeito ninhada, um macho e uma fêmea de cada ninhada foram selecionados para as avaliações (LAZIC; ESSIUX, 2013).

A avaliação do desenvolvimento dos filhotes foi realizada através de observações diárias do dia do aparecimento dos parâmetros físicos e reflexivos, em ninhadas diferentes daquelas em que foi analisado o CM e sempre no período da manhã (07 – 09hs). Os filhotes foram retirados da caixa moradia, avaliados individualmente e recolocados em poucos minutos (n=10 a 14).

Os parâmetros físicos avaliados foram:

- Desdobramento das orelhas (ao menos uma delas);
- Crescimento de pelos;
- Erupção dos incisivos (inferiores);
- Abertura dos olhos (qualquer interrupção visível na membrana que recobre o olho) (KISS et al, 2012).
- Teste olfativo: os filhotes de ninhada normal e ninhada reduzida foram testados no DL 7, o qual é considerado o dia ideal para a expressão do aprendizado de preferência ao odor materno. Para o teste, a mãe era retirada da caixa moradia e os filhotes analisados um por vez utilizando-se uma caixa de acrílico de 34 x 40 x 24 cm, a qual foi dividida em 2 áreas de 19 cm por uma zona neutra de 2 cm. No início de cada teste, 300 mL de maravalha limpa (odor neutro), e a mesma quantidade de maravalha do ninho da caixa de moradia (odor familiar), foram colocadas no canto de cada área. O filhote foi colocado na linha que determina a zona neutra em local oposto às maravalhas. O comportamento de cada filhote foi filmado por 1 minuto e ao fim dessa filmagem a caixa foi limpa com álcool 10% e as maravalhas trocadas de lado (n=8 a 9). Cada teste consistiu de 5 tentativas com 1 minuto de intervalo entre elas, sendo o tempo total obtido pela soma das 5 tentativas. Os dados foram expressos como o tempo em segundos que o filhote permaneceu sobre a área de odor familiar em cada uma das 5 tentativas e na soma total delas (RAINEKI et al., 2009).

Os parâmetros reflexivos avaliados foram:

- Geotaxia negativa: animal com a cabeça para baixo em uma rampa inclinada em 20° aproximadamente e aguardou-se que ele virasse sobre si mesmo no mínimo 135° para a avaliação do sentido de reorientação;
- Apreensão palmar: as patas dianteiras do animal devem segurar suavemente um clip de papel, estando este reflexo diminuído à medida que o animal cresce. Avaliou-se o dia em que o animal não apresentava mais tal reflexo;
- Susto auditivo: realizado através de um estímulo sonoro produzido por estalos de uma ratoeira, avaliando-se o reflexo de extensão dos membros posteriores após tal estímulo;
- Teste das vibrissas: segurou-se o animal pela cauda, com a face voltada para a borda de um béquer, de forma que as vibrissas do mesmo tocassem a superfície vertical do recipiente. O reflexo ocorria quando o contato das vibrissas com a superfície fazia o animal levantar a cabeça e as patas anteriores;
- Teste visual: segurou-se o animal pela cauda, também com a face voltada para a borda de um recipiente colorido, mas mais distante desta, não a tocando. Avaliou-se a capacidade do animal de apresentar uma forte e persistente resposta de reconhecimento de cor, através da fixação do olhar na tarja colorida anexada ao recipiente (SMART; DOBBING,1971).

5.6 DESENVOLVIMENTOS SEXUAL DOS FILHOTES

Após o desmame, os filhotes foram mantidos em grupos de 4 animais, separados por sexo e nascidos no mesmo dia ou próximos, a fim de serem avaliados quanto ao desenvolvimento sexual (n=12). A descida dos testículos foi avaliada do dia pós-natal (DPN) 21 ao 30, enquanto a separação prepucial o foi no DPN 45 ao 55 em machos. A abertura vaginal em fêmeas foi observada do DPN 30 ao 40 em filhotes de ambos os grupos (KISS et al, 2012).

5.7 COMPORTAMENTO JUVENIL DE BRINCADEIRA

Com a finalidade de se avaliar os efeitos da redução de ninhada sobre o comportamento juvenil de brincadeira (CJB), ratos machos e fêmeas de NN e NR foram separados por sexo ao desmame e mantidos em grupos de 4 animais por caixa até o momento dos testes. Para evitar o efeito ninhada, somente um macho e uma fêmea de cada ninhada foram avaliados neste teste (n=10 por grupo). Todos os experimentos foram realizados em uma sala apropriada e em condições de pouca luminosidade (até 100 lux). A arena de testes consistiu em uma caixa de vidro medindo 40 x 40 x 60 cm (l x c x a) com aproximadamente 2 cm de maravalha cobrindo o fundo da caixa, de acordo com a metodologia proposta por VANDERSCHUREN et al. (2008).

Os grupos experimentais foram: NR isolados (NRI), NN isolados (NNI), NR agrupados (NRA) e NN agrupados (NNA). Os animais machos e fêmeas foram individualmente habituados à arena de testes nos 26º, 27º e 28º dias de vida, por 10 minutos cada, sempre no período da manhã. No 30º dia de nascimento, metade dos animais foi socialmente isolado por 3,5h antes dos testes e metade se manteve em grupos de 4 animais por caixa. O dia 30 de vida foi o escolhido em razão de ser o pico para a ocorrência do CJB (PLETNIKOV et al, 1999). O período de isolamento induz aumento na quantidade deste comportamento (NIESINK; VAN REE, 1989).

O teste consistiu em confrontar-se 2 animais de NR entre si e 2 animais de NN entre si (isolado X agrupado) por 15 minutos na arena de testes. Os animais de cada teste não diferiam mais que 10 gramas de peso e não eram irmãos consanguíneos ou tiveram qualquer contato social prévio. O comportamento dos animais foi filmado e analisado posteriormente.

Os seguintes parâmetros foram analisados:

- Frequência de imobilização (*pinning*): um animal fica sobre sua superfície dorsal sobre a maravalha com o outro de pé sobre ele, enquanto o rato solicitante imobiliza o parceiro.
- Frequência de investida (*pouncing*): um animal solicita o outro à brincadeira esfregando a ponta do focinho na nuca do parceiro.

- Tempo em *sniffing*: a quantidade total de tempo em segundos gastos em cheirar a região anogenital do parceiro.
- Tempo em *grooming*: a quantidade total de tempo em segundos gastos fazendo “*grooming*” em qualquer parte do corpo do parceiro, exceto a região anogenital.
- Frequência de locomoção: número de vezes que o animal cruza as linhas traçadas sobre a arena de testes.
- Tempo em perseguição: a quantidade total de tempo em segundos que um animal persegue o outro, correndo atrás do parceiro.

Na Tabela 1, podemos observar a representação dos dias das avaliações realizadas em filhotes de NN e NR.

Tabela 1 – Cronograma das avaliações realizadas em filhotes de ninhada normal e ninhada reduzida.

Nascimento	DL 1
Padronização das ninhadas	DL 2
Peso corporal	DL 3,6, 9, 12, 15, 18 e 21
Comprimento nasoanal	DL 2, 10 E 21
Distância anogenital	DL 2, 10 E 21
Índice anogenital	DL 2, 10 E 21
Teste de preferência ao odor maternal	DL 7
Índice de Lee/desmame	DL 21
Descida dos testículos	DPN 21 - 30
Comportamento juvenil de brincadeira	DPN 30
Abertura vaginal	DPN 30 - 40
Separação prepucial	DPN 45 - 55

Nota: DL: dia lactacional; DPN: dia pós-natal.

Fonte: Da autora

5.8 TESTES COMPORTAMENTAIS APÓS INDUÇÃO DE COMPORTAMENTO DOENTIO COM LPS

Nossas avaliações foram realizadas em ratos machos *Wistar*, criados em NN e NR por volta dos 60 dias de vida, sempre após injeções intraperitoneais (i.p.) de salina (100 mL/kg) ou de LPS (100 µg/kg) e incluíram os seguintes testes:

5.8.1 Ingestão alimentar

Este experimento foi realizado em machos de NN e NR, os quais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais com ração em pó (NUVILAB-CR-1) contida em cubas de metal e água *ad libitum*, enquanto permaneceram em ambientação em sala apropriada por 4 dias (n=15). No dia anterior ao experimento, os animais foram privados de ração por 12h, mas não de água. Duas horas após as injeções i.p. de salina (100 ml/kg) ou de LPS (100 µg/kg) as cubas com ração foram reofertadas aos animais. As cubas de metal com ração foram pesadas antes (peso inicial, hora 0) e 2, 4, 6, 8 e 24h após a reintrodução dos mesmos. Os dados foram computados pela diferença entre o peso inicial e os pesos nas diversas horas analisadas, sendo o total ingerido nas diferentes horas convertidos para 100 gramas de peso do animal (RORATO et al, 2012).

5.8.2 Preferência à sacarose

Este teste é usado para medida de anedonia, ou seja, a perda da capacidade do animal de sentir prazer (SHANKMAN et al., 2010). Avalia o efeito do LPS na preferência por uma solução palatável, usando-se um paradigma de duas garrafas, nas quais os animais podem escolher entre a garrafa de água e uma garrafa contendo solução de sacarose a 10%. A preferência por sacarose é usada como medida para a sensibilidade do animal à recompensa.

Filhotes adultos machos de NN e NR (n= 15) foram mantidos em caixas de acrílico individuais, devidamente etiquetadas e receberam ração em pellets e água *ad libitum* e tiveram acesso às garrafas com sacarose a 10% por 2h (10h– 12h) durante 5 dias (treino para ingestão de sacarose). Durante o período de ambientação, os animais foram colocados em contato com a solução de sacarose sempre no mesmo horário do dia. No 6º dia do experimento, os animais receberam injeções i.p. de salina (100 ml/kg) ou LPS (100 µg/kg) às 8h da manhã. Após 2h (10h da manhã) as garrafas de água e sacarose foram pesadas e oferecidas aos animais (peso inicial), sendo estas retiradas e pesadas novamente ao meio-dia (peso final).

O resultado para cada animal é a diferença em porcentagem entre o peso inicial e o peso final das garrafas de água e de sacarose (SONCINI et al., 2012)

A preferência à sacarose (PS) foi determinada pela seguinte equação:

$$PS = \frac{\text{Volume de sacarose ingerido (mL)}}{\text{Total (volume de água+ volume de sacarose ingerido)}} \times 100$$

5.8.3 Campo aberto

Este teste é um modelo animal que consiste em colocar um animal dentro de uma grande arena circular de acrílico com diâmetro de 60 cm e paredes com 50 cm de altura, com o piso dividido em quadrantes, dos quais 8 áreas junto às paredes do aparato são consideradas periferia e as 4 demais as centrais. Uma vez dentro do campo, a atividade do animal é registrada, através de linhas dispostas no assoalho da câmara, contando-se o número de vezes que tais linhas são cruzadas durante o teste. Tem por finalidade avaliar a atividade exploratória (atividade motora voluntária) e a tendência do animal em preferir a periferia ao centro do campo aberto (CA) e também contar o número de *Rearings* (exploração vertical do ambiente). Observa-se que uma baixa atividade motora frequentemente indica uma reação de medo do animal. Ratos com medo apresentam um comportamento tigmotático, ou seja, eles procuram não se aventurar para longe das paredes da câmara, além de evitarem ficar sobre as patas traseiras e explorarem o ambiente ou se limparem. Os ratos apresentam tal comportamento de medo quando introduzidos num CA desconhecido. Este comportamento irá diminuir à medida que o animal se familiarize com a caixa (ARCHER, 1973)

Este teste foi realizado em ratos machos de NN e NR, por volta dos 60 dias de vida, os quais receberam salina (100 ml/kg) ou LPS (100 µg/kg) i.p. e foram filmados após 2h da administração (n=10). Os animais dos grupos NN e NR foram colocados, um por vez, no centro da arena e filmados por 5 minutos, quanto ao número de

cruzamentos na periferia, número de cruzamentos no centro, número total de cruzamentos e número de *Rearings* (SWIERGIEL; DUNN, 2007).

Após o teste do CA, os animais foram decapitados e tiveram seus plasmas coletados e mantidos em freezers -80° C para dosagens de citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6.

5.9 MONITORAMENTO DA TEMPERATURA CORPORAL

Para o monitoramento da temperatura corpórea, animais machos adultos (n=12) ainda não testados em nenhum outro experimento, tiveram um transmissor de biotelemetria (probe - série 4000 E-Mitter; Mini Mitter, Bend, OR) implantado na cavidade peritoneal, o qual transmitia sinais, a cada um minuto, para uma placa receptora acoplada a um computador. Anteriormente à cirurgia, os probes foram higienizados em detergente enzimático e em solução de álcool 70%. Os animais experimentais (ratos machos de NN e NR, com aproximadamente 60 dias de vida) foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg), sendo então executada uma incisão de aproximadamente 2 cm na pele e músculos abdominais, onde o probe foi inserido na cavidade peritoneal. Após o implante do transmissor, a incisão foi fechada por meio de dois pontos internos feitos no tecido muscular e dois externos feitos no tecido epitelial (CRUNFLI; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2014). A seguir, os animais receberam anti-inflamatório cetoprofeno via subcutânea (3 mg/animal) e antibiótico pentabiótico via intramuscular (2 mg/animal), ambos de uso veterinário.

Após a cirurgia, para evitar a hipotermia pós-cirúrgica, todos os animais foram colocados à temperatura de 32°C durante a recuperação da anestesia (STEINER et al., 2011) e depois transferidos para uma caixa acrílica individual com livre acesso à água e ração. Após 6 ou 7 dias da cirurgia, as caixas foram colocadas sobre o receptor telemétrico (Data Science) conectado a um computador, registrando-se a temperatura corpórea, sendo os dados então coletados e graficamente exibidos no monitor, impressos digitalmente e armazenados.

A temperatura basal foi calculada pelos 60 minutos antecedentes à aplicação de salina ou LPS, ou seja, foram feitas 12 leituras de 5 em 5 minutos, e a temperatura foi monitorada durante 8h, após as aplicações. Em seguida, calculou-se

a diferença da temperatura pela média da temperatura basal e obtemos o delta da temperatura. Os dados da telemetria foram demonstrados pelo gráfico linear e estatísticas foram realizadas pela área sob a curva (AUC) calculada no intervalo da segunda à quinta horas, obtendo-se o índice térmico para este período (GIUSTI-PAIVA et al., 2004).

5.10 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

A fim de se avaliar a ativação do eixo HHA em ratos machos adultos procedeu-se a dosagem de corticosterona (CT) plasmática. No 59º dia de vida (12h antes da coleta), filhotes machos de NR e NN (n=8), por volta dos 60 dias de vida, foram colocados em caixas individuais devidamente etiquetadas, transportados para uma sala silenciosa e mantidos em condições de temperatura e ciclo claro-escuro apropriados. No dia seguinte, os animais foram decapitados 1, 2 e 4h após a injeção i.p. de LPS (100 µg/kg) ou salina (100 ml/kg) e tiveram 5 mL de sangue coletados em tubos heparinizados, etiquetados e mantidos em cubos de gelo até a finalização das coletas. Os animais foram manipulados de maneira a não sofrerem estresse que pudesse interferir nos resultados das dosagens. Após a coleta, os tubos foram centrifugados (4°C, 3500 rpm, 15 min), para ter o plasma separado dos elementos figurados do sangue e foram pipetados os sobrenadantes. Estes foram mantidos em freezers apropriados (-80°C) até o momento das dosagens hormonais.

No primeiro dia do ensaio para dosagem, a CT foi extraída de 25 µL de soro por meio do uso de 1 mL de etanol, e liofilizada. A dosagem de CT foi realizada pela técnica de radioimunoensaio (RIE) e as amostras foram solubilizadas em tampão apropriado e ensaiadas em duplicata juntamente com uma curva padrão. As replicatas foram incubadas com um anticorpo anti-corticosterona produzido em coelho (#C8784, Sigma) e com corticosterona triciada [1,2-3(H)] (New England Nuclear). A separação da fração livre da ligada foi realizada com uma solução de carvão-dextran 0,5/0,05% por meio de centrifugação. O sobrenadante foi então lido em cintilador capaz de quantificar a emissão de radiação beta, sendo as concentrações estimadas com base na curva padrão (ELIAS et al., 1997; ELIAS et al., 2004). Estas dosagens tiveram a gentileza da colaboração do Laboratório de

Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, coordenado pelo Prof. Dr. José Antunes Rodrigues.

5.11 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os animais machos de NN e NR (n=6 a 8), por volta dos 60 dias de vida, tiveram seus plasmas coletados por decapitação 2h após a aplicação i.p. de salina ou LPS e imediatamente após terem sido filmados no campo aberto. O sangue coletado foi colocado em tubos heparinizados e centrifugados a 3500 rpm durante 15 minutos a 4°C para separação do plasma que foi então armazenado a -80°C até o dia das dosagens.

As concentrações plasmáticas das citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) foram mensuradas através de ensaios enzimáticos (ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) usando kits comerciais (Peprotech, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Microplacas com 96 orifícios foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais de captura e tiveram os sítios inespecíficos bloqueados com solução de albumina bovina. Após lavagem, as amostras ou padrões foram incubados para possibilitar a quantificação. Em seguida, a adição de anticorpo de detecção, incubação com solução de avidina-peroxidase e posterior adição da solução cromogênica para leituras das reações colorimétricas que foram realizadas a 405 nm em leitor de microplacas (Synergy H1, BioTek). Cálculos foram realizados a partir da curva padrão para determinação das concentrações das amostras.

5.12 DROGAS

Para a execução deste trabalho foram utilizadas as seguintes drogas: Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* sorotipo 026:B6, da Sigma-AldrichCo (EUA) para indução do comportamento doentio e soro fisiológico a 0.9% (isofarma) como veículo. Tribromoetanol (TBE – Sigma) na dose de 250 mg/kg para anestésiar os

animais; Cetoprofeno (Cristalina) e Pentabiótico (Fort Dodge Saúde Animal LTDA) após a cirurgia de implantação dos probes na telemetria.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram apresentados como média e erro padrão da média e analisados considerando-se, dentro de cada protocolo, sempre a coerente relação entre os grupos experimentais e seus respectivos controles. Para comparação de duas médias aplicou-se a análise de variância (*One-way*) e para comparação de três ou mais médias aplicou-se a análise de variância (*Two-way*) seguida do pós-teste de *Newman-Keuls* ou *Bonferroni*, quando apropriado. O teste de *t-Student* para 2 médias também foi usado, quando indicado. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

6 RESULTADOS

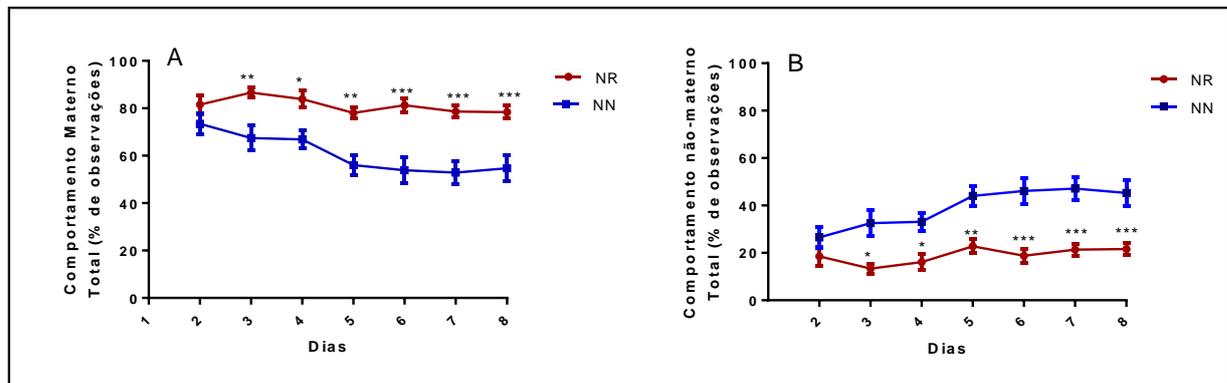
Nossos resultados estão descritos a seguir.

6.1 COMPORTAMENTO MATERNA

Os resultados obtidos demonstram que ratas lactantes de ninhadas reduzidas apresentaram maior comportamento materno total (CMT) em relação às lactantes de ninhadas normais. Da mesma forma, ratas lactantes de ninhadas reduzidas exibiram menor comportamento não-materno total (CNMT) comparadas às lactantes do grupo controle, durante a primeira semana de lactação (Figuras 6A e 6B).

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para o CMT e o CNMT são descritos na Tabela 2.

Figura 6 - Avaliação de ratas lactantes de NN (ninhada normal) e NR (ninhada reduzida) durante a primeira semana de lactação.



Nota: Comportamento materno total (A) e o Comportamento não-materno total (B). Valores expressos como média \pm EPM. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, quando comparados ao grupo controle (n=8 a 9 por grupo). ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*.

Fonte: Da autora.

Tabela 2 - Análises de variância de duas vias do Comportamento maternal total (CMT) e do Comportamento não-maternal total (CNMT) de ratas lactantes de ninhadas normais e ninhadas reduzidas na primeira semana de lactação.

Parâmetros	Ninhada	Dia de lactação	Interação
CMT	$F_{1,105} = 86.16, p < 0.001$	$F_{6,105} = 3.40, p < 0.01$	$F_{6,105} = 1.26, p = 0.2809$
CNMT	$F_{1,105} = 84.15, p < 0.001$	$F_{6,105} = 3.41, p < 0.01$	$F_{6,105} = 1.23, p = 0.2933$

Fonte: Da autora.

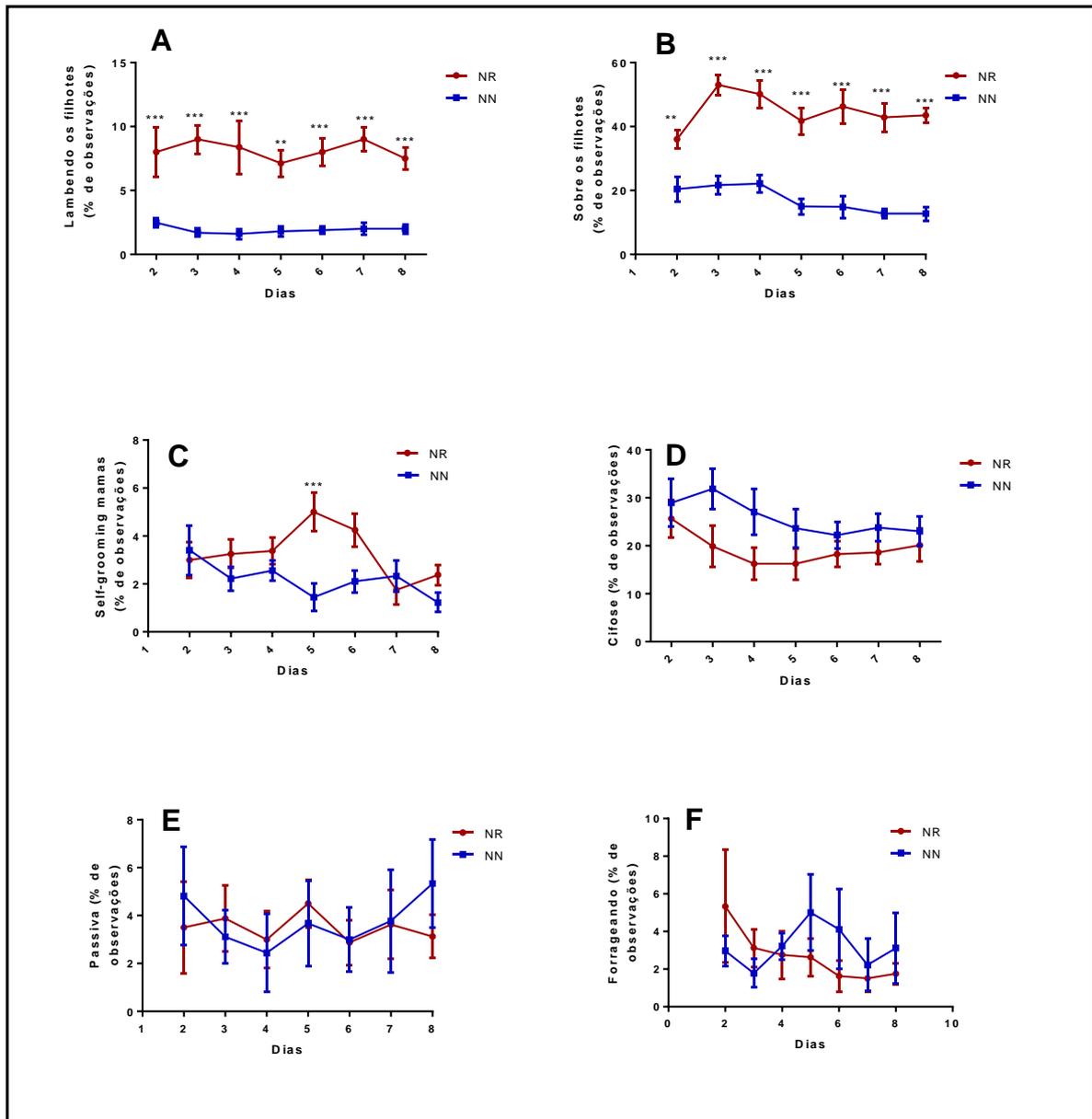
Na avaliação dos parâmetros maternos, considerados individualmente em lactantes de ninhada normal e ninhada reduzida, observou-se que ratas lactantes de ninhada reduzida despenderam mais tempo lambendo os filhotes e sobre eles comparadas às lactantes de ninhada normal ($p < 0.01$; $p < 0.001$), conforme pode ser verificado nas Figuras 7A e 7B.

Quanto ao comportamento de *self-grooming* de mamas, ratas lactantes de ninhada reduzida exibiram maior porcentagem de observações somente no dia lactacional 5 comparadas ao seu grupo controle, conforme pode ser visto na Figura 7C ($p < 0.001$).

Quanto às Figuras 7D, 7E e 7F, as quais demonstram os resultados para os parâmetros de cifoze, posição passiva e forrageando, respectivamente pode-se observar que não houve diferenças significantes entre as ratas lactantes de ninhada normal e ninhada reduzida.

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para o comportamento maternal total analisado individualmente estão descritos na Tabela 3.

Figura 7 - Avaliação dos parâmetros maternos de NN (ninhada normal) e NR (ninhada reduzida) durante a primeira semana de lactação.



Nota: Lambendo os filhotes (A); Sobre os filhotes (B), *Self-grooming* de mamas (C), Cifose (D), Passiva (E), Forrageando (F). Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, quando comparados ao grupo controle (n=8 a 9 por grupo). ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*.

Fonte: Da autora.

Tabela 3 - Análises de variância de duas vias do Comportamento maternal total (CMT) analisado individualmente em ratas lactantes com ninhada normal e ninhada reduzida na primeira semana de lactação.

Parâmetros	Ninhada	Dia de lactação	Interação
Lambida	$F_{1,105} = 148.9, p < 0.001$	$F_{6,105} = 0.283, p = 0.944$	$F_{6,105} = 0.359, p = 0.903$
Sobre	$F_{1,105} = 240.5, p < 0.001$	$F_{6,105} = 2.968, p < 0.05$	$F_{6,105} = 1.419, p = 0.214$
SG mamas	$F_{1,105} = 10.70, p < 0.01$	$F_{6,105} = 1.74, p = 0.119$	$F_{6,105} = 2.587, p < 0.05$
Cifose	$F_{1,105} = 10.72, p < 0.01$	$F_{6,105} = 1.19, p = 0.313$	$F_{6,105} = 0.489, p = 0.489$
Passiva	$F_{1,105} = 0.079, p = 0.778$	$F_{6,105} = 0.298, p = 0.936$	$F_{6,105} = 0.269, p = 0.950$
Forragear	$F_{1,105} = 0.449, p = 0.503$	$F_{6,105} = 0.597, p = 0.732$	$F_{6,105} = 0.763, p = 0.600$

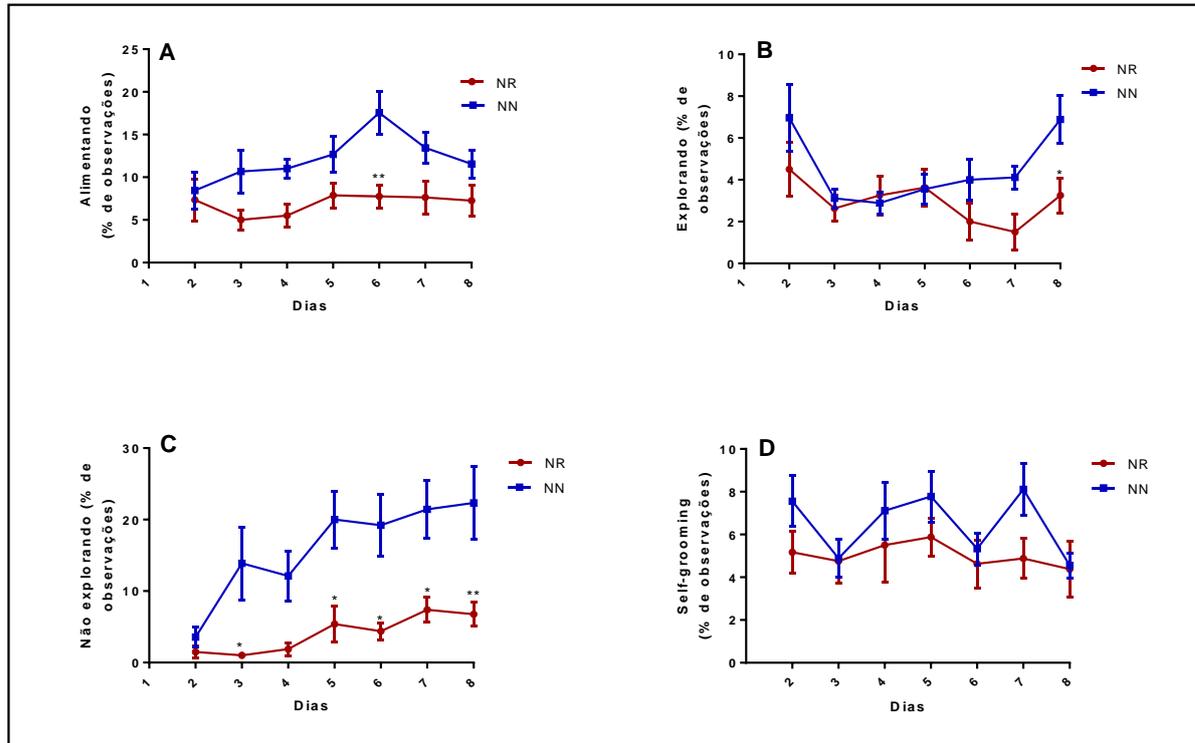
Fonte: Da autora.

Na análise dos parâmetros considerados individualmente como não-maternais, nas Figuras 8A e 8B pode-se observar que ratas lactantes de ninhada reduzida alimentaram-se menos no DL 6 ($p < 0.01$) e exploraram menos no DL 8 ($p < 0.05$) comparadas ao grupo controle.

Na Figura 8C, pode-se observar que lactantes de NR ficaram menor tempo em não exploração na maior parte dos dias analisados comparadas às lactantes de NN ($p < 0.05$; $p < 0.01$). Quanto ao *self-grooming*, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 8D).

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para o CMT analisado individualmente são descritos na Tabela 4.

Figura 8 - Avaliação dos parâmetros não-maternais de NN (ninhada normal) e NR (ninhada reduzida) durante a primeira semana de lactação.



Nota: Alimentando (A), Explorando (B), Não explorando (C), *Self-grooming* (D). Valores expressos como média \pm EPM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, quando comparados ao grupo controle ($n=8$ a 9 por grupo). ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*.
Fonte: Da autora.

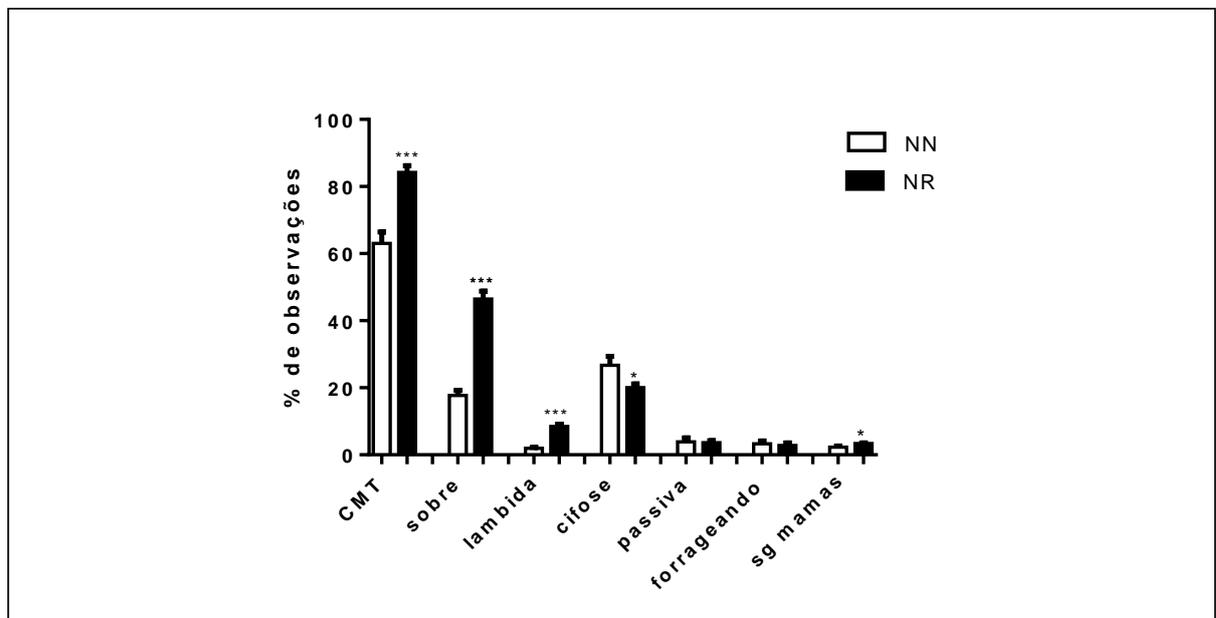
Tabela 4 - Análises de variância de duas vias do Comportamento não-maternal total (CNMT) analisado individualmente em ratas lactantes com ninhada normal e ninhada reduzida na primeira semana de lactação.

Parâmetros	Ninhada	Dia de lactação	Interação
Alimentando	$F_{1,105} = 26.89, p<0.001$	$F_{6,105} = 1,69, p=0.128$	$F_{6,105} = 0.906, p=0.493$
Explorar	$F_{1,105} = 9.464, p<0.01$	$F_{6,105} = 3.19, p<0.01$	$F_{6,105} = 1.327, p=0.252$
Não explorar	$F_{1,105} = 49.17, p<0.001$	$F_{6,105} = 3.93, p<0.01$	$F_{6,105} = 1.09, p=0.374$
<i>Self-grooming</i>	$F_{1,105} = 5.96, p<0.05$	$F_{6,105} = 1.481, p=0.191$	$F_{6,105} = 0.551, p=0.768$

Fonte: Da autora.

Para facilitar a descrição destes resultados, os comportamentos maternos e não-maternais foram descritos em gráficos de colunas. Na Figura 9, observou-se que os parâmetros maternos, nos quais ratas lactantes de NR tiveram maior CMT que as de NN ($p < 0.001$), permaneceram mais tempo sobre os filhotes ($p < 0.001$), lambeiram mais os filhotes ($p < 0.001$) e fizeram mais autolimpeza ($p < 0.05$). Quanto à cifose, lactantes de NN estiveram mais em cifose que as de NR ($p < 0.05$), enquanto que os parâmetros de posição passiva e forrageamento não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Figura 9 – Gráfico de colunas da avaliação dos parâmetros maternos na primeira semana de lactação em fêmeas de NN (ninhada normal) e NR (ninhada reduzida).

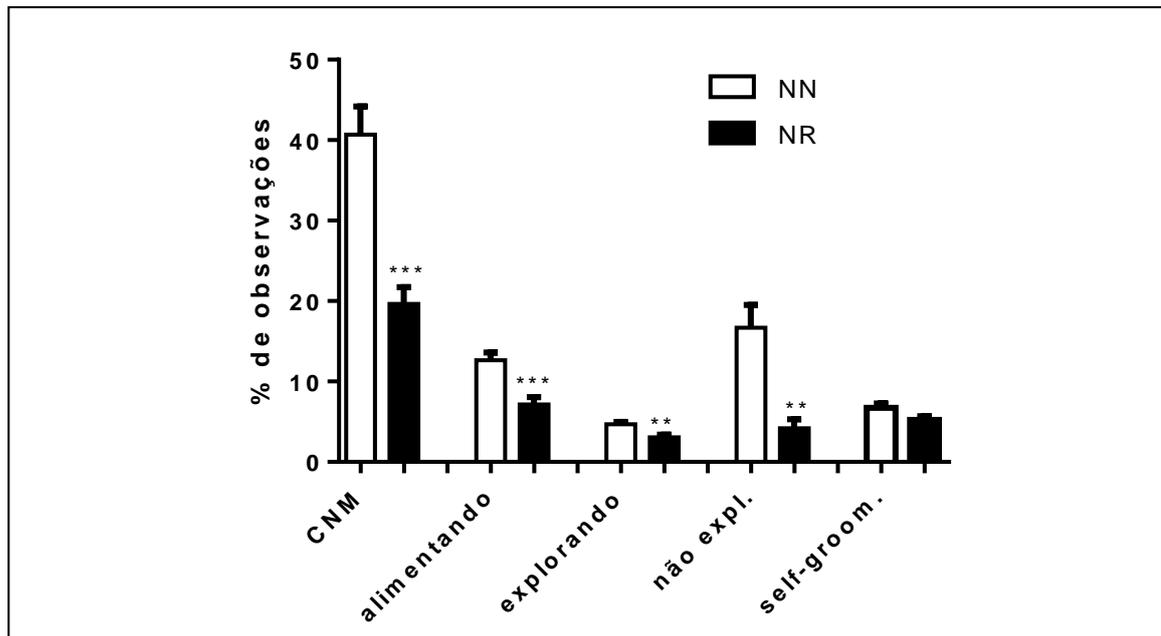


Nota: Comportamento materno total (CMT), Sobre os filhotes, Lambida, Cifose, Passiva, Forrageando, *Self-grooming* de mamas. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ comparados ao grupo controle ($n = 8$ a 9 por grupo). Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Quanto aos parâmetros considerados como não-maternais (Figura 10) pode-se observar que ratas lactantes de NR tiveram menor CNM que as mães de NN ($p < 0.001$), ficaram menor tempo se alimentando ($p < 0.001$), menor tempo explorando ($p < 0.01$) e não explorando ($p < 0.01$). Quanto ao *self-grooming* não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 10 – Gráfico de colunas da avaliação dos parâmetros não-maternais na primeira semana de lactação em fêmeas de NN (ninhada normal) e NR (ninhada reduzida).



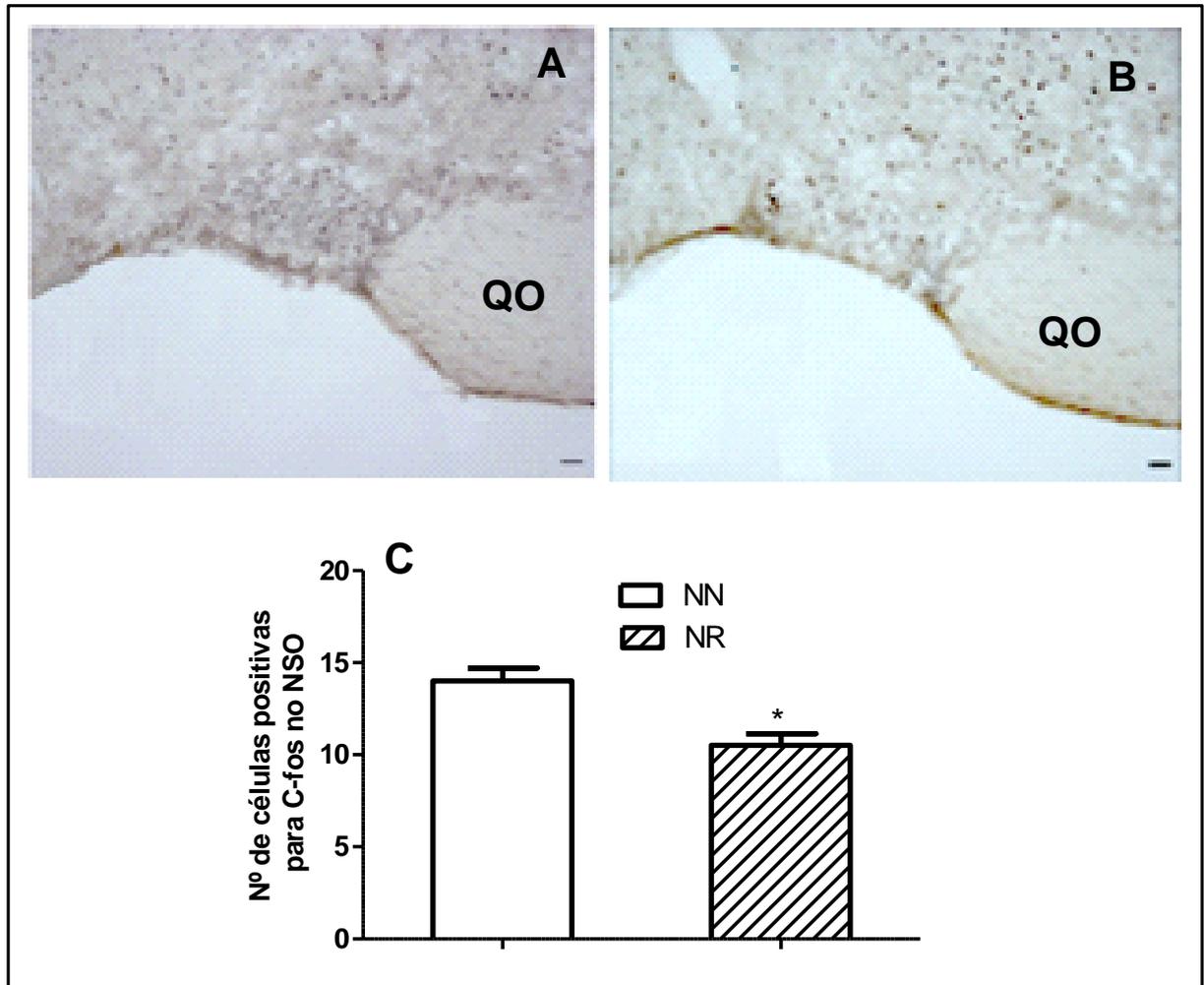
Nota: Comportamento não-maternal (CNM), Alimentando, Explorando, Não Explorando, *Self-grooming*. Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparados ao grupo controle (n=8 a 9 por grupo). Teste t-Student.

Fonte: Da autora.

6.2 AVALIAÇÃO NEURONAL POR IMUNOHISTOQUÍMICA PARA c-Fos DURANTE A LACTAÇÃO

Os resultados para imunohistoquímica mostram que nas áreas analisadas para c-Fos no SON (Figura 11) e no PVN (Figura 12) do hipotálamo a contagem de células apresentaram-se significativamente menores em fêmeas lactantes de NR em relação às lactantes de NN nas duas áreas analisadas ($p < 0.05$).

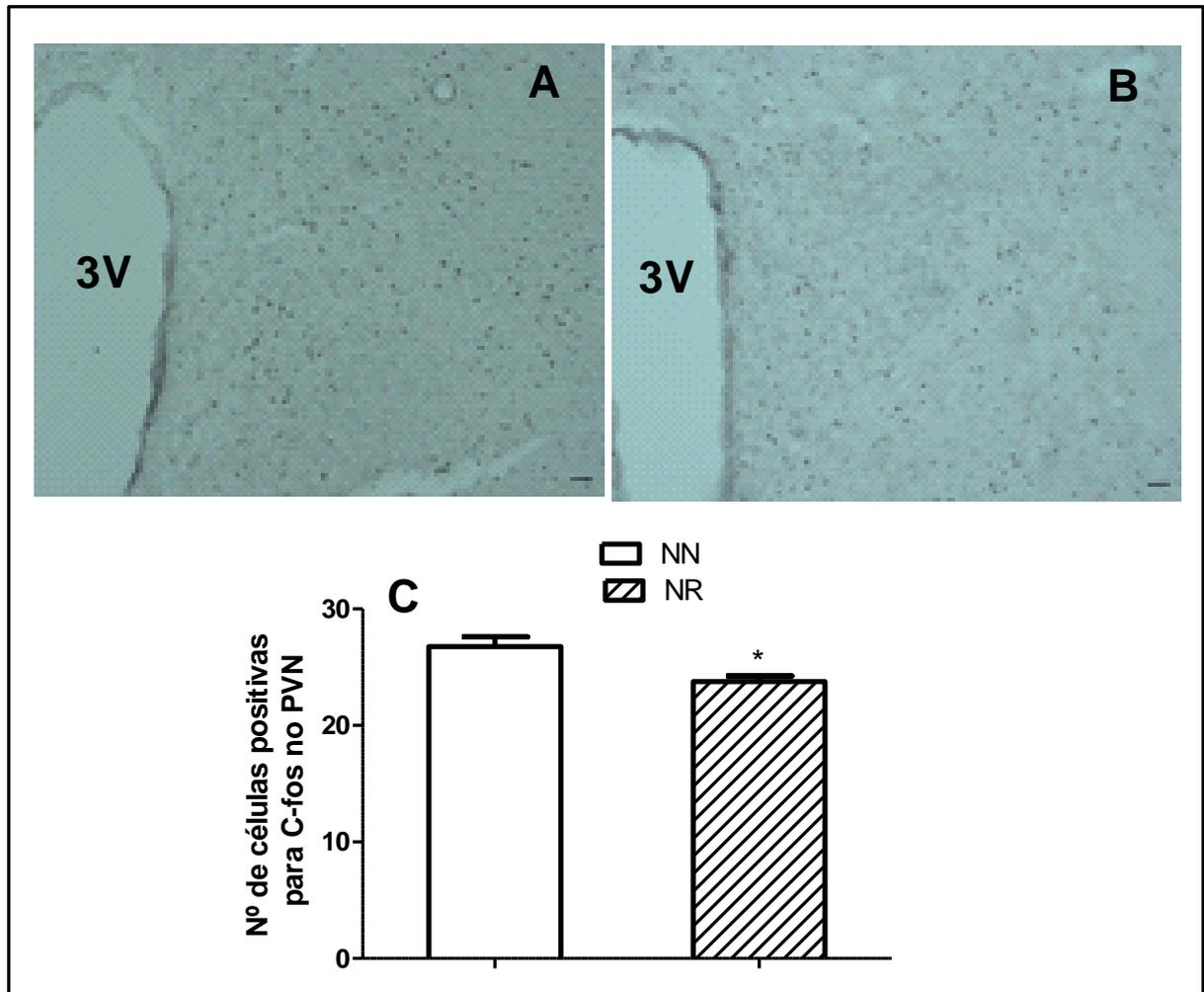
Figura 11 - Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo de mães de ninhada normal (A) e reduzida (B). Efeitos da redução de ninhadas sobre a expressão de c-Fos no SON de ratas lactantes no DL 7 (C).



Nota: SON= núcleo supra-óptico; QO= quiasma óptico; NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Escala 50 μ m. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle ($n=4$). Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Figura 12- Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo de mães de ninhada normal (A) e reduzida (B). Efeitos da redução de ninhadas sobre a expressão de c-Fos no PVN de ratas lactantes no DL 7 (C).

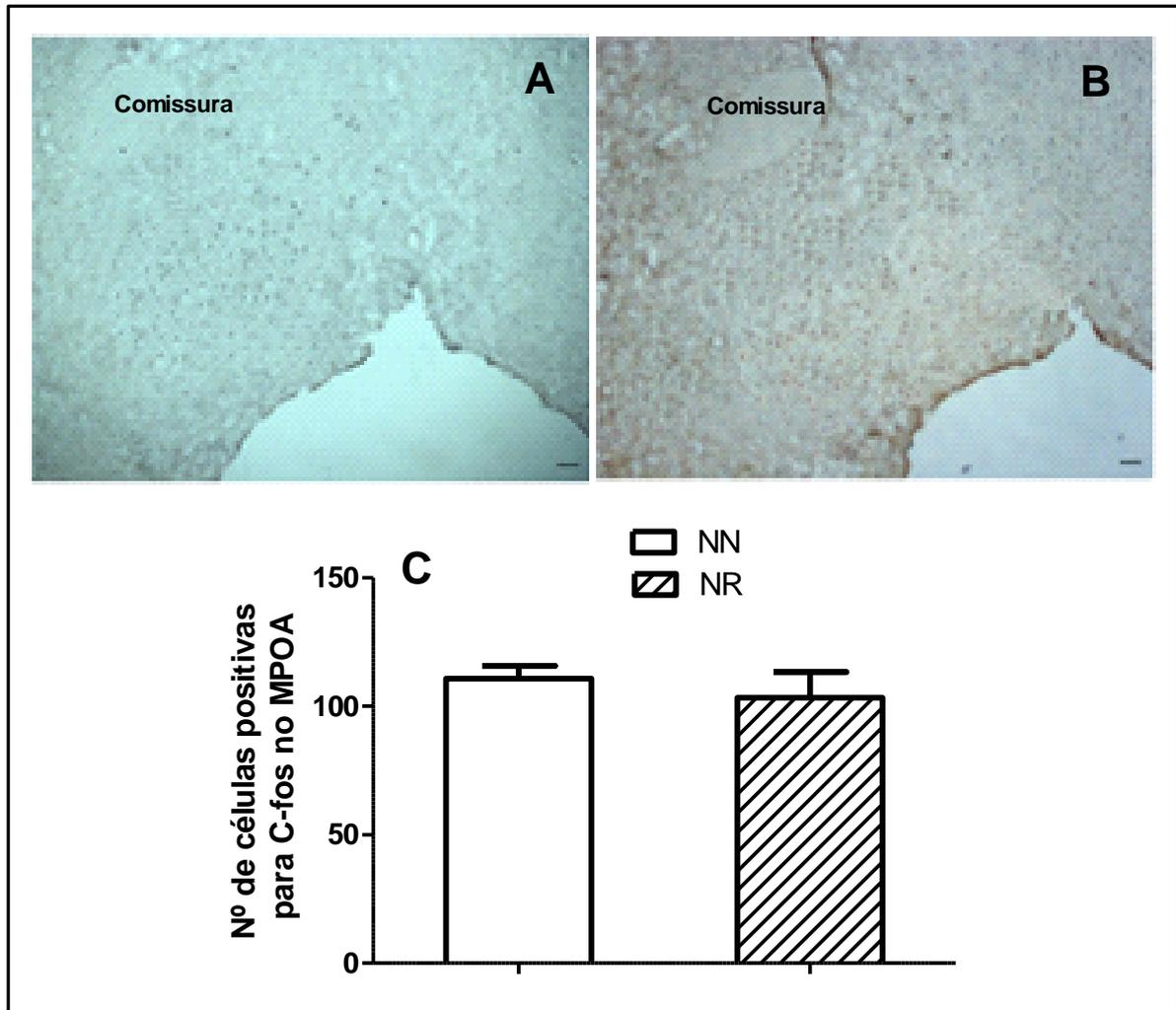


Nota: PVN= núcleo paraventricular; 3V= terceiro ventrículo; NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Escala 50 μ m. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle (n=4). Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Quanto à área pré-óptica medial (MPOA) e ao bed núcleo da estria terminal (BNST) não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, conforme pode ser visto nas Figuras 13 e 14.

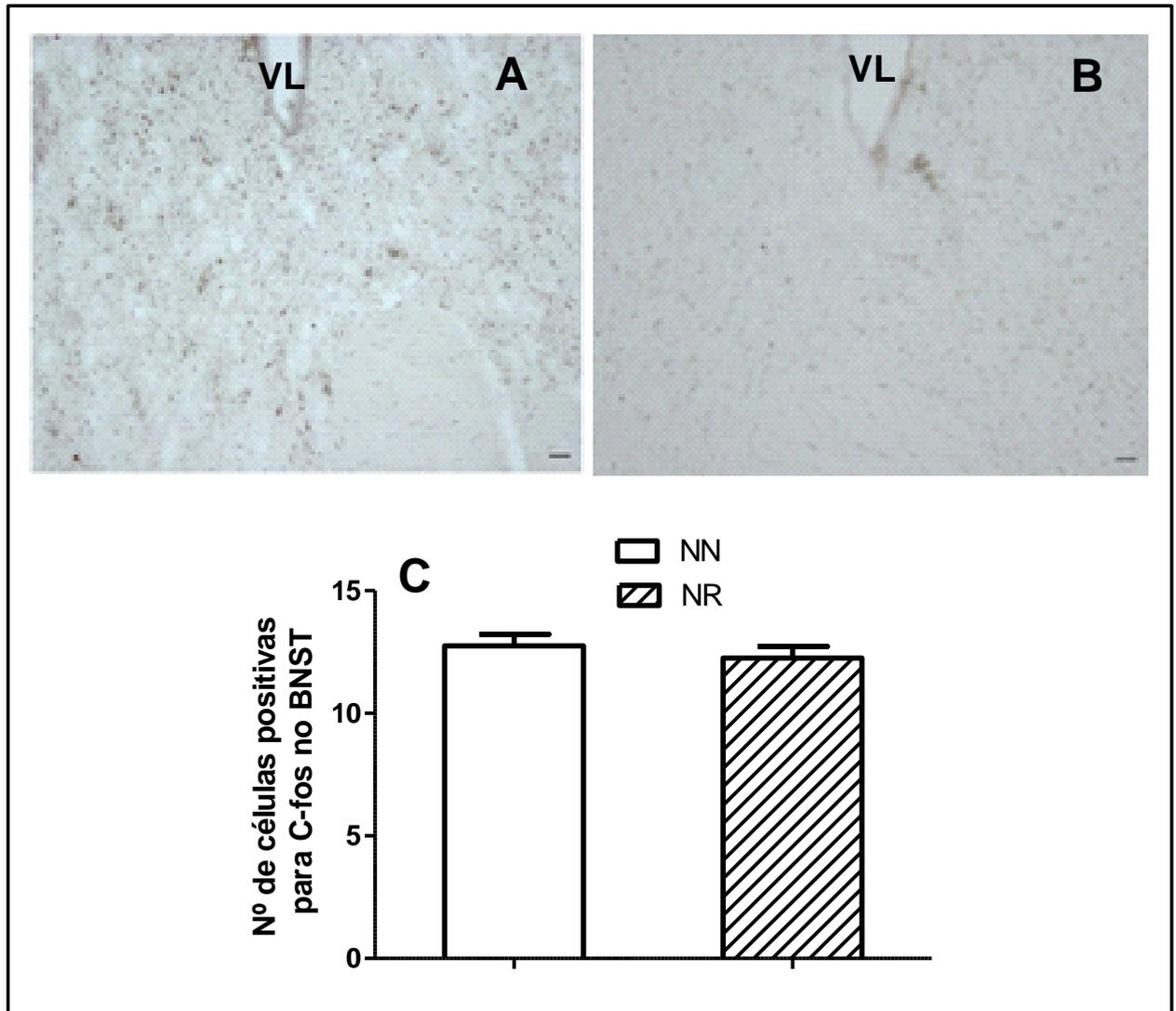
Figura 13 – Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo de mães de ninhada normal (A) e reduzida (B). Efeitos da redução de ninhadas sobre a expressão de c-Fos na MPOA em ratas lactantes no DL 7 (C).



Nota: MPOA= área pré-óptica medial; NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Escala 50 μ m. Valores expressos como média \pm EPM. Sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (n=4). Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora

Figura 14 – Fotomicrografias representativas de cortes de encéfalo de mães de ninhada normal (A) e reduzida (B). Efeitos da redução de ninhadas sobre a expressão de c-Fos na BNST em ratas lactantes no DL 7 (C).



Nota: BNST= bed núcleo da estria terminal; VL= ventrículo lateral; NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Escala 50 μ m. Valores expressos como média \pm EPM. Sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (n=4). Teste *t-Student*.

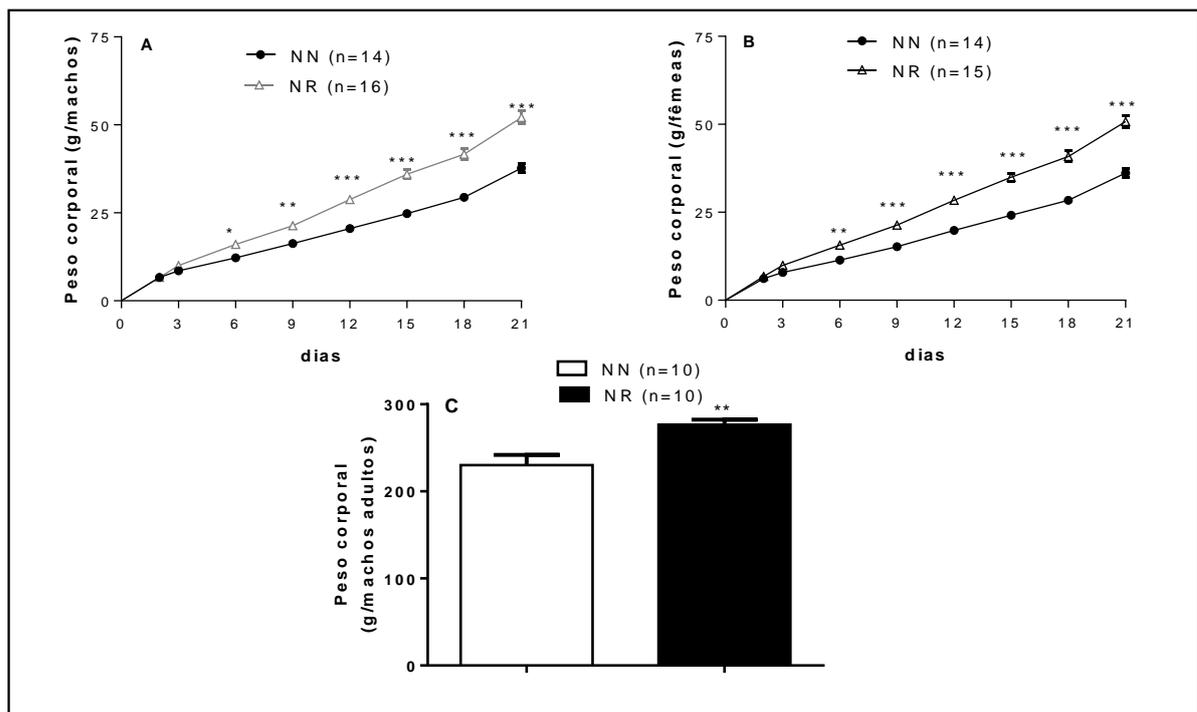
Fonte: Da autora.

6.3 DESENVOLVIMENTO DOS FILHOTES

Os resultados para o ganho de peso corporal mostram que os animais de NR ganharam mais peso comparados aos de NN, a partir do DL 6, mantendo-se este maior ganho até o desmame, tanto em machos (Figura 15A) quanto em fêmeas (Figura 15B). Na fase adulta (60 dias), machos de NR mostraram maior peso corporal que machos de NN ($p < 0.01$) (Figura 15C).

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para o ganho de peso corporal de filhotes machos e fêmeas até o desmame são descritos na Tabela 5.

Figura 15 - Ganho de peso corporal de filhotes machos e fêmeas de NN e NR nos DLs 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21 e peso corporal em machos adultos com 60 dias de vida.



Nota: Filhotes machos (A) e fêmeas (B); machos adultos (C); NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, quando comparados ao grupo NN. ANOVA *Two-way* seguido pelo pós-teste de *Bonferroni*; *Teste t-Student*.

Fonte: Da autora.

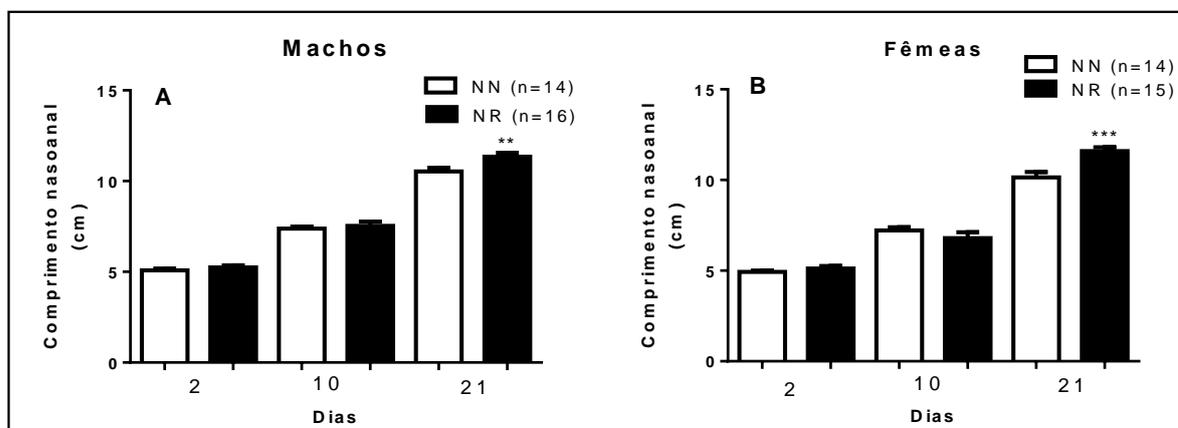
Tabela 5 - Análises de variância de duas vias do ganho de peso corporal de filhotes de NN e NR do DL 2 ao desmame.

Parâmetros	Peso corporal	Dia de lactação	Interação
Machos	$F_{1,224} = 231.8, p < 0.001$	$F_{7,224} = 414.7, p < 0.001$	$F_{7,224} = 16.10, p < 0.001$
Fêmeas	$F_{1,216} = 281.4, p < 0.001$	$F_{7,216} = 430.1, p < 0.001$	$F_{7,216} = 16.12, p < 0.001$

Fonte: Da autora.

Quanto ao CNA em machos, a Figura 16A mostra que nos dias lactacionais 2 e 10 não houve diferenças entre os grupos. No DL 21 os animais de NR mostraram maior CNA que os animais controle ($p < 0.01$). Em fêmeas, conforme pode ser visto na Figura 16B no DL 2 e no DL 10 não houve diferenças entre os grupos. No DL 21 as fêmeas de NR mostraram maior CNA que os animais controle ($p < 0.001$).

Figura 16 - Comprimento naso-anal (cm) em filhotes machos e fêmeas de NN e NR nos DLs 2, 10 e 21.

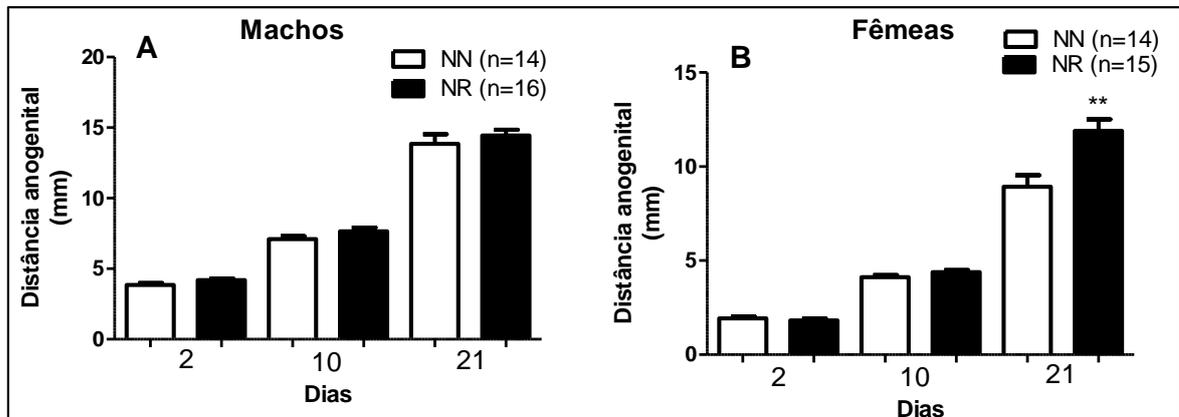


Nota: Filhotes machos (A) e fêmeas (B); NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; DL= dia lactacional.. Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, quando comparados ao grupo NN. Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Quanto à DAG em machos, a Figura 17A mostra que não houve diferenças entre os grupos nos dias lactacionais 2, 10 e 21. Em fêmeas, conforme pode ser visto na Figura 17B no DL 2 e no DL 10 não houve diferenças entre os grupos. No DL 21 as fêmeas de NR mostraram maior DAG que os animais controle ($p < 0.01$).

Figura 17 – Distância anogenital (mm) em filhotes machos e fêmeas de NN e NR nos DLs 2, 10 e 21.

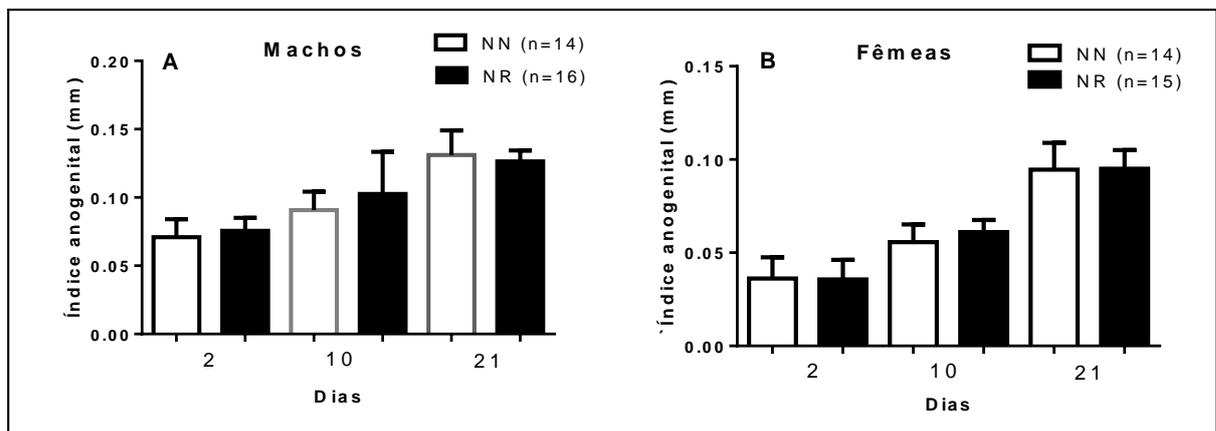


Nota: Filhotes machos (A) e fêmeas (B); NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; DL= dia lactacional. Valores expressos como média \pm EPM. ** $p < 0.01$ quando comparado ao grupo NN. Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Quanto ao IAG, não houve diferença entre os grupos tanto em machos (Figura 18A) quanto em fêmeas (Figura 18B) nos dias lactacionais 2, 10 e 21.

Figura 18 – Índice anogenital (mm) em filhotes machos e fêmeas de NN e NR nos DLs 2, 10 e 21.

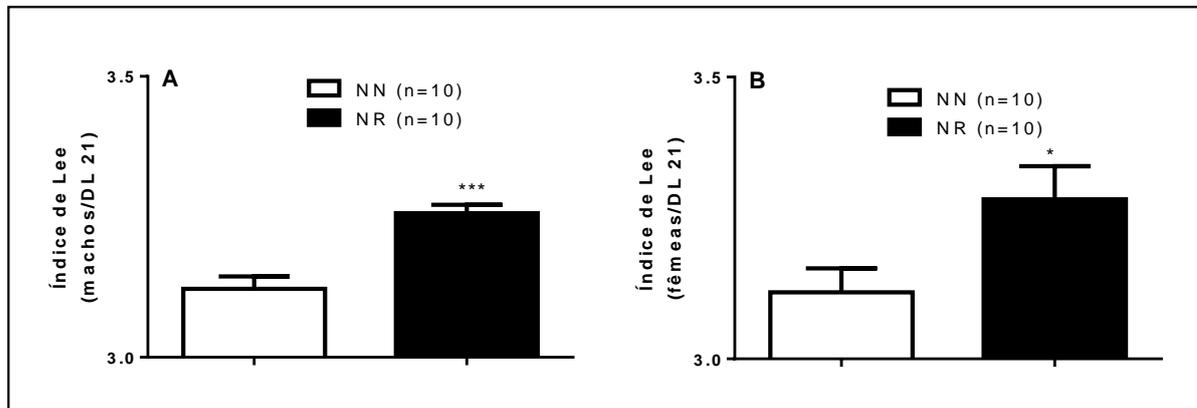


Nota: Filhotes machos (A) e fêmeas (B); NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; DL= dia lactacional. Valores expressos como média \pm EPM. Sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Machos de NR apresentaram maior Índice de Lee (DL 21) comparados aos machos de NN ($p < 0.001$) (Figura 19A), enquanto que fêmeas de NR exibiram maior IL comparadas às fêmeas de NN ($p < 0.05$) (Figura 19B).

Figura 19 – Índice de Lee no DL 21 em filhotes machos (A) e fêmeas (B) de NN e NR.

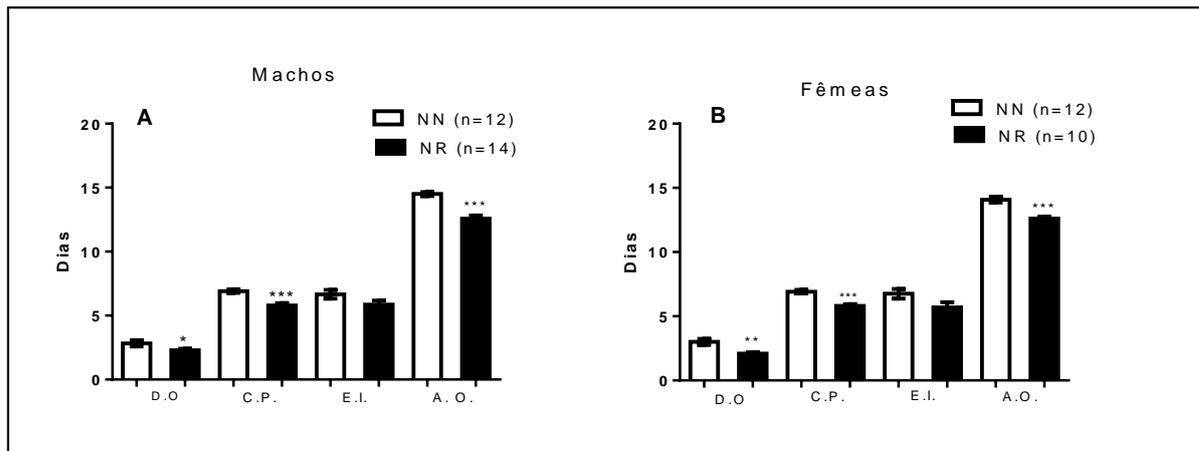


Nota: Filhotes machos (A) e fêmeas (B); NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; DL= dia lactacional. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$, quando comparados ao grupo NN. Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Em relação ao desenvolvimento dos parâmetros físicos em machos (Figura 20A), o desdobramento da orelha ($p < 0.05$), crescimento de pelos ($p < 0.001$) e abertura dos olhos ($p < 0.001$) foram antecipados nos filhotes de NR em relação aos de NN. Na avaliação da erupção dos incisivos, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Quanto às fêmeas (Figura 20B), o desdobramento da orelha ($p < 0.01$), crescimento de pelos ($p < 0.001$) e abertura dos olhos ($p < 0.001$) também foram antecipados em filhotes de NR em relação aos de NN. Quanto à erupção dos incisivos não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Figura 20 – Desenvolvimento físico de filhotes machos e fêmeas de NN e NR dos DLs 2 ao 21.

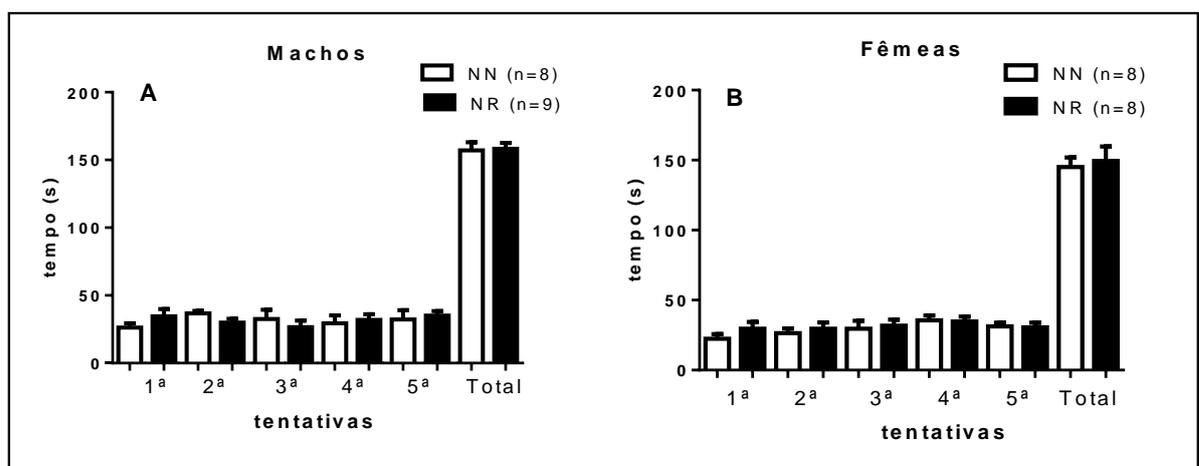


Nota: Filhotes machos (A) e fêmeas (B); D.O= desdobraimento da orelha; C.P.= crescimento de pelos; E.I.= erupção dos incisivos; A.O.= abertura dos olhos; NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; DL= dia lactacional. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle. Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Nas Figuras 21A (machos) e 21B (fêmeas) observou-se que o teste de preferência ao odor maternal (TPOM) não mostrou diferenças significantes nas tentativas e no tempo total de permanência sobre a área com odor maternal em filhotes no DL 7.

Figura 21 – Tempo de permanência sobre a área com odor maternal no TPOM em filhotes machos e fêmeas de NN e NR no DL 7, em 5 tentativas e no tempo total em segundos.

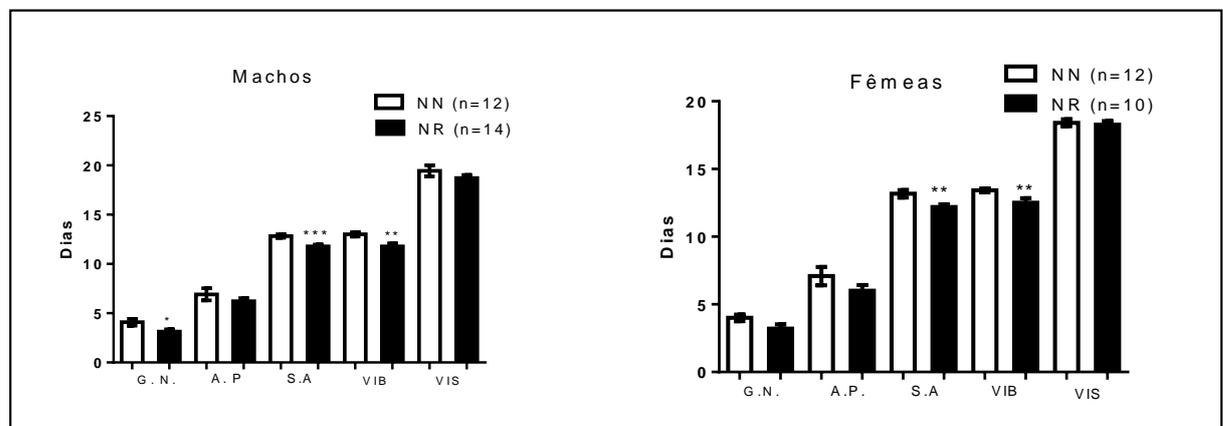


Nota: Filhotes machos (A) e fêmeas (B); TPOM= teste de preferência ao odor maternal; NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; DL= dia lactacional. Valores expressos como média \pm EPM. Sem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Quanto ao desenvolvimento reflexivo, os animais machos (Figura 22A) de NR apresentaram 3 dos 5 reflexos antecipados: geotaxia negativa ($p < 0.05$), susto auditivo ($p < 0.001$) e teste da vibrissa ($p < 0.01$). Os reflexos de apreensão palmar e teste visual não mostraram diferenças estatísticas entre os grupos. Quanto às fêmeas (Figura 22B), as de NR apresentaram 2 dos 5 reflexos antecipados: susto auditivo ($p < 0.01$) e teste da vibrissa ($p < 0.01$). Os reflexos de geotaxia negativa, apreensão palmar e teste visual não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de fêmeas analisados.

Figura 22 – Desenvolvimento reflexivo de filhotes machos e fêmeas de NN e NR dos DLs 2 ao 21.

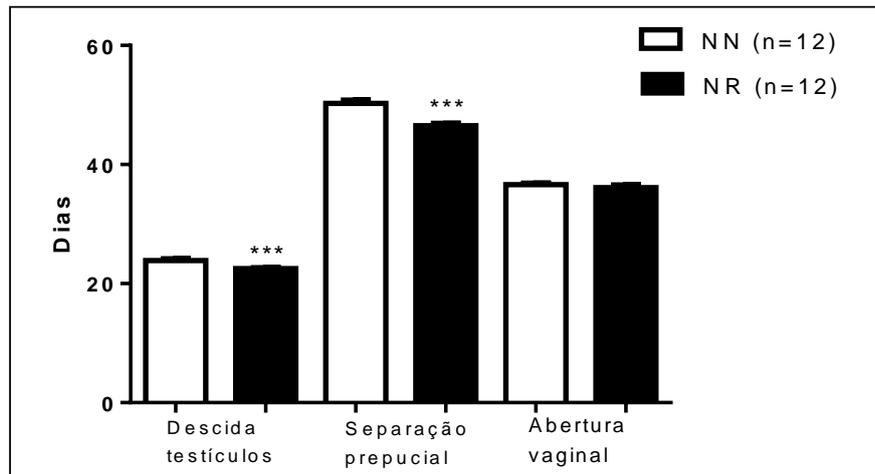


Nota: Filhotes machos (A) e fêmeas (B); G.N= geotaxia negativa; A.P.= apreensão palmar; S.A.= susto auditivo; VIB= teste das vibrissas; VIS= teste visual; NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; DL= dia lactacional. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle. Teste *t-Student*.

Fonte: Da autora.

Na avaliação do desenvolvimento sexual dos filhotes, machos de NR tiveram antecipados a descida dos testículos ($p < 0.001$) e a separação prepucial ($p < 0.001$) em relação aos machos de NN, enquanto que nas fêmeas a abertura vaginal não apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos avaliados (Figura 23).

Figura 23 – Desenvolvimento sexual de filhotes de NN e NR após o desmame.



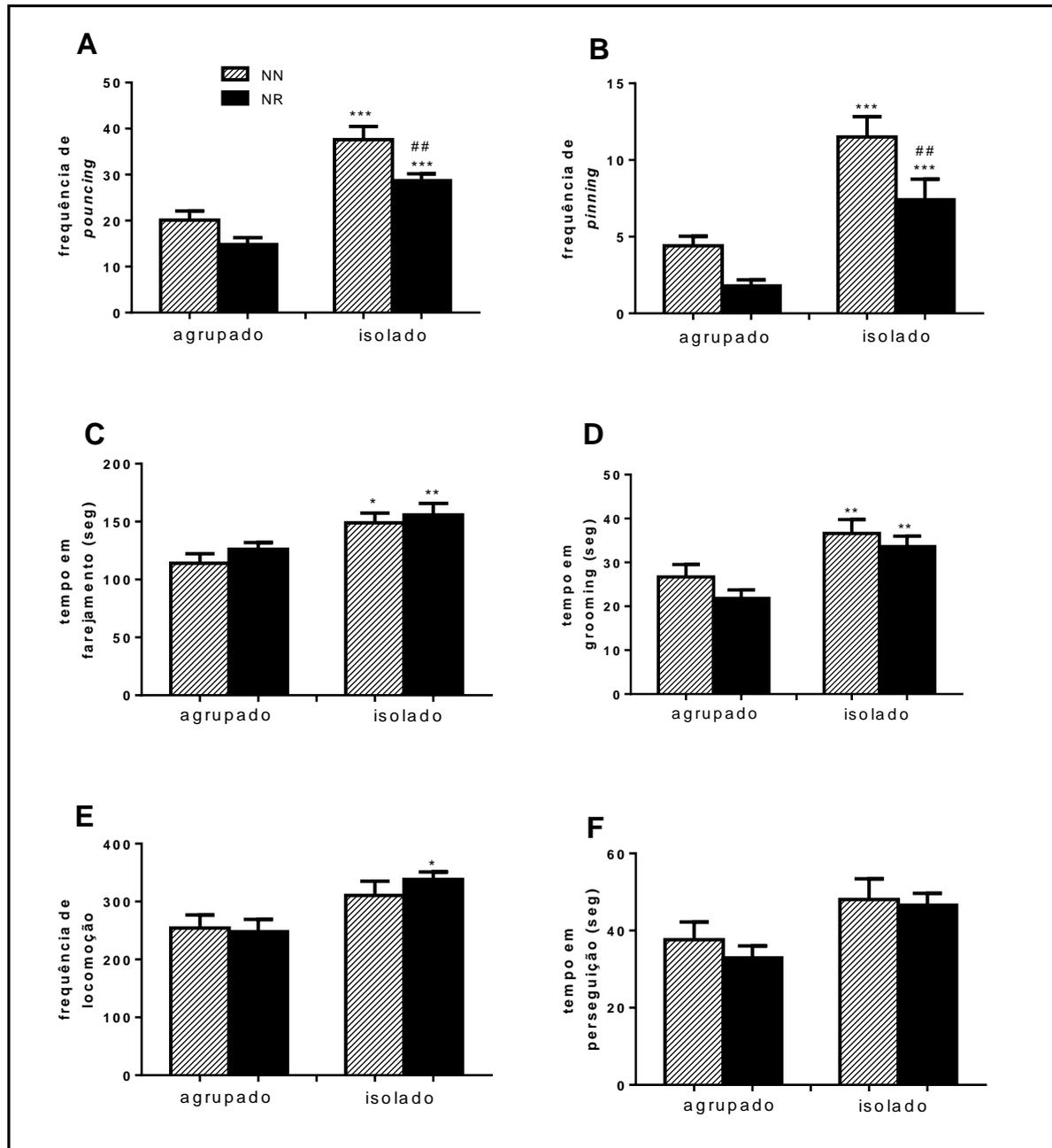
Nota: NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Valores expressos como média \pm EPM.
 *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle. Teste *t-Student*;
 Fonte: Da autora.

6.4 COMPORTAMENTO JUVENIL DE BRINCADEIRA

Quanto aos resultados do CJB em filhotes machos de NN e NR, podemos observar na Figura 24 que o isolamento aumentou a frequência e o tempo da brincadeira na maioria dos parâmetros avaliados em animais de NN e NR comparados aos animais agrupados (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Além disso, animais de NR isolados mostraram menor frequência de *pouncing* (## $p < 0.01$; Figura 24A) e de *pinning* (## $p < 0.01$; Figura 24B) comparados aos seus controles isolados. Quanto aos parâmetros de tempo em farejamento, tempo em *grooming*, frequência de locomoção e tempo em perseguição (Figura 24C, 24D, 24E e 24F) não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos que foram isolados.

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para o CJB em filhotes machos são descritos na Tabela 6.

Figura 24 – Comportamento juvenil de brincadeira em filhotes machos de NN e NR.



Nota: *Pouncing* (A); *Pinning* (B); *Farejamento* (C); *Grooming* (D); *Locomoção* (E); *Perseguição* (F); NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Valores expressos como média ± EPM. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 em relação ao controle agrupado; ## p<0.01 em relação ao controle isolado (n=10 por grupo). ANOVA Two-way, pós-teste Newman-Keuls.

Fonte: Da autora.

Tabela 6 - Análises de variância de duas vias do comportamento juvenil de brincadeira em machos de NN e NR.

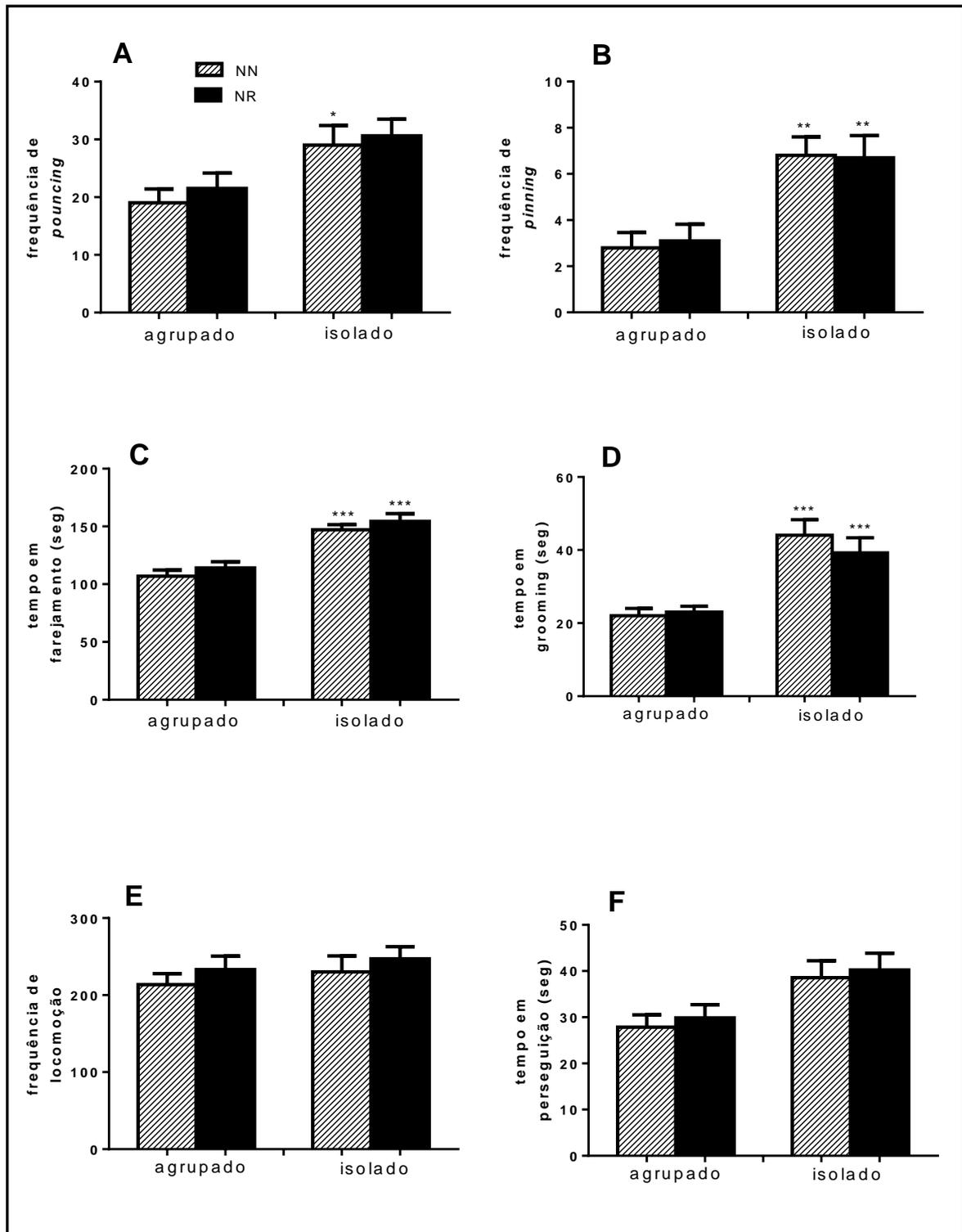
Parâmetros	Ninhada	Alojamento	Interação
<i>Pinning</i>	$F_{1,36} = 10,72; p < 0.01$	$F_{1,36} = 38,51; p < 0.001$	$F_{1,36} = 0.537; p = 0.468$
<i>Pouncing</i>	$F_{1,36} = 12,01; p < 0.001$	$F_{1,36} = 58,73; p < 0.001$	$F_{1,36} = 0,772; p = 0.385$
Farejamento	$F_{1,36} = 1,321; p = 0.462$	$F_{1,36} = 15,46; p < 0.001$	$F_{1,36} = 0,096; p = 0.703$
<i>Grooming</i>	$F_{1,36} = 2,272; p = 0.140$	$F_{1,36} = 17,14; p < 0.001$	$F_{1,36} = 0,131; p = 0.719$
Locomoção	$F_{1,36} = 0,250; p = 0.619$	$F_{1,36} = 12,20; p < 0.01$	$F_{1,36} = 0,664; p = 0.420$
Perseguição	$F_{1,36} = 0,552; p = 0.462$	$F_{1,36} = 8,30; p < 0.01$	$F_{1,36} = 0,147; p = 0.703$

Fonte: Da autora.

Quanto aos resultados obtidos do CJB em filhotes fêmeas (Figura 25) podê-se observar que o isolamento aumentou a frequência e o tempo da brincadeira na maioria dos parâmetros avaliados tanto em animais de NN quanto nos de NR (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; Figuras 25A, 25B, 25C e 25D). Não foram observadas diferenças entre os grupos de fêmeas de NN e NR que foram isoladas antes do início dos testes.

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para o CJB em filhotes fêmeas são descritos na Tabela 7.

Figura 25 – Comportamento juvenil de brincadeira em filhotes fêmeas de NN e NR.



Nota: *Pouncing* (A); *Pinning* (B); *Farejamento* (C); *Grooming* (D); *Locomoção* (E); *Perseguição* (F). NN=ninhada normal; NR=ninhada reduzida. Valores expressos como média \pm EPM. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001 em relação ao controle agrupado (n=10 por grupo). ANOVA *Two-way*, pós-teste *Newman-Keuls*.

Fonte: Da autora.

Tabela 7 - Análises de variância de duas vias do comportamento juvenil de brincadeira em fêmeas de NN e NR.

Parâmetros	Ninhada	Alojamento	Interação
<i>Pinning</i>	$F_{1,36} = 0,0157$; $p=0.901$	$F_{1,36} = 22,78$; $p<0.001$	$F_{1,36} = 0.063$; $p= 0.803$
<i>Pouncing</i>	$F_{1,36} = 0,507$; $p= 0.481$	$F_{1,36} = 11,00$; $p<0.01$	$F_{1,36} = 0,024$; $p= 0.876$
Farejamento	$F_{1,36} = 1,799$; $p=0.188$	$F_{1,36} = 54,25$; $p<0.001$	$F_{1,36} = 0,0004$; $p= 0.983$
<i>Grooming</i>	$F_{1,36} = 0,381$; $p=0.551$	$F_{1,36} = 34,81$; $p<0.001$	$F_{1,36} = 0,826$; $p= 0.369$
Locomoção	$F_{1,36} = 1,120$; $p=0.297$	$F_{1,36} = 0,780$; $p=0.383$	$F_{1,36} = 0,062$; $p=0.937$
Perseguição	$F_{1,36} = 0,323$; $p= 0.573$	$F_{1,36} = 10,72$; $p<0.01$	$F_{1,36} = 0,0029$; $p= 0.957$

Fonte: Da autora.

6.5 TESTES COMPORTAMENTAIS APÓS INDUÇÃO DE COMPORTAMENTO DOENTIO COM LPS

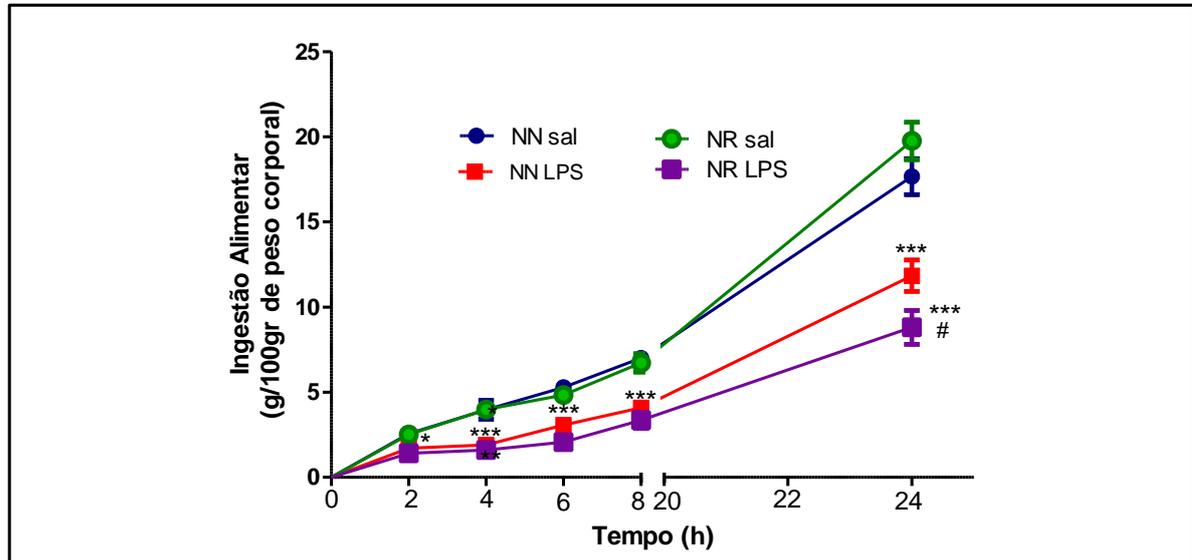
Os resultados de nosso estudo sobre os efeitos da administração de LPS estão descritos a seguir.

6.5.1 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar foi monitorada durante 24h após a aplicação de salina ou LPS em animais machos controle e de ninhada reduzida. Conforme demonstrado na Figura 26, os animais que receberam LPS, tanto do grupo controle quanto do grupo NR, ingeriram menos ração comparados aos animais que receberam salina na 2ª hora ($p<0.05$), na 4ª hora ($p<0.001$), na 6ª hora ($p<0.001$), na 8ª hora ($p<0.001$) e na 24ª hora ($p<0.001$). Os animais que receberam LPS do grupo NR mostraram ainda menor ingestão alimentar comparados aos animais do grupo NN LPS na 24ª hora após o desafio imunológico ($\#p<0.05$).

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para a ingestão alimentar em machos adultos de NN e NR são descritos na Tabela 8.

Figura 26 – Ingestão alimentar em filhotes machos de NN e NR 2, 4, 6, 8 e 24h após injeções de salina ou LPS.



Nota: NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; sal= salina. Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle salina; # $p < 0.05$ em relação ao grupo controle LPS (n=15 por grupo). ANOVA *Two-way*, pós-teste *Newman-Keuls*.

Fonte: Da autora.

Tabela 8 - Análises de variância de duas vias da ingestão alimentar em ratos machos adultos após salina ou LPS.

Parâmetros	Ninhada	Desafio imune	Interação
2ª hora	$F_{1,50} = 0.511$; $p = 0.478$	$F_{1,50} = 16.69$; $p < 0.001$	$F_{1,50} = 0.294$; $p = 0.590$
4ª hora	$F_{1,50} = 0.127$; $p = 0.722$	$F_{1,50} = 33.84$; $p < 0.001$	$F_{1,50} = 0.169$; $p = 0.682$
6ª hora	$F_{1,50} = 4.303$; $p < 0.05$	$F_{1,50} = 50.84$; $p < 0.001$	$F_{1,50} = 0.639$; $p = 0.428$
8ª hora	$F_{1,50} = 1.212$; $p = 0.276$	$F_{1,50} = 45.94$; $p < 0.001$	$F_{1,50} = 0.243$; $p = 0.624$
24ª hora	$F_{1,50} = 0.209$; $p = 0.649$	$F_{1,50} = 66.67$; $p < 0.001$	$F_{1,50} = 6.212$; $p < 0.05$

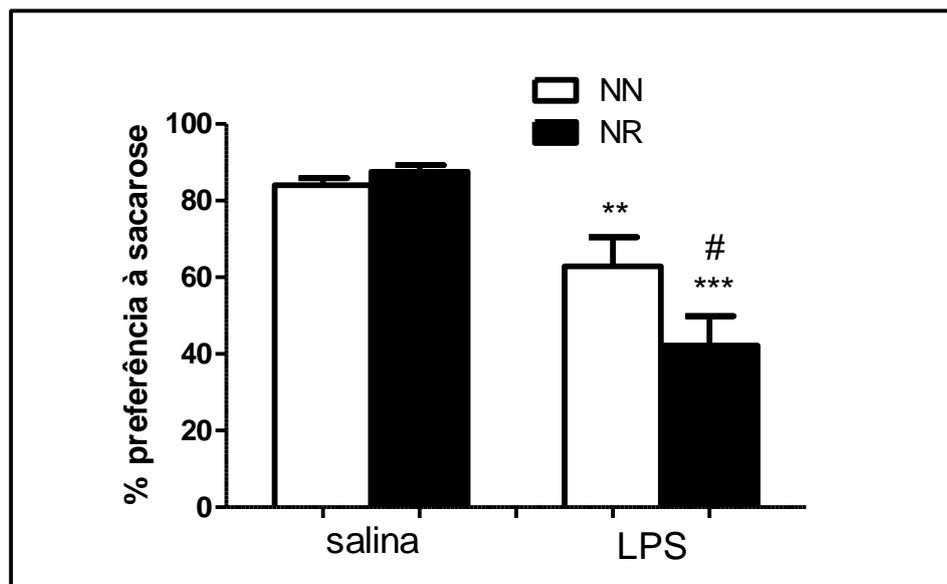
Fonte: Da autora.

6.5.2 Preferência à sacarose

Na Figura 27 observou-se os resultados do teste de preferência à sacarose para os animais NN e NR. Os machos de NN LPS preferiram menos sacarose quando comparados aos animais controle salina ($p < 0.01$); da mesma forma, os machos de NR LPS também tiveram menor porcentagem de preferência à sacarose comparados aos NR salina ($p < 0.001$). Quanto aos animais do grupo LPS, os de NR preferiram ainda menos sacarose comparados aos seus controles LPS ($p < 0.05$).

A análise de variância ANOVA *Two-way* para o teste de preferência à sacarose em machos adultos de NN e NR está descrita na Tabela 9.

Figura 27 – Porcentagem de preferência à sacarose em filhotes machos de NN e NR 2h após injeções de salina ou LPS.



Nota: NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Valores expressos como média \pm EPM.
 ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ em relação ao grupo controle salina; # $p < 0.05$ em relação ao grupo controle LPS (n=15 por grupo). ANOVA *Two-way*, pós-teste *Newman-Keuls*.
 Fonte: Da autora.

Tabela 9 - Análises de variância de duas vias da preferência à sacarose em ratos machos adultos após salina ou LPS.

Parâmetros	Ninhada	Desafio imune	Interação
Preferência	$F_{1,56} = 2.42$; $p = 0.125$	$F_{1,56} = 36.23$; $p < 0.001$	$F_{1,56} = 4.751$; $p < 0.05$

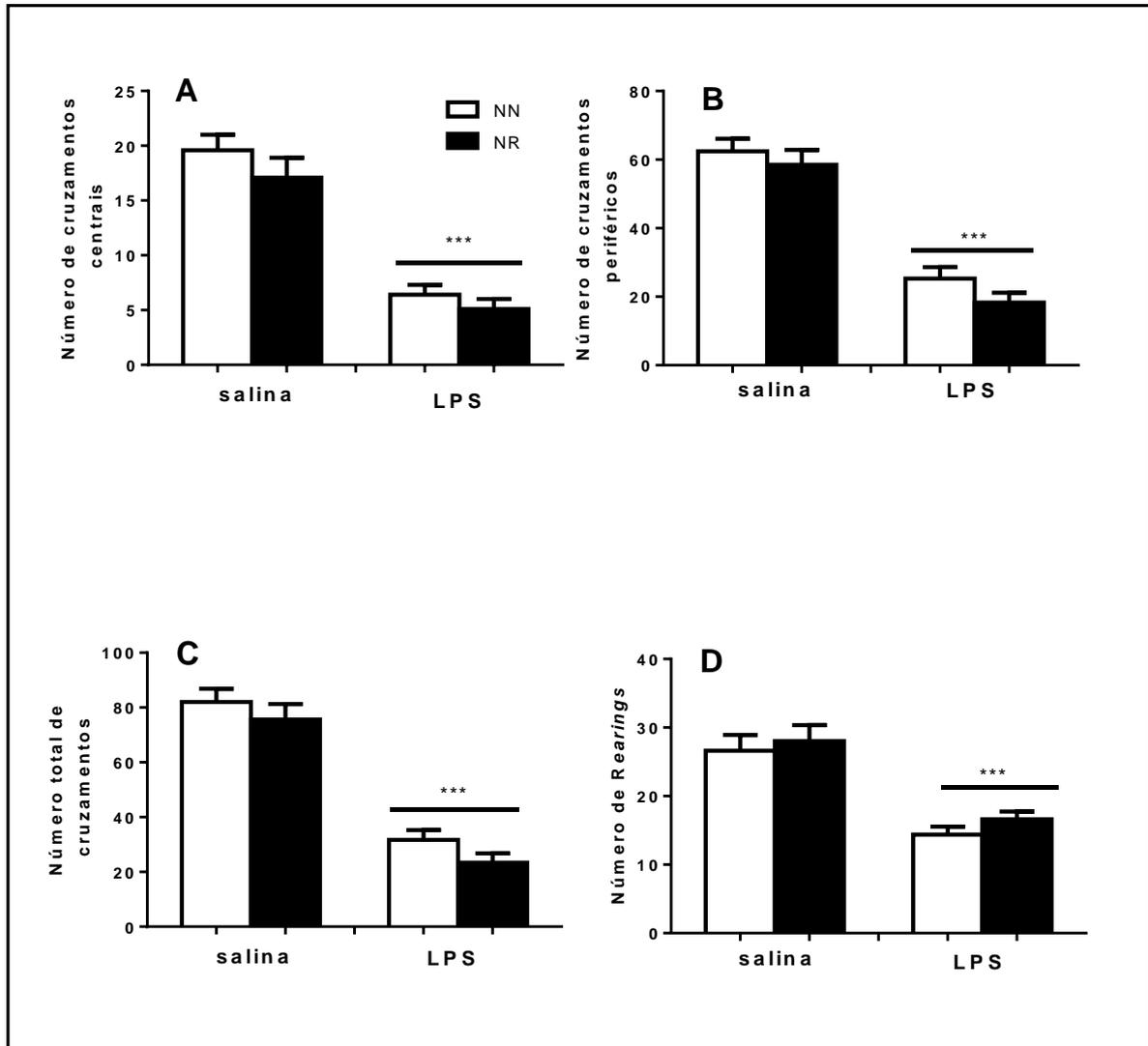
Fonte: Da autora.

6.5.3 Campo aberto

Análises realizadas 2 horas após a aplicação de salina ou LPS revelaram no campo aberto a diminuição no número de entradas no centro ($p < 0.001$; Figura 28A), no número de entradas na periferia ($p < 0.001$; Figura 28B), no número total de entradas ($p < 0.001$; Figura 28C) e no número de *Rearings* ($p < 0.001$; Figura 28D), em animais de ninhada normal e ninhada reduzida que receberam LPS comparados aos que receberam salina. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em nenhum dos parâmetros analisados em animais dos grupos NN e NR que receberam LPS.

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para o teste de campo aberto em nossos animais experimentais estão descritos na Tabela 10.

Figura 28 - Efeitos da aplicação de salina ou LPS sobre o comportamento no aparato de campo aberto em machos adultos de NN e NR.



Nota: NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Número de cruzamentos centrais (A); Número de cruzamentos periféricos (B); Número total de cruzamentos (C); Número de *Rearings* (D). Valores expressos como média \pm EPM. *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo controle salina ($n = 10$ por grupo). ANOVA *Two Way*, pós-teste *Newman-Keuls*.

Fonte: Da autora.

Tabela 10 - Análises de variância de duas vias do teste de campo aberto em ratos machos adultos após salina ou LPS.

Parâmetros	Ninhada	Desafio imune	Interação
Campo aberto	$F_{1,36} = 2.101$; $p = 0.156$	$F_{1,36} = 92.39$; $p < 0.001$	$F_{1,36} = 0.21$; $p = 0.649$

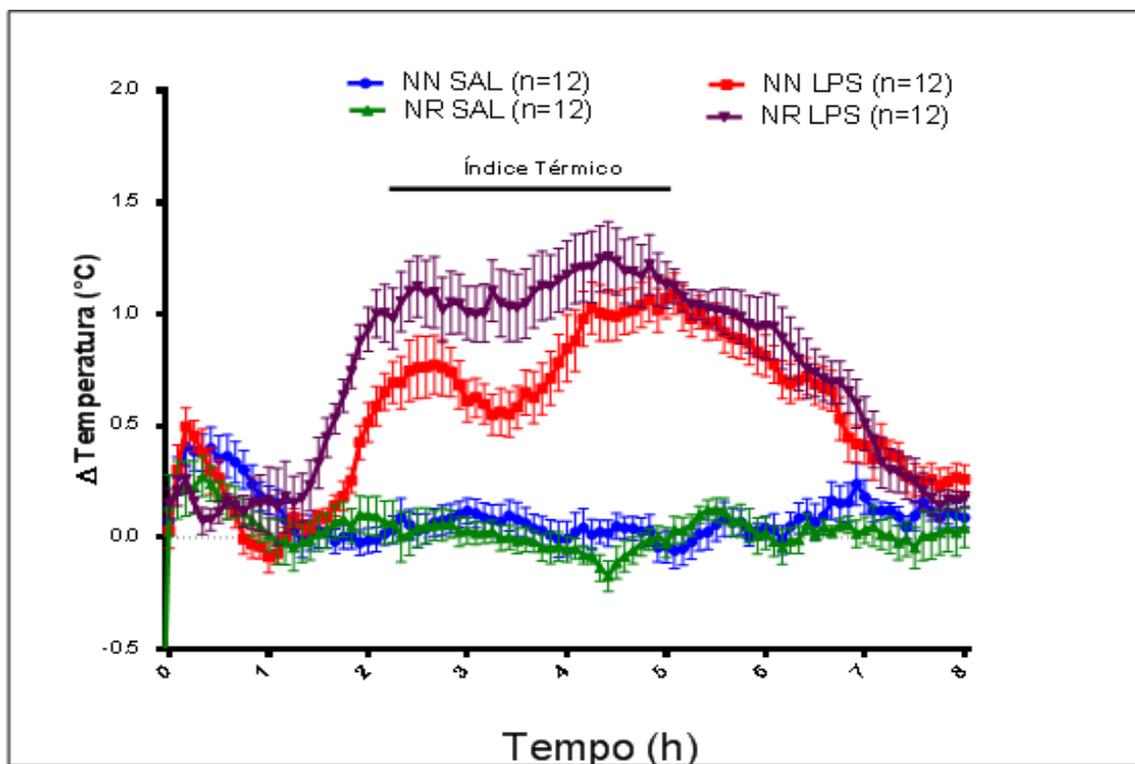
Fonte: Da autora.

6.5.4 Monitoramento da temperatura corporal

Os resultados da avaliação da temperatura corporal por telemetria mostraram que a administração de LPS induziu a um aumento da temperatura corporal em animais de NN e de NR (Figura 29). O Índice térmico (área sob a curva) do intervalo entre 2 e 5 horas (Figura 30) aumentou tanto no grupo NN quanto no grupo NR, após a administração de LPS. Entretanto, tanto a variação de temperatura corporal quanto o índice térmico após o desafio imune apresentaram-se maiores em machos criados em ninhadas reduzidas comparados aos machos criados em ninhadas normais, evidenciando uma resposta febril mais acentuada frente ao LPS em animais de NR. Uma vez que o estado febril é estabelecido, a febre tem a mesma magnitude tanto no grupo controle quanto no grupo NR.

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para o índice térmico entre 2-5h são descritos na Tabela 11.

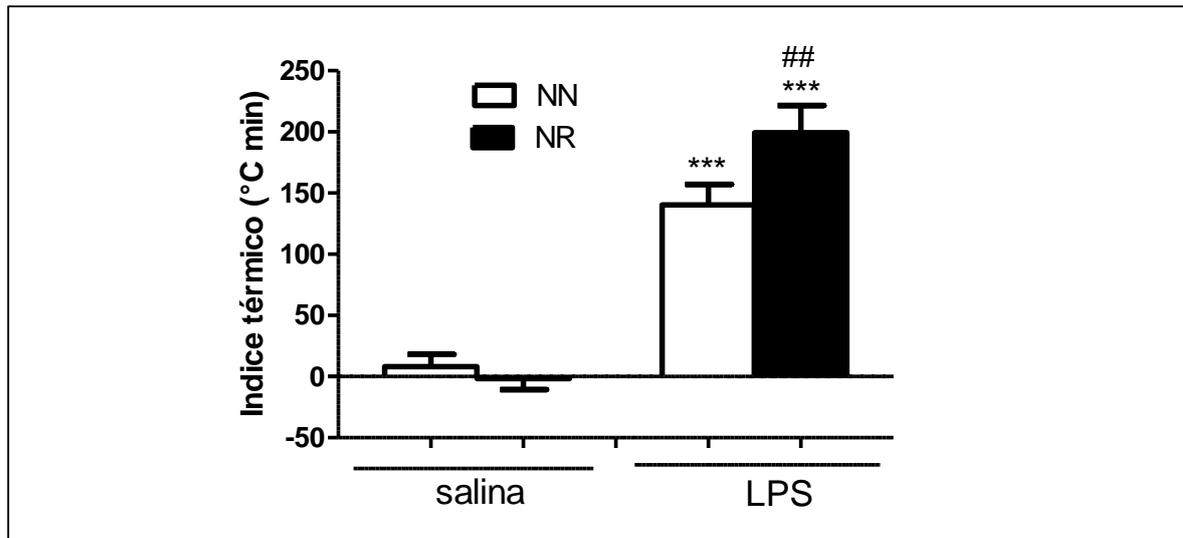
Figura 29 – Efeitos da administração de salina ou LPS sobre a variação da temperatura corporal em animais de NN e NR.



Nota: NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; sal= salina; h= hora.

Fonte: Da autora.

Figura 30 - Efeitos da administração de salina ou LPS sobre o índice térmico no intervalo de 2-5 hs após administração em animais de NN e NR.



Nota: NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida. Valores expressos como média \pm EPM.
 *** $p < 0.001$ quando comparado ao grupo controle salina; ## $p < 0.01$ quando comparado ao grupo controle LPS. ANOVA *Two Way*, pós-teste *Newman-Keul*.

Fonte: Da autora.

Tabela 11 - Análises de variância de duas vias do índice térmico (2-5h) em ratos machos adultos após salina ou LPS.

Parâmetros	Ninhada	Desafio imune	Interação
Índice térmico	$F_{1,22} = 2,504$; $p = 0,128$	$F_{1,22} = 118,0$; $p < 0,001$	$F_{1,22} = 4,915$; $p < 0,05$

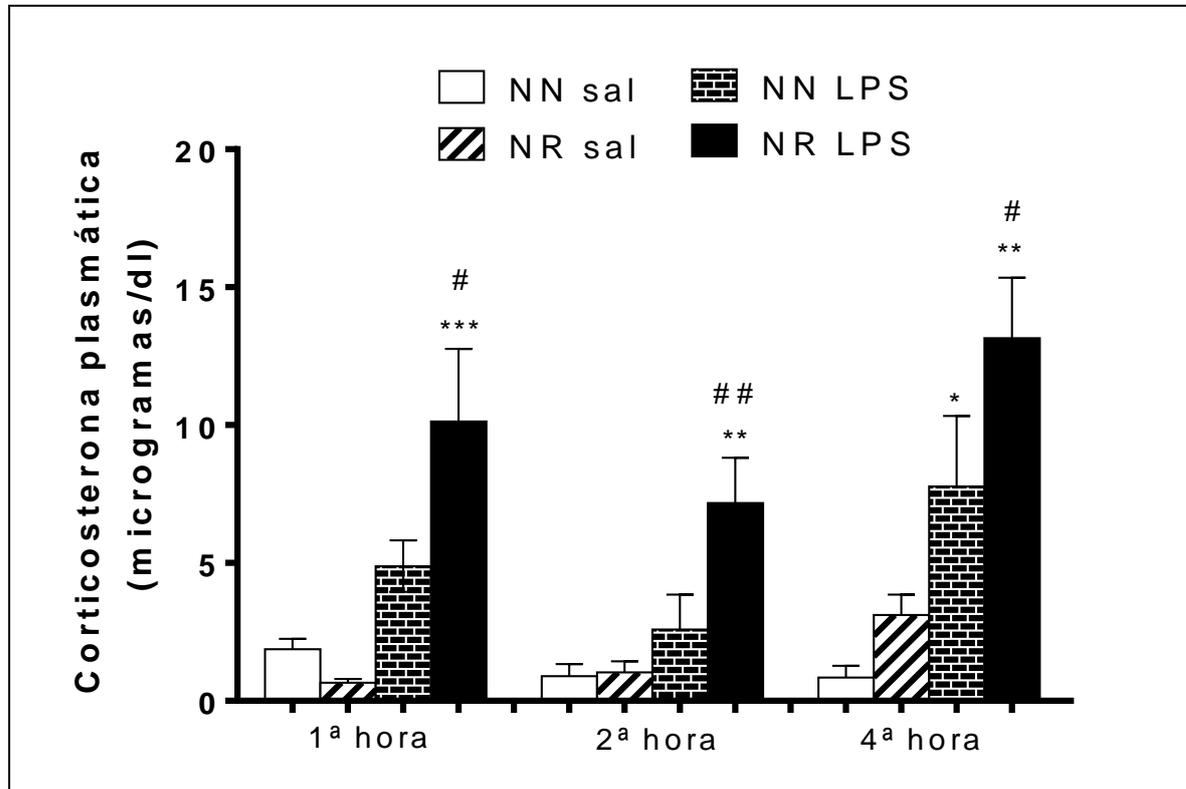
Fonte: Da autora

6.6 DOSAGENS DE CORTICOSTERONA

Na Figura 31 estão descritos os resultados das dosagens dos níveis plasmáticos de CT ($\mu\text{g/dL}$) em filhotes machos adultos de NN e NR 1, 2 e 4h após receberem salina ou LPS. Os animais do grupo NN LPS tiveram maiores níveis comparados ao seu grupo controle salina na 4ª hora após o desafio imune ($p < 0.05$), enquanto que os animais NR LPS mostraram maiores níveis em todas as horas avaliadas em relação aos animais NR que receberam salina ($p < 0.01$; $p < 0.001$). Além disso, os animais NR LPS demonstraram maiores níveis de CT comparados aos NN LPS em todas as horas avaliadas ($p < 0.05$; $p < 0.01$).

Os resultados da análise de variância ANOVA *Two-way* para os níveis plasmáticos de CT em machos adultos de NN e NR são descritos na Tabela 12.

Figura 31 – Níveis plasmáticos de CT ($\mu\text{g/dL}$) 1, 2 e 4 horas após injeções i.p.de salina ou LPS em filhotes machos adultos de NN e NR.



Nota: NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; sal= salina; i.p.= intraperitoneal; $\mu\text{g/dL}$ = micrograma por decilitro. Valores expressos como média \pm EPM. * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ em relação ao grupo controle salina; # $p<0.05$; ## $p<0.01$ em relação ao grupo controle LPS (n=8). ANOVA *Two-way*, pós-teste *Newman-Keuls*.

Fonte: Da autora.

Tabela 12 - Análises de variância de duas vias das dosagens de corticosterona em ratos machos adultos após salina ou LPS.

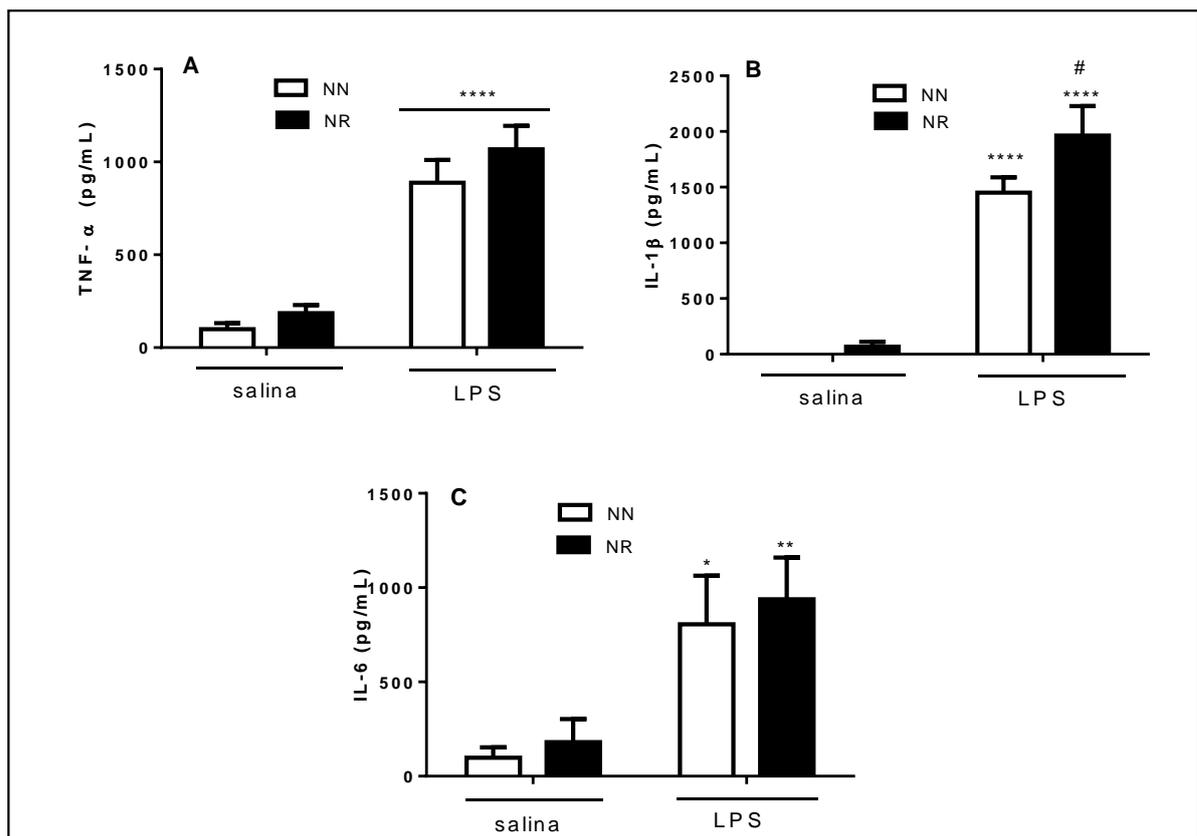
Parâmetros	Ninhada	Desafio imune	Interação
1ª hora	$F_{1,27} = 1.941$; $p=0.175$	$F_{1,27} = 18.65$; $p<0.001$	$F_{1,27} = 5.005$, $p<0.05$
2ª hora	$F_{1,26} = 4.257$; $p<0.05$	$F_{1,26} = 11.71$; $p<0.01$	$F_{1,26} = 3.748$; $p=0.064$
4ª hora	$F_{1,25} = 4.616$, $p<0.05$	$F_{1,25} = 22.74$; $p<0.001$	$F_{1,25} = 0.766$; $p=0.389$

Fonte: Da autora

6.7 DOSAGENS DE CITOCINAS

Na Figura 32 estão descritos os resultados das dosagens de citocinas em animais do presente estudo. Animais de NN e NR que receberam LPS apresentaram maiores níveis plasmáticos de TNF- α , IL-1 β e IL-6 comparados aos animais que receberam salina. Animais de NR LPS mostraram maiores níveis de IL-1 β comparados aos animais NN LPS (Figura 32B), enquanto que para as outras citocinas avaliadas as diferenças entre os grupos LPS não foram estatisticamente significantes (Figuras 32A e 32C).

Figura 32 – Níveis plasmáticos de citocinas (pg/mL) 2h após injeções i.p. de salina ou LPS em filhotes machos adultos de NN e NR.



Nota: Níveis de TNF- α (A) IL-1 β (B) e IL-6 (C). NN= ninhada normal; NR= ninhada reduzida; pg/mL= picograma por mililitro. Valores expressos como média \pm EPM. * p <0.05; ** p <0.01; **** p <0.0001 em relação ao grupo controle salina; # p <0.05 em relação ao grupo controle LPS (n=6 a 8). ANOVA *Two-way*, pós-teste *Newman-Keuls*.

Fonte: Da autora.

7 DISCUSSÃO

A modificação do ambiente neonatal pela redução no número de filhotes por ninhada foi capaz de programar mudanças no comportamento maternal e no desenvolvimento dos filhotes nos períodos lactacional, juvenil e adulto, demonstrando a importância da programação neonatal na responsividade da mãe e da prole aos estímulos ambientais.

Uma provável explicação para o aumento ou a diminuição do comportamento maternal em diferentes tamanhos de ninhada foi apresentada por Priestnall (1972) em estudo com camundongos. Este autor observou que lactantes de ninhadas menores despendem mais tempo em lambidas e amamentando os filhotes enquanto que mães de ninhadas maiores deixam mais frequentemente o ninho pelo desconforto ou fadiga produzidos pelo contato excessivo ou a estimulação extra da região mamária durante a sucção. FLEMING et al. (2002) em estudo com ratos observaram que a quantidade de lambida ofertada aos filhotes diminui quando a prole é criada em ninhadas grandes ou se a mãe é submetida à bulbectomia olfatória. Estes autores demonstraram ainda que mães mais responsivas materno materno a sua prole produzem filhotes mais responsivos para seus próprios filhotes, mostrando que os efeitos do CM podem ser propagados através de gerações sob certas circunstâncias ambientais, assumindo um caráter adaptativo.

A programação ocorrida no período neonatal com a redução no número de filhotes foi capaz de afetar substancialmente o ambiente maternal no presente estudo, uma vez que o desenvolvimento do sistema neurocomportamental que fundamenta o CM envolve a sinalização sensorial entre mãe e filhotes, o contato social com coespecíficos, a alimentação e a ritmicidade da ejeção de leite (GONZALEZ et al., 2001), com implicações importantes no desenvolvimento neonatal e futuro da prole.

Um dos fatores potencialmente afetados nas variações no número de filhotes é a disponibilidade de leite oferecido. Embora nutrizas de ninhadas grandes sabidamente secretem mais leite que àquelas de ninhadas menores, a quantidade de leite disponível por filhote diminui à medida que o tamanho da ninhada aumenta (KUMARESAN; ANDERSON; TURNER, 1966). Além disso, a literatura mostra que a redução no número de filhotes por nutriz é capaz de alterar a quantidade e a

qualidade da produção do leite, o qual passa a apresentar maior conteúdo de gordura, elevando o teor calórico de nutrientes durante a lactação (FIOROTTO et al., 1991; SHANKAR et al., 2008).

Apesar da maior quantidade de leite disponível à medida que a ninhada diminui, estudos prévios mostram um déficit na amamentação em ninhadas pequenas, evidenciando um estado hipomotivacional, no qual há a atenuação do componente apetitivo e do vigor com que estes filhotes procuram suas mães (TEICHER; KENNY, 1978). Estes resultados corroboram os dados de maior ativação neuronal em áreas hipotalâmicas envolvidas na amamentação em mães que criam ninhadas maiores.

A sucção mamilar é capaz de estimular a secreção de ocitocina (OT) durante o período pós-parto. A OT é um hormônio liberado na neurohipófise, a qual atua também como um neurotransmissor/neuromodulador lançado em sinapses no cérebro (NUMAN, 1994). Neurônios do PVN e do SON do hipotálamo secretam OT para diversas regiões, entre elas a MPOA e a expressão de receptores de OT aumenta em muitas destas regiões cerebrais próximo ao momento do parto (LENG; MEDDLE; DOUGLAS, 2008; MOOS et al., 1989; NUMAN; STOLZENBERG, 2009). Dentre estas regiões estão a área tegmental ventral (VTA), o núcleo accumbens (NA) e o sistema mesolímbico dopaminérgico, os quais modulam, além do CM, também a agressividade e a ansiólise maternal (NUMAN; WOODSIDE, 2010).

Apesar da maior estimulação mamilar pela sucção em ninhadas grandes, em ninhadas com menor número de filhotes a maior disponibilidade de leite leva à maior ingestão alimentar e maior ganho de peso e isto se deve à imaturidade do mecanismo de controle do comportamento ingestivo no período neonatal (MCMILLEN; ADAM; MUHLHAUSLER, 2005). O sobrepeso e a hiperfagia em ratos submetidos à redução de ninhadas podem ser decorrentes da diminuição da sensibilidade à leptina no hipotálamo (PLAGEMMAN et al., 1999) ou de um distúrbio no mecanismo de *feedback* negativo de insulina, acompanhado de má formação do núcleo hipotalâmico ventromedial (VHM) , região envolvida no controle da ingestão alimentar e da massa corporal (SCHWARTZ et al., 1996; OOMURA, 1983).

Variações de peso em diferentes tamanhos de ninhadas corroboram os resultados observados e demonstram que compartilhar o leite materno com maior número de filhotes leva os mesmos a alimentarem-se menos, tornando-os menores

em peso e tamanho em relação aos filhotes criados em ninhadas menores (BAUTISTA et al., 2010; HOU et al., 2011; SPENCER; TILBROOK, 2009; LORANCA; TORRERO; SALAS, 1999; RÖDEL et al., 2008).

Outra importante variável capaz de mediar os efeitos de manipulações na infância é a estimulação tátil e cinestésica oferecida pela mãe (LEVINE, 1962). A interrupção de estímulos sensoriais pela mãe tem efeitos negativos sobre o desenvolvimento da ninhada em muitas espécies (SCHANBERG; KUHN, 1980). O atraso no desenvolvimento reflexivo pode ser consequência da privação sensorial da mãe (LORANCA; TORRERO; SALAS, 1999; WARD; STEHM, 1991) e da exposição precoce ao frio, mais comum em nutrizes com maior número de filhotes, devido à ausência materna do ninho, com relevante influência no desenvolvimento da prole (BARNETT; BORLAND, 1967).

Variações no CM em roedores produzem importantes consequências nas respostas comportamentais ao estresse. Menores níveis de corticosterona e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) foram encontrados no plasma de ratos adultos de mães HL (LIU et al., 1997); a reação comportamental ao medo no teste de ocultação defensiva é maior em adultos que receberam menor cuidado maternal (MENARD; CHAMPAGNE; MEANEY, 2004) e há um aumento na duração do *freezing* no medo condicionado em ratos machos adultos cujas mães apresentaram diminuição do CM após tratamento com agonista canabinoide (COSTA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2013).

As respostas cognitivas também podem estar alteradas em razão das variações no cuidado maternal. Filhos adultos de mães HL exibiram memória e aprendizagem espacial dependentes do hipocampo aumentadas no labirinto aquático de Morris (BREDY et al., 2003; BREDY et al., 2004; LIU et al., 2000) e um aumento da capacidade de propagação da atenção sensório-motora, medida pela inibição pré-pulso (IPP) da resposta de sobressalto acústica (ZHANG et al., 2005).

Dentre as importantes consequências advindas das variações no cuidado maternal estão as diferenças na época de maturação do desenvolvimento sexual, uma vez que a lambida anogenital da mãe é especialmente importante para a maturação do desenvolvimento sexual e a entrada da puberdade na prole (CUMMINGS; CLEMENS; NUNEZ, 2010; MOORE, 1982).

Assim, conforme resultados vistos na Figura 23, houve um avanço no desenvolvimento sexual em machos de NR, evidenciando que o comportamento

maternal mais efetivo em ninhadas menores afeta mais a maturação sexual e a entrada da puberdade em machos que em fêmeas. A literatura corrobora os resultados apresentados ao relatar que a lambida e a limpeza da região anogenital que os filhotes recebem das mães são sexo-específicas e que machos recebem maior atenção das mães que as fêmeas, de maneira dependente da testosterona (CUMMINGS; CLEMENS; NUNEZ, 2010; MOORE, 1982).

A qualidade e a quantidade de estimulação anogenital que os filhotes recebem de suas mães podem moldar o desenvolvimento do comportamento sociosexual em ratos machos. O mesmo não ocorre em fêmeas, uma vez que ao se alterar a quantidade de estímulo tátil oferecida às fêmeas neonatas não ocorrem alterações no comportamento de brincadeira social no período juvenil. Altos níveis de comportamentos de brincar são considerados normais em machos, enquanto níveis menores constituem-se em comportamento normal em fêmeas, embora estas diferenças não tenham ainda sido caracterizadas ou experimentalmente quantificadas (BLAKE; MCCOY, 2015).

Quanto às diferenças de gênero e comportamento social, os dados são consistentes com estudos prévios, os quais sugerem que a redução do cuidado maternal aumenta o comportamento de brincadeira social em machos, mas não em fêmeas (PARENT; MEANEY, 2008) e que esta variação na responsividade à brincadeira entre machos e fêmeas pode ser devido à influência hormonal, a qual leva os machos a se engajarem mais frequentemente em lutas, contra atacarem mais e apresentarem maiores taxas de iniciação da brincadeira comparados às fêmeas (AUGER; OLESEN, 2009). Outros autores também observaram que roedores machos iniciam mais comportamentos sociais de brincadeira do que as fêmeas (MEANEY; STEWART, 1981; MEANEY; STEWART, 1981a) e que o dimorfismo no comportamento social é resultado dos maiores níveis de testosterona circulante em machos durante o desenvolvimento (MEANEY; STEWART, 1981a; OLIOFF; STEWART, 1978; WARD; STEHM, 1991; THOR; HOLLOWAY, 1986).

Somente mais recentemente, comportamentos sexualmente dimórficos têm sido investigados e incluem o envolvimento do sistema dopaminérgico mesocorticolímbico para a expressão da brincadeira em fêmeas no período juvenil, mostrando uma diferença de gênero sexual na rede neural que medeia o CJB (NORTHCUTT; NGUYEN, 2014). Além disso, outros autores observaram que mães HL têm níveis elevados de RNAm do receptor de dopamina no núcleo *accumbens*

associado às mudanças nas preferências de recompensa. Assim, o efeito do cuidado maternal no desenvolvimento da via dopaminérgica e no comportamento de recompensa de filhotes fêmeas pode ser crítico para modular as diferenças individuais no sistema mesolímbico dopaminérgico (PÉNA et al., 2014).

Corroborando os resultados encontrados, uma relação negativa entre o estímulo maternal pós-natal e o desenvolvimento do comportamento social na vida futura foi descrita mais recentemente na literatura. A simulação do cuidado maternal através da estimulação anogenital com uma escova reduziu o comportamento de brincadeira social em machos. Além disso, os mesmos tiveram aumentados a expressão de mRNA para os receptores 5HT_{2a} (receptor de serotonina 2a) na amígdala, sugerindo uma relação inversa entre a sinalização de serotonina e a frequência do comportamento social em ratos machos (EDELDMANN; DEMERS; AUGER, 2013). Além disso, a diminuição dos níveis de *licking/grooming* maternos após a aplicação de perfume à área anogenital (BIRKE; SADLER, 1987) e após dieta salina para a redução do apetite por urina e o bloqueio de pistas olfativas com sulfato de zinco (MOORE; POWER, 1992) aumentaram a brincadeira social em ratos machos.

Por outro lado, a literatura mostra também uma correlação positiva entre o comportamento maternal e o comportamento social em ratos machos na adolescência. Assim, animais que receberam maiores níveis de *licking/grooming* durante o período neonatal, tiveram maior frequência e duração de *pinning* e *pouncing* no CJB (VAN HASSELT et al., 2012).

O número e o grau de interação entre os filhotes da mesma ninhada podem influenciar o início da independência da mãe e o comportamento social no futuro. Proles de ninhadas grandes parecem ser mais competitivas e socialmente engajadas, em contraste com as de ninhadas menores, mais emocionais e menos ativas. Além da presença de coespecíficos, o meio hormonal e nutricional pré e pós-natal, a qualidade do cuidado maternal recebido e a atuação de hormônios neurohipofisários são fatores que podem resultar em alterações comportamentais importantes na vida adulta (DIMITSANTOS et al., 2007).

Mudanças hormonais no período lactacional já foram descritas como possíveis fatores capazes de afetar o comportamento social. Segundo Moore et al. (2010), ratos administrados com insulina do 10º ao 19º dia de vida exibiram uma diminuição no CJB social, principalmente nos parâmetros de *pinning* e *pouncing*, evidenciando

uma interessante consequência da sobrenutrição sobre a sensibilidade da prole aos estímulos do meio.

Modificações na nutrição perinatal em roedores e humanos podem comprometer o próprio desenvolvimento do sistema imune inato. Evidências recentes sugerem que a dieta perinatal pode independentemente influenciar o desenvolvimento do sistema imune, através de mecanismos como a propensão à obesidade, alteração na microbiota intestinal e através de modificações epigenéticas, as quais alteram a transcrição gênica por toda a vida (SPENCER, 2013).

A resposta imune em diferentes circunstâncias nutricionais as quais afetam o balanço energético demonstra a complexidade e heterogeneidade das defesas do hospedeiro e requerem um estudo integral das células imunocompetentes, bem como dos sistemas indutores e regulatórios, específicos ou não envolvidos no processo (MARTI; MARCOS; MARTINEZ, 2001).

A obesidade e a resistência à insulina têm sido descritas como causas do aperfeiçoamento do fenótipo inflamatório e do aumento do estresse oxidativo em humanos, contribuindo para o comprometimento da reatividade vascular pela estimulação de alterações pró-aterogênicas na vasculatura (CABALLERO, 2003).

A obesidade está associada a um estado de inflamação crônica devido à resposta de células metabólicas ao excesso de nutrientes e energia, as quais liberam mediadores pró-inflamatórios como TNF- α , IL-1 β , IL-6, leptina e resistina a partir do aumento do tecido adiposo em humanos e roedores (BASTARD et al., 2006; FAIN, 2006; GREGOR; HOTAMISLIGIL, 2011; HOTAMISLIGIL, 2006; SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004; TILG; MOSCHEN, 2006).

Semelhantemente aos animais de nosso estudo, ratos com obesidade induzida por dieta têm se mostrado mais responsivos aos efeitos do LPS, sendo estes efeitos provavelmente ligados às mudanças qualitativas no tecido adiposo branco e sua função na produção de citocinas inflamatórias. A restrição energética em 50% em ratos alimentados com dieta de cafeteria foi capaz de restaurar, pelo menos parcialmente as deficiências na resposta imune observadas em animais com sobrepeso (LAMAS; MARTINEZ; MARTI, 2004). Além disso, modificações na resposta imune à infecção foram descritas em vários modelos genéticos animais de obesidade, incluindo camundongos *ob/ob* e *db/db* e ratos *Zucker fa/fa* (IKEJIMA et al., 2005; IVANOV; KULCHITSKY; ROMANOVSKY, 2001; IVANOV;

ROMANOVSKY, 2002; LUGARINI et al., 2005; O'CONNOR et al., 2005; PARK et al., 2009). Ratos que receberam dieta rica em frutose tiveram maior expressão de citocinas no hipotálamo e no tecido adiposo após desafio imunológico com LPS (ORLANDI et al., 2015).

Em camundongos com obesidade induzida por dieta a inoculação oral bacteriana resultou em 40% de aumento na perda óssea 10 dias após o desafio bacteriano (AMAR et al., 2007). Camundongos obesos mostraram ainda um aumento na mortalidade e alterações na resposta imune após infecção pelo vírus *influenza* (SMITH et al., 2007) e um aumento na expressão e liberação de citocinas no plasma, baço, fígado e macrófagos peritoniais (LAWRENCE; BROUGH; KNIGHT, 2012),

Corroborando os resultados obtidos de que o sobrepeso e a obesidade podem modificar as respostas inflamatórias, ratos *Wistar* com obesidade induzida por dieta mostraram aumento dos níveis circulantes de TNF- α , IL-6, IL-1ra (antagonista receptor de IL-1) e de leptina, além de uma resposta aumentada e prolongada à febre após administração do LPS (POHL; WOODSIDE; LUHESHI, 2014; POHL, WOODSIDE, LUHESHI, 2009).

A literatura descreve ainda que ratos machos com sobrealimentação neonatal por redução de ninhadas exibiram maiores níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias, maior ativação de neurônios no PVN do hipotálamo, aumento na expressão de receptores TLR 2 e 4 em adipócitos e macrófagos no tecido adiposo e maior anorexia após endotoxemia (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2011).

A anorexia ou diminuição da ingestão alimentar é uma importante consequência da administração de LPS ou de citocinas (AKASAKA et al., 2006; CROSS-MELLOR et al., 2003; LANGHANS, 2007; RORATO et al, 2009; RORATO et al, 2012), sendo as citocinas pró-inflamatórias os principais mediadores endógenos na anorexia. Embora o mecanismo pelo qual o LPS ou as citocinas estimulam o cérebro para a inibição do apetite ainda não seja totalmente compreendido, existem evidências do envolvimento do receptor serotoninérgico 5-HT_{2c}, da PGE₂ e do eixo HHA neste processo (ASARIAN; LANGHANS, 2010).

Conforme dados das Figuras 30 e 32, o maior índice térmico e os maiores níveis plasmáticos de IL-1 β após LPS em animais com sobrepeso do presente estudo demonstram que provavelmente o acúmulo de tecido adiposo levou a respostas diferenciadas frente ao desafio imunológico com LPS. A IL-1 β atua na

regulação do comportamento doentio por suas ações no hipotálamo e hipocampo (DANTZER, 2001; BLUTHÉ et al., 2000).

Ratos *Zucker* obesos (*fa/fa*) e magros (*Fa/Fa*) os quais receberam microinfusões cerebrais de IL-1 β e de IL-6 demonstraram respostas à febre diferenciadas. Enquanto microinfusões de IL-1 β induziram maior resposta febril em obesos, microinfusões de IL-6 induziram maior resposta em magros, sugerindo que a obesidade genética nestes animais está associada à ação diferencial das citocinas nos mecanismos termorregulatórios (PLATA-SALAMAN; PELOSO; SATINOFF, 1998).

Outra citocina com efeitos pró-inflamatórios é a leptina, a qual tem sido descrita estar envolvida na mediação da resposta febril frente ao estímulo inflamatório do LPS. Injeções (periférica ou i.c.v.) de leptina induziram um aumento nos níveis de citocina pró-inflamatória IL-1 β no hipotálamo de ratos *Sprague-Dawley* (LUHESHI et al., 1999). Além disso, o jejum reduz a resposta à febre e este efeito é parcialmente restaurado pelo tratamento com leptina (INOUE; LUHESHI, 2010).

A febre e a anorexia induzidas por LPS em ratos são mediadas, pelo menos em parte pelos níveis circulantes de leptina (SACHOT; POOLE; LUHESHI, 2004). Em animais obesos, a leptina anti-soro específica da espécie (LAS), utilizada para neutralizar a leptina endógena, reduziu significativamente a magnitude da fase tardia da resposta febril bem como os níveis circulantes de IL-6, IL-1ra e a bioatividade da leptina (POHL, WOODSIDE, LUHESHI, 2014).

O modelo de sobrenutrição e obesidade tem também sido associado a um risco aumentado para o desenvolvimento de estresse, exacerbando a resposta do eixo HHA em humanos (ABILES et al., 2010; DOYLE et al., 2007; SCOTT et al., 2008) e em ratos (SPENCER; TILBROOK, 2009; WINKELMANN et al., 2007).

Mudanças no padrão de alimentação neonatal são capazes de alterar a função do eixo HHA. Fêmeas com sobrealimentação neonatal têm respostas mais acentuadas ao estresse agudo, com maiores níveis de corticosterona (SPENCER; TILBROOK, 2009). A sobrenutrição neonatal em ninhadas reduzidas foi capaz de aumentar os níveis plasmáticos de corticosterona e levar ao desenvolvimento do conjunto de sintomas conhecidos como síndrome metabólica em animais adultos (HOU et al.; 2011).

A correlação entre tipo de dieta e resposta ao estresse também tem sido descrita na literatura. Ratos que receberam dieta com alta porcentagem de gordura

têm resposta exagerada ao estresse moderado, com aumento dos níveis séricos de corticosterona (LEGENDRE; HARRIS, 2006). Mas na relação entre estresse e dieta gordurosa não fica claro se a responsividade aumentada ao estresse é devida à composição da dieta ou a um aumento da adiposidade.

De forma contrária, machos com subnutrição neonatal têm respostas mais eficientes ao estresse, com redução na ativação neuronal no PVN e na CT plasmática, as quais retornam aos níveis basais mais rapidamente (BULFIN et al., 2011).

Os maiores níveis plasmáticos de CT em animais com sobrepeso após indução do estresse imunológico em nossos resultados mostram que o excesso de peso provavelmente foi fator relevante para o agravamento destas respostas. Corroborando os dados, estudos anteriores mostraram que animais com sobrealimentação neonatal têm maior ativação do eixo HHA e maiores níveis de CT frente ao desafio imune por LPS (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2011).

A relação entre dieta e os efeitos do LPS sobre o eixo HHA foi estudada por ASTIZ et al. (2016). Camundongos submetidos ao desafio imune com LPS, os quais ingeriram dieta com baixa gordura (*low fat diet* – LFD) apresentaram menores níveis hipotalâmicos de CRH e GR (receptor de glicocorticoide) e animais com dieta de alta gordura (*high fat diet* – HFD) mostraram maior expressão hipotalâmica de CRH e GR. Estes autores sugerem que em camundongos LFD o aumento nos níveis de glicocorticoides induzido por LPS atue como sinal de *feedback* negativo, suprimindo a ativação do eixo HHA e diminuindo a expressão de CRH e GR, enquanto que em camundongos HFD este efeito contrarregulatório não ocorre, indicando uma possível dessensibilização do eixo HHA ao mecanismo de *feedback* negativo.

Resumindo, manipulações ocorridas em períodos precoces de desenvolvimento podem afetar de maneira relevante lactantes e filhotes. Alterações no ambiente maternal pela redução no número de filhotes por nutriz aumenta de maneira significativa o comportamento maternal em relação à prole, aumentando a oferta de leite aos neonatos e levando à antecipação dos desenvolvimentos físico e reflexivo na prole, e também do desenvolvimento sexual em ratos machos.

Quanto ao comportamento social no período juvenil, machos criados em ninhadas reduzidas mostraram menores níveis de brincadeira social. O maior cuidado maternal e a experiência social precoce com menor número de

coespecíficos, além da própria mudança nos padrões nutricionais podem ter contribuído para estes resultados.

As respostas comportamentais e inflamatórias mais intensas em animais com sobrepeso de nosso estudo demonstram uma maior susceptibilidade aos efeitos do LPS. Podemos concluir que há uma forte conexão entre eventos nutricionais precoces programando maior propensão à obesidade e esta resultando em um perfil pró-inflamatório basal e maior susceptibilidade a infecções.

Os resultados encontrados poderão contribuir para aprofundar o conhecimento sobre as mudanças orgânicas decorrentes do sobrepeso e da obesidade e suas consequências sobre o comportamento na presença de processos infecciosos graves, como na endotoxemia.

8 CONCLUSÃO

A redução de ninhadas promove aumento do comportamento maternal e sobrealimentação da prole. Como consequências têm-se sobrepeso, adiantamento do desenvolvimento e redução no comportamento juvenil de brincadeira em machos. Na vida adulta, os machos apresentam acentuado *sickness behavior* que pode ser atribuído à maior produção de IL-1 β .

REFERÊNCIAS

ABILES, V. et al. Psychological characteristics of morbidly obese candidates for bariatric surgery. **Obesity Surgery**. v. 20, p.161-167, 2010.

ADEREM, A; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**. v. 406, p. 782-787, 2000.

AHIMA, R.S.; ANTWI, D.A. Brain regulation of appetite and satiety. **Endocrinology Metabolism Clinics of North American**. v. 37, p. 811–823, 2008.

AKASAKA, S. et al. The hypothalamo-pituitary axis responses to lipopolysaccharide induced endotoxemia in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Brain Research**. v. 1089, n. 1, p. 1-9, 2006.

AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**. 4:499-511, 2004.

AMAR, S. et al. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 104, n. 51, p. 20466-20471, 2007.

ANGOÁ-PÉREZ, M. et al. Brain serotonin determines maternal behavior and offspring survival. **Revista Genes, Brain and Behavior**. v. 13, p. 579-591, 2014.

ANTUNA-PUENTE, B. et al. Adipokines: the missing link between insulin resistance and obesity. **Diabetes & Metabolism**. v. 34, n. 1, p. 2-11, 2008.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior**. v. 21, p. 205–235, 1973.

ASARIAN L.; LANGHANS W. A new look on brain mechanisms of acute illness anorexia. **Physiology & behavior**. v. 100, p. 464–471, 2010.

ASTIZ, M. et al. Short-term high fat diet-feeding provides hypothalamic but not hippocampal protection against acute infection in male. **Neuroendocrinology**. 2016. No prelo.

AUBERT, A. Sickness and behavior in animals: a motivational perspective. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 23, p. 1029-1036, 1999.

AUGER, A.P.; OLESEN, K.M. Brain sex differences and the organization of juvenile social play behavior. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 21, n. 6, p. 519-525, 2009.

AZIZI-MALEKABADI, H. et al. Deletion of ovarian hormones induces a sickness behavior in rats comparable to the effect of lipopolysaccharide. **Neurology Research International**. p. 627–642, 2015a.

AZIZI-MALEKABADI, H. et al. Tamoxifen antagonizes the effects of ovarian hormones to induce anxiety and depression-like behavior in rats. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 73, p. 132–139, 2015b.

BANKS, W.A.; ERICKSON, M.A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiology of Disease**. v. 37, p. 26–32, 2010.

BARKER, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**. v. 261, p.412-417, 2007.

BARNETT, S.A; BORLAND, K.A. An effect of cold exposure at birth on the reproduction of mice. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 13, p. 501-504, 1967.

BASTARD, J.P. et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. **European Cytokine Network**. v. 17, p. 4–12, 2006.

BAUTISTA, A. et al. Development of Behavior in the Litter Huddle in Rat Pups: Within- and Between-Litter Differences. **Developmental Psychobiology**. v. 52, n. 1, p. 35-43, 2010.

BEISHUIZEN, A; THIJS, L.G. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Journal of Endotoxin Research**. v. 9, n. 1, p.:3-24, 2003.

BERCZI I. Neurohormonal host defense in endotoxin shock. **Annals of the New York Academic of Science**. v. 840, P. 787–802, 1998.

BESSESEN, D. H. Update on obesity. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**. v. 93, p. 2027-2034, 2008.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**. v. 40, p. 845–859, 2004.

BIRKE, L.I.; SADLER, D. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. **Developmental Psychobiology**. v. 20, p. 85–99, 1987.

BLAKE, B.E.; MCCOY, K.A. Hormonal programming of rat social play behavior: Standardized techniques will aid synthesis and translation to human health. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 55, p. 184–197, 2015.

BLATTEIS, C.M. Body temperaure. In: Blatteis, C.M. (Ed.) **Physiology and Pathophysiology of Temperature Regulation**. New Jersey, World Scentic, p.14-21, 1998.

BLUTHÉ, R.M. et al. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor deficient mice. **European Journal of Neuroscience**. v. 12, p. 4447–4456, 2000.

BONIZZI, G., KARIN, M. The two NF-kB activation pathways and their role in innate and adaptative immunity. **Trends in Immunology**. v. 25, p. 280-288, 2004.

BOSCH, O.J. et al. Brain Oxytocin Correlates with Maternal Aggression:Link to Anxiety. **The Journal of Neuroscience**. v. 25, n. 29, p. 6807– 6815, 2005.

BOSCH, O.J., NEUMANN, I.D. Both ocytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: From central release to sites of action. **Hormones and Behavior**. v. 61, p. 293-303, 2012.

BOUBRED, F. et al. Effects of early postnatal hypernutrition on nephron number and long-term renal function and structure in rats, **American Journal of Physiology- Renal Physiology**. v. 293, p. 1944-1949, 2007.

- BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. **Diabetes**. v. 54, p. 197-203, 2005.
- BREDY, T. W. et al. Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment. **Neuroscience**. v. 118, p. 571–576, 2003.
- BREDY, T. W. et al. Peripubertal environmental enrichment reverses the effects of maternal care on hippocampal development and glutamate receptor subunit expression. **The European Journal of Neuroscience**. v. 20, p. 1355–1362, 2004.
- BRUNTON, P.J.; RUSSELL, J.A. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex specific effects. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 22, p. 258–271, 2010.
- BRUNTON, P.J. et al. Sex-specific effects of prenatal stress on glucose homeostasis and peripheral metabolism in rats. **Journal of Endocrinology**. v. 217, p. 161–173, 2013.
- BUCKLEY, A.J.; JAQUIERY, A.L.; HARDING, J.E. Nutritional programming of adult disease. **Cell and Tissue Research**. v. 322, p. 73-79, 2005.
- BULFIN, L.J. et al. Anxiety and hypothalamic- pituitary-adrenal axis responses to psychological stress are attenuated in male rats made lean by large litter rearing. **Psychoneuroendocrinology**. v. 36, p.1080–1091, 2011.
- BULLO, M. et al. Inflammation, obesity and comorbidities: the role of diet. **Public Health Nutrition**. v. 10, p. 1164-1172, 2007.
- BUSSO, N. et al. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. **The Journal of Immunology**. v. 168, n. 2, p. 875-882, 2002.
- CABALLERO, A.E. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. **Obesity Research**. v. 11, p. 1278–1289, 2003.
- CABANAC, M.; MASSONNET, B. Pathology of thermoregulation. **Revue Neurologique**. v. 136, n. 4, p. 285-302, 1980.

CAI, G. et al. Overfeeding during a critical postnatal period exacerbates hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to immune challenge: a role for adrenal melanocortin 2 receptors. **Scientific reports**. v. 6, 21097, 10.1038/srep21097, 2016.

CALDJI, C. et al. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Science. U.S.A.** v. 95, p. 5335–5340, 1998.

CANNON, T.D. et al. Prediction of psychosis in youth at high clinical risk: A multisite longitudinal study in North America. **Archives of General Psychiatry**. v. 65; n. 1, p. 28–37, 2008.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology and Behavior**. v. 79, n. 3, p. 359-371, 2003.

CLARKE, M.A.; STEFANIDIS, A.; SPENCER, S. J. Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 24, n. 3, p. 511-524, 2011.

CIRULLI, F.; BERRY, A.; ALLEVA, E. Early disruption of the mother-infant relationship: Effects on brain plasticity and implication for psychopathology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 27, p. 73-82, 2003.

CONCEIÇÃO, E.P.S. et al. Higher White adipocyte area and lower leptina production in adult rats overfed during lactation. **Hormone and metabolic research**. v. 43, p. 513-516, 2011.

CONCEIÇÃO, E.P.S. et al. Neonatal overfeeding causes higher adrenal catecholamine content and basal secretion and liver dysfunction in adult rats. **European Journal of Nutrition**. v. 52, p. 1393-1404, 2013.

COSTA, H. H.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: Consequences for fear conditioning in adulthood males. **Behavioural Brain Research**. v. 257, p. 31-38, 2013.

CROSS-MELLOR, S.K. et al. Activation of the immune system in rats with lipopolysaccharide reduces voluntary sucrose intake but not intraoral intake, **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**. v. 76, p. 153–159, 2003.

CROWELL-DAVIS, S.L., HOUPPT, K.A. Maternal behavior. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 2, n. 3, p. 557-571, 1986.

CRUNFLI, F., VILELA F.C., GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid CB1 receptors mediate the effects of dipyrone. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v. 42, n. 3, p. 246-255, 2014.

CRUZ-MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): Ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NF-kB. **Revista da Biologia**. v. 4, p. 40-43, 2010.

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

CUMMINGS, D. E. et al. Plasma ghrelin levels and hunger scores in humans initiating meals voluntarily without time- and food-related cues. **American journal of physiology**. v. 287, p. 297-304, 2004.

CUMMINGS, J.A.; CLEMENS, L.G.; NUNEZ, A.A. Mother counts: How effects of environmental contaminants on maternal care could affect the offspring and future generations. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 31, p. 440-451, 2010.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 15, n. 1, p. 7-24, 2001.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. **European Journal of Pharmacology**. v. 500, p. 399-411, 2004.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunology And Allergy Clinics of North America**. v. 29, n. 2, p. 247-264, 2009.

DANTZER, R. et al. Cytokines and sickness behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 840, p. 586-590, 1998.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Neurologic Clinics**. v. 24, p. 441-460, 2006.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Decreased inhibition by leptina of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. **Neuroreport**. v. 11, n. 12, p. 2795-2798, 2000.

DAVIDOWA, H.; YUZHEN, L.; PLAGEMANN, A. Altered response to orexigenic and anorexigenic neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. **European Journal of Neuroscience**. v. 18, p. 613-621, 2003.

DE ARAUJO, I.E. et al. Food reward in the absence of taste receptor signaling. **Neuron**. v. 57, p. 930–941, 2008.

DE LA GARZA, R. 2nd. Endotoxin- or pro-inflammatory cytokine-induced sickness behavior as an animal model of depression: focus on anhedonia. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 29, p. 761–770, 2005.

DE MOURA et al. Metabolic syndrome signs in wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. **The British Journal of Nutrition**. v. 101, n. 8, p. 1178-1184, 2009.

DE MOURA, E.G.; PASSOS, M.C. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. **Bioscience Reports**. v. 25, p. 251–269, 2005.

DE MOURA, E. G.; LISBOA, P. C.; PASSOS, M. C. F. Neonatal Programming of Neuroimmunomodulation – Role of Adipocytokines and Neuropeptides. **Neuroimmunomodulation**. v. 15, n. 3, p. 176-188, 2008.

DE PAIVA, V.N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research**. v. 215, p. 146–151, 2010.

DIMITSANTOS, E. et al. Litter size affects emotionality in adult male rats. **Physiology & Behavior**. v. 92, n. 4, p. 708-716, 2007.

DHILLO, W.S. Appetite regulation: an overview. **Thyroid**. v. 17, p.433–445, 2007.

DOYLE, A.C. et al. Psychosocial and physical impairment in overweight adolescent at high risk for eating disorders. **Obesity**. v. 15, p. 145-154, 2007.

DUNN, A.J. Mechanisms by which cytokines signal the brain. **International Review of Neurobiology**. v. 52, p. 43-65, 2002.

EDELMANN, M.N.; DEMERS, C.H.; AUGER, A.P. Maternal touch moderates sex differences in juvenile social play behavior. **PLoS One**. v. 8, p. e5739610, 2013.

EHRHARDT, R.A. et al. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 21, p. 85-96, 2001.

ELIAS, L. L. K. et al. Effect of Plasma Osmolality on Pituitary-Adrenal Responses to Corticotropin-Releasing Hormone and Atrial Natriuretic Peptide Changes in Central Diabetes Insipidus. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 82, n. 4, p. 1243-1247, 1997.

ELIAS, P.C.L. et al. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis up-regulation in rats submitted to pituitary stalk compression. **Journal of Endocrinology**. v. 180, p. 297–302, 2004.

FAIN, J.N. Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. **Vitamins and hormones**. v. 74, p. 443–477, 2006.

FALAGAS, M.E.; KOMPOTI, M. Obesity and infection. **The Lancet. Infectious diseases**. v. 6, p. 438-446, 2006.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **The Journal of allergy and clinical immunology**. v. 115, p. 911-919, 2005.

FERREIRA, A. et al. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. **Physiology Behavioral**. v. 77, p. 197-204, 2002.

FIOROTTO, M. L. et al. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium or large litters. **American Journal of Physiology**. v. 260, n. 6 Pt2, p. R1104-R1113, 1991.

FLEMING, A.S. et al. Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 73, p. 61-75, 2002.

FLEMING, A.S.; LUEBKE, C. Timidity prevents the nulliparous female from being a good mother. **Physiology and Behavior** v. 27, p. 863–868, 1981.

FLEMING, A. S.; WALSH, C. Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions. **Psychoneuroendocrinology**. v. 19, p. 429-443, 1994.

FLEMING, A.S., O DAY, D.H., KRAEMER, G.W. Neurobiology of mother–infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**.. v. 23, p. 673–685, 1999.

GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, 1992.

GARCIA, H. L. Dermatological complications of obesity. **American Journal of Clinical Dermatology**. v. 3, p. 497-506, 2002.

GRAHAM, K. L.; BURGHARDT, G. M. Current perspectives on the biological study of play: Signs of progress. **Quarterly Review of Biology**. v. 85, p. 393–418, 2010.

GREGOR, M.F.; HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammatory Mechanisms in Obesity. **Annual Review of Immunology**. v. 29, p. 415–445, 2011.

GERSTBERGER, R. Nitric oxide and body temperature control. **News in Physiological Sciences**. v.14, p. 30-36, 1999.

GIUSTI-PAIVA, A et al. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. **Shock**. v. 21, n. 3, p. 271-275, 2004.

GHOSH, S.; HAYDEN, M.S. New regulators of NFkappaB in inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 11, p. 837-848, 2008.

GONZALEZ, A. et al. Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. **Developmental of Psychobiology**. v. 38, p. 11–32, 2001.

GOTTLIEB, M.G.V.; DA CRUZ, I.B.M.; BODANESE, L.C. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. **Scientia Medica**. v. 18, n. 1, p. 31-38, 2008.

GROTA, L.J.; ADER, R. Continuous recording of maternal behavior in *Rattus norvegicus*. **Animal Behavior**. v. 17, p. 722-729, 1969.

GUZIK, T.J. et al. Perivascular adipose tissue as a messenger of the brain-vessel axis: role in vascular inflammation and dysfunction. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 58, n. 4, p. 591-610, 2007.

HABBOU, A. et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. **The Journal of Nutrition**. v. 143, p. 553–562, 2013.

HADDAD, J.J.; SAADE, N.E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuron-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of Neuroimmunology**. v. 133, p. 1-19, 2002.

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

HART. Biological basis of the behavior sickness animals. **Neuroscience & Biobehavioral Review**. v. 12, p. 123-137, 1988.

HOLE, G. Temporal feature of social play in the laboratory rat. **Ethology**. v. 78, p. 1-20, 1988.

HOLE, G. The effects of social deprivation on levels of social play in the laboratory rat (*Rattus norvegicus*). **Behavioral Processes**. v. 25, p. 41-53, 1991.

HOU, M. et al. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. **PLoS ONE**. v. 6, n. 11, p. e25726, 2011.

HOTAMISLIGIL, G.S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**. v. 444, p. 860–867, 2006.

INOUE, W.; LUHESHI, G.N. Acute starvation alters lipopolysaccharide-induced fever in leptin-dependent and -independent mechanisms in rats. **American Journal of physiol. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.** v. 299, R1709–R1719, 2010.

IKEJIMA, S. et al. Impairment of host resistance to *Listeria monocytogenes* infection in liver of db/db and ob/ob mice. *Diabetes.* v. 54, p. 182-189, 2005.

IVANOV, A.I.; KULCHITSKY, V.A; ROMANOVSKY, A.A. Does obesity affect febrile responsiveness? **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders.** v. 25, p. 586-589, 2001.

IVANOV, A. I.; ROMANOVSKY, A.A. Fever responses of Zucker rats with and without fatty mutation of the leptin receptor. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.** v. 282, p. 311-316, 2002.

JUGE-AUBRY, C.E.; HENRICHOT, E.; MEIER, C.A. Adipose tissue: a regulator of inflammation. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism.** v. 19, p. 547-566, 2005.

KAFFMAN, A.; MEANEY, M.J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. **Journal of Child Psychology and Psychiatry.** v. 48; p. 224-244, 2007.

KANOSUE, K. et al. Set pointll revisited. In: Nielsen Johannsen B.; R. Nielsen (Eds.) **Thermal Physiology.** August Krogh Institute, Copenhagen, Denmark, p. 39-43, 1997.

KELLEY, K.W. et al. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity.** v. 1, n. 17, p. 1-8, 2003.

KELMER, G. Uptade on treatments for endotoxemia. **Veterinary Clinics of North America.** v. 25, p. 259-270, 2009.

KIRSTEN, T.B. et al. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. **Journal of Neuroscience Research.** v. 90, p. 1903-1912, 2012.

KIRSTEN, T.B. et al. Zinc Prevents Sickness Behavior Induced by Lipopolysaccharides after a Stress Challenge in Rats. **PLoS ONE.** v. 10, n. 3, 2015.

KIRSTEN, T.B. et al. LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1 β levels in adult rat offspring: relevance to autism. **PLoS One**. v. 8, n. 12, p. e82244, 2013.

KISS, A.C.I. et al. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. **Physiology & Behavior**. v. 107, n. 3, p. 292-300, 2012.

KLUGER, M. J. Is fever beneficial? **The Yale Journal of biology and medicine**. v. 59, p. 89-95, 1986.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**. v. 71, p. 93-127, 1991.

KUMARESAN, P.; ANDERSON, R. R.; TURNER, C. W. Effect of litter size upon milk yield and litter weight gains in rats. **Revue de tuberculose et de pneumologie**. v. 30, n. 12, p. 41-45, 1966.

LAMAS, O.; MARTINEZ, J.A.; MARTI A. Energy restriction restores the impaired immune response in overweight (cafeteria) rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 15, p. 418–425, 2004.

LANCASTER, K. Abnormal social behaviors in young and adult rats neonatally infected with Borna disease virus. **Behavioural Brain Research**. v. 176, p. 141-148, 2007.

LANDMAN, R.E. et al. Endotoxin stimulates leptin in the human and nonhuman primate. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. v. 88, n. 3, p. 1285-1291, 2003.

LANGHANS, W. Signals generating anorexia during acute illness, **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 66, p. 321–330, 2007.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**. v. 1, p. 335–359, 1983.

LARSON, S.J.; DUNN, A.J. Behavioral effects of cytokines. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 6, p. 371–387, 2001.

LAZIC, S.E., ESSIUX, L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. **BioMed Central Neuroscience**. v. 14, n. 37, 2013.

LAWRENCE, C.B.; BROUGH, D.; KNIGHT, E.M. Obese mice exhibit an altered behavioural and inflammatory response to lipopolysaccharide. **Disease Model and Mechanisms**. v. 5, p. 649–659, 2012.

LEE, H.; LEE, I.S.; CHOUE, R. Obesity, inflammation and diet. **Pediatric, gastroenterology, hepatology & nutrition**. v. 16, p. 143–152, 2013.

LEGENDRE, A., HARRIS, R.B. Exaggerated response to mild stress in rats fed high-fat diet. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 291, p. R1288–R1294, 2006.

LENG, G.; MEDDLE, S.L.; DOUGLAS, A.J. Oxytocin and the maternal brain. **Current Opinion in Pharmacology**. v. 8, n. 6, p. 731–734, 2008.

LEVINE, S. The effects of infantile experience on adult behavior. **Experimental Foundations of Clinical Psychology** (Ed. By A. J. Bachrach). New York: basic Books, 1962.

LI, R. et al. Enhanced engagement of CTLA-4 induces antigen-specific CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ and CD4⁺CD25⁺TGF-beta 1⁺ adaptive regulatory T cells. **The Journal of Immunology**. v. 179, n. 8, p. 5191-5203, 2007.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**. v. 277, p. 1659–1662, 1997.

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience**. v. 3, p. 799-806, 2000.

LOPEZ, M. et al. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. **Diabetologia**. v. 48, p. 140-148, 2005.

LORANCA, A.; TORRERO, C.; SALAS, M. Development of play behavior in neonatally undernourished rats. **Physiology & Behavior**. v. 66, n. 1, p. 3-10, 1999.

LUCAS, A. Programming in early nutrition in man. **Ciba Foundation Symposium.** v. 156, p. 38-53, 1991.

LUGARINI, F. et al. Acute and chronic administration of immunomodulators induces anorexia in Zucker rats. **Physiology & Behavior.** v. 84, p. 165-173, 2005.

LUHESHI, G. N. et al. Leptin actions on food intake and body temperature are mediated by IL-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 96, p. 7047–7052, 1999.

MACIA, L. et al. Impairment of dendritic cell functionality and steady-state number in obese mice. **The Journal of Immunology.** v.177, n. 9, p. 5997-6006, 2006.

MANN, P. E. Finasteride delays the onset of maternal behavior in primigravid rats. **Physiology & Behavior.** v. 88, p. 333-338, 2006.

MARISSAL-ARVY, N. et al. Effect of a high-fat–high-fructose diet, stress and cinnamon on central expression of genes related to immune system, hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis function and cerebral plasticity in rats. **British Journal of Nutrition.** v. 111, p. 1190–1201, 2014.

MARTÍ, A.; MARCOS, A., MARTÍNEZ, J.A. Obesity and immune function relationships. **Obesity Reviews.** v. 2, p. 131–140, 2001.

MARTINS, M. R. et al. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. **Journal of Endocrinology.** v. 198, p. 591-598, 2008.

MARTIN S. A. et al. Effects of voluntary Wheel running on LPS-induced sickness behavior in aged mice. **Brain, Behavior, and Immunity.** v. 29, p. 113-123, 2013.

MATTHEWS, S.G. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Trends in Endocrinology & Metabolism.** v.13, p. 373–380, 2002

McCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. **Journal of Experimental Biology.** v. 216, p.:84-98, 2013.

MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MUHLHAUSLER, B. S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **The Journal of Physiology**. v. 567, p. 9-17, 2005.

MEANEY, M.J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annual Review Neuroscience**. v. 24, p. 1161-1192, 2001.

MEANEY, M.J. et al. Sexual differentiation of social play in rat pups is mediated by the neonatal androgen-receptor system. **Neuroendocrinology**. v. 37, p. 85–90, 1983.

MEANEY, M.J.; STEWART, J. A descriptive study of social development in the rat (*Rattus Norvegicus*). **Animal Behavior**. v. 29, p. 34-45, 1981.

MEANEY, M.J.; STEWART, J. Neonatal androgens influence the social play of prepuberence rats. **Hormones and Behavior**. v. 15, p.197-213, 1981a.

MEANEY, M.J.; STEWART, J.; BEATTY, W.W. Sex differences in social play: the socialization of sex roles. **Advances in the Study of Behavior**. v. 15, p. 1-56, 1985.

MENARD, J.L.; CHAMPAGNE, D.L.; MEANEY, M.J.P. Variations of maternal care differentially influence “fear” reactivity and regional patterns of c-Fos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. **Neuroscience**. v. 129, p. 297-308, 2004.

MOLTZ, H. Fever: causes and consequences. **Neuroscience and BioBehavioral Reviews**. v. 17, p. 237-269, 1993.

MOORE, C.L. Maternal-behavior of rats affected by hormonal condition of pups. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**. v. 96, p. 123-129, 1982.

MOORE, C.L., POWER, K.L. Variation in maternal care and individual differences in play, exploration, and grooming of juvenile Norway rat offspring. **Developmental Psychobiology**. v. 25, p. 165-182, 1992.

MOORE, H. et al. Moderate recurrent hypoglycemia during early development leads to persistent changes in affective behavior in the rat. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 24, p. 839–849, 2010.

- MOOS, F. et al., Release of oxytocin within the supraoptic nucleus during the milk ejection reflex in rats. **Experimental Brain Research**. v. 76, n. 3, p. 593–602, 1989.
- MOREIRA, A. S. et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases**. v. 19, p. 805-810, 2009.
- MORRISON, S.F.; NAKAMURA, K.; MADDEN, C.J. Central control of thermogenesis in mammals. **Experimental Physiology**. v. 93, p. 773–797, 2008.
- MUHLHAUSLER, B.S. Programming of the appetite-regulating neural network: a link between maternal overnutrition and the programming of obesity? **Journal of Neuroendocrinology**. v. 19, p. 67–72, 2007.
- NEWPORT, D.J.; STOWE, Z.N.; NEMEROFF, C.B. Parental depression: animal models of an adverse live event. **The American Journal of Psychiatry**. v. 159, p. 1265-1283, 2002.
- NIESINK, R.J.; VAN REE, J.M. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. **Neuropharmacology**. v. 28, p. 411-418, 1989.
- NISHIO et al. Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols. **Redox Biology**. v. 1, p. 97-103, 2013.
- NOROUZI, F. et al. The effects of *Nigella sativa* on sickness behavior induced by lipopolysaccharide in male Wistar rats. **Avicenna Journal of Phytomedicine**. v. 6, n. 1, p. 104-116, 2016.
- NORTHCUTT K. V., NGUYEN J. M. Female juvenile play elicits Fos expression in dopaminergic neurons of the VTA. **Behavioral Neuroscience**. v. 128, p. 178–186, 2014.
- NOVAKOV, M.; FLEMING, A.S. The effects of early rearing environment on the hormonal induction of maternal behavior in virgin rats. **Hormone and Behavior**. v. 48: p. 528-536, 2005.
- NUMAN, M. A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. **Acta Paediatric Supplement**. v. 397, p. 19-28, 1994.

NUMAN, M. Neural basis of maternal behavior in the rat. **Psychoneuroendocrinology**. v. 13, n. 1-2, p. 47-62, 1988.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D.S. Medial preoptic area interaction with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in Neuroendocrinology**. v. 30, p. 46-64, 2009.

NUMAN, M.; WOODSIDE, B. Maternity: Neural Mechanisms, Motivational processes and Physiological Adaptations. **Behavioral Neuroscience**. v. 124, n. 6, p. 715-741, 2010.

O'CONNOR, J. C. et al. IL-1beta-mediated innate immunity is amplified in the db/db mouse model of type 2 diabetes. **The Journal of Immunology**. v. 174, p. 4991-4997, 2005.

OLESEN, K.M. et al. Dopaminergic activation of estrogen receptor in neonatal brain alters progesterin receptor expression and juvenile social play behavior. **Endocrinology**. v. 146, p. 3705-3712, 2005.

OLIOFF, M.; STEWART, J. Sex differences in the play behavior of prepubescent rats. **Physiology & Behavior**. v. 20, p. 113-115, 1978.

OOMURA, Y. Glucose as a regulator of neuronal activity. **Advances in Metabolic Disorders**. v. 10, p. 31-65, 1983.

ORLANDI, L. et al. Sickness behavior is accentuated in rats with metabolic disorders induced by a fructose diet. **Journal of Neuroimmunology**. v. 289, p. 75-83, 2015.

PALMER, C., CORPUZ, T., GUIRGUIS, M., et al. The effect of obesity on intrahepatic cytokine and chemokine expression in chronic hepatitis C infection. **Gut**. v. 59, p. 397-404, 2010.

PANKSEPP, J.; BEATTY, W.W. Social deprivation and play in rats. **Behavioral and Neural Biology**. v. 30, p. 197-206, 1980.

PANKSEPP, J.; SIVIY, S.M.; NORMANSELL, L. The psychobiology of play: theoretical and methodological perspectives. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 8, p. 465-492, 1984.

- PARENT, C.I.; MEANEY, M.J. The influence of natural variations in maternal care on play fighting in the rat. **Developmental Psychobiology**. v. 50, p. 767–76, 2008.
- PARK, S. et al. Defects in innate immunity predispose C57BL/6J-Leprdb/Leprdb mice to infection by Staphylococcus aureus. **Infection and Immunity**. v. 77, p. 1008-1014, 2009.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat brain, in stereotaxic coordinates**. 7 ed. San Diego: Academic Press, 1997.
- PEÑA C.J. et al. Effects of maternal care on the development of midbrain dopamine pathways and reward-directed behavior in female offspring. **The European Journal of Neuroscience**. v. 39, n. 6, p. 946–956, 2014.
- PELLIS, S.M. et al. Multiple differences in the play fighting of male and female rats. Implications for the causes and functions of play. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 7; n. 21, p. 105–120, 1997.
- PELLIS, S.M.; PELLIS, V.C. Differential rates of attack and counterattack during the developmental decrease in play fighting by male and female rats. **Developmental Psychobiology**. v. 23, p. 215-231, 1990.
- PELLIS, S.M.; PELLIS, V.C.; KOLB, B. Neonatal testosterone augmentation increases juvenile play fighting but does not influence the adult dominance relationships of male rats. **Aggressive Behavior**. v. 18, p. 437-447, 1992.
- PELLIS, S.M.; PELLIS, V.C. Play-fighting differs from serious fighting in both target of attack and tactics of fighting in the laboratory rat *Rattus norvegicus*. **Aggressive Behavior**. v. 13, p. 227–242, 1987.
- PEREIRA, R. et al. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats heart's. **Regulatory Peptides**. v. 136, p. 117-121, 2006.
- PIRES, G. et al. Comportamento materno em ciências básica pesquisa translacional e aplicabilidade clínica. **Eisten**. v. 11, p. 256-260, 2013.
- PIZZAGALLI, D.A. et al. Reduced Caudate and Nucleus Accumbens Response to Rewards in Unmedicated Individuals With Major Depressive Disorder. **The American Journal of Psychiatry**. v. 166, n. 6, p. 702-710, 2009.

PLAGEMANN, A. et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **Journal of perinatal medicine**. v. 38, p. 393-400, 2010.

PLAGEMANN, A. et al. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 11, p. 541-546, 1999.

PLAGEMANN, A. et al. 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, n. 1-2, p. 146-155, 1999a.

PLAGEMANN, A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. **Hormone Research**. v. 65, p. 83–89, 2006.

PLATA-SALAMAN, C.R.; PELOSO, E.; SATINOFF, E. Cytokine-induced fever in obese (fa/fa) and lean (Fa/Fa) Zucker rats. **The American Journal of Physiology**. v. 275; p. R1353–R1357, 1998.

PLETNIKOV, M.V. et al. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. **Behavioural Brain Research**. v. 100, p. 43–50, 1999.

POHL, J. et al. Diet-induced weight gain produces a graded increase in behavioral responses to an acute immune challenge. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 35, p. 43–50, 2013.

POHL, J., WOODSIDE, B., LUHESHI, G.N. Changes in hypothalamically mediated acute-phase inflammatory response to lipopolysaccharide in diet-induced obese rats. **Endocrinology**. v. 150, n. 11, p. 4901-4910, 2009.

POHL, J., WOODSIDE, B., LUHESHI, G.N. Leptin modulates the late fever response to LPS in diet-induced obese animals. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 42, p. 41–47, 2014.

POINDRON, P. Mechanisms of activation of maternal behavior in mammals. **Reproduction, Nutrition, Development**. v. 45, p. 341-351, 2005.

POLTORAK, A. et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in tlr4 gene. **Science**. v. 282, p. 2085-2088, 1998.

PRIESTNALL, R. Effects of litter size on the behavior of lactating female mice. **Animal Behaviour**. v. 20, p. 386-394, 1972.

PRYCE, C.R., BETTSCHEN, D.; FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 27, p. 57-71, 2003.

RAETZ, C.R., WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**. v. 71, p. 635-700, 2002.

RAINEKI, C. et al. Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. **Neuroscience**. v. 159, p. 31-38, 2009.

RAJIA, S.; CHEN, H.; MORRIS, M.J. Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 22, p. 905-914, 2010.

REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WALL, H.A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocrine Reviews**. v. 32, n. 2, p. 272-311, 2011.

REISBICK, S., ROSENBLATT, J.S., MAYER, A.D. Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. *Journal of Comparative, Physiological, Psychology*, v. 89, p. 722-732, 1975.

RIETSCHEL, E.T. et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. **The FASEB Journal**. v. 8, p. 217-225, 1994.

RITCHIE, S.A., CONNELL, J.M. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 17, n. 4, p. 319-326, 2007.

RIVEST, S. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain, Behavior, and Immunity**. v. 17, p. 13-19, 2003.

RÖDEL, H.G. et al. Litter size is negatively correlated with corticosterone levels in weanling and juvenile laboratory rats. **Physiology & Behavior**. v. 99, n. 5, p. 644-650, 2010.

RÖDEL, H.G. et al. Separating maternal and litter size effects on early postnatal growth in two species of altricial small mammals. **Physiology & Behavior**. v. 93, p. 826-834, 2008.

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

RODRIGUES, A. L. et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. **The Journal of endocrinology**. v. 195, p. 485-494, 2007.

ROMANOVSKY, A. A. et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. **Frontiers in Bioscience**. v. 10, p. 2193–2216, 2005.

ROMANOVSKY, A.A. Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 292, n. 1, p. R37-46, 2007.

RORATO, R. et al. Cannabinoid CB₁ receptor restrains accentuated activity of hypothalamic corticotropin-releasing factor and brainstem tyrosine hydroxylase neurons in endotoxemia-induced hypophagia in rats. **Neuropharmacology**. v. 63, n. 1, p. 154-160, 2012.

RORATO, R. et al. Prostaglandin mediates endotoxaemia-induced hypophagia by activation of pro-opiomelanocortin and corticotrophin-releasing factor neurons in rats. **Experimental Physiology**. v. 94, p. 371–379, 2009.

ROSENBLATT, J.S. Hormone-behavior relations in the regulation of parental behavior. **Behavioral Endocrinology**. Massachusetts Institute of Technology Press, Massachusetts, USA, p. 219-229, 1992.

ROSENBLATT, J.S.; SIEGEL. H.I.; MAYER, A.D. Progress in the study of maternal behavior in the rat: Hormonal, nonhormonal, sensory and developmental aspects. **Advances Study in Behavior**. v. 10, p. 225-311, 1979.

ROTH, J.; BLATTEIS, C.M. Mechanisms of fever production and lysis: lessons from experimental LPS fever. **Comprehensive. Physiology.** v. 4, p. 1563–1604, 2014.

ROTH, J.; SOUZA, G.E.P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 34, n. 3, p. 301-314, 2001.

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

SALERNO, F. G. et al. Airway inflammation in patients affected by obstructive sleep apnea syndrome. **Respiratory Medicine.** v. 98, p. 25-28, 2004.

SCHANBERG, S. M.; KUHN, C. M. Maternal deprivation: an animal model of psychosocial dwarfism. In.: **Enzymes and neurotransmitters in mental disease** (USDIN, E.; SOURKES, T. eds), p. 373-395, 1980.

SCHNEIDER, M.; KOCH, M. Deficient social and play behavior in juvenile and adult rats after neonatal cortical lesion: effects of chronic pubertal cannabinoid treatment. **Neuropsychopharmacology.** v. 30, p. 944–957, 2005.

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

SCHWARTZ, M.W. et al. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 98, p. 1101-1106, 1996.

SCOTT, K.M. et al. Obesity and mental disorders in the adult general population. **Journal of Psychosomatic Research.** v. 64, p. 97-105, 2008.

SEIPP, C.M.; JOHNSTON, C. Mother-son interactions in families of boys with attention deficit/hyperactivity disorder with and without oppositional behavior. **Journal of Abnormal Child Psychology.** v. 33, p. 87-98, 2005.

SERRATS, J.; SAWCHENKO, P.E. How T-cell-dependent and –independent challenges access the brain: vascular and neural responses to bacterial lipopolysaccharide and staphylococcal enterotoxin. **Brain, Behavior, and Immunity.** v. 23, p. 1038-1052, 2009.

SHANKMAN, S.A. et al. Does physical anhedonia play a role in depression? A 20-year longitudinal study. **Journal Affective Disorders**. v. 120, p. 170-176, 2010.

SHANKAR, K. et al. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 294, n. 2, p. 28-38, 2008.

SHIMAZU, R. et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 189, p. 1777-1782, 1999.

SHIRAZI, S.N. et al. Glucocorticoids and the Brain: Neural Mechanisms Regulating the Stress Response. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 872, p. 235-252, 2015.

SMART, J.L.; DOBBING, J. Vulnerability of developing brain: II Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. **Brain Research**. v. 28, p. 85-95, 1971.

SMITH, A.G. et al. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. **Journal of Nutrition**. v. 137, p.1236–1243, 2007.

SONCINI, R. et al. Dipyrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. **Neuroscience Letters**. v. 516, p. 114-118, 2012.

SONG, M. J. et al. Activation of Toll-like receptor 4 is associated with insulin resistance in adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 346, p. 739–745, 2006.

SOUZA, J.R. et al. Níveis séricos de interleucina-6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18) e proteína C reativa (PCR) na síndrome coronariana aguda sem supradesnívelamento do ST em pacientes com diabetes tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 90, n. 2, p. 94-99, 2008.

SPEAR, L.P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. v. 24, p. 417-463, 2000.

SPENCER, S.J. Perinatal nutrition programs neuroimmune function long-term: mechanisms and implications. **Frontiers in Neuroscience**. v. 7, 2013.

SPENCER, S.J.; TILBROOK, A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. **Psychoneuroendocrinology**. v. 34, p. 1133-1143, 2009.

STEINER, A.A.; COLOMBARI, E.; BRANCO, L.G.S. Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. **American Journal of Physiology**. v. 277, p. R499-R507, 1999.

STEINER, A.A. et al. The hypothermic response to bacterial lipopolysaccharide critically depends on brain CB1, but not CB2 or TRPV1, receptors. **Journal of Physiology**. v. 589, p. 2415-2431, 2011

STERN, J.M.; JOHNSON, S.K. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. **Physiology & Behavior**. v. 47, n. 5, p. 993-1011, 1990.

STERN, J.M. Parturition experience influences initial pups preference at later onset of maternal behavior in primiparous rats. **Physiology & Behavior**. v. 35, p. 25-31, 1989.

SUN, B., KARIN, M. Obesity, inflammation, and liver cancer. **Journal of Hepatology**. v. 56, p. 704–713, 2012.

SWIERGIEL, A.H.; DUNN, A.J. Effects of interleukin-1 β and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**. v. 86, p. 651–659, 2007.

TEICHER, M.H., KENNY, J.T. Effect of reduced litter size on the suckling behaviour of developing rats. **Nature**. v. 275, p. 644–646, 1978.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**. v. 6, p. 772–783, 2006.

THOR, H.D.; HOLLOWAY, W.R. Developmental analysis of social play behavior in juvenile rats. **Bulletin of the Psychonomic Society**. v. 22, p. 587-590, 1984.

TOUBAL, A. et al. Genomic and epigenomic regulation of adipose tissue inflammation in obesity. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 24, p. 625–634, 2013.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P.J.; VANDERSCHUREN, L.J.

The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms.

Trends in Pharmacological Sciences. v. 10, p. 463-469, 2010.

TUIN, A. et al. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver.

American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology. v. 290, p. 377-385, 2006.

URIARTE, N. et al. Effects of Maternal Care on Development, Emotionality and

Reproductive Functions in Male and Female Rats. **Developmental Psychobiology.**

v. 49, p. 451-462, 2007.

VANDERSCHUREN, L. J. et al. Methylphenidate disrupt social play behavior in

adolescent rats. **Neuropsychopharmacology.** v. 33, p. 2946-2956, 2008.

VANDERSCHUREN, L.J.; NIESINK, R.J.; VAN REE, J.M. The neurobiology of social

play behavior in rats. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** v. 21, p. 309–

326, 1997.

VAN HASSELT, F. N. et al. Within-litter variation in maternal care received by

individual pups correlates with adolescent social play behavior in male

rats. **Physiology & Behavior.** v. 106, p. 701–706, 2012.

VELKOSKA, E.; COLE, T.J.; MORRIS, M.J. Early dietary intervention: long-term

effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. **American**

Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism. v. 288, p. E1236-E1243, 2005.

VELKOSKA, E et al. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body

weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male

rats. **The Journal of Nutrition.** v. 138, p. 1622-1627, 2008.

VERONESI, V. B. **Influência da dipirona sódica sobre as respostas**

comportamentais em camundongos fêmeas lactantes e a repercussão nos

filhotes adolescentes. 2016. 86 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas

a Saúde), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.

VIEIRA, M.L.; SARTORIO, R. Análise motivacional, causal e funcional da

brincadeira em duas espécies de roedores. **Estudos de Psicologia.** v. 7, n. 1, p.

189-196, 2002.

VILELA, F. C. **Endocannabinóides modulam os efeitos inibitórios dos glicocorticoides sobre as respostas neuroendócrinas e comportamentais durante a lactação**. 2011. 133 f. Tese (Doutorado em Fisiologia pelo Programa Multicêntrico) - Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2011.

VILELA, F.C.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. **Endocrinology**. v. 152, p. 4838-4845, 2011

VILLANUEVA, E. C. MYERS, M. G. Jr. Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. **The International Journal of Obesity**. v. 32, p. S8-S12, 2008.

WARD, I.L.; STEHM, K. Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. **Physiology & Behavior**. v. 50, p. 601-605, 1991.

WEIL, Z.M. et al. Social interactions alter proinflammatory cytokine gene expression and behavior following endotoxin administration. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 20, p. 72–79, 2006.

WEAVER, I.C. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**. v. 7, p. 847–854, 2004.

WILLIAMS, M.T. et al. Developmental 3,4- methylenedioxymethamphetamine (MDMA) impairs sequential and spatial but not cued learning independent of growth, litter effects or injection stress. **Brain Research**. v. 968, p. 89–101, 2003.

WINKELMANN-DUARTE, E.C. et al. Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. **Brain Research**. v. 1170, p. 20-30, 2007.

WOOD, N.; JOHNSON, R.B.; STRECKFUS, C.F. Comparison of body composition and periodontal disease using nutritional assessment techniques: Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). **Journal of Clinical Periodontology**. v. 30, p. 321-327, 2003.

YIM, H.E. et al. Overweight, hypertension and renal dysfunction in adulthood of neonatally overfed rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 24, n. 7, p. 1324-1333, 2013

YIRMIYA R. Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. **Brain Research.** v. 711, n. 1-2, p. 163–174, 1996.

ZHANG, J.; RIVEST, S. Metabolites in the Brain During Systemic Infection: Is Survival Possible Without Arachidonate? **Physiology.** v. 18, p. 137-142, 2003.

ZHANG, T. Y. et al. Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. **The Journal of Neuroscience.** v. 25, p. 1493–1502, 2005.

ZHANG, T. Y. et al. Epigenetic mechanisms for the early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression in rodents and humans. **Neuropsychopharmacology.** v. 38, p. 111–123, 2013.

ANEXO A – APROVAÇÃO CEUA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 19 de dezembro de 2012.

Dr^a. Fabiana Cardoso Vilela

Prezada Dr^a;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 468/2012, intitulado “Efeitos do sobrepeso por redução de ninhada sobre os parâmetros neuroendócrinos, o desenvolvimento físico e reflexo de filhotes de ratas Wistar” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento
Presidente do CEUA – Unifal-MG

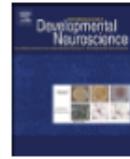
ANEXO B – ARTIGO

Int. J. Devl Neuroscience 53 (2016) 75–82



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Developmental Neuroscience

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

Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats



Ana Laura O. Carvalho^{a,b}, Bárbara G. Ferri^b, Francielly A. Lopes de Sousa^b,
Fabiana C. Vilela^b, Alexandre Giusti-Paiva^{a,b,*}

^a Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis), Brazil

^b Laboratório de Fisiologia Translacional, Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Alfenas-MG, Alfenas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2016

Received in revised form 19 July 2016

Accepted 23 July 2016

Available online 25 July 2016

Keywords:

Litter size

Maternal behavior

Social play behavior

Rat

ABSTRACT

Several studies have investigated the effects of artificial litter size adjustment on offspring development. Social play behavior is important for neurobehavioral development and is impaired in several developmental psychiatric disorders. This study therefore investigated the effect of litter size on play behavior in adolescent rats. On postnatal day (PND) 2, litters were adjusted to a small litter (SL) size of 3 pups per dam or normal litter (NL) size of 12 pups per dam. Maternal behaviors scored daily during the first week of lactation (PND2–8) revealed that arched nursing and pup licking behaviors were increased in dams with SLs versus those with NLs. SL offspring exhibited accelerated weight gain and advanced development of physical landmarks and reflexes, possibly due to overnutrition. Social isolation lasting 3.5 h prior to social play behavioral testing produced a higher frequency and duration of pouncing, pinning, sniffing, and grooming in both male and female offspring. However, male SL offspring exhibited a lower frequency of pouncing and pinning when compared with male NL offspring, while no litter size-dependent differences were observed in social behaviors unrelated to play (sniffing and grooming). These findings identify a possible sexually dimorphic influence of litter size in the development of social behavior. Given that social behaviors such as play behavior are vital for normal cognitive and social development, these findings have important implications for developmental and neuropsychiatric research.

© 2016 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nutritional manipulation during the perinatal period has been reported to alter metabolic and/or endocrine regulation in adulthood (Boullu-Ciocca et al., 2005; Rodrigues et al., 2007; Davidowa and Plagemann, 2007; Patterson et al., 2010). Several studies have used artificial litter size adjustment to investigate the effects of nutrition and maternal care on developmental parameters including the appearance of developmental landmarks and neurobehavioral indicators (Plagemann et al., 1999; Davidowa et al., 2003). Because rat pups raised in small litters (SLs) have greater access to milk, these pups tend to become overweight during the suckling period and have been reported to display an overweight

phenotype well into adulthood (Velkoska et al., 2005; Plagemann, 2006; Spencer and Tilbrook, 2009; Stefanidis and Spencer, 2012). Indeed, several studies have reported that animals raised in SL conditions are predisposed to develop hyperphagia, obesity, hypertension, and hyperinsulinemia later in life (Plagemann et al., 1992; Rodrigues et al., 2011).

Neonatal changes in litter size can also affect mother-pup and pup-pup (littermate) interactions. During the first days after birth, maternal contact provides pups with maternal odor and other maternal stimuli such as warmth, cutaneous contact, perioral stimulation from suckling, and mechanical stimulation from licking and handling (Kojima and Alberts, 2009). Normal growth and behavioral development largely depend on stable mother-pup interactions, and it has also been well documented that mothers alter the type of care provided to the litter in response to changes in offspring behavior or health status (Cummings et al., 2010).

Play behavior is one of the earliest forms of non-mother directed social behavior in rodents, and is considered to be a vigorous form of social interaction in young mammals (Vanderschuren et al., 1997; Spear, 2000). Most young mammals spend a substantial part of mat-

* Corresponding author at: Laboratório de Fisiologia Translacional, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas (Unifal-MG/SBFis), Universidade Federal de Alfenas-MG, Av Jovino Fernandes Sales 2600, Alfenas, 37130-000, MG, Brazil.

E-mail addresses: agiustipaiva@gmail.com, alexandre.paiva@unifal-mg.edu.br (A. Giusti-Paiva).

uration engaged in play with partners. This ability to participate in social play is a principal indicator of healthy development (Trezza et al., 2010). Social behaviors are relevant to normal cognitive and social development and have been utilized as behavioral biomarkers for altered development in both rodent models and humans (Blake and McCoy, 2015). In fact, deficits in play behavior after neonatal infection and brain injury have already been described as a model of autism (Pletnikov et al., 1999; Lancaster et al., 2007; Kirsten et al., 2012). In consideration of these previous findings, the purpose of the present study was to evaluate the effect of litter size on offspring development and social play behavior in rats.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult Wistar nulliparous female rats 9 weeks of age were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas. Rats were housed in a temperature-controlled room (22 °C) on a 12 h light-dark cycle (lights on at 7:00 h) with access to water and food *ad libitum*. For experiments, females were timed-mated with sexually experienced males. Then, two females were housed with one male to allow mating. The day on which sperm was observed during vaginal lavage was designated as day 1 of pregnancy. Pregnant females were individually housed in transparent cages (42 cm × 34 cm × 16 cm). The first day of life was designated as post-natal day 0 (PND0). To induce early postnatal overnutrition or normonutrition, the primary litter size was adjusted on PND2 to 3 pups per litter (2 males, 1 female; SL; early postnatal overnutrition) or 12 pups per litter (6 males, 6 females; normal litter, NL; normonutrition), respectively. To avoid the litter effect, one male pup and one female pup from each litter were marked with ink and used for all physical development assessments as well as for body weight tracking. (Plagemann et al., 1999; Velkoska et al., 2005; Lazic and Essioux, 2013). All experimental procedures were approved by the Committee of Ethics in Animal Experimentation (#468/2012) of the Federal University of Alfenas, Minas Gerais State, Brazil.

2.2. Experimental procedure

2.2.1. Maternal behavior

The maternal behavior of lactating females (NL, n = 10; SL, n = 10) was scored daily during the first week of lactation (PND2–8). Observations were conducted during three 72-min periods in the light phase (08:00, 12:00, and 16:00) and one 72-min period in the dark phase (20:00). During each session, maternal behavior was scored every 3 min (25 observations per 4 periods per day for a total of 100 observations per mother per day). Five maternal behaviors and four non-maternal behaviors were recorded as follows: (1) licking pups (either the body surface or the anogenital region), (2) nursing pups in an arched-back posture, (3) “blanket” posture in which the mother lays over the pups, (4) passive posture in which the mother lies either on her back or side while the pups nurse, (5) nest building, (6) feeding, (7) exploring the cage housing, (8) movement away from the pups, and (9) self-grooming (Costa et al., 2013). Behavioral data are reported as percentages of the total number of behavioral observations (number of target behavior observations divided by the total number of all behavior observations × 100).

2.2.2. Physical and neurobehavioral development

One male pup and one female pup from each litter were weighed at PND1, PND3, PND7, PND10, PND14 and PND21 (NL, n = 10; SL, n = 10). Digital pachymeters were used to measure the anogenital distance (the length from the anus to the genital tubercle) in millimeters and the anogenital index was calculated as a ratio of the anogenital distance to total body weight (Kiss et al., 2012; Noriega

et al., 2005). The following physical parameters were also assessed in one male pup and one female pup from each litter as follows: pinna detachment (beginning on PND1), hair growth and incisor eruption (beginning on PND5), eye opening (beginning on PND10), testis descent (when the scrotum purse contacts the testis, typically beginning on PND18); vaginal opening (when the vaginal orifice is visualized, typically beginning on PND30), and preputial separation (beginning on PND35). The following reflexes were also assessed in one male pup and one female pup from each litter as follows: negative geotaxis (turning at least 135° within 30 s of face-down placement on a 45° incline, beginning on PND4), palmar grasp reflex (grasping of a paper clip with the forepaws if stroked, beginning on PND2), auditory startle (beginning on PND10), vibrissae placing (beginning on PND10) and visual placing (beginning on PND15).

Pups were briefly removed from their dams between 15:00 and 16:00 for daily observation and then immediately returned to the home cage. The mean number of days required for the appearance of each of the above parameters was calculated. On PND21, the offsprings were weaned, marked with nontoxic ink, distributed according to their sex and litter size and housed in groups of 4 per cage. All scores were performed by two observers who were blind to the litter conditions.

2.2.3. Social play behavior

The testing arena was a Plexiglas cage (40 cm × 40 cm × 60 cm), with approximately 2 cm of wood shavings covering the floor. On PND26–28, pups from NL (n = 10) and SL (n = 10) were individually habituated to the test cage for 10 min each day. On the test day (PND 30), half of the pups were socially isolated for 3.5 h before testing and the other half were kept in their normal groups. The isolation period was used to induce an increase in the amount of social play behavior (Niesink and Van Ree, 1989). Pups were paired with an unfamiliar partner (i.e., not a cage mate) and did not differ in body weight by more than 10 g (Van Kerkhof et al., 2013). In rats, social play behavior typically starts with one rat soliciting (“pouncing”) another rat by attempting to nose or rub the nape of its neck. The animal that is pounced upon can respond in different ways: if the animal that is pounced upon fully rotates to its dorsal surface, “pinning” is the result (i.e., one animal lies in a supine position while the other animal stands over it). From this position, the supine animal can initiate another play bout by trying to gain access to the other animal’s neck. Thus, during social play, pouncing is considered an index of play solicitation, while pinning functions as a releaser of a prolonged play bout (Panksepp and Beatty, 1980; Pellis et al., 1997; Pellis and Pellis, 1987; Poole and Fish 1976). Pouncing and pinning frequencies can be easily quantified and are considered to be the most characteristic parameters of social play behavior in rats (Panksepp and Beatty, 1980). However, during a social encounter, animals may also display social behaviors that are not directly associated with play, such as sniffing or grooming of the partner (Panksepp and Beatty 1980; Vanderschuren et al., 1995). One male pup and one female pup from each litter were used for offspring evaluations to minimize potential confounding factors associated with the litter (Lazic and Essioux, 2013).

The following parameters were scored (Panksepp and Beatty 1980; Vanderschuren et al., 1995):

- frequency of pinning: one animal lying with its dorsal surface on the floor with the other animal standing over it. This is the most characteristic posture in social play in rats and occurs when one animal is solicited to play by its test partner and rotates to its dorsal surface;
- frequency of pouncing: one animal is soliciting the other to play, by attempting to nose or rub the nape of the neck of the test partner;

- time spent on social exploration: sniffing any part of the body of the test partner, including the anogenital area; grooming; chewing and licking the partner's fur.

2.3. Data analysis

Data were analyzed using the GraphPad software program version 6.0 and are expressed as the mean \pm S.E.M. Maternal behavior parameters and pup developmental parameters were compared between groups using *t*-tests. Alternatively, a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures and Tukey's post hoc test were used where appropriate. A *p*-value of less than 0.05 ($P < 0.05$) was used to establish significance.

3. Results

The composite maternal behaviors of lactating rats in the NL and SL conditions were quantified from a total of 700 observations per mother (100 observation per mother per day; PND2–8) and are shown in Fig. 1. A larger number of maternal behaviors and a smaller number of non-maternal behaviors were observed in dams with SLs compared to those with NLs. Dams with SLs showed a higher frequency of arched nursing ($P < 0.05$) and licking pups ($P < 0.05$) and a lower frequency of blanket nursing ($P < 0.05$), feeding ($P < 0.05$), exploring ($P < 0.05$), and non-exploring non-maternal behaviors ($P < 0.05$) compared to dams with NLs.

A summary of the appearance of development signs in male and female pups from the NL and SL conditions is shown in Fig. 2. Physical developmental landmarks for males (Fig. 2A) and females (Fig. 2C) appeared sooner in SL pups than in NL pups. Pinna unfolding ($P < 0.05$), hair appearance ($P < 0.05$), and eye opening ($P < 0.05$) also appeared sooner in SL pups than in NL pups; however, there was no difference in time of incisor eruption between groups. In addition, male SL offspring exhibited advanced reflex development including negative geotaxis ($P < 0.05$), auditory startle ($P < 0.05$), and vibrissae placing ($P < 0.05$) compared to male NL offspring (Fig. 1B). Similarly, female SL offspring showed advanced development of the auditory startle ($P < 0.05$) and vibrissae placing ($P < 0.05$) reflexes compared to female NL offspring (Fig. 1B).

The body weights of both male (Fig. 3A) and female (Fig. 3C) pups were measured during lactation; a two-way repeated-measures ANOVA indicated that there were significant main effects for litter size [male: $F(1,224) = 231.8$, $P < 0.001$; female: $F(1,216) = 281.4$, $P < 0.001$] and time [male: $F(7,224) = 414.7$, $P < 0.001$; female: $F(7,216) = 430.1$, $P < 0.001$], and that there was a significant interaction between litter size and time [male: $F(7,224) = 16.1$, $P < 0.001$; female: $F(7,216) = 16.1$, $P < 0.001$]. These results indicated that weight gain during lactation was increased in SL offspring compared to NL offspring. At PND 21, there was no difference in anogenital index between groups (Fig. 3B and D, male and female offspring, respectively).

The effect of litter size on social play behavior is shown in Fig. 4. Isolation increased the frequencies and durations of pouncing, pinning, sniffing, and grooming in the social play behavior test. However, male SL offspring exhibited lower frequencies of pouncing and pinning when compared with male NL offspring. Litter size did not impact the durations of social behaviors unrelated to play such as sniffing. While female offspring exhibited higher frequencies and durations of pouncing, pinning, sniffing and grooming after isolation, no significant main effects of litter size were identified (Statistical data: Table 1).

4. Discussion

The alteration of neonatal nutrition according to litter size has important implications for long-term physiology and behavior. In the current study, we demonstrated that changes in litter size not only alter neonatal weight gain and the onset of physical and neurodevelopmental landmarks, but also impact social behavior in male juvenile rats.

Consistent with our findings, it has been reported that offspring with fewer littermates often receive more milk and thus experience increased postnatal growth and faster physiological development (Teicher and Kenny, 1978; Loranca et al., 1999; Bautista et al., 2010; Rödel et al., 2008), whereas pups raised in larger litters develop more slowly as a consequence of lower breast milk intake (Spencer and Tilbrook, 2009; Bautista et al., 2010; Hou et al., 2011). Early postnatal overnourishment can lead to persistent weight gain and respective changes in the regulation of hormones such as leptin and insulin (Davidowa and Plagemann, 2000). These hormones have a decisive influence on growth, the formation of synaptic connections, and the programming of homeostatic systems. Developmental programming is the phenomenon by which a nutritional stimulus overlapping with a critical window of organogenesis permanently alters the physiology and metabolism of an organism (Proulx et al., 2002; Liu et al., 2013; Bei et al., 2005). Our data support the hypothesis that postnatal developmental programming is altered according to litter size in pups.

In large litters, early food restriction is unlikely to be the sole reason for delayed reflexive development. Sensory deprivation arising from the need to share maternal care with other pups is another possible factor (Ward and Stehm, 1991; Loranca et al., 1999). Thus, we decided to analyze maternal care behaviors in different litter sizes and observed that SL pups received more care from their mothers than did NL pups. The long-term consequences of maternal care should be considered as a putative factor mediating the behavioral consequences of litter size (Champagne et al., 2003; Dimitantos et al., 2007). Consistent with our observation, variations in maternal care in rodents have been reported to produce important long-term behavioral and physiological consequences (Meaney, 2001). Adult offspring from mothers that provided high maternal care (as measured by licking/grooming and arched-back nursing during the early postnatal period) show enhanced hippocampal-dependent spatial learning and memory in the Morris water-maze task (Liu et al., 2000; Bredy et al., 2003) as well as improved sensorimotor gating (Zhang et al., 2005). Conversely, less maternal care in the early postnatal period produces increased behavioral reactivity to threat in the defensive burying test (Menard et al., 2004) and increased freezing in response to fear conditioning in adult male rats (Costa et al., 2013).

Our results showed that males from small litters exhibited reduced social play behavior relative to those from large litters. In rodents, play behavior is the earliest form of social behavior that is not directed toward the mother. In addition, after social isolation, animals display a higher frequency of these play behaviors (Panksepp and Beatty, 1980; Auger and Olesen, 2009). Our data corroborated this observation in both male and female rodents.

Play behavior is considered to be sexually dimorphic (Olioff and Stewart, 1978; Meaney and Stewart, 1981a,b; Meaney et al., 1983; Auger and Olesen, 2009). Indeed, our results showed that NL males exhibited higher levels of play behavior than NL females. This variance in the responsiveness of play between males and females may be due to sex hormone differences that lead males to more frequently engage in play initiation, boxing, and counterattacking compared to females (Auger and Olesen, 2009). Testosterone administration in the neonatal period has been shown to masculinize and increase the social play behavior of female rats (Pellis et al., 1992; Pellis et al., 1997), while prenatal stress of the dam has been

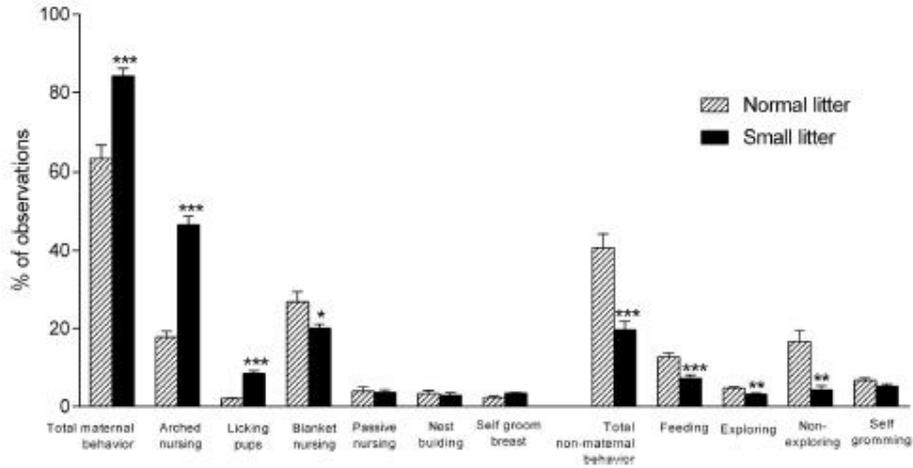


Fig. 1. Composite maternal and non-maternal behavioral data from dams after litter adjustment on PND2 to 12 pups per nest (normal litters, $n = 10$) or 3 pups per nest (small litters, $n = 10$). Data are plotted as the mean \pm S.E.M percent of observations from a total of 700 observations per mother (100 observations/mother/day, PND2–8). * indicates $P < 0.05$; ** indicates $P < 0.01$; and *** indicates $P < 0.001$ vs. normal litters.

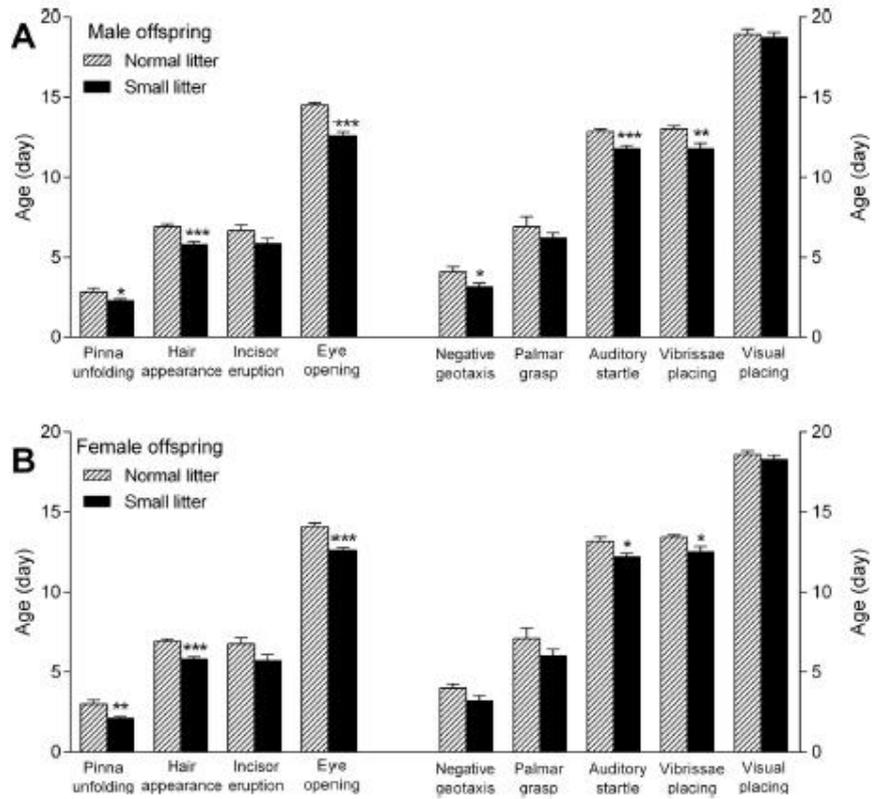


Fig. 2. Physical and reflex developmental parameters in male (A) and female (B) pups from normal ($n = 10$) or small litters ($n = 10$). Data are presented as the mean \pm S.E.M. * indicates $P < 0.05$; ** indicates $P < 0.01$; and *** $P < 0.001$ vs. normal litters.

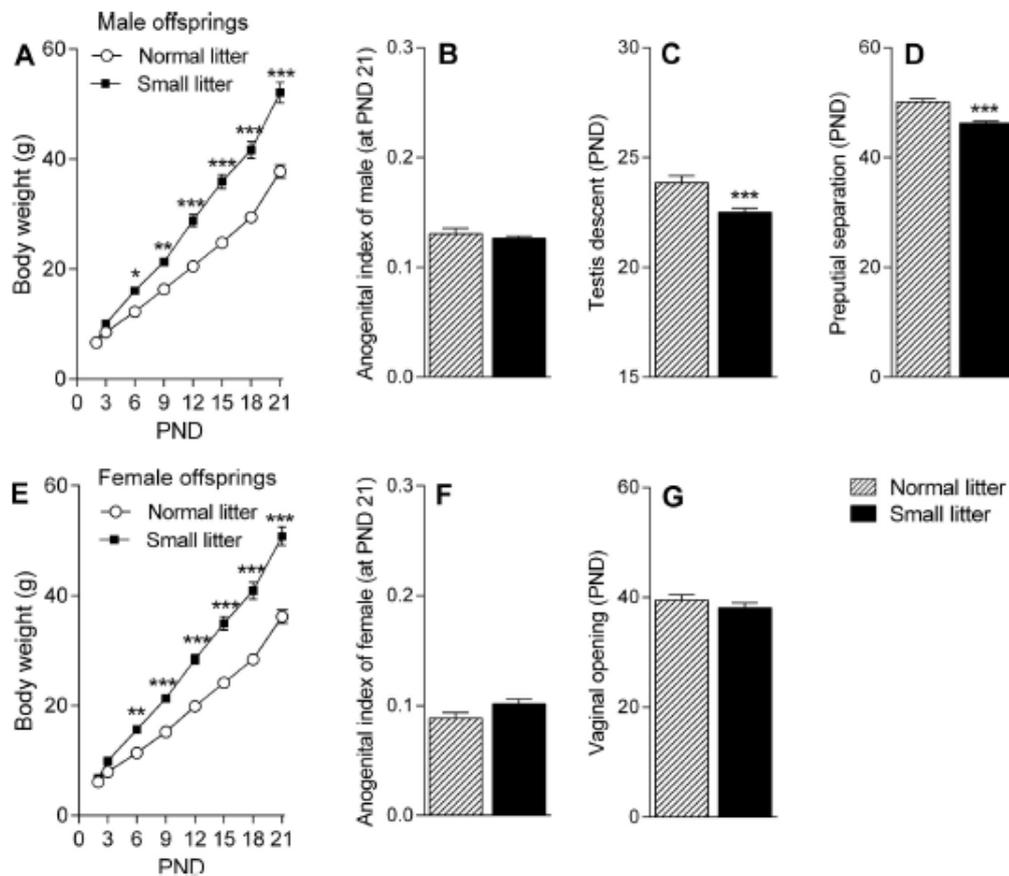


Fig. 3. Effect of litter size on body weight from PND2–21 in male (A) and female (E) pups. The anogenital indices at PND 21 in male (B) and female (F) pups, and the onset of sexual development in males (testis descent, C; preputial separation, D) and females (vaginal opening, G) are shown. Data are presented as the mean \pm S.E.M. NL: $n = 10$; SL: $n = 10$. * indicates $P < 0.05$; ** indicates $P < 0.01$; and *** indicates $P < 0.001$ vs. normal litters.

Table 1

Two-way ANOVA results for all analyses in play behavior test with litter (normal or small) and housing (grouped or isolated) as main factors.

	Litter factor			Housing factor			Interaction litter \times housing		
	F	df	P	F	df	P	F	df	P
Male offspring									
Pouncing	12.01	1,36	<0.001	58.73	1,36	<0.001	0.77	1,36	0.385
Pinning	10.72	1,36	<0.01	38.51	1,36	<0.001	0.53	1,36	0.468
Sniffing	1.32	1,36	0.462	15.46	1,36	<0.001	0.09	1,36	0.703
Grooming	2.27	1,36	0.14	17.14	1,36	<0.001	0.13	1,36	0.0719
Female offspring									
Pouncing	0.50	1,36	0.48	11.0	1,36	<0.01	0.024	1,36	0.87
Pinning	0.015	1,36	0.9	22.78	1,36	<0.001	0.06	1,36	0.8
Sniffing	1.8	1,36	0.18	54.25	1,36	<0.001	0.001	1,36	0.98
Grooming	0.381	1,36	0.55	34.81	1,36	<0.001	0.82	1,36	0.36

F: F value; df: degrees of freedom; P: P value.

shown to feminize and decrease the social play behavior of male rats (Ward and Stehm, 1991). These reports are in agreement with our findings and show that the sexual differentiation of social play begins during prenatal ontogeny in the rat. Therefore, a reduction in the play behavior of SL male offspring suggests that a small litter environment produced the feminization of social behavior; how-

ever, this effect did not delay sexual development, and in fact sexual development was advanced in SL males.

As aforementioned, naturally occurring variations in maternal behavior are associated with the development of individual differences in social behavior and the stress response (Stern, 1997; Liu et al., 1997; Caldji et al., 1998; Parent and Meaney, 2008;

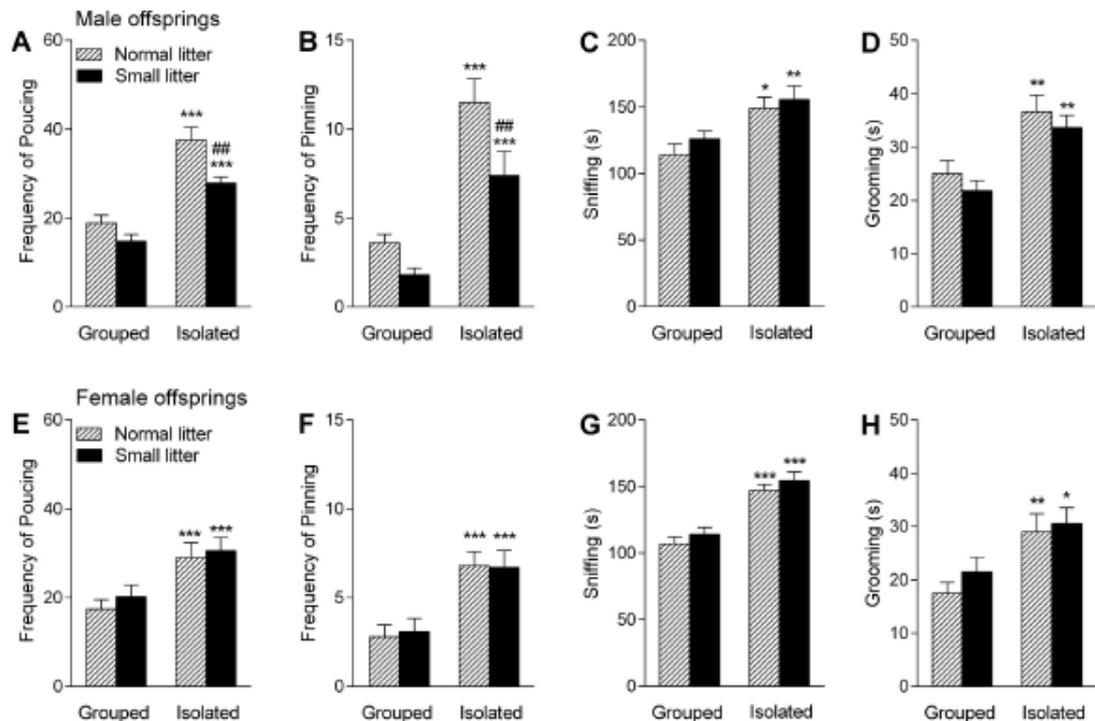


Fig. 4. Social play behavior in male (A–D) and female (E–H) offspring from normal or small litters. Data are presented as the mean \pm S.E.M. NL: n = 10; SL: n = 10. * indicates $P < 0.05$; ** indicates $P < 0.01$; and *** indicates $P < 0.001$ vs. normal litters. ## indicates $P < 0.01$ vs. isolated males from normal litters.

Costa et al., 2013). However, the exact nature of the relationship between maternal profile and the level of social play in male adolescent animals is controversial. Van Hasselt et al. (2012) found that male juvenile rats that received a higher level of licking/grooming from their mothers during the neonatal period exhibited an increased frequency and duration of pinning and pouncing. Conversely, increased somatosensory contact from other offspring during the early neonatal period reduced male social play behavior and increased levels of 5HT2a mRNA in the juvenile amygdala (Edelmann et al., 2013), suggesting an inverse relationship between serotonin signaling and the frequency of social play in male rats. In addition, male pups that received a low frequency of anogenital licking by dams (Birke and Sadler, 1987; Moore and Power, 1992) engaged in significantly more play fighting than control males. In our study, a reduction in litter size increased maternal care and decreased the social play behavior of pups. It is possible that behavioral and social development may be more influenced by the number of littermates than by the amount of maternal care received per offspring, such that the presence of several littermates promotes social play and independence from the mother. The nutritional aspects of reduced litter size should also be considered; fetal and neonatal nutrition substantially influence metabolic and hormonal development during perinatal life. It has been shown that SL animals exhibit accelerated weight gain prior to weaning, which is associated with permanent modulation of adiposity and hypothalamic circuits that control food intake and energy balance in adulthood (Plagemann et al., 1992; Plagemann, 2006). Higher levels of plasma insulin, leptin, thyroid hormones, and thyroid-stimulating hormone, as well as elevated hypothalamic insulin, have also identified in SL offspring at PND21 (Plagemann et al.,

1999; Rodrigues et al., 2009); however, the exact influence of these hormones on play behavior is not well known. In a previous study, administration of insulin from PND10–19 produced a decrease in rodent adolescent social play behavior (Moore et al., 2010).

Finally, an interesting potential consequence of litter size is a lasting influence of dam-pup interactions and overnutrition on the sensitivity of offspring to other environmental stimuli at later stages in development. The ability to engage in social play is a principal indicator of healthy development in both animals and humans. Conversely, social play deficits are a core symptom of neuropsychiatric disorders in childhood and adolescence, such as autism, early-onset schizophrenia, and attention-deficit/hyperactivity disorder. In summary, the present findings identify a sexually dimorphic influence of litter size on development and behavior that has important implications for developmental and neuropsychiatric research.

Conflict of interest

All authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

We are grateful for the excellent technical support of José dos Reis Pereira. This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, #456078/2014-2; FCV and #300977/2013-1; AG-P), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG #01483/2013, #00041/2015AG-P).

References

- Auger, A.P., Olesen, K.M., 2009. Brain sex differences and the organization of juvenile social play behaviour. *J. Neuroendocrinol.* 21, 519–525.
- Bautista, A., Garcia-Torres, E., Prager, G., Hudson, R., Rödel, H.G., 2010. Development of behavior in the litter huddle in rat pups: within- and between-litter differences. *Dev. Psychobiol.* 52, 35–43.
- Bei, F., Jia, J., Jia, Y.Q., Sun, J.H., Liang, F., Yu, Z.Y., Cai, W., 2005. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis.* 26 (14), 96.
- Birke, L.I., Sadler, D., 1987. Differences in maternal behavior of rats and the sociosexual development of the offspring. *Dev. Psychobiol.* 20, 85–99.
- Blake, B.E., McCoy, K.A., 2015. Hormonal programming of rat social play behavior: standardized techniques will aid synthesis and translation to human health. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 184–197.
- Boullu-Ciocca, S., Dutour, A., Guillaume, V., Achard, V., Oliver, C., Grino, M., 2005. Postnatal diet induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes* 54, 197–203.
- Bredy, T.W., Humpartzoomian, R.A., Cain, D.P., Meaney, M.J., 2003. Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment. *Neuroscience* 118, 571–576.
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5335–5340.
- Champagne, F.A., Francis, D.D., Mar, A., Meaney, M.J., 2003. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol. Behav.* 79, 359–371.
- Costa, H.H., Vilela, F.C., Giusti-Paiva, A., 2013. Continuous central infusion of cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 decreases maternal care in lactating rats: consequences for fear conditioning in adulthood males. *Behav. Brain Res.* 257, 31–38.
- Cummings, J.A., Clemens, L.G., Nunez, A.A., 2010. Mother counts: how effects of environmental contaminants on maternal care could affect the offspring and future generations. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 440–451.
- Davidowa, H., Plagemann, A., 2000. Decreased inhibition by leptina of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. *Neuroreport* 11, 2795–2798.
- Davidowa, H., Plagemann, A., 2007. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport* 18, 521–524.
- Davidowa, H., Li, Y., Plagemann, A., 2003. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH: CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *Eur. J. Neurosci.* 18, 613–621.
- Dimitsantos, E., Escorihuela, R.M., Fuentes, S., Armario, A., Nadal, R., 2007. Litter size affects emotionality in adult male rats. *Physiol. Behav.* 92, 708–716.
- Edelmann, M.N., Demers, C.H., Auger, A.P., 2013. Maternal touch moderates sex differences in juvenile social play behavior. *PLoS One* 8, e57396.
- Hou, M., Liu, Y., Zhu, L., Sun, B., Guo, M., Buren, J., Li, X., 2011. Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats. *PLoS One* 6, e25726.
- Kirsten, T.B., Chaves-Kirsten, G.P., Chaible, L.M., Silva, A.C., Martins, D.O., Britto, L.R., Dagli, M.L., Torráo, A.S., Palermi-Neto, J., Bernardi, M.M., 2012. Hypoactivity of the central dopaminergic system and autistic-like behavior induced by a single early prenatal exposure to lipopolysaccharide. *J. Neurosci. Res.* 90, 1903–1912.
- Kiss, A.C., Woodside, B., Felicio, L.F., Anselmo-Franci, J., Damasceno, D.C., 2012. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. *Physiol. Behav.* 107, 292–300.
- Kojima, S., Alberts, J.R., 2009. Maternal care can rapidly induce an odor-guided huddling preference in rat pups. *Dev. Psychobiol.* 51, 95–105.
- Lancaster, K., Dietz, D.M., Moran, T.H., Pletnikov, M.V., 2007. Abnormal social behaviors in young and adult rats neonatally infected with Borna disease virus. *Behav. Brain Res.* 176, 141–148.
- Lazic, S.E., Essioux, L., 2013. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. *BMC Neurosci.* 14, 37.
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P.M., Meaney, M.J., 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277, 1659–1662.
- Liu, D., Diorio, J., Day, J.C., Francis, D.D., Meaney, M.J., 2000. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat. Neurosci.* 3, 799–806.
- Liu, H.W., Mahmood, S., Srinivasan, M., Smiraglia, D.J., Patel, M.S., 2013. Developmental programming in skeletal muscle in response to overnutrition in the immediate postnatal life in rats. *J. Nutr. Biochem.* 24, 1859–1869.
- Loranca, A., Torrero, C., Salas, M., 1999. Development of play behavior in neonatally undernourished rats. *Physiol. Behav.* 66, 3–10.
- Meaney, M.J., Stewart, J., 1981a. A descriptive study of social development in the rat (*Rattus norvegicus*). *Anim. Behav.* 29, 34–45.
- Meaney, M.J., Stewart, J., 1981b. Neonatal androgens influence the social play of prepubercent rats. *Horm. Behav.* 15, 197–213.
- Meaney, M.J., Stewart, J., Poulin, P., McEwen, B.S., 1983. Sexual differentiation of social play in rat pups is mediated by the neonatal androgen-receptor system. *Neuroendocrinology* 37, 85–90.
- Meaney, M.J., 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 1161–1192.
- Menard, J.L., Champagne, D.L., Meaney, M.J., 2004. Variations of maternal care differentially influence fear reactivity and regional patterns of c-Fos immunoreactivity in response to the shock-probe burying test. *Neuroscience* 129, 297–308.
- Moore, C.L., Power, K.L., 1992. Variation in maternal care and individual differences in play exploration, and grooming of juvenile Norway rat offspring. *Dev. Psychobiol.* 25, 165–182.
- Moore, H., Craft, T.K., Grimaldi, L.M., Babic, B., Brunelli, S.A., Vannucci, S.J., 2010. Moderate recurrent hypoglycemia during early development leads to persistent changes in affective behavior in the rat. *Brain Behav. Immun.* 24, 839–849.
- Niesink, R.J., Van Ree, J.M., 1989. Involvement of opioid and dopaminergic systems in isolation-induced pinning and social grooming of young rats. *Neuropharmacology* 28, 411–418.
- Noriega, N.C., Ostby, J., Lambricht, C., Wilson, V.S., Gray Jr., L.E., 2005. Late gestational exposure to the fungicide prochloraz delays the onset of parturition and causes reproductive malformations in male but not female rat offspring. *Biol. Reprod.* 72, 1324–1335.
- Olioff, M., Stewart, J., 1978. Sex differences in the play behavior of prepubescent rats. *Physiol. Behav.* 20, 113–115.
- Panksepp, J., Beatty, W.W., 1980. Social deprivation and play in rats. *Behav. Neural Biol.* 30, 197–206.
- Parent, C.L., Meaney, M.J., 2008. The influence of natural variations in maternal care on play fighting in the rat. *Dev. Psychobiol.* 50, 767–776.
- Patterson, C.M., Bouret, S.G., Park, S., Irani, B.G., Dunn-Meynell, A.A., Levin, B.E., 2010. Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. *Endocrinology* 151, 4270–4279.
- Pellis, S.M., Pellis, V.C., 1987. Play-fighting differs from serious fighting in both target of attack and tactics of fighting in the laboratory rat *Rattus norvegicus*. *Aggress. Behav.* 13, 227–242.
- Pellis, S.M., Pellis, V.C., Kolb, B., 1992. Neonatal testosterone augmentation increases juvenile play fighting but does not influence the adult dominance relationships of male rats. *Aggress. Behav.* 18, 437–447.
- Pellis, S.M., Field, E.F., Smith, L.K., Pellis, V.C., 1997. Multiple differences in the play fighting of male and female rats. Implications for the causes and functions of play. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 105–120.
- Plagemann, A., Heidrich, I., Gotz, F., Rohde, W., Dörner, G., 1992. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp. Clin. Endocrinol.* 99, 154–158.
- 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 Res.* 836, 146–155.
- Plagemann, A., 2006. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm. Res.* 3, 83–89.
- Pletnikov, M.V., Rubin, S.A., Vasudevan, K., Moran, T.H., Carbone, K.M., 1999. Developmental brain injury associated with abnormal play behavior in neonatally Borna disease virus-infected Lewis rats: a model of autism. *Behav. Brain Res.* 100, 43–50.
- Poole, T.B., Fish, J., 1976. An investigation of individual, age, and sexual differences in the play of *Rattus norvegicus* (Mammalia: Rodentia). *J. Zool.* 179, 249–260.
- Proulx, K., Richard, D., Walker, C.D., 2002. Leptin regulates appetite-related neuropeptides in the hypothalamus of developing rats without affecting food intake. *Endocrinology* 143, 4683–4692.
- Rödel, H.G., Prager, G., Stefanski, V., von Holst, D., Hudson, R., 2008. Separating maternal and litter size effects on early postnatal growth in two species of altricial mammals. *Physiol. Behav.* 93, 826–834.
- Rodrigues, A.L., de Souza, E.P., da Silva, S.V., Rodrigues, D.S., Nascimento, A.B., Barja-Fidalgo, C., et al., 2007. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J. Endocrinol.* 195, 485–494.
- Rodrigues, A.L., de Moura, E.G., Passos, M.C., Dutra, S.C., Lisboa, P.C., 2009. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J. Physiol.* 587, 2647–2661.
- Rodrigues, A.L., de Moura, E.G., Passos, M.C., Trevenzoli, L.H., da Conceição, E.P., Bonono, I.T., Neto, J.F., Lisboa, P.C., 2011. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J. Nutr. Biochem.* 22, 109–117.
- Spear, L.P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24, 417–463.
- Spencer, S.J., Tilbrook, A., 2009. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 34, 1133–1143.
- Stefanidis, A., Spencer, S.J., 2012. Effects of neonatal overfeeding on juvenile and adult feeding and energy expenditure in the rat. *PLoS One* 7, e2130.
- Stern, J.M., 1997. Offspring-induced nurturance: animal-human parallels. *Dev. Psychobiol.* 31, 19–37.
- Teicher, M.H., Kenny, J.T., 1978. Effect of reduced litter size on the suckling behaviour of developing rats. *Nature* 275 (5681), 644–666.
- Trezza, V., Baarendse, P.J., Vanderschuren, L.J., 2010. The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 463–469.

- Van Hasselt, F.N., Tieskens, J.M., Trezza, V., Krugers, H.J., Vanderschuren, L.J., Joëis, M., 2012. Within-litter variation in maternal care received by individual pups correlates with adolescent social play behavior in male rats. *Physiol. Behav.* 106, 701–706.
- Van Kerkhof, L.W., Damsteegt, R., Trezza, V., Voorn, P., Vanderschuren, L.J., 2013. Functional integrity of the habenula is necessary for social play behavior in rats. *Eur. J. Neurosci.* 38, 3465–3475.
- Vanderchuren, L.J., Spruijt, B.M., Hol, T., Niesink, R.J., Van Ree, J.M., 1995. Sequential analysis of social play behavior in juvenile rats: effects of morphine. *Behav. Brain Res.* 72, 89–95.
- Vanderschuren, L.J., Niesink, R.J., Van Ree, J.M., 1997. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 309–326.
- Velkoska, E., Cole, T.J., Morris, M.J., 2005. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 288, E1236–E1243.
- Ward, L.L., Stehm, K., 1991. Prenatal stress feminizes juvenile play patterns in male rats. *Physiol. Behav.* 50, 601–605.
- Zhang, T.Y., Chretien, P., Meaney, M.J., Gratton, A., 2005. Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. *J. Neurosci.* 25, 1493–1502.