

EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR MATERNA DURANTE A PRENHEZ E LACTAÇÃO NOS NEURÔNIOS MCH E CART DA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL (LHA)

CARLA DE MORAES MACHADO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de
Botucatu, Unesp, para a obtenção do título de Doutora no
Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e
Aplicada, Área de Concentração Biologia Celular
Estrutural e Funcional

Prof. Ass. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

**Botucatu-SP
2019**

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**EFEITO DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR MATERNA DURANTE
A PRENHEZ E LACTAÇÃO NOS NEURÔNIOS MCH E CART
DA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL (LHA)**

CARLA DE MORAES MACHADO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de
Botucatu, Unesp, para a obtenção do título de Doutora no
Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e
Aplicada, Área de Concentração Biologia Celular
Estrutural e Funcional

Prof. Ass. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior
Prof. Tit. Jackson Cioni Bittencourt

Botucatu-SP
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Machado, Carla de Moraes.

Efeito da restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação nos neurônios MCH e CART da área hipotalâmica lateral (LHA) / Carla de Moraes Machado. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Coorientador: Jackson Cioni Bittencourt

Capes: 20600003

1. Hipotálamo. 2. Lactação. 3. Neuropeptídeos. 4. Prenhez. 5. Desnutrição fetal.

Palavras-chave: hipotálamo; lactação; neuropeptídeos; prenhez; restrição alimentar materna.

CARLA DE MORAES MACHADO

**Efeito da Restrição Alimentar Materna durante a Prenhez e
Lactação nos Neurônios MCH e CART da Área Hipotalâmica
Lateral (LHA)**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, Unesp, para a obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de Concentração Biologia Celular Estrutural e Funcional

Orientador: Prof. Ass. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior

Co-Orientador: Prof. Tit. Jackson Cioni Bittencourt

Comissão Examinadora:

Prof. Ass. José de Anchieta de Castro e Horta Júnior
Instituto de Biociências – UNESP Botucatu

Profa. Ass. Luciana Pinato
Faculdade de Filosofia e Ciências – UNESP Marília

Profa. Dra. Valéria Paula Sassoli Fazan
Faculdade Medicina de Ribeirão Preto - USP

Profa. Dra. Camila Renata Correa Camacho
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Profa. Dra. Ana Carolina Inhaz Kiss
Instituto de Biociências – UNESP Botucatu

DEDICATÓRIA

Ao vô Bibiu, Jovito Machado Neto (*In Memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos e Sineide, e à minha irmã, Gabriela, por todo o apoio em cada etapa cumprida dessa jornada, vocês são a minha base para que eu possa construir meus sonhos. À minha segunda família, Shirley, Thiago e Marina, pela presença em todos os momentos e por me apoiarem em cada um deles.

Ao Professor Associado José de Anchieta de Castro e Horta Júnior, por ter aceitado compartilhar a condução dessa tese, por todo aprendizado durante a sua execução, sempre dentro de valores profissionais éticos, para que o melhor sempre fosse nosso objetivo.

Ao Professor Titular Jackson Cioni Bittencourt, por mais uma vez acreditar no meu trabalho, pela receptividade, disponibilidade, motivação e também todo suporte em seu laboratório.

Às Professoras Doutoras Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro e Ana Carolina Inhaz Kiss, pelas ricas sugestões para esse trabalho durante o Exame de Qualificação.

Às Professoras Doutoras Luciana Pinato, Ana Carolina Inhaz Kiss, Valéria Paula Sassoli Fazan e Camila Renata Correa Camacho, pelas contribuições para a discussão e o aprimoramento dessa tese.

Ao Professor Doutor Luis Alberto Domingo Francia Farje, pela confiança e parceria de trabalho, permitindo assim que eu pudesse fazer aquilo que mais amo que é ensinar Anatomia.

Aos meus irmãos de Botucatu (patota querida), Juliana (Balsa), Cristiane (Dofa), Ana Carolina (Passa), André (Qualy) e Amanda (Para), por caminharmos juntos todo o trajeto e partilharmos as alegrias, as tristezas e as conquistas.

À Marina, pelo companheirismo dentro e fora do laboratório, pelas longas e interessantes discussões científicas e pelo sinergismo impecável.

Às colegas do Laboratório de Neuromorfologia atuais e que passaram pelo laboratório durante esse trabalho, Giulia, Gabriela, Luciana, Paola e Isabella, pelos bons momentos compartilhados durante todo o trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Neuroanatomia Química (ICB/USP), Daniella, Giovanne, Josi, Jéssica, Marianne, Ísis, Jully, Beatriz e Ariel, e à Professora Doutora Luciane Valéria Sita pela recepção sempre cordial e pelas conversas nos intervalos, tornando as etapas pesadas de trabalho em São Paulo mais leves, e toda atenção oferecida.

Aos membros do Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências, Luciana, Claudete, Marilena, Thiago, Shelly, Carolina e à Professora Doutora Daniela Carvalho dos Santos pela receptividade e atenção, pelo cuidado ao material e por todas as horas disponibilizadas para que a análise fosse finalizada.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, pelo atendimento solícito na condução dessa tese.

Aos alunos, funcionários e docentes do Departamento de Anatomia do Instituto de Biociências de Botucatu, pela convivência harmoniosa no ambiente de trabalho e fora dele.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro na forma de bolsa e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido na forma de auxílio pesquisa (2016/13136-6) para a execução do presente trabalho.

*"So make the best of this test
And don't ask why
It's not a question
But a lesson learned in time*

*It's something unpredictable
But in the end it's right
I hope you had the time of your life"*

Good Riddance – Green Day

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 JUSTIFICATIVA.....	20
3 OBJETIVOS	21
4 DESENHO EXPERIMENTAL	22
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1 Animais.....	24
5.2 Teste de tolerância à insulina (TTI)	25
5.3 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG).....	25
5.4 Experimento I – Microscopia Óptica	25
5.4.1 Preparo de material biológico	25
5.4.2 Imuno-histoquímica.....	26
5.4.3 ELISA	27
5.5 Experimento II – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	28
5.5.1 Preparo de material biológico	28
5.5.2 Imuno-histoquímica pré-inclusão (<i>pre-embedding</i>)	28
5.6 Forma de análise dos resultados.....	29
5.6.1 Parâmetros biométricos	29
5.6.2 Experimento I	30
5.6.3 Experimento II - Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	32
5.6.4 Apresentação das ilustrações científicas	32
5.6.5 Análise estatística	32
6 RESULTADOS.....	33
6.1 Parâmetros biométricos, metabólicos e ingestão alimentar	33
6.1.1 Peso corporal materno, tamanho e peso corporal da prole no DPN 1	33
6.1.2 Peso corporal e distância naso-anal	35
6.1.3 Peso do encéfalo e peso relativo do encéfalo	35
6.1.4 Índice de Lee, relação peso-distância naso-anal e gorduras visceral e retroperitoneal.....	35
6.1.5 Glicemia	38
6.1.6 Peso corporal, ingestão alimentar e taxa de ingestão alimentar semanais	38
6.1.7 Ingestão alimentar total, ganho de peso, conversão e eficiência energética	38
6.1.8 ELISA para leptina e insulina.....	42
6.2 Experimento I	42
6.3 Experimento II.....	75
7 DISCUSSÃO	86
7.1 Parâmetros biométricos.....	86
7.2 Experimento I	90
7.3 Experimento II	92
8 CONCLUSÃO	94
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
Anexo.....	100
APÊNDICES – PROTOCOLOS.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS

3V – III ventrículo
Arc – núcleo arqueado
CART – transcrito regulado pela anfetamina e cocaína
DMH – núcleo dorsomedial do hipotálamo
DPN – dia pós-natal
f – fórnix
GC – grupo controle
GR – grupo restrito
Hcrt/OX – hipocretina/orexina
ic – cápsula interna
LHA – área hipotalâmica lateral
MCH – hormônio concentrador de melanina
MCH-1R – receptor de MCH tipo 1
MET – microscopia eletrônica de transmissão
mt – trato mamilotalâmico
NEI – neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina
NGE – neuropeptídeo glicina-ácido glutâmico
NPY – neuropeptídeo Y
Ob-r – receptor de leptina
opt – trato óptico
PVH – núcleo paraventricular do hipotálamo
POMC – peptídeo da pró-opiomelanocortina
ppMCH – pré-pró-hormônio concentrador de melanina
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
SNC – sistema nervoso central
TTI – teste de tolerância à insulina
TTOG – teste de tolerância oral à glicose
VMH – núcleo ventromedial do hipotálamo
PBS – tampão fosfato salina
TBS-TX – tampão Trisma Base 0,05M, NaCl 0,85% e Triton-x 0,25%, pH 7,6
TRIS-HCL – tampão Trisma Base 0,05M
PB - tampão fosfato
DAB - 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura do pré-pró-hormônio concentrador de melanina (ppMCH), molécula precursora da síntese do MCH.	15
Figura 2. Esquema proposto por Nahon, J.L (1989) que mostra a localização dos neurônios MCH (esferas) e suas projeções axonais para as diversas áreas do neuro-eixo.....	16
Figura 3. Esquema do delineamento experimental.....	22
Figura 4. Imagem da janela de observação do programa <i>Stereo Investigator</i> , obtida em tempo real através de câmera digital acoplada ao microscópio óptico.	30
Figura 5. Gráficos de ingestão alimentar e peso corporal maternos, tamanho e peso da prole no DPN 1.....	34
Figura 6. Classificação do peso ao nascer dos animais do GC e GR em pequenos (PIP), adequados (AIP) e grandes (GIP) de acordo com peso corporal em DPN 1.	35
Figura 7. Gráficos do peso corporal, distância naso-anal e peso do encéfalo nos subgrupos etários.	36
Figura 8. Gráficos do índice de Lee, relação peso-distância naso-anal e peso das gorduras visceral e retroperitoneal.	37
Figura 9. Gráficos da glicemia e metabolismo da glicose no GC e GR.....	39
Figura 10. Gráficos do peso corporal, ingestão alimentar e taxa de ingestão semanais.	40
Figura 11. Gráficos de ingestão alimentar e ganho de peso total, conversão e eficiência energética.	41
Figura 12. Gráficos de dosagem sérica para leptina e insulina em GC e GR para todas idades.	42
Figura 13. Fotomicrografias de neurônios CART da região tuberal da LHA, marcados por imunohistoquímica em GC e GR nos DPNs 21, 28 e 50.	44
Figura 14. Fotomicrografias de neurônios CART da região tuberal da LHA, marcados por imunohistoquímica em GC e GR nos DPNs 90 e 540.	45
Figura 15. Fotomicrografias de neurônios MCH da região tuberal da LHA, marcados por imunohistoquímica em GC e GR nos DPNs 21, 28 e 50.	46
Figura 16. Fotomicrografias de neurônios MCH da região tuberal da LHA, marcados por imunohistoquímica em GC e GR nos DPNs 90 e 540.	47
Figura 17. Gráficos da área e volume da LHA, e número de neurônios CART, nos DPN 21, 50, 90 e 540.....	48
Figura 18. Gráficos do número de neurônios MCH na LHA no DPN 21, 50, 90 e 540.....	49
Figura 19. Gráficos dos neurônios CART e MCH na LHA durante o desenvolvimento pós-natal, nos DPN 21, 50, 90 e 540.....	50
Figura 20. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios CART na LHA do GC21 e GR21.....	52
Figura 21. Mapeamento dos neurônios CART do GC21.	53
Figura 22. Mapeamento dos neurônios CART do GR21.	54
Figura 23. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios CART na LHA do GC50 e GR50.....	55
Figura 24. Mapeamento dos neurônios CART do GC50.	56
Figura 25. Mapeamento dos neurônios CART do GR50.	57
Figura 26. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios CART na LHA do GC90 e GR90.....	58
Figura 27. Mapeamento dos neurônios CART do GC90.	59
Figura 28. Mapeamento dos neurônios CART do GR90.	60
Figura 29. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios CART na LHA do GC540 e GR540.....	61

Figura 30. Mapeamento dos neurônios CART do GC540.	62
Figura 31. Mapeamento dos neurônios CART do GR540.	63
Figura 32. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH na LHA do GC21 e GR21.....	64
Figura 33. Mapeamento dos neurônios MCH do GC21.....	65
Figura 34. Mapeamento dos neurônios MCH do GR21.....	65
Figura 35. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH na LHA do GC50 e GR50.....	66
Figura 36. Mapeamento dos neurônios MCH do GC50.....	67
Figura 37. Mapeamento dos neurônios MCH do GR50.....	68
Figura 38. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH na LHA do GC90 e GR90.....	69
Figura 39. Mapeamento dos neurônios MCH do GC90.....	70
Figura 40. Mapeamento dos neurônios MCH do GR90.....	71
Figura 41. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH na LHA do GC540 e GR540.....	72
Figura 42. Mapeamento dos neurônios MCH do GC540.....	73
Figura 43. Mapeamento dos neurônios MCH do GR540.....	74
Figura 44. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC21(A, C e E) e GR21(B, D e F).....	76
Figura 45. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC28 (A, C e E) e GR28 (B, D e F).....	77
Figura 46. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC50 (A, C e E) e GR50 (B, D e F).....	78
Figura 47. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC90 (A, C e E) e GR90 (B, D e F).....	79
Figura 48. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC540 (A, C e E) e GR540 (B, D e F).	80
Figura 49. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC21(A, C e E) e GR21(B, D e F).....	81
Figura 50. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC28 (A, C e E) e GR28 (B, D e F).....	82
Figura 51. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC50 (A, C e E) e GR50 (B, D e F).....	83
Figura 52. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC90 (A, C e E) e GR90 (B, D e F).....	84
Figura 53. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC540 (A, C e E) e GR540 (B, D e F).	85
Figura 54. Fotomicrografias de neurônios MCH identificados pelo protocolo de hibridização <i>in situ</i> com sonda marcada com biotina.	91

RESUMO

A associação do baixo peso ao nascer com alto risco de doenças como obesidade, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares na vida adulta levaram à hipótese da “Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença” (DOHaD). Nessa hipótese, *Programação* se refere às adaptações executadas pelo organismo frente a insultos ocorridos durante seu desenvolvimento, gerando efeitos permanentes ou não na estrutura e função de órgãos. A nutrição materna durante o desenvolvimento do indivíduo é considerada um importante indutor de Programação, visto que a deficiência de nutrientes, durante a prenhez e a lactação, provoca alterações significativas no peso corpóreo, no balanço energético, na ingestão alimentar e na expressão de neuropeptídeos. O hormônio concentrador de melanina (MCH) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) são neuropeptídeos expressos na área hipotalâmica lateral (LHA), que participam da regulação do balanço energético e do comportamento alimentar, nos quais o MCH desempenha papel orexígeno e o CART, anorexígeno. Nosso objetivo foi analisar o número e a distribuição de neurônios MCH e CART e sua ultraestrutura na LHA de ratos cujas mães foram submetidas à restrição alimentar durante a prenhez e lactação. Fêmeas prenhes *Wistar* foram separadas em dois grupos experimentais: grupo controle (GC), dieta padrão *ad libitum*, e grupo restrição calórica (GR), dieta de 50% de restrição em relação ao grupo controle durante os períodos de prenhez e lactação. Foram avaliados o número de animais de cada prole e o peso no DPN 1. Os filhotes machos, provenientes dos grupos restrição (GR) e controle (GC), foram divididos em cinco subgrupos etários (n=8) de 21, 28, 50, 90 e 540 dias. Foram avaliados o peso e comprimento corpóreo de cada animal, sua ingestão alimentar após o desmame, e os níveis sanguíneos de glicose, insulina e leptina, além dos testes de tolerância oral à glicose e à insulina nos animais de 540 dias. Os encéfalos foram processados para análise do número e da distribuição dos neurônios MCH e CART na área hipotalâmica lateral, segundo protocolos de imuno-histoquímica (n=5) e microscopia eletrônica de transmissão (n=3). O mapeamento e a estimativa do número de neurônios MCH e CART na LHA foram realizados, respectivamente, por reconstrução tridimensional e estereologia. A ultraestrutura dos neurônios MCH e CART foi analisada qualitativamente por MET. Nossos dados indicaram que a restrição alimentar materna provocou diminuição permanente no peso e comprimento corporais, no peso encefálico e das gorduras visceral e retroperitoneal. Não foram observadas modificações no metabolismo de glicose e na eficiência alimentar do GR, embora a ingestão alimentar relativa desses animais tenha sido superior ao GC. Não foram observadas alterações nos níveis séricos de leptina, porém os animais do GR apresentaram diminuição dos níveis de insulina no DPN 21. Aos 540 dias de idade, o GR apresentou uma diminuição do número de neurônios CART na LHA. Não houve diferenças no número de neurônios MCH entre os grupos, mas a área e o volume da LHA foi menor no GR em 21, 50 e 90 dias. Modificações na distribuição dos neurônios CART na LHA foram observadas no DPN 540, com diminuição do número de células na região perifornical e nas secções mais caudais da LHA. Nenhuma alteração ultraestrutural foi observada no GR, tanto nos neurônios CART quanto nos MCH. Concluímos que a restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação modificou a estrutura corporal dos descendentes e seu comportamento alimentar. Além disso, diminuiu o número de neurônios CART da LHA, alterando sua distribuição, sem alterações nos neurônios MCH, que não foram refletidas na ultraestrutura.

Palavras-chave: rato *Wistar*, microscopia eletrônica de transmissão, restrição alimentar materna, hipotálamo, neuropeptídeos, prenhez, lactação.

ABSTRACT

Effect of Maternal Food Restriction during Pregnancy and Lactation on MCH and CART Neurons in the Lateral Hypothalamic Area (LHA)

The association between lower birth weight and an increased risk of obesity, diabetes type 2 and cardiovascular diseases in adult life led to Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis. In this hypothesis, programming is related to the adjustments performed by the organism to insults occurring at key stages of their development, which may lead to long-lasting effects in the organs structure and function. Maternal nutrition during critical periods of individual development is considered an important Programming inductor, since the nutrient deficiency during pregnancy and lactation causes significant changes in body weight, energy balance, food intake and neuropeptides expression. The melanin-concentrating hormone (MCH) and the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) are neuropeptides expressed in the lateral hypothalamic area (LHA) that are involved in the regulation of energy balance and feeding behavior in which MCH plays an orexigenic role and CART an anorexigenic one. Thus, our aim was to analyze the number and the distribution of MCH and CART and the ultrastructure of these neurons in the LHA of rats whose mothers were subjected to food restriction during pregnancy and lactation. After pregnancy confirmation, female *Wistar* rats were divided in two groups: control group (CG), *ad libitum* standard diet, and caloric restriction group (RG), 50% diet restriction compared to the control group during pregnancy and lactation. After birth, the number of pups and their body weight in postnatal day (PND) 1 were evaluated. The male pups from both groups were divided into five age subgroups (n = 8): PND 21, 28, 50, 90 and 540. Body weight and nasoanal distance of each animal, their weekly food intake after weaning and glycemia, leptin and insulin serum concentrations were evaluated. An oral glucose tolerance test and insulin tolerance test were also executed in PND 540. Brains were processed for analysis of MCH and CART number and distribution in the LHA, according to immunohistochemistry protocols (n=5) and transmission electron microscopy (n=3). The mapping and estimate of MCH and CART neurons in the LHA were performed using three-dimensional reconstruction and stereological study. The ultrastructure of MCH and CART neurons was analyzed by transmission electron microscopy. Our data indicated that caloric restriction during pregnancy and lactation decreased body weight, body length, brain weight and visceral and retroperitoneal adipose tissues throughout life. No differences were observed in the glucose metabolism and in RG food efficiency, although the relative food intake was increased in RG. There were no differences in the leptin concentration; however RG has showed lower insulin concentration in PDN 21. Stereological data have shown a decreased number of CART neurons in the LHA of RG540. There were no differences in the number of MCH neurons among groups, however the LHA area and volume were smaller in RG in PND 21, 50 and 90. Modifications were observed in the distribution of CART neurons in RG540, with lower number of neurons on perifornical region and caudal sections of LHA. No ultrastructural alterations in CART and MCH neurons were caused by caloric restriction during pregnancy and lactation. In conclusion, maternal food restriction during pregnancy and lactation changed biometric parameters in the offspring and their food intake. Furthermore, there was a decrease in CART neurons in LHA and changes in its distribution, with no effects on MCH neurons and on both neuropeptides ultrastructure.

Keywords: *Wistar* rat, transmission electron microscopy, maternal food restriction, hypothalamus, neuropeptides, pregnancy, lactation

1 INTRODUÇÃO

Nutrição inadequada é um problema mundial e tema de interesse da Organização Mundial da Saúde (OMS). Estima-se que a subnutrição materna e infantil é responsável por 11% das doenças em nível global (BLACK et al., 2008). O período entre 2016 e 2025 é considerado a “década de ações em nutrição” pelas Nações Unidas, ampliada até 2030. Nesse período, dentre as diversas metas, destacam-se a erradicação da fome e a promoção de saúde através da nutrição adequada (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) et al., 2018).

A má nutrição afeta uma a cada três pessoas na população mundial (WORLD FOOD PROGRAMME, 2017) e tem um impacto negativo no desenvolvimento cognitivo, no desempenho escolar e na produtividade. Aliada à estimulação cognitiva inadequada, é um importante fator de risco que contribui para que 200 milhões de crianças deixem de atingir seu potencial pleno de desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Segundo a edição de 2015 da OMS, juntamente com a UNICEF e o Banco Mundial, estima-se que no mundo haja 159 milhões de crianças com nanismo, 50 milhões com baixo peso para altura, dentre as quais 16 milhões em estado severo.

Durante o período de gestação e lactação, todas as necessidades nutricionais do descendente dependem da mãe. Portanto, o período entre a concepção até o segundo ano de vida (primeiros 1000 dias) é crucial, no qual a boa alimentação gera benefícios para toda a vida (BHUTTA et al., 2008; KOLETZKO et al., 2014). Assim, alterações no estado nutricional materno, durante estágios críticos de desenvolvimento, podem gerar modificações estruturais e fisiológicas significativas e duradouras na prole (MCARDLE et al., 2006; DEARDEN e OZANNE, 2015).

Estudos mostram que a restrição alimentar materna durante essas fases têm consequências a longo prazo no metabolismo energético da prole e uma maior propensão desses indivíduos ao desenvolvimento de doenças metabólicas, como obesidade e diabetes tipo 2, e cardiovasculares na idade adulta (MCMILLEN et al., 2005; MCARDLE et al., 2006; PICO et al., 2012).

As observações feitas por Barker, nas quais o baixo peso ao nascer está associado ao alto risco de desenvolvimento dessas doenças, bem como a plasticidade e vulnerabilidade dos períodos fetal e neonatal, deram origem à hipótese denominada “Origem Desenvolvimentista da Saúde e Doença” (*Developmental Origins of Health and Disease – DOHaD*) (BARKER, 2004; CALKINS e DEVASKAR, 2011). Nessa hipótese, o termo “Programação” define e envolve as adaptações do organismo frente às injúrias ocorridas em fases importantes de seu desenvolvimento (fetal, neonatal e infância), gerando efeitos permanentes ou não na estrutura e função de órgãos (OZANNE, 2001).

A teoria do “*thrifty phenotype*”, proposta por Hales e Barker (1992), enuncia que em resposta à falta de nutrientes durante a gestação, o feto adotará uma série de estratégias metabólicas que visem a aumentar suas chances de sobrevivência. Dessa forma, a programação metabólica prepara o indivíduo para a sobrevivência em condições pós-natais de desnutrição. Entretanto, esse ajuste metabólico pode causar efeitos adversos quando, posteriormente, uma dieta adequada ou hipercalórica é oferecida ao indivíduo (HALES e BARKER, 1992; CRIPPS et al., 2005), que pode apresentar crescimento corporal acelerado, fenômeno denominado “*catch up growth*”, e até mesmo desenvolver obesidade precoce (OZANNE e HALES, 2004).

A variedade de fenótipos adaptativos na vida adulta depende do tipo, período, duração e severidade da restrição a que o feto ou lactente for submetido. Estudos em modelos animais, por

exemplo, mostram que a restrição alimentar materna durante a prenhez, do tipo calórica, proteica ou de outro nutriente, produz alterações na homeostase do balanço energético (relação entre ingestão e gasto energético) e obesidade (DESAI et al., 2007a; PICO et al., 2012). Já os efeitos tardios da desnutrição durante a lactação ainda são pouco claros, mas dados mostram que a restrição severa durante essa fase está associada ao retardo no crescimento corporal (REMMERS et al., 2008b).

A restrição calórica durante a prenhez e/ou lactação gera modificações no peso corporal, aumenta a ingestão alimentar e altera o controle do balanço energético da prole (DESAI et al., 2007a; DELAHAYE et al., 2008; PALOU et al., 2012). Mudanças permanentes no hipotálamo em períodos importantes de seu desenvolvimento podem gerar modificações na homeostase energética na vida adulta, fenômeno descrito como programação hipotalâmica, e no qual a restrição calórica pode ser um fator determinante (REMMERS e DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011; PICO et al., 2012).

O comportamento alimentar é determinado por uma série de processos neurobiológicos que o controlam direta ou indiretamente: a palatabilidade do alimento, aferências viscerais pós-ingestão e absorção, circuitos de recompensa, emoções e o controle homeostático energético, no qual se destacam os núcleos hipotalâmicos e ação da insulina e leptina (ZELTSER, 2018).

O hipotálamo, centro integrativo essencial para a sobrevivência, está associado às funções que controlam o comportamento alimentar e o balanço energético (SCHWARTZ et al., 2000), destacando-se a área hipotalâmica lateral (LHA) como um centro importante de regulação da homeostase energética (BERNARDIS e BELLINGER, 1993;1996; BROBERGER et al., 1998; BROWN et al., 2015).

A LHA, localizada no hipotálamo lateral (SIMERLY e PAXINOS, 2004), pode ser dividida em três sub-regiões (anterior, tuberal e mamilar) no eixo rostro-caudal e possui muitas conexões com estruturas do neuro-eixo, mediadas pela passagem do feixe prosencefálico medial em sua parte central (SAPER et al., 1979; BERTHOUD, 2002). Além do papel de destaque no controle do balanço energético e da ingestão alimentar (BERNARDIS e BELLINGER, 1996; BROWN et al., 2015), a LHA está relacionada ao processamento de informações sensitivas, modulação de respostas motoras somáticas, ingestão hídrica, reprodução, modulação autônoma, ciclo sono-vigília (SZYMUSIAK et al., 1989; KRILOWICZ et al., 1994), controle neuroendócrino (BERNARDIS e BELLINGER, 1993; LARSEN et al., 1994), termorregulação (SATINOFF e SHAN, 1971; ZHANG et al., 1997) e ativação cortical (SAPER, 1985; SAPER et al., 1986).

A grande variedade de neurotransmissores e neuromodulares presentes na LHA é responsável por sua diversidade de funções. Estudos anteriores demonstraram a presença de diversos neuropeptídeos na LHA, dentre eles a hipocretina/orexina (Hcr/Ox), que apresenta importante papel na manutenção da vigília e controle da ingestão alimentar (BROBERGER et al., 1998; BROBERGER, 2005); o neuropeptídeo ácido glutâmico-isoleucina (NEI), associado ao comportamento de auto-limpeza e locomoção (NAHON et al., 1989); o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), relacionado à manutenção do peso corporal e ingestão alimentar, no qual exerce papel anorexígeno (KOYLU et al., 1997; KUHAR et al., 2002; ZHANG et al., 2012); e o hormônio concentrador de melanina (MCH), associado à regulação do balanço energético e controle tônico do comportamento alimentar, exercendo um papel orexígeno (QU et al., 1996; SHIMADA et al., 1998; DINIZ e BITTENCOURT, 2017).

O MCH do rato possui estrutura cíclica composta por 19 aminoácidos (NAHON et al., 1989; VAUGHAN et al., 1989), diferenciando do MCH do salmão, descrito previamente por Kawauchi *et al.* (1983), em dois aminoácidos da porção amino-terminal e quatro substituições. O MCH do rato ocupa a porção carboxi-terminal de um precursor (pré-pró-hormônio concentrador de melanina – ppMCH – Figura 1) composto por 165 aminoácidos, a partir do qual também são traduzidos o NEI e o neuropeptídeo glicina-ácido glutâmico (NGE) (TOUMANIANTZ et al., 1996; TOUMANIANTZ et al., 2000; ALLAEYS et al., 2004).

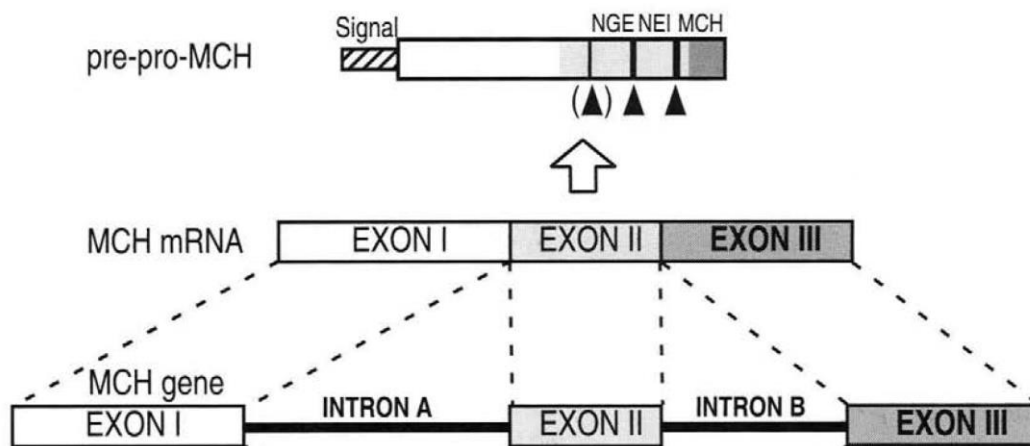


Figura 1. Esquema da estrutura do pré-pró-hormônio concentrador de melanina (ppMCH), molécula precursora da síntese do MCH. Posição dos íntrons e éxons relacionando com as sequências do MCH, NEI e NGE, originados a partir do ppMCH. Adaptado de Nahon *et al.* (1989), Vaughan *et al.* (1989) e Nahon e Abba (2006).

A distribuição de fibras e terminais imunorreativos ao MCH, associada à distribuição de seu receptor (MCH-1R), demonstra seu papel na organização de comportamentos motivados, através da influência no alerta, comportamento exploratório, regulação autonômica, alimentação, aprendizado e memória (BITTENCOURT et al., 1992; HERVIEU et al., 2000; SAITO et al., 2001).

O estudo da distribuição dos neurônios MCH no sistema nervoso central do rato foi realizado por Bittencourt *et al.* (1992). Nesse trabalho, também foi estudado o padrão de distribuição do RNAm do ppMCH através de hibridização *in situ*. No rato, a distribuição de neurônios MCH é essencialmente diencefálica (Figura 2), ocupando principalmente a LHA e zona incerta rostromedial. Além disso, também foram observados grupamentos menores, como a parte dorsomedial do núcleo tuberomamilar, núcleo periventricular anterior e uma região não definida no hipotálamo medial entre os limites ventrolateral do núcleo dorsomedial e dorsolateral do núcleo ventromedial. Outros grupamentos extra-diencefálicos também apresentam expressão do RNAm do ppMCH e de seus peptídeos, como o tubérculo olfatório e uma parte não descrita da formação reticular pontina paramediana (BITTENCOURT *et al.*, 1992; BITTENCOURT, 2011).

Há projeções imunorreativas ao MCH para quase todo neuro-eixo (Figura 2); entretanto, o cerebelo e os núcleos motores de nervos cranianos do tronco encefálico parecem não receber uma densa inervação por essas fibras. A maior parte das fibras imunorreativas ao MCH é veiculada pelo feixe prosencefálico medial, que atravessa a LHA (BITTENCOURT et al., 1992). A zona incerta rostromedial e os grupamentos extra-diencefálicos também enviam projeções imunorreativas ao MCH.

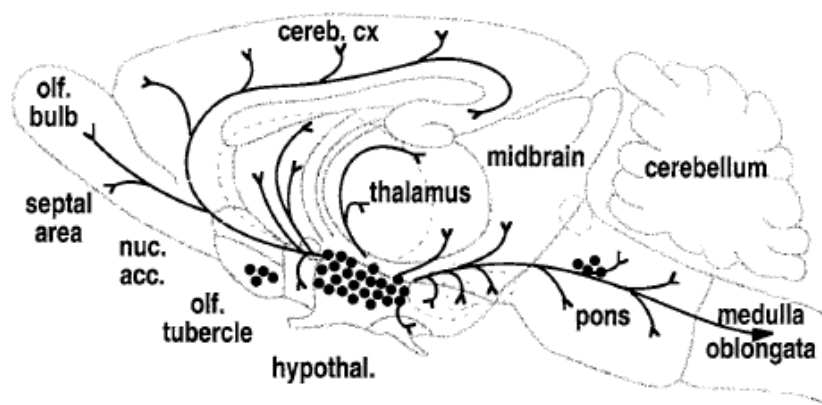


Figura 2. Esquema proposto por Nahon, J.L (1989) que mostra a localização dos neurônios MCH (esferas) e suas projeções axonais para as diversas áreas do neuro-eixo. Abreviaturas: nuc. acc.= núcleo accumbens, hypothal.= hipotálamo, olf. tubercle = tubérculo olfatório, olf. bulb = bulbo olfatório, cereb. cx = córtex cerebral.

A distribuição subcelular do MCH segue o padrão tipicamente descrito para neurônios peptidérgicos (PICKEL, 1985). O MCH foi encontrado nos somas de neurônios com núcleos invaginados, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos e vesículas com grânulos densos distribuídas no citoplasma (NAITO et al., 1988; BITTENCOURT et al., 1992). Uma característica marcante no padrão de distribuição do MCH é o acúmulo nas cisternas *trans* do complexo de Golgi (BITTENCOURT et al., 1992).

O MCH é um dos primeiros neuropeptídeos expressos no encéfalo. Neurônios MCH se diferenciam entre os 10º e 16º dias do período embrionário do rato, com um pico em sua formação no 13º dia, no qual é possível detectar o RNAm e o próprio peptídeo (BRISCHOUX et al., 2001). Em neonatos, neurônios MCH estão organizados em grupamentos menores e localizados mais medialmente do que o observado no período embrionário. No dia pós-natal (DPN) 16, os somas já apresentam dimensões e distribuição semelhantes aos padrões encontrados em animais adultos (BRISCHOUX et al., 2001). Os terminais axônicos se dirigem primeiramente ao tronco encefálico e ampliam sua distribuição progressivamente até o DPN 21 (STEININGER et al., 2004).

Estudos funcionais indicam a participação do MCH na homeostase de água e eletrólitos (PARKES e VALE, 1993; PRESSE e NAHON, 1993) e no comportamento alimentar (PRESSE et al., 1996; QU et al., 1996; SAPER et al., 2002; SZEKELY e SZELENYI, 2005). Entre todos os participantes do controle do balanço energético, atribuiu-se ao MCH uma função de destaque no controle tônico do comportamento alimentar, exercendo um papel orexígeno (QU et al., 1996; ROSSI et al., 1997), fato confirmado pela inativação gênica do MCH (SHIMADA et al., 1998), que resultou num modelo de camundongos magros e hipofágicos, nos quais o fenótipo se estabeleceu progressivamente após o nascimento.

Outro neuropeptídeo abundante na LHA é o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART), primeiramente descrito no cérebro de roedores, mais precisamente no estriado, após a injeção de cocaína e anfetamina por via intraperitoneal (DOUGLASS et al., 1995). O CART é derivado de duas moléculas precursoras (pré-pro-CART) que dão origem a três peptídeos ativos: CART 33-102, CART 55-102 e CART 62-102, denominados de acordo com a sequência de aminoácidos na molécula precursora (DOUGLASS et al., 1995; KUHAR et al., 2002). As sequências de aminoácidos

para o CART do rato e do homem apresentam semelhanças de 95%, sendo a região carboxi-terminal a mais conservada (DOUGLASS e DAOUD, 1996).

Diversas regiões do sistema nervoso central (SNC) apresentam neurônios CART ou RNAm para CART, como núcleo *accumbens*, amígdala basolateral e área tegmental ventral, associando a participação do CART aos mecanismos de recompensa. O hipotálamo possui grande expressão desse neuropeptídeo, destacando-se os núcleos paraventricular do hipotálamo (PVH), núcleo arqueado (Arc) e a LHA, indicando participação do CART no controle da homeostase energética e dos comportamentos motivados (COUCEYRO *et al.*, 1997; KOYLU *et al.*, 1997; KOYLU *et al.*, 1998; ELIAS *et al.*, 2001; SUBHEDAR *et al.*, 2014). A distribuição de fibras CART descrita por Koylu *et al.* (1998) mostra densa inervação de importantes centros vegetativos do SNC, como os núcleos paraventricular, dorsomedial e arqueado no hipotálamo, núcleo do trato solitário e coluna intermediolateral da medula espinal.

Estudos ontogênicos em ratos avaliaram a expressão do CART durante o período embrionário na região mesencefálica, mostrando que ele é detectado a partir do 11º dia embrionário, mas que, após o 16º dia, sua imunorreatividade diminui consideravelmente, sugerindo uma participação importante do CART no desenvolvimento desses neurônios na fase embrionária, devido a sua expressão transitória (BRISCHOUX *et al.*, 2002).

A expressão do RNAm do CART durante o desenvolvimento pós-natal apresenta diferenças temporais em distintos grupamentos neuronais prosencefálicos. Regiões como córtex somato-sensório, giro denteado e núcleo *accumbens* apresentam altos níveis de expressão no DPN 6 e posterior diminuição nos DPN 26 e 66. Porém, no núcleo arqueado, a expressão de RNAm do CART é menor no DPN 6 quando comparado ao DPN 26 e 66. Já na LHA e no núcleo dorsomedial do hipotálamo, a expressão do RNAm não se altera entre as diferentes idades (RODRIGUES *et al.*, 2011).

O CART está associado a diversas funções, como recompensa, regulação neuroendócrina, dor, estresse, comportamento alimentar e metabolismo energético (KIMMEL *et al.*, 2000; VRANG *et al.*, 2000; KUHAR *et al.*, 2002; DAMAJ *et al.*, 2004; SUBHEDAR *et al.*, 2014). Kristensen *et al.* (1998) demonstraram a ação do CART como fator de saciedade, desempenhando, em conjunto com a leptina, uma função inibitória (anorexígena) da ingestão alimentar.

A presença de CART em núcleos importantes para a manutenção do metabolismo energético e controle do comportamento alimentar sugere importante participação de neurônios CART nessas funções (KOYLU *et al.*, 1997). Além disso, o CART apresenta co-localização com outros neuropeptídeos envolvidos na homeostase energética, como o pró-opiomelanocortina (POMC) no núcleo arqueado e o MCH na LHA (ELIAS *et al.*, 1998a; ELIAS *et al.*, 2001; JANCSEK *et al.*, 2018).

Em nível ultraestrutural, o CART é observado em somas com núcleo oval grande e invaginado, com grande imunorreatividade no retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, podendo apresentar vesículas imunorreativas com grânulos densos (DALL VECHIA *et al.*, 2000), e também em terminais axônicos com vesículas escuras com núcleos densos fortemente imunorreativos (COUCEYRO *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 1997).

A elucidação do verdadeiro papel do MCH e do CART no comportamento alimentar depende do estudo de sua relação com os outros neuropeptídeos. Trabalhos prévios investigaram o papel desses neuropeptídeos e de seus receptores no que se refere à gênese da obesidade e suas

possíveis utilizações farmacológicas (FAN et al., 1997; BROBERGER et al., 1998; ELIAS et al., 1998b; HAKANSSON et al., 1998; SAWCHENKO, 1998; ELIAS et al., 1999; VRANG et al., 1999). Nesse contexto, a leptina produzida pelo tecido adiposo branco está envolvida na sinalização ao SNC sobre o estado energético do indivíduo, através da mediação de neurônios imunorreativos ao neuropeptídeo Y (NPY), ao peptídeo relacionado à proteína agouti (AgRP), ao POMC e ao CART do núcleo arqueado. Esses grupos neuronais, por sua vez, projetam-se para neurônios MCH ou CART da LHA que modulam os comportamentos necessários à manutenção do equilíbrio energético, dentre os quais inclui-se o comportamento de busca de água e alimentos. Assim, o MCH e o CART mostram-se como vias finais da ação da leptina sobre o neuro-eixo, veiculando informações sobre as necessidades energéticas do indivíduo (ELIAS et al., 1998b; ELIAS et al., 1999; ELIAS et al., 2001).

Além disso, a relação entre o MCH e a sinalização pela leptina é evidenciada pela presença de receptores de leptina (Ob-r) nos neurônios MCH da LHA, demonstrando que essas células são sensíveis à ação da leptina (FEI et al., 1997; HAKANSSON et al., 1998). Outros estudos mostram que os neurônios presentes no núcleo arqueado possuem receptores de insulina e exercem um papel anoréxico na homeostase energética, através de projeções para neurônios MCH e CART da LHA, sugerindo que esses neuropeptídeos possam ser via final também da insulina (MCGOWAN et al., 1993; ELIAS et al., 1998a).

Com o processo de envelhecimento, mesmo em indivíduos saudáveis, ocorre perda de gordura e peso corporais, possivelmente relacionados a um balanço energético negativo, uma vez que grupos etários mais velhos apresentam substancial redução da sua capacidade de manter um balanço energético constante (ROBERTS, 2000; AKIMOTO e MIYASAKA, 2010). Kappeler et al. (2003) relacionaram o envelhecimento à diminuição de expressão de genes de neuropeptídeos hipotalâmicos, como POMC, CART e MCH, o que sugere uma diminuição na ingestão alimentar.

Esse aspecto foi corroborado por estudo recente de nosso grupo, em ratos, no qual se observou que o número e a distribuição dos neurônios MCH na LHA não sofrem alteração em função da idade, desde a pré-puberdade até a senilidade, e que, após a maturação do sistema MCH-érgico, a expressão do RNAm para o MCH aumenta durante o desenvolvimento pós-natal até a idade adulta e diminui com o envelhecimento na LHA (MACHADO, 2015).

A restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação provoca diminuição da expressão do RNAm para POMC (DELAHAYE et al., 2008) e do receptor de leptina no hipotálamo (DESAI et al., 2007b), diminuição do número de neurônios imunorreativos ao NPY no Arc (GARCIA et al., 2010), redução nos níveis plasmáticos de leptina na prole no desmame (DELAHAYE et al., 2008) e aumento na proliferação celular em núcleos do hipotálamo medial como o PVH, o VMH e o Arc até o DPN 21 (COUPE et al., 2009). No entanto, os efeitos da restrição alimentar materna em grupos neuronais no hipotálamo lateral, como os neurônios MCH e CART da LHA, importantes para o controle do metabolismo energético, são desconhecidos.

Os efeitos que a restrição alimentar materna pode gerar na organização celular ultraestrutural também são pouco conhecidos. Há pouquíssimos dados na literatura sobre a distribuição subcelular desses neuropeptídeos (JANCSIK et al., 2018) e nenhuma informação relacionada à descrição ultraestrutural desses neuromoduladores no paradigma de restrição alimentar materna.

Dados na literatura mostraram que a restrição calórica materna promove redução na quantidade de citoplasma e de vesículas de secreção em células da hipófise (GOMEZ DUMM et al.,

1987), bem como redução no número de segmentos e na extensão da arborização dendrítica dos neurônios do núcleo do trato solitário (RUBIO et al., 2004). Um estudo eletrofisiológico indicou que a restrição calórica perinatal reduz as entradas sinápticas excitatórias ao hipocampo, podendo afetar o processamento de informações pela redução seletiva de espinhos dendríticos (ZHANG et al., 2013). Já a restrição proteica materna levou a uma diminuição do peso encefálico, da área dos terminais axonais no córtex occipital, sugerindo atraso no desenvolvimento da prole (JONES e DYSON, 1981).

Além disso, ainda não estão esclarecidas as futuras implicações que a restrição alimentar materna pode promover nos neurônios da LHA durante o desenvolvimento pós-natal e o envelhecimento. Assim, acreditamos que a restrição alimentar materna pode alterar o fenótipo e o metabolismo energético dos descendentes, modificando os neurônios da LHA durante o desenvolvimento pós-natal dos sistemas MCH-érgico e CART-érgico e durante o envelhecimento.

2 JUSTIFICATIVA

A restrição calórica materna é capaz de alterar a homeostase do balanço energético, na qual a área hipotalâmica lateral se destaca como centro importante de regulação. Contudo, os seus efeitos em nível estrutural e ultraestrutural sobre a área hipotalâmica lateral ainda não são conhecidos, em especial, os relacionados à expressão de MCH e CART durante o desenvolvimento pós-natal e no envelhecimento.

3 OBJETIVOS

Analisar os efeitos da restrição alimentar materna, durante a prenhez e lactação, no número e distribuição dos neurônios MCH e CART na LHA de ratos, bem como sua ultraestrutura, ao longo do desenvolvimento pós-natal e envelhecimento.

4 DESENHO EXPERIMENTAL

Para estudar os neurônios MCH e CART da LHA de ratos cujas mães foram submetidas à restrição alimentar durante a prenhez e lactação, foram realizados acasalamentos de ratos *Wistar* adultos para obtenção das proles (n=20 fêmeas e 10 machos), as quais foram objeto de estudo. Após a detecção da prenhez, as fêmeas foram separadas para a formação de dois grupos experimentais: grupo controle (GC), dieta padrão e água *ad libitum*, e grupo restrição calórica (GR), água *ad libitum* e dieta de 50% de restrição em relação à ingestão alimentar média diária do GC, durante os períodos de prenhez e lactação.

Os filhotes machos, provenientes dos grupos restrição calórica (GR) e controle (GC), foram divididos em cinco subgrupos etários (n=8) de 21, 28, 50, 90 e 540 dias (QUINN, 2005; ANDREOLLO et al., 2012), representativos das fases de fim da lactação, pré-púbere, púbere, adulto jovem e adulto senescente, respectivamente (Figura 3). A presença de mais de um animal da mesma ninhada nos subgrupos etários foi evitada, sendo as mães consideradas as unidades experimentais, excluindo a influência do fator ninhada nos resultados obtidos.

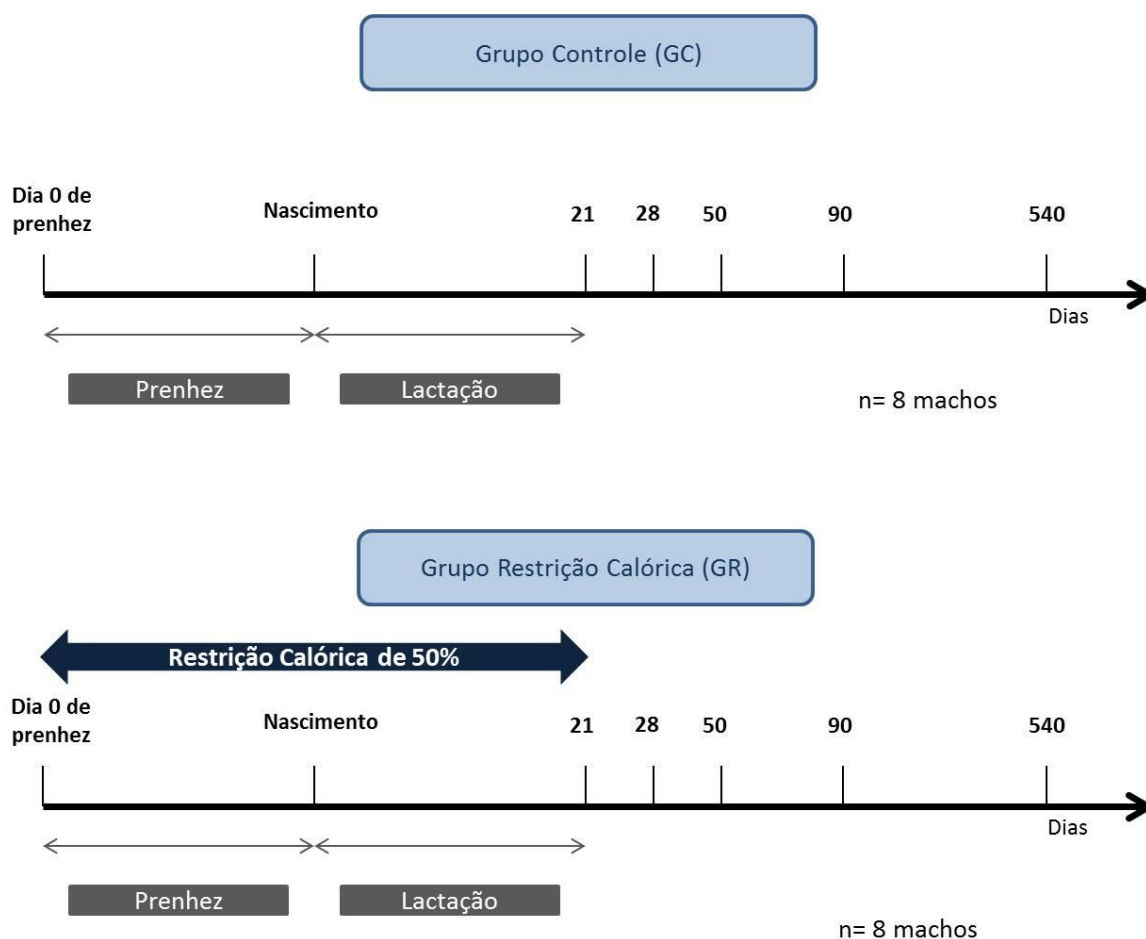


Figura 3. Esquema do delineamento experimental. Os dois grupos experimentais (GC e GR) estão representados durante a prenhez e lactação, assim como os subgrupos etários (DPN 21, 28, 50, 90 e 540). Além disso, o período de restrição de dieta em 50%, durante os períodos de prenhez e lactação, está destacado.

No DPN 1, foram avaliados o número de filhotes de cada prole e o peso dos animais machos. Em seguida, as ninhadas foram padronizadas entre 8 a 10 filhotes, no intuito de evitar a influência do

tamanho da ninhada no desenvolvimento dos descendentes (WURTMAN e MILLER, 1976; REMMERS et al., 2008b; GARCIA et al., 2010), mantendo a mesma proporção entre machos e fêmeas (5:5) quando possível. Após o desmame, todos os animais receberam água e dieta padrão ad libitum e tiveram peso e a ingestão alimentar monitorados semanalmente até 540 dias.

4.1 Experimento I – Microscopia óptica

No dia da eutanásia de cada subgrupo etário, em ambos grupos experimentais, foram avaliados o peso corporal e a distância naso-anal. Sangue do ventrículo cardíaco esquerdo foi coletado imediatamente antes da perfusão, para dosagens de glicose, insulina e leptina. Nos animais de GC540 e GR540, 10 e 5 dias antes da eutanásia, respectivamente, foram realizados o teste de tolerância à insulina (TTI) e o teste de tolerância oral à glicose (TTOG), a fim de verificar possíveis efeitos tardios da programação no metabolismo da glicose.

Para cada subgrupo, cinco animais (n=5) foram eutanasiados por perfusão transcardíaca, fixados e seus encéfalos e tecido adiposo visceral e retroperitoneal coletados e pesados. Cada encéfalo teve a região do hipotálamo seccionada em 5 séries de cortes obtidos em micrótomo de congelamento.

Em todos os casos experimentais, uma série de cortes foi destinada para imuno-histoquímica para o MCH e outra para imuno-histoquímica para o CART, ambas com contra-coloração com tionina para referência citoarquitetônica.

Para analisar os efeitos da restrição calórica materna no número de neurônios MCH e CART da LHA, foi realizada análise estereológica. O estudo da distribuição dos neurônios MCH e CART foi realizado através da elaboração de um modelo de reconstrução tridimensional da LHA.

4.2 Experimento II – Microscopia eletrônica de transmissão

Em cada subgrupo etário, de ambos os grupos experimentais, três animais (n=3) foram eutanasiados por perfusão transcardíaca, fixados, seus encéfalos e tecido adiposo visceral e retroperitoneal coletados e pesados. Cada encéfalo teve a região do hipotálamo seccionada em 6 séries de cortes obtidos em vibrátomo. Uma série de cortes foi destinada ao protocolo de imuno-histoquímica para MCH e outra para o protocolo de imuno-histoquímica para CART. Na sequência, ambas as séries foram processadas para a microscopia eletrônica de transmissão.

O estudo da ultraestrutura dos neurônios MCH e CART visou, principalmente, à descrição das possíveis alterações na sua distribuição subcelular, avaliando qualitativamente as alterações nos somas dos neurônios nos diferentes subgrupos etários de GC e GR, com especial ênfase no retículo endoplasmático rugoso, no complexo de Golgi e nas vesículas sinápticas com núcleos densos.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animais

Todos os experimentos propostos requerem a utilização de animais de experimentação, não existindo método alternativo. O planejamento e execução dos experimentos visaram à diminuição do estresse e desconforto para os animais, a fim de aumentar as possibilidades de êxito, reduzindo o número de animais utilizados. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Biociências de Botucatu (Protocolo CEUA nº 722).

Foram utilizados ratos albinos machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, obtidos no Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção das proles dos dois grupos experimentais. Essa espécie é representativa dos mamíferos roedores e já foi utilizada para estudos fisiológicos e neuroquímicos do MCH e CART, com as técnicas de imuno-histoquímica, hibridização *in situ* e avaliação desses neuropeptídeos após restrição alimentar (VRANG et al., 1999; SITA et al., 2007; REMMERS et al., 2008b).

Os animais foram mantidos em biotério com umidade do ar e temperatura controladas (21 a 22° C) e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7 h). Após aclimatização dos animais, duas fêmeas em estro foram introduzidas na caixa de um macho para acasalamento durante a noite. Na manhã seguinte, foi coletado o lavado vaginal das fêmeas para verificação da presença de espermatozoides, com posterior coloração com eosina, hematoxilina e Orange G, para ratificar a observação a fresco.

A presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerada o dia 0 de prenhez. As fêmeas prenhes foram separadas em caixas individuais e divididas em dois grupos experimentais: grupo controle (GC), com dieta padrão para ratos (Presence®, Invivo Nutrição e Saúde Animal LTDA., para informações sobre composição básica e níveis de garantia vide Anexo) e água *ad libitum*; e grupo restrição calórica (GR), água *ad libitum* e dieta padrão com restrição de 50% em relação à ingestão alimentar média diária do grupo controle, durante a prenhez e lactação. Primeiramente, a ingestão diária de ração das mães do GC foi mensurada nos períodos indicados e sua curva de ingestão média diária construída (Resultados, Figura 5A), para posterior administração da dieta no GR.

O peso corporal das fêmeas prenhes foi acompanhado durante toda a prenhez e lactação. Por volta do 21º dia de prenhez, todas fêmeas de GC (n=20) pariram naturalmente. Já no GR (n=18), 3 mães não pariram, 15 mães pariram naturalmente, contudo 2 mães abandonaram o cuidado da prole no DPN10, levando todos a óbito, de forma que foram utilizadas 13 mães do GR.

No DPN 1 foram avaliados, em cada prole, o número de neonatos e o peso corporal de todos os filhotes machos. As ninhadas foram padronizadas entre 8 a 10 filhotes, no intuito de evitar a influência do tamanho da ninhada no desenvolvimento da prole (WURTMAN e MILLER, 1976; REMMERS et al., 2008b; GARCIA et al., 2010), mantendo a mesma proporção entre machos e fêmeas (5:5) quando possível.

A partir do desmame (DPN 21), os animais machos foram alojados em gaiolas (33x17x18cm) para avaliação da ingestão alimentar, com livre acesso à água e ração (dieta padrão). Os animais do subgrupo etário de 21 dias foram submetidos aos protocolos experimentais I e II imediatamente após o desmame. Os demais permaneceram em biotério até atingirem a idade experimental desejada,

alocados em duplas ou trios até os 70 dias e posteriormente de forma individual. Durante todo o período, foram monitorados semanalmente o peso corporal e a ingestão alimentar, para análise e cálculo dos valores de conversão e eficiência energéticas.

Das proles de GC e GR, os machos foram divididos em cinco subgrupos etários: 21, 28, 50, 90 e 540 dias de idade. As idades escolhidas são representativas do fim da lactação, pré-puberdade, puberdade, adulto jovem e adulto senescente, respectivamente (QUINN, 2005; ANDREOLLO et al., 2012), e foram selecionadas com base em trabalho prévio que identificou períodos críticos de variação da expressão de MCH durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento (MACHADO, 2015).

5.2 Teste de tolerância à insulina (TTI)

Em GC540 e GR540, foi realizado o TTI dez dias antes da perfusão desses animais (n=10). Após jejum de 6 horas, todos os animais tiveram suas glicemias mensuradas com glicosímetro (*FreeStyle Freedom Lite*, Abbot®, mg/dL), através de amostra de sangue obtida da veia caudal.

A seguir, solução de insulina (Humulin 1 U/ml em água para injeção) foi aplicada via subcutânea, na dose de 1 U/1000 g de peso corporal do animal. Posteriormente, amostras de sangue foram obtidas da veia caudal para determinação da glicemia 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de insulina, utilizando o mesmo glicosímetro para as mensurações (KISS et al., 2012).

As comparações entre as curvas glicêmicas de GC540 e GR540 foram feitas em cada tempo de avaliação, bem como através do cálculo da área total sob a curva (AUC), utilizando método trapezoide (TAI, 1994).

5.3 Teste de tolerância oral à glicose (TTOG)

O TTOG foi realizado nos animais de GC540 e GR540 (n=10) cinco dias antes do protocolo de perfusão. Após jejum de 6 h, todos os animais tiveram suas glicemias mensuradas com glicosímetro, através de amostra de sangue obtida da veia caudal.

Em seguida, foi administrada solução de glicose (1 g/ml) através de gavagem, na dose de 2 g/1000 g de peso corporal do animal. Posteriormente, amostras de sangue foram obtidas da veia caudal para determinação da glicemia 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose, utilizando glicosímetro para as mensurações (KISS et al., 2012).

As comparações entre as curvas glicêmicas de GC540 e GR540 foram realizadas pelo método trapezoide à semelhança do que foi previamente descrito para o TTI.

5.4 Experimento I – Microscopia Óptica

5.4.1 Preparo de material biológico

Precedendo o momento da eutanásia, os animais passaram por jejum (exceto animais de 21 dias) para coleta de sangue durante o procedimento. A eutanásia dos animais (n=5 por grupo) foi realizada sob anestesia profunda, sempre entre as 14-16h. Antes de se iniciar qualquer procedimento, sempre foi comprovada a ausência do reflexo de retirada do membro como sinal de anestesia profunda. Como anestésico, utilizamos solução composta por de ketamina 10% (25 mg/ml), xilazina 2% (0,5 mg/ml) e acepromazina 1% (1 mg/ml) diluída em água purificada (2 ml/kg) via intraperitoneal.

Todos os animais foram perfundidos com solução salina 0,9% (30 ml/min), seguida de solução fixadora de formaldeído a 4%, recém-preparada a partir paraformaldeído, em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, durante 30 minutos. O fluxo de passagem das soluções foi reduzido para GC21 e GR21 (12 ml/min), para evitar o rompimento do leito vascular durante a fixação dos tecidos.

No dia da eutanásia de cada subgrupo etário, foram mensurados o peso corporal e, após a anestesia, a distância naso-anal dos animais e a glicemia. O sangue do ventrículo cardíaco esquerdo foi coletado para dosagem das concentrações sanguíneas de glicose e séricas de insulina e leptina. A medida de glicemia foi realizada utilizando glicosímetro.

O peso corporal e distância naso-anal foram utilizados para calcular dois parâmetros biométricos utilizados em estudos sobre obesidade: a relação entre peso corporal e a distância naso-anal e o Índice de Lee [$(\sqrt[3]{\text{peso corporal (g)}/\text{distância naso-anal (cm)}}) \times 10$] (LEE, 1929; BERNARDIS e PATTERSON, 1968), indicador que mimetiza o índice de massa corporal para ratos.

Após a perfusão, os tecidos adiposos visceral e retroperitoneal foram coletados e pesados. Foi realizada craniotomia dorsal, na qual os encéfalos foram retirados da caixa craniana, pesados, divididos em dois blocos por uma secção coronal ao nível dos colículos superiores com o auxílio de uma matriz para encéfalos (RBM-4000C, ASI Instruments) e pós-fixados na mesma solução fixadora durante uma noite a 4° C. Posteriormente, os blocos foram transferidos para solução de tampão fosfato 0,1M com 30% de sacarose para crioproteção até o momento da microtomia.

Os blocos foram congelados e cortados no plano coronal em secções de 40 µm de espessura com um micrótomo de deslizamento (Leica SM2010R) equipado com platina congeladora (BFS-30MP, Physiotemp Inc.). Os cortes foram recolhidos, sequencialmente, em uma série de 5 frascos preenchidos com solução anti-congelante (30% de etilenoglicol e 20% de glicerol em 1xPBS 0,1M), de maneira que o intervalo entre os cortes consecutivos em cada frasco era de 200µm. As séries de cortes foram armazenadas a -20° C.

Desde a perfusão até o armazenamento das séries de cortes, todo o cuidado foi tomado para evitar a contaminação dos tecidos por RNases, deixando o tecido preparado para a realização, futuramente, do protocolo de hibridização *in situ*. As soluções foram preparadas com água purificada tratada com dietilpirocarbonato a 0,1% (DEPC) e autoclavadas. O material utilizado para todas as etapas descritas foi higienizado e autoclavado ou descontaminado com solução RNase AWAY® (Invitrogen, #10328-011) para eliminação de RNases.

5.4.2 Imuno-histoquímica

O protocolo de imuno-histoquímica foi utilizado para identificar de forma permanente neurônios MCH e CART na LHA, para posterior contagem por estereologia e análise de distribuição por reconstrução tridimensional.

Inicialmente, os cortes histológicos foram lavados em tampão fosfato (PB) 0,1M pH 7,4, passando à inibição da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 3% em PB 0,1M pH 7,4. Posteriormente, os cortes foram lavados em PB 0,1M, pH 7,4 e TBS-Tx (Trisma Base 0,05M, NaCl 0,85% e Triton-x 0,25%, pH 7,6) e incubados em solução para bloqueio da marcação inespecífica contendo soro normal de cabra (Vector Laboratories) a 2% em TBS-Tx. Finalizando a primeira etapa do protocolo, os cortes foram incubados em solução de anticorpo primário anti-MCH ou anti-CART 55-102 (Phoenix Pharmaceuticals, Inc.; #H-003-62) do rato, produzidos em coelho, na

concentração de 1:6000 (MCH) ou 1:10.000 (CART) em TBS-Tx por 24 h, a 4° C e constante agitação. O anticorpo primário anti-MCH foi produzido e gentilmente cedido pelo Dr. Wylie W. Vale e Dra. Joan Vaughan (Salk Institute, La Jolla, CA, USA), do mesmo lote (PBL #234) previamente testado (BITTENCOURT et al., 1992).

Após 48 h, os cortes foram lavados em TBS-Tx e incubados em anticorpo secundário biotilado anti-IgG de coelho produzido em cabra (#BA-1000, Vector Laboratories), na concentração de 1:200 por 2 h em temperatura ambiente, lavados em TBS-Tx e incubados em complexo avidina-biotina peroxidase (Vectastain Elite ABC Kit, #PK-6100, Vector Laboratories), diluído em TBS-Tx a 1:200, por 2 h em temperatura ambiente (HSU et al., 1981).

Em seguida, os cortes foram lavados em TBS-Tx e em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0. Finalmente, a peroxidase unida ao complexo ABC foi evidenciada pela reação de peróxido de hidrogênio, utilizando como cromógeno o 3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB), reforçado com níquel amônio sulfato, que gera um produto de reação estável na cor negra (HSU e SOBAN, 1982).

Após o processo de imuno-histoquímica, os cortes foram transferidos para uma solução de gelatina 0,4%, em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0, e montados em lâminas de vidro sequencialmente, de caudal para rostral. As lâminas foram contra-coradas com tionina pelo método de Nissl, para referência citoarquitetônica. A coloração de Nissl tem por objetivo evidenciar estruturas basófilas do tecido nervoso, especialmente o retículo endoplasmático rugoso, presente em grande quantidade nos corpos celulares de neurônios (KADAR et al., 2009).

Para isso, as lâminas com os cortes montados foram imersas em formol 10% por 30 min, seguidas de desidratação por meio de banhos de álcool etílico de concentração crescente (de 95% a 100%), dissolução dos lipídeos em banhos de xilol, reidratação por meio de banhos de álcool etílico de concentração decrescente (de 100% a 50%), coloração com solução de tionina a 0,25% (Fisher #T-409) com 1,2% de ácido acético glacial e 0,144% de NaOH, seguida de lavagens em água deionizada. Em seguida, foi realizada uma nova desidratação com álcoois etílicos (50% a 100%), imersão em xilol e cobertura das lâminas com lamínula, utilizando Permont[®] como meio de montagem (PAXINOS e WATSON, 2005).

5.4.3 ELISA

As dosagens de insulina e leptina de todos os subgrupos etários (n=6-8) foram realizadas em soro pelo método imunoenzimático ELISA (SPARY et al., 2010). Após a coleta e repouso de 30 minutos, o sangue foi centrifugado por 20 minutos, 3000rpm a 4°C para a obtenção do soro e as amostras foram aliquotadas e estocadas a -80°C até a realização das dosagens. Foram empregados kits comerciais específicos para dosagens desses hormônios no rato. No caso da insulina, a dosagem foi realizada com o kit de ELISA Insulin (rat) EIA Kit (EZRIM-13K; Millipore) e para leptina, a dosagem foi realizada com o kit de ELISA Leptin (mouse/rat) EIA Kit (#10007609; Bertin Pharma - Cayman). Em cada caso as amostras foram processadas seguindo estritamente as orientações do fabricante desde o preparo da placa até a obtenção dos resultados em leitor de microplaca (Epoch12, Biotek[®]).

5.5 Experimento II – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O estudo da ultraestrutura foi importante para descrever, em nível subcelular, a distribuição do MCH e do CART. Há pouquíssimos dados na literatura sobre a distribuição subcelular destes peptídeos e nenhuma informação relacionada às suas prováveis alterações no paradigma de programação metabólica por restrição calórica. A técnica de microscopia eletrônica de transmissão consiste na preparação do tecido para visualização da ultraestrutura que compõe os somas, axônios e terminais de neurônios. Por ser uma técnica de alta resolução de imagem, possibilita a observação de detalhes das células, vesículas e organelas (HORTA- JÚNIOR e LÓPEZ, 2007).

5.5.1 Preparo de material biológico

Para esse experimento, foram utilizados três animais de cada subgrupo etário. A intervenção para a eutanásia dos animais foi realizada sob anestesia profunda da mesma forma descrita para o experimento I. No dia da eutanásia, imediatamente antes da perfusão, também foram avaliados o peso e o comprimento naso-anal dos animais.

A perfusão foi realizada como descrito para o experimento I, empregando solução fixadora composta de formaldeído, recém-preparado a partir do paraformaldeído a 4% e 0,05% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,06M com cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,0025% a 4° C.

Após a perfusão, os animais foram decapitados e suas cabeças ficaram em repouso, imersas em gelo picado, por 30 min para aprimorar a fixação do tecido. Os tecidos adiposos visceral e retroperitoneal foram coletados e pesados. Foi realizada craniotomia dorsal e os encéfalos foram retirados da caixa craniana, pesados e divididos em dois blocos por uma secção coronal ao nível dos colículos superiores com o auxílio de uma matriz para encéfalos (RBM-4000C, ASI Instruments). Antes da microtomia, os blocos foram lavados PBS 0,1M a 4° C e todas as meninges removidas com uma pinça de relojoeiro, com auxílio de uma lupa. O bloco do prosencéfalo foi seccionado em vibrátomo (velocidade 15/amplitude 1/frequência 90) com PBS 0,1M a 4°C, em cortes seriados coronais de 60µm de espessura, divididos em seis séries, com intervalo de 360 µm e recolhidos no mesmo tampão.

5.5.2 Imuno-histoquímica pré-inclusão (*pre-embedding*)

Durante todo o processamento, até a etapa de desidratação para inclusão, todas as soluções foram mantidas a 4° C. O protocolo para detecção imuno-histoquímica do MCH e do CART foi do tipo pré-inclusão, seguindo as mesmas etapas descritas no experimento tipo I, excluindo o Triton X-100 dos tampões. Antes de incubar as secções em anticorpo primário, o bloqueio dos grupamentos aldeídos remanescentes da fixação foi realizado pela incubação dos cortes em boroidreto de sódio a 0,1% e o bloqueio da marcação inespecífica por soro normal de cabra (#S1000, Vector Laboratories) a 5% e gelatina de peixe de água fria (#25560, Electron Microscopy Sciences) a 0,1%. Cada série de cortes foi incubada em anticorpo primário anti-MCH ou anti-CART.

Posteriormente, os cortes foram incubados em anticorpo secundário anti-IgG de coelho feito em cabra (#BA-1000 Vector Laboratories, 1:200) conjugado com biotina e, em seguida, incubados em complexo avidina-biotina (Vectastain Elite ABC Kit, PK-6100, Vector Laboratories). A evidenciação da marcação foi realizada utilizando DAB sem níquel como cromógeno.

Após a imuno-histoquímica, os cortes foram lavados em tampão cacodilato de sódio 0,1M e imersos em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) a 0,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 5,5, por 1 h em suave agitação. O tetróxido de ósmio é usado como fixador, com intuito de estabilizar os lipídeos, evitando a sua extração pelos solventes orgânicos utilizados durante a etapa de desidratação e de inclusão em resina, além de conferir contraste eletrônico à amostra pelo fato de apresentar elétron-densidade.

Na sequência, os cortes foram desidratados com uma série de banhos de álcool etílico de 35%, 50% e 70%, a 4º C. Os cortes foram então incubados em solução de acetato de uranila (Fluka #73943) a 1% em álcool etílico a 70%, por 18 h a 4º C, sob suave agitação e protegidos da luz. A desidratação foi completada com banhos de álcool etílico 100% e acetona P.A. (Merck).

A inclusão foi iniciada pela imersão em solução acetona e resina tipo I (Embed 812, DDSA e NMA) 1:1, em dissecador com vácuo de 400 mmHg, evitando a condensação de partículas de água. Os cortes foram transferidos para resina tipo I por 2 h. Em seguida, o material foi imerso em resina tipo II (Embed 812, DDSA, NMA e DMP-30- Electron Microscopy Sciences) em estufa a 50º C por 2 h.

Na sequência, os cortes foram incluídos entre lâminas de acetato (acler embedding film, Electron Microscopy Sciences #50425-25), com resina tipo II (Electron Microscopy Sciences #14120) que foi polimerizada a 70º C por 72 h. Esse processo é conhecido como *flat embedding* e permite a visualização do corte espesso obtido no vibrátomo ao microscópio óptico, para seleção da região que será levada ao microscópio eletrônico, garantindo a exata localização da origem do material analisado.

Os cortes que continham a LHA foram removidos do filme de resina polimerizada e observados ao microscópio óptico para seleção das secções que apresentaram os somas marcados na LHA. Nas secções selecionadas, a LHA foi recortada e aderida a blocos de resina previamente polimerizados e aplainados, utilizando como adesivo uma cola a base de cianoacrilato.

Por fim, foram realizados cortes ultrafinos, obtidos em ultramicrotomo, com navalha de diamante e cor de interferência entre prateada e dourada (aproximadamente 70 nm de espessura). Os cortes ultrafinos foram recolhidos em grades de cobre de microscopia eletrônica (150 - 300 mesh) e não foram contrastados. Tanto a obtenção dos cortes ultrafinos quanto a análise do material foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu.

5.6 Forma de análise dos resultados

5.6.1 Parâmetros biométricos

A presença de mais de um animal da mesma ninhada nos subgrupos etários foi evitada, sendo as mães consideradas as unidades experimentais, excluindo a influência do fator ninhada nos resultados obtidos. Nos subgrupos onde havia mais de um animal da mesma ninhada, uma média dos valores foi calculada, sendo essa média a representativa daquela prole.

Utilizando os dados de peso corporal no DPN 1, os animais de GC e GR foram classificados em pequeno, adequado e grande para a idade de prenhez (PIP, AIP e GIP, respectivamente). Para isso, os valores do peso corporal de todos os neonatos (GC e GR) foram comparados à média $\pm 1,7$ do desvio-padrão dos valores de peso corporal de GC; sendo assim, PIP para valores menores, AIP

para valores dentro desse intervalo e GIP para valores maiores (SOULIMANE-MOKHTARI et al., 2005; KISS et al., 2012).

A glicemia do GC540 e GR540 foi analisada de forma independente, pois, durante a execução do protocolo experimental, alterou-se o método de coleta do sangue para o teste nessa idade (de punção cardíaca para veia caudal), a fim de reduzir a influência do estresse gerado pela contenção e anestesia nos valores glicêmicos. Dessa maneira, acreditamos ser mais prudente analisar os dados separadamente.

5.6.2 Experimento I

Os resultados do experimento I foram observados em microscópio óptico de campo claro. A estimativa do número de neurônios imunorreativos ao MCH e ao CART, assim como a área e o volume da LHA, e sua distribuição foram analisados por estereologia e reconstrução tridimensional, respectivamente. Na análise estereológica, foram utilizados 5 animais em cada subgrupo etário (GC e GR), evitando animais provenientes das mesmas ninhadas. A reconstrução tridimensional do hipotálamo foi realizada em um animal representativo de cada idade.

5.6.2.1 Estereologia

O número de neurônios MCH e CART da LHA, bem como em suas 3 regiões (mamilar, tuberal e anterior), foi estimado utilizando princípios estereológicos de amostragem sistemática e aleatória (GUNDERSEN e JENSEN, 1987; GUNDERSEN et al., 1988; WEST e GUNDERSEN, 1990; WEST et al., 1991; KULESZA et al., 2002). A técnica de estereologia é um método que determina parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas a partir de seções bidimensionais. Para sua execução, foi utilizado o programa *Stereo Investigator* (versão 11, MBF Bioscience, MicroBrightfield, Inc., Colchester, VT, USA) e empregado o protocolo de fracionador óptico, que se baseia nos princípios de disector e fracionador óptico (GUNDERSEN et al., 1988). Para essa análise, foi selecionada uma série de cortes destinada ao protocolo de imuno-histoquímica para MCH e uma para o CART em cada caso experimental. As estimativas foram realizadas bilateralmente.

Em cada secção, os limites da LHA esquerda e direita foram delineados a partir do centro do fórnix (Figura 4), seguindo ventrolateralmente em direção à superfície ventral do hipotálamo até a cápsula interna, que foi contornada até a altura do núcleo subtalâmico para então dirigir-se horizontalmente em direção medial, para encontrar com a linha reta que une o trato mamilotalâmico ao fórnix (PANKSEPP, 1979; KESSLER et al., 2011).

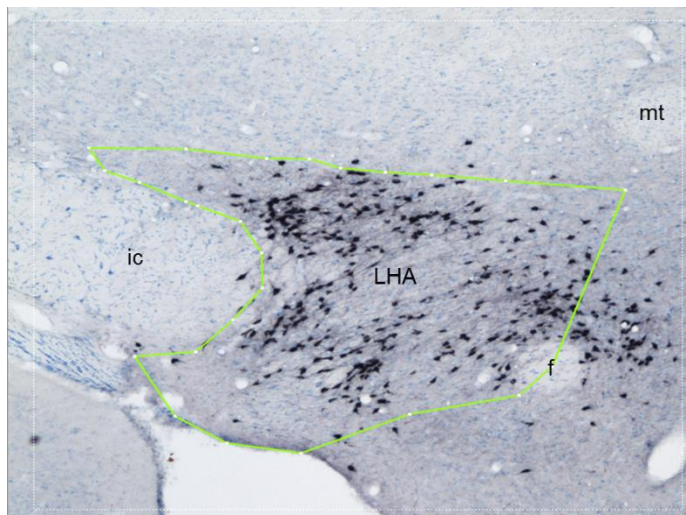


Figura 4. Imagem da janela de observação do programa *Stereo Investigator*, obtida em tempo real através de câmera digital acoplada ao microscópio óptico. Secção imuno marcada para MCH (material próprio), na qual a LHA foi delimitada pela linha verde utilizando referências citoarquitetônicas: cápsula interna (ic), fórnix (f) e trato mamilotalâmico (mt).

Os neurônios MCH e CART foram selecionados a partir de uma janela de contagem quadrada (70 μm de lado = fração de área, constituída por duas linhas de inclusão (verdes) e duas linhas de exclusão (vermelhas). A espessura da secção foi determinada em cada campo de observação com objetiva de imersão a óleo e aumento de 100x (NA=1,45), selecionando o topo e base do tecido.

Para os cálculos estereológicos, foram determinadas como zonas de segurança no eixo Z (fração de dissecção) no mínimo 2 μm superiores e inferiores de cada secção, assim o dissector foi fixado no centro do tecido com altura mínima de 5 μm , evitando qualquer viés gerado pela compressão do tecido após os protocolos de imuno-histoquímica e coloração de Nissl. Somente foram contados os neurônios que estavam em foco, entre as zonas de segurança, e que não tocaram as linhas de exclusão da janela de contagem.

A precisão das estimativas da contagem neuronal, em cada caso experimental, foi avaliada usando como parâmetro o coeficiente de erro de Gundersen ($m=1$) (GUNDERSEN e JENSEN, 1987; SLOMIANKA e WEST, 2005). A amostragem foi considerada apropriada com coeficiente de erro menor que 0,10 (WEST e GUNDERSEN, 1990; LIM et al., 2014). A área e o volume da LHA foram estimados pelo método de planimetria a partir da delimitação da área de interesse e aplicação do método de Cavalieri. A área total da LHA é o resultado da soma das áreas da LHA em cada corte em que ela se apresenta. Adicionalmente a análise semiquantitativa das regiões da LHA (anterior, tuberal e mamilar) foi realizada com base na contagem dos perfis neuronais CART e MCH presentes nas secções de amostragem de cada região.

5.6.2.2 Mapeamento e reconstrução tridimensional

Um animal de cada subgrupo etário, o mais próximo da média do número de neurônios de seu subgrupo, foi selecionado para a representação dos neurônios MCH e CART da LHA em esquemas bidimensionais e modelos tridimensionais. A reconstrução tridimensional foi realizada com auxílio do sistema *Neurolucida* (versão 11, MBF Bioscience, MicroBrightfield, Inc.) com a finalidade de facilitar a compreensão da distribuição dos neurônios MCH e CART durante o desenvolvimento e envelhecimento nos GC e GR.

Em cada caso experimental, foi utilizada uma série de cortes submetida à imuno-histoquímica para MCH e outra para CART, ambas contra-coradas pelo método de Nissl. O intervalo entre secções utilizado foi de 200 μm .

Em cada secção foram delineados: o contorno externo do encéfalo na região do hipotálamo de ambos os antímeros; a marca de lateralidade; o sistema ventricular, representado pelo aqueduto cerebral e III ventrículo com seus recessos; os tratos ópticos; núcleos do hipotálamo medial (núcleos ventromedial, dorsomedial e paraventricular); e as referências citoarquiteônicas que limitam a LHA, como o fórnice, o trato mamilotalâmico e a cápsula interna. Além desses contornos, também foi delineado o limite da LHA segundo os mesmos critérios utilizados nas análises de estereologia e identificados os neurônios MCH e CART.

Imagens do modelo tridimensional foram capturadas para confecção de pranchas. Além disso, utilizando os contornos e marcadores de cada secção, foram confeccionados esquemas 2D para observação da distribuição desses neurônios em cada corte e o modelo também foi representado em forma de PDF interativo 3D (vide apêndice: instruções e modelo 3D).

5.6.3 Experimento II - Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para comparar, de forma qualitativa, a ultraestrutura dos neurônios MCH e CART entre os subgrupos etários de GC e GR, foi realizada a observação e aquisição de imagens em microscópio eletrônico de transmissão. A análise foi realizada por dois observadores, sendo que o segundo não teve conhecimento do grupo experimental ao qual cada animal pertencia. Foram observadas possíveis modificações ultraestruturais dos neurônios MCH e CART da LHA, devido à restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação, frente aos animais do GC, com especial ênfase no retículo endoplasmático rugoso, no complexo de Golgi e nas vesículas sinápticas com núcleos densos, regiões que são reconhecidamente importantes para o metabolismo destes neuropeptídeos (PICKEL, 1985).

5.6.4 Apresentação das ilustrações científicas

Toda a iconografia científica foi digitalizada. As imagens foram trabalhadas com o programa *PhotoShop*® CS2 (version 9.0; Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA), ajustando o brilho, contraste e balanço de cores de acordo com o preconizado para preparação de imagens digitais para publicação científica (SAPER, 1999; SCHENK et al., 1999) e organizadas em figuras com o programa *CorelDRAW*® *graphics suite* X3 (Corel Corporation, Ottawa, Canada). As barras de calibração das fotomicrografias foram confeccionadas fotografando uma lâmina com escala micrométrica calibrada (Leica, Leitz Wetzlar), cuja menor divisão é de 100 µm, com os mesmos equipamentos e aumentos do material histológico em questão. A nomenclatura e as abreviaturas utilizadas na descrição dos resultados foram baseadas no atlas estereotático do encéfalo do rato (PAXINOS e WATSON, 2005).

5.6.5 Análise estatística

Os resultados de todas as variáveis quantitativas foram comparados e analisados estatisticamente. Antes de qualquer análise, a distribuição normal dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e sua homocedasticidade pelo teste de Bartlett.

Os dados que atenderam a essas duas premissas foram analisados por testes paramétricos, ANOVA para dois fatores (grupo e tempo) com pós-teste de Bonferroni ou teste t de Student, de acordo com as comparações realizadas. Os dados que não as atenderam foram analisados por testes não-paramétricos, teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn ou teste de Mann-Whitney.

Além disso, também foram utilizados os testes de Fisher para classificação dos animais no DPN 1 em PIP, AIP e GIP e ANOVA para medidas repetidas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism version* 5.01 (GraphPad Software, San Diego California USA). Em todos os casos, as diferenças estatísticas foram consideradas em nível de significância de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Parâmetros biométricos, metabólicos e ingestão alimentar

Os parâmetros foram analisados nas mães e nos subgrupos etários de 21, 28, 50, 90 e 540 dias imediatamente antes de realizar a perfusão e coleta do material biológico.

6.1.1 Peso corporal materno, tamanho e peso corporal da prole no DPN 1

Na curva de ingestão alimentar média das mães do GC (Figura 5A), utilizada como base para a aplicação da dieta do GR, podemos observar um aumento na ingestão alimentar materna na última semana de prenhez, queda acentuada no DPN 1 e maior consumo no período de lactação em relação ao período de prenhez. A análise do peso corporal materno diário mostrou que existe efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo tanto na prenhez quanto na lactação. Durante o período de prenhez, as mães do GR apresentaram menor peso corporal que as mães do GC a partir do 8º dia de prenhez, e essa diferença continuou existindo durante todos os dias da lactação (Figura 5B e 5C).

Em relação à quantidade de filhotes na prole, não houve diferenças no número total de animais e no número de animais machos entre os grupos experimentais (Figuras 5D e 5E). Apesar disso, os filhotes machos do GR são mais leves do que os filhotes do GC no DPN 1 (Figura 5F).

Após a classificação dos animais do GR e GC de acordo com o peso corporal ao nascimento (DPN1), observou-se maior porcentagem de filhotes pequenos (PIP) no GR do que no GC. Já GC apresentou maior proporção de filhotes considerados adequados (AIP) e grandes (GIP) (Figura 6).

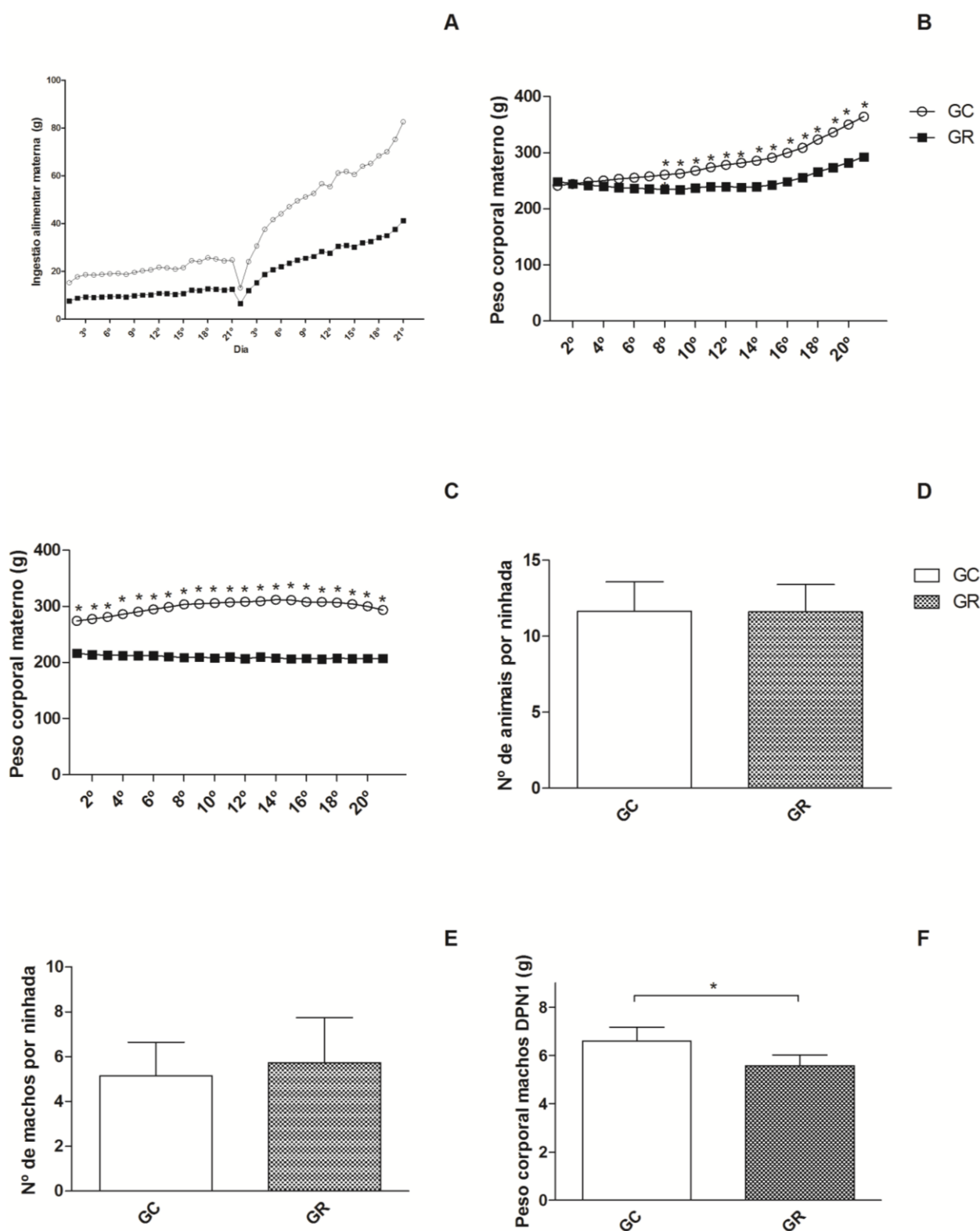


Figura 5. Gráficos de ingestão alimentar e peso corporal maternos, tamanho e peso da prole no DPN 1. (A) Curvas de ingestão alimentar materna diária do GC e GR durante a prenhez e lactação. (B) Peso corporal materno diário durante a prenhez. Dados descritos em média e desvio-padrão, analisados por Two-way ANOVA para medidas repetidas. Efeito de tempo, tratamento e interação tempo x tratamento ($F(20,660)=1109,01$, $p<0.001$; $F(1,660)=21,28$, $p<0.001$; $F(20,660)=215,0$, $p<0.001$, respectivamente). (C) Peso corporal materno diário durante a lactação. Dados descritos em média e desvio-padrão, analisados por Two-way ANOVA para medidas repetidas. Efeito de tempo, tratamento e interação tempo x tratamento ($F(20,620)=12,88$, $p<0.001$; $F(1,620)=196,9$, $p<0.001$; $F(20,620)=30,76$, $p<0.001$, respectivamente). (D) Número total de filhotes na ninhada em GC e GR. Dados descritos em média e desvio-padrão, analisados por teste de Mann-Whitney. (E) Número de animais machos na ninhada em GC e GR. Dados descritos em média e desvio-padrão, analisados por teste t-Student. ($t(3)=0,9836$, $p>0,05$) (F) Peso corporal dos animais machos da prole no DPN 1. Dados descritos em média e desvio-padrão, analisados por teste t-Student. ($t(32)=5,664$, $p<0,001$) * = $p<0,05$. A legenda em B é válida para A e C e a legenda em D é válida para E e F.

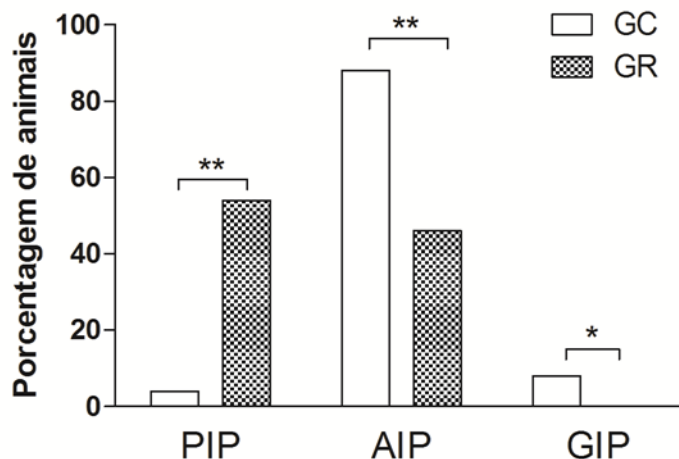


Figura 6. Classificação do peso ao nascer dos animais do GC e GR em pequenos (PIP), adequados (AIP) e grandes (GIP) de acordo com peso corporal em DPN 1. Dados descritos em porcentagem e analisados pelo Teste de Fisher. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

6.1.2 Peso corporal e distância naso-anal

Os animais do GR apresentaram menor peso corporal que GC nas idades de 50, 90 e 540 dias (efeito de grupo) (Figura 7A). Ambos os grupos apresentaram aumento progressivo do peso corporal ao longo do tempo (efeito de tempo), e a diferença de peso entre GC e GR torna-se significativa a partir do DPN 50, na puberdade.

Assim como em relação ao peso corporal, ambos os grupos apresentaram aumento progressivo da distância naso-anal ao longo do tempo, decorrente do crescimento físico do animal (efeito de tempo). No entanto, em todas as idades, os animais do GR têm menor comprimento corporal em relação ao GC (efeito de grupo), demonstrando, assim, um efeito permanente da restrição calórica na estrutura física da prole (Figura 7B).

6.1.3 Peso do encéfalo e peso relativo do encéfalo

Todos os subgrupos etários pertencentes ao GR apresentaram menor peso encefálico do que GC (efeito de grupo). Os valores de peso encefálico apresentaram aumento progressivo ao longo do tempo em ambos os grupos (efeito de tempo) (Figura 7C).

Os valores absolutos do peso do encéfalo foram normalizados pelo peso corporal, a fim de avaliar a porcentagem que o encéfalo representa na estrutura corporal do animal. Os animais do GR apresentaram maior peso relativo do encéfalo em relação ao GC (efeito de grupo) (Figura 7D), com valores significativos nos DPN 21 e 28.

6.1.4 Índice de Lee, relação peso-distância naso-anal e gorduras visceral e retroperitoneal

Os valores de gordura visceral e retroperitoneal foram normalizados pelo índice de Lee e pela relação peso-distância naso-anal, já que esses índices levam em consideração tanto o peso corporal quanto o comprimento do animal.

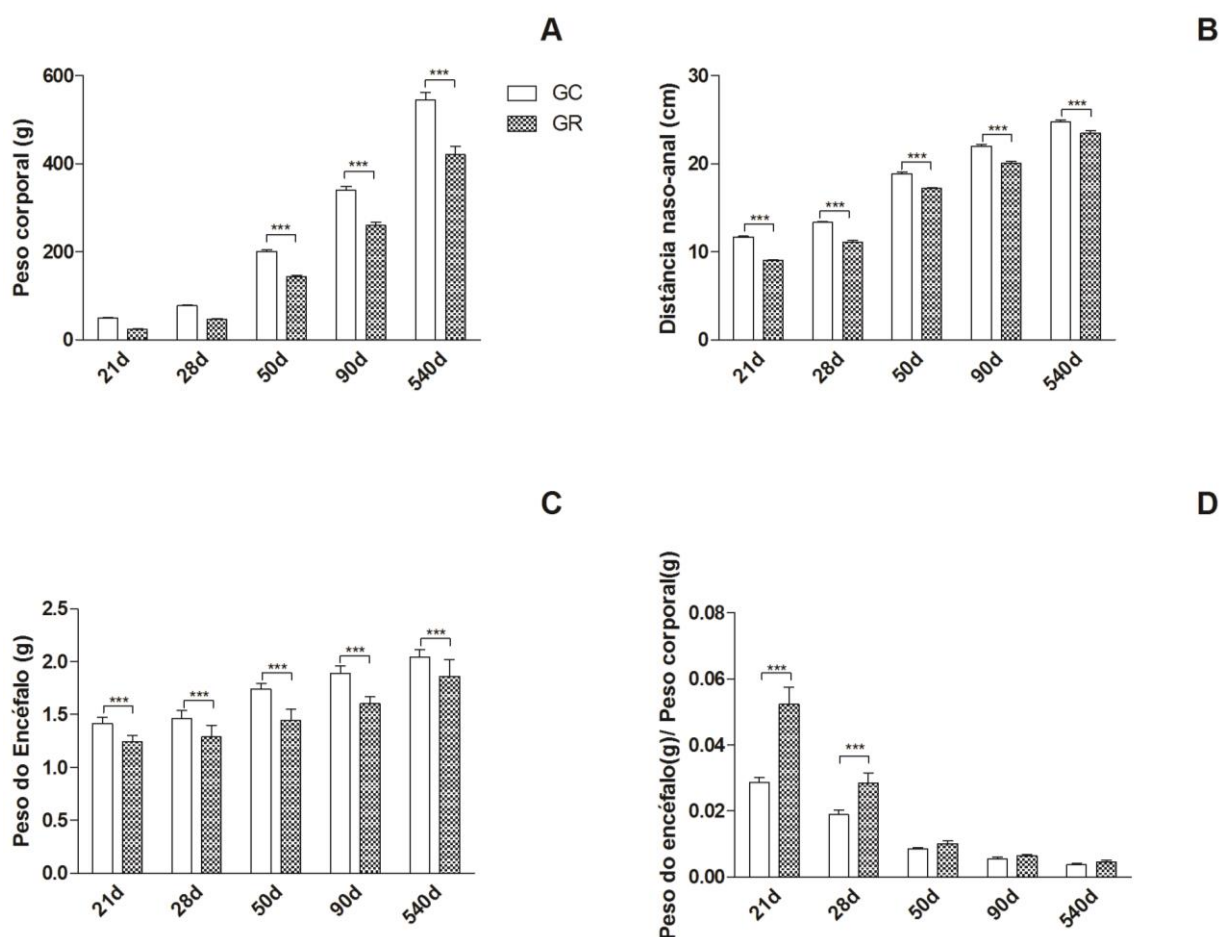


Figura 7. Gráficos do peso corporal, distância naso-anal e peso do encéfalo nos subgrupos etários. (A) Peso corporal dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=870,7$, $p<0.001$; $F(1,90)=130,9$, $p<0.001$; $F(4,90)=10,39$, $p<0.001$, respectivamente). (B) Distância naso-anal dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=21,46$, $p<0.001$; $F(1,90)=304,9$, $p<0.001$; $F(4,90)=4,443$, $p<0.01$, respectivamente). (C) Peso do encéfalo dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=175,3$, $p<0.001$; $F(1,90)=160,7$, $p<0.001$; $F(4,90)=2,563$, $p<0.05$, respectivamente). (D) Peso do encéfalo normalizado pelo peso corporal dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=1071,3$, $p<0.001$; $F(1,90)=304,4$, $p<0.001$; $F(4,90)=112,4$, $p<0.001$, respectivamente). Dados em A–D descritos em média e desvio-padrão e analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. *** = $p<0,001$. A legenda em A é válida para todos os gráficos.

Os animais do GR apresentaram diminuição do índice de Lee quando comparados aos animais do GC (efeito de grupo), especificamente nos DPN 50 e 540. (Figura 8A). Nos demais subgrupos etários, os valores do índice de Lee mantiveram-se constantes e sem diferenças entre GC e GR.

Em relação à gordura normalizada pelo índice de Lee, os animais do GR apresentaram diminuição na quantidade de gordura visceral em relação ao GC em 540 dias (efeito de grupo) (Figura 8C). Os animais do GR também apresentaram menos gordura retroperitoneal do que o GC, tanto nas idades de 90 quanto 540 dias (Figura 8E). Esses dados mostraram perda significativa de tecido adiposo nos animais restritos adultos e senis, visto que nos grupos mais jovens essas diferenças não foram observadas.

A relação peso–distância naso-anal dos animais do GR foi sempre menor do que nos animais do GC (efeito de grupo) (Figura 8B). Assim, verifica-se que os animais do GR possuem menor quantidade de massa por centímetro corporal. O peso da gordura visceral normalizada por essa relação mostrou que o GR tem menos tecido adiposo que o GC (efeito de grupo), nos DPN 90 e 540 (Figura 8D). O GR também possui menos gordura retroperitoneal do que o GC (efeito de grupo), nos DPN 50, 90 e 540 (Figura 8F).

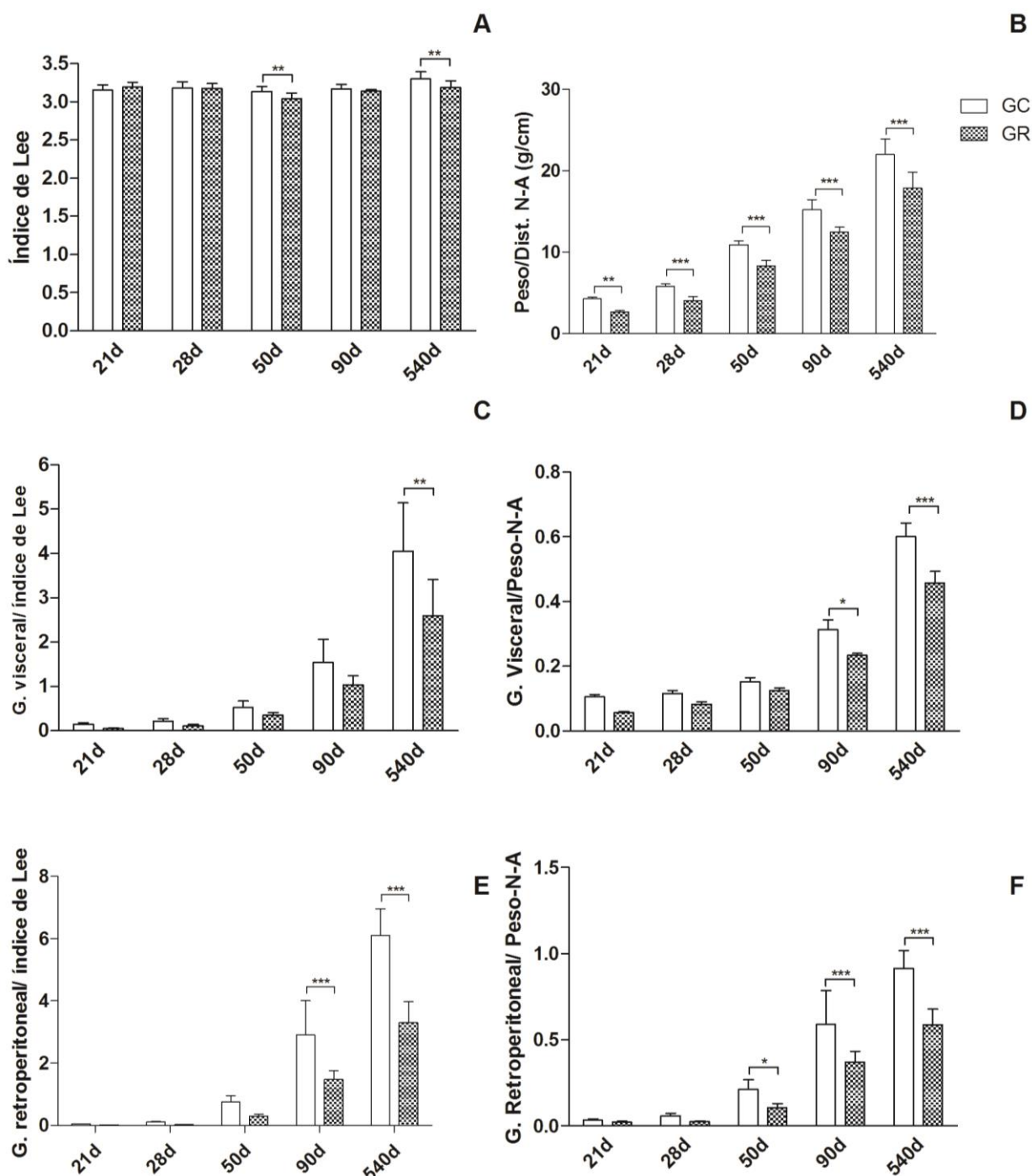


Figura 8. Gráficos do índice de Lee, relação peso-distância naso-anal e peso das gorduras visceral e retroperitoneal. (A) Índice de Lee dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=12,53$, $p<0.001$; $F(1,90)=8,793$, $p<0.001$; $F(4,90)=4,178$, $p<0.001$, respectivamente). (B) Relação peso-distância naso-anal dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,72)=903,9$, $p<0.001$; $F(1,72)=149,4$, $p<0.001$; $F(4,72)=5,051$, $p<0.001$, respectivamente). (C) Peso da gordura visceral normalizada pelo índice de Lee dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=167,03$, $p<0.001$; $F(1,90)=25,12$, $p<0.001$; $F(4,90)=7,543$, $p<0.001$, respectivamente). (D) Peso da gordura visceral normalizada pela relação peso-distância naso-anal dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=164,2$, $p<0.001$; $F(1,90)=26,22$, $p<0.001$; $F(4,90)=2,732$, $p<0.05$, respectivamente). (E) Peso da gordura retroperitoneal normalizada pelo índice de Lee dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=318,9$, $p<0.001$; $F(1,90)=92,94$, $p<0.001$; $F(4,90)=27,73$, $p<0.001$, respectivamente). (F) Peso da gordura retroperitoneal normalizada pela relação peso-distância naso-anal dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(4,90)=300,7$, $p<0.001$; $F(1,90)=74,32$, $p<0.001$; $F(4,90)=13,40$, $p<0.001$, respectivamente). Dados em A–F descritos em média e desvio-padrão e analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$. A legenda em B é válida para todos os gráficos.

6.1.5 Glicemia

O GR possui glicemia menor do que os animais de GC (efeito de grupo), mas somente aos 21 dias (Figuras 9A e 9B). A fim de aprofundar o estudo dos possíveis efeitos tardios da restrição alimentar materna no metabolismo da glicose, foram realizados os TTOG e TTI nos animais de 540 dias (GC e GR). Em ambos os testes, não foram encontradas diferenças entre as curvas glicêmicas dos dois grupos experimentais, nem nas áreas sob as curvas obtidas pelo método trapezoide (Figuras 9C-9F). Entretanto, existe efeito de tempo durante os testes em todas as curvas glicêmicas, mostrando que o metabolismo dos animais respondeu tanto à glicose quanto à insulina.

6.1.6 Peso corporal, ingestão alimentar e taxa de ingestão alimentar semanais

Ao longo de todo período experimental (74 semanas), todos os animais dos grupos GC540 e GR540 tiveram seu peso corporal e sua ingestão alimentar semanais acompanhados após o desmame. As curvas de peso corporal mostraram que os animais do GR apresentaram menor peso corporal do que GC ao longo de todo período, sendo essa diferença mais acentuada a partir da quinta semana após o desmame (efeito de grupo) (Figura 10A). Os dois grupos apresentam aumento do peso corporal ao longo do tempo (efeito de tempo). Além disso, GR obteve menor ingestão alimentar semanal quando comparado aos animais do GC (efeito de grupo e tempo) (Figura 10B).

No entanto, quando a ingestão alimentar é normalizada pelo peso corporal, calculando-se os valores de taxa de ingestão alimentar, os animais do GR apresentaram maior taxa de ingestão do que GC (efeito de grupo e tempo), sendo essa diferença mais acentuada nas primeiras 15 semanas de vida, mas persistindo até o adulto senescente (Figura 10C).

6.1.7 Ingestão alimentar total, ganho de peso, conversão e eficiência energética

A ingestão alimentar total média dos animais do GR foi menor do que GC, assim como o ganho de peso durante todo o período experimental (Figuras 11A e 11B). No entanto, não foram observadas diferenças nos valores de conversão energética e na eficiência energética entre GC e GR (Figuras 11C e 11D).

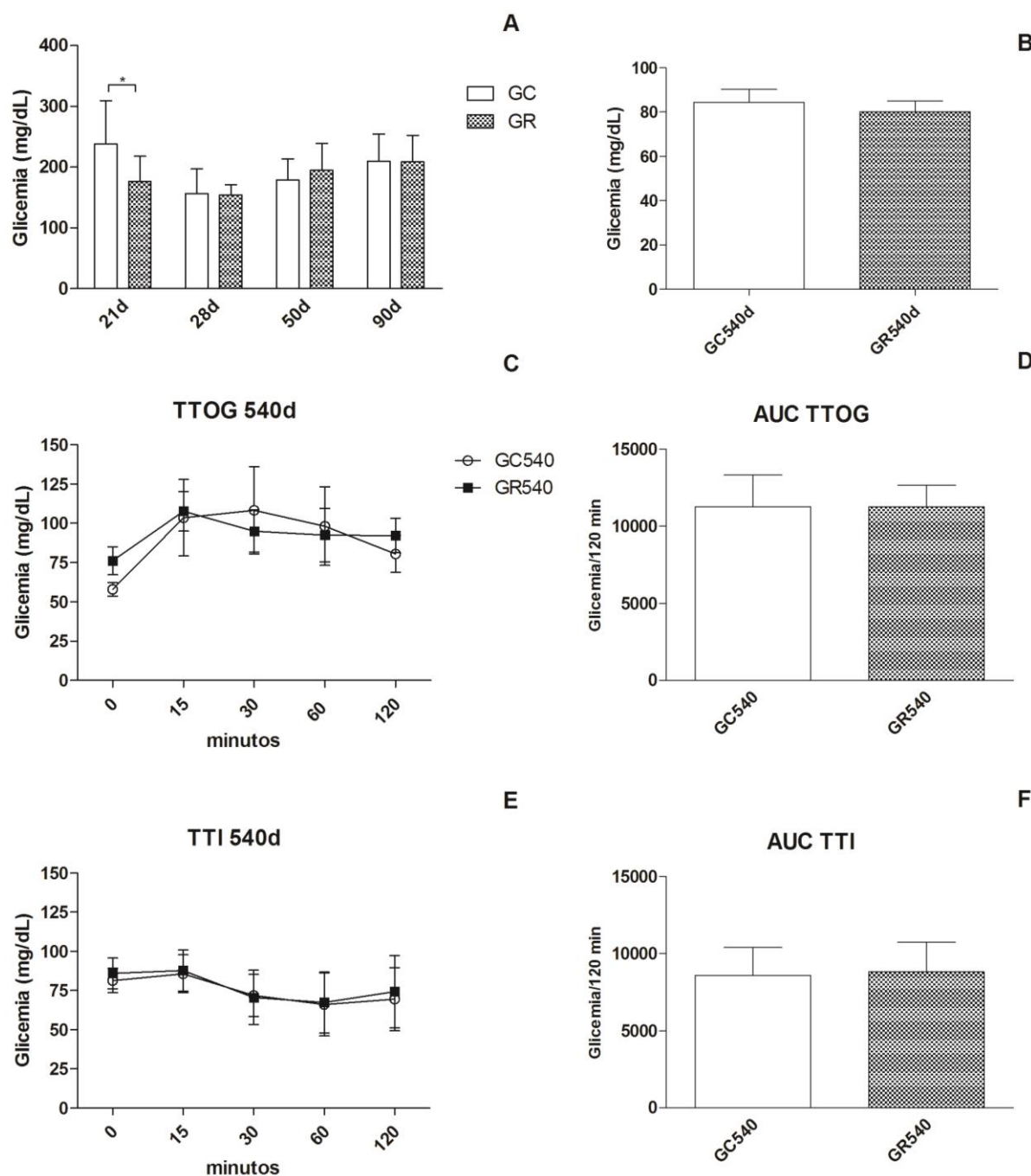


Figura 9. Gráficos da glicemia e metabolismo da glicose no GC e GR. (A) Glicemia dos animais do GC e do GR aos 21, 28, 50 e 90 dias. Efeito de tempo e interação tempo x grupo ($F(3,72)=6,355$, $p<0.001$; $F(3,72)=2,843$, $p<0.05$, respectivamente). (B) Glicemia dos animais do GC e GR, aos 540 dias. (C) Teste de tolerância oral à glicose do GC540 e GR540. Efeito de tempo e interação tempo x grupo ($F(4,72)=28,16$, $p<0.001$; $F(4,72)=4,835$, $p<0.01$, respectivamente). (D) Área sob a curva (AUC) do teste de tolerância oral à glicose do GC540 e GR540. (E) Teste de tolerância à insulina do GC540 e GR540. Efeito de tempo ($F(4,72)=11,30$, $p<0,001$). (F) Área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à insulina do GC540 e GR540. Dados em A, C e E descritos em média e desvio-padrão e analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. Dados em B, D e F descritos em média e desvio-padrão e analisados por teste t-Student. * = $p<0,05$. A legenda em A é válida para B, D e F. A legenda em C é válida para E.

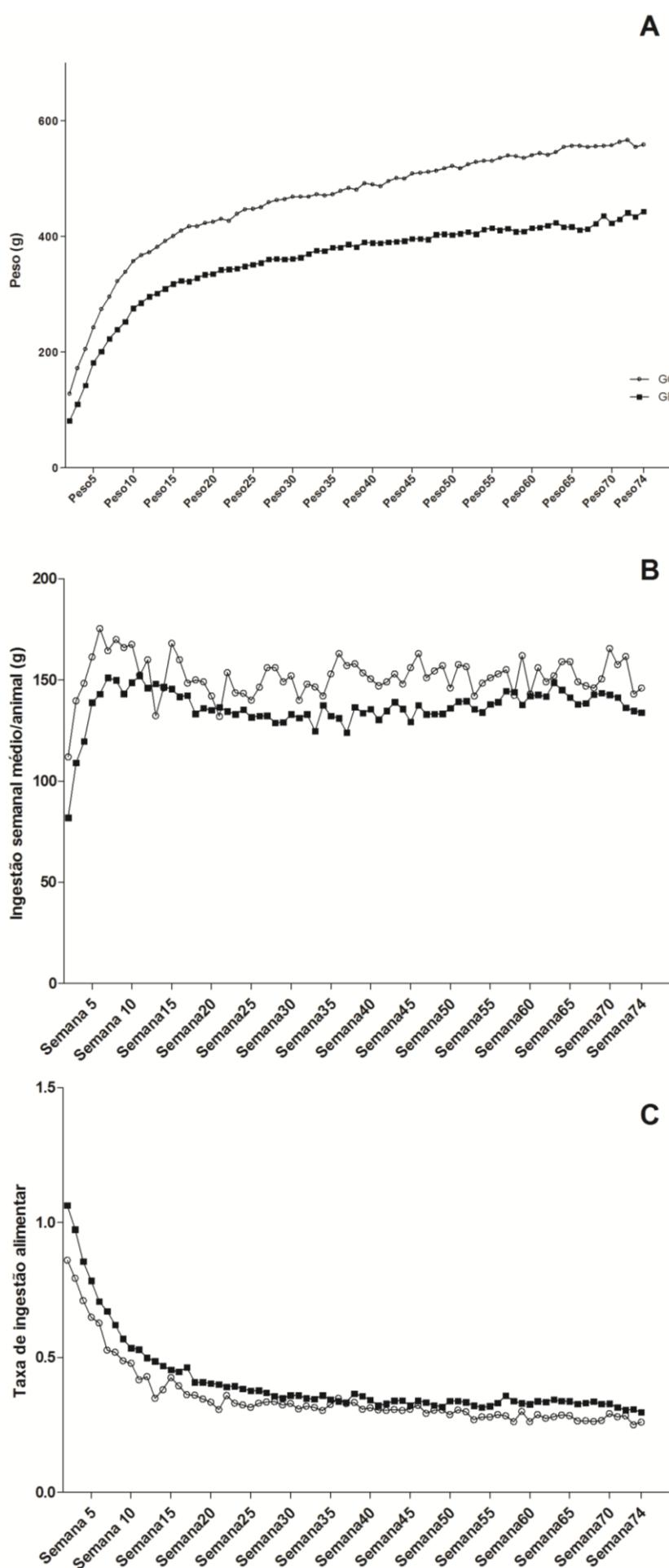


Figura 10. Gráficos do peso corporal, ingestão alimentar e taxa de ingestão semanais. (A) Peso corporal dos animais do GC e do GR ao longo do período experimental (74 semanas). Dados descritos em média e desvio-padrão, analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni (GC e GR diferentes em todas as semanas). Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(72,1728)=534,5$, $p<0,001$; $F(1,1728)=54,99$, $p<0,001$; $F(72,1728)=9,436$, $p<0,001$, respectivamente). (B) Ingestão alimentar média dos animais do GC e do GR no mesmo período. Dados descritos em média e desvio-padrão, analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni (GC e GR diferentes nas semanas: 2-6, 8-10, 15-16, 22, 26-30, 32-33, 35-38, 40-46, 48-49, 51-52, 54-56, 59, 64-65, 70-72, 74). Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(72,1800)=25,7$, $p<0,001$; $F(1,1800)=22,1$, $p<0,001$; $F(72,1800)=7,917$, $p<0,001$, respectivamente). (C) Taxa de ingestão alimentar (ingestão/peso corporal) dos animais do GC e do GR. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(72,1728)=577,1$, $p<0,001$; $F(1,1728)=75,59$, $p<0,001$; $F(72,1728)=12,11$, $p<0,001$, respectivamente). Dados descritos em média e desvio-padrão, analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni (GC e GR diferentes nas semanas: 2-14, 16-21, 23-26, 31, 34, 39, 50, 53, 57-58, 60-69, 73). A legenda em A é válida para todos os gráficos.

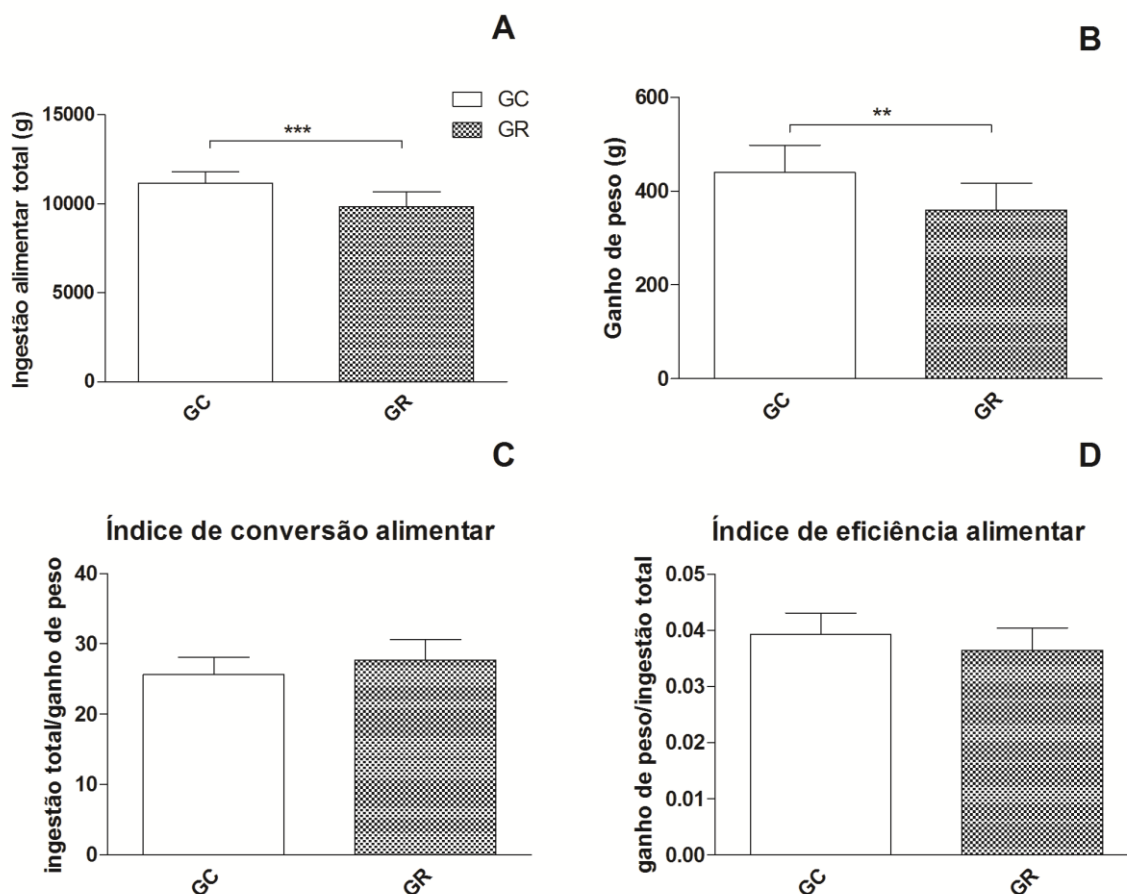


Figura 11. Gráficos de ingestão alimentar e ganho de peso total, conversão e eficiência energética. (A) Ingestão alimentar total dos animais do GC e do GR ao longo do período experimental. ($t(24)=4,654$, $p<0,001$). (B) Ganho de peso total dos animais do GC e do GR no mesmo período. ($t(24)=3,514$, $p<0,01$). (C) Conversão energética total dos animais do GC e do GR. (D) Eficiência energética total dos animais do GC e do GR. Dados A-D descritos em média e desvio-padrão e foram analisados por teste t-Student. ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$. A legenda em A é válida para todos os gráficos.

6.1.8 ELISA para leptina e insulina

As dosagens séricas de leptina não mostraram diferenças entre os grupos experimentais, ambas as curvas apresentaram mesmo comportamento ao longo do tempo (efeito de tempo) (Figura 12A). Já para insulina, observamos uma diminuição dos valores séricos em GR apenas no DPN 21 (Figura 12B).

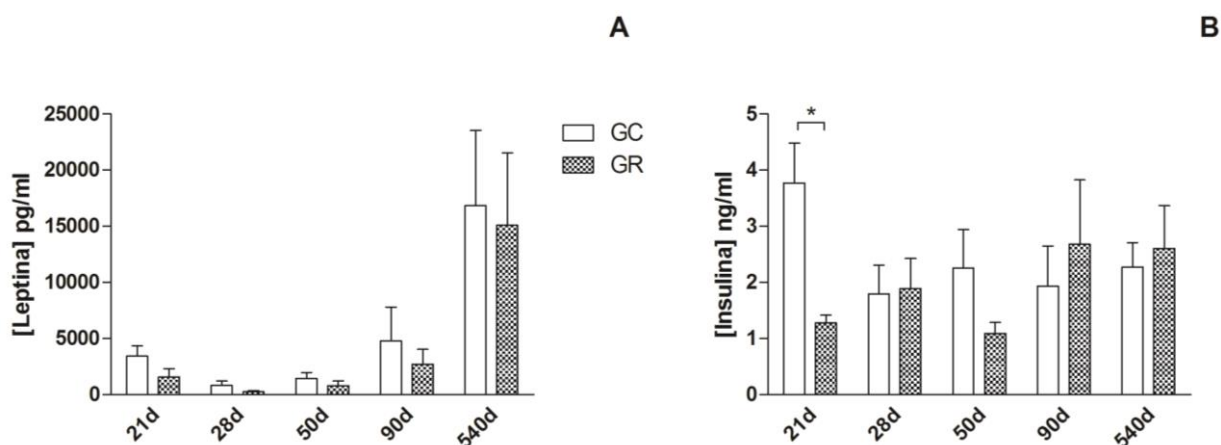


Figura 12. Gráficos de dosagem sérica para leptina e insulina em GC e GR para todas idades (A) Leptina. Efeito de tempo ($F(4,66)=59,74$, $p<0,001$). (B) Insulina. Dados descritos em média e desvio-padrão e analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni * = $p<0,05$. A legenda em A é válida para B.

6.2 Experimento I

6.2.1 Estereologia

Foram realizados os protocolos de imuno-histoquímica para MCH e CART em GC e GR em todos os subgrupos etários (Figuras 13-16). A partir da imunomarcação desses neuropeptídeos, o número total de neurônios MCH e CART foi estimado por estereologia nos animais de 21, 50, 90 e 540 dias de idade. A área e o volume absolutos da LHA sempre foram menores no GR do que no GC, em todas as idades, com diferenças nos DPN 21, 50 e 90 (efeito de grupo, Figura 17A e 17B). No entanto, não houve diferenças nos valores de área e volume relativos ao peso encefálico entre os grupos experimentais (Figura 17C e 17D).

A partir da comparação da estimativa do número de neurônios, observou-se que o GR possui menor quantidade de neurônios CART na LHA do que GC nos DPN 21 e 540, sendo essa diferença significativa nos animais mais velhos (Figura 17E). Quando analisamos semi-quantitativamente os dados da LHA em suas 3 regiões (mamilar, tuberal e anterior) com base na contagem direta dos perfis neuronais, não foram encontradas alterações no número de neurônios CART na região mamilar (Figura 17F). Contudo, na região tuberal, o GR apresentou menor quantidade de neurônios no DPN 21 (efeito de grupo) e na região anterior houve diminuição no GR no DPN 90 (Figura 17G e 17H).

O número de neurônios MCH da LHA não se alterou entre GR e GC, em nenhuma idade estudada (Figura 18A). Em relação às regiões da LHA, somente na região anterior foi observado uma maior quantidade de neurônios MCH no GR quando comparado ao GC, no DPN 540 (Figura 18B-D).

Os dados de estimativa do número de neurônios CART e MCH da LHA também podem ser utilizados para avaliar o desenvolvimento pós-natal dessas células. Para o CART, não há diferenças no GC entre as faixas etárias estudadas (21, 50, 90 e 540 dias). No entanto, no GR, diferenças significativas foram observadas no DPN 21, que apresentou menos neurônios CART quando

comparado ao DPN 50 e os animais de 540 dias apresentaram menor número de neurônios CART do que todas as demais idades (Figura 19A e 19B). Já para os neurônios MCH, tanto GC quanto GR comportam-se de maneira semelhante: menos neurônios MCH no DPN 21 (Figura 19C e 19D).

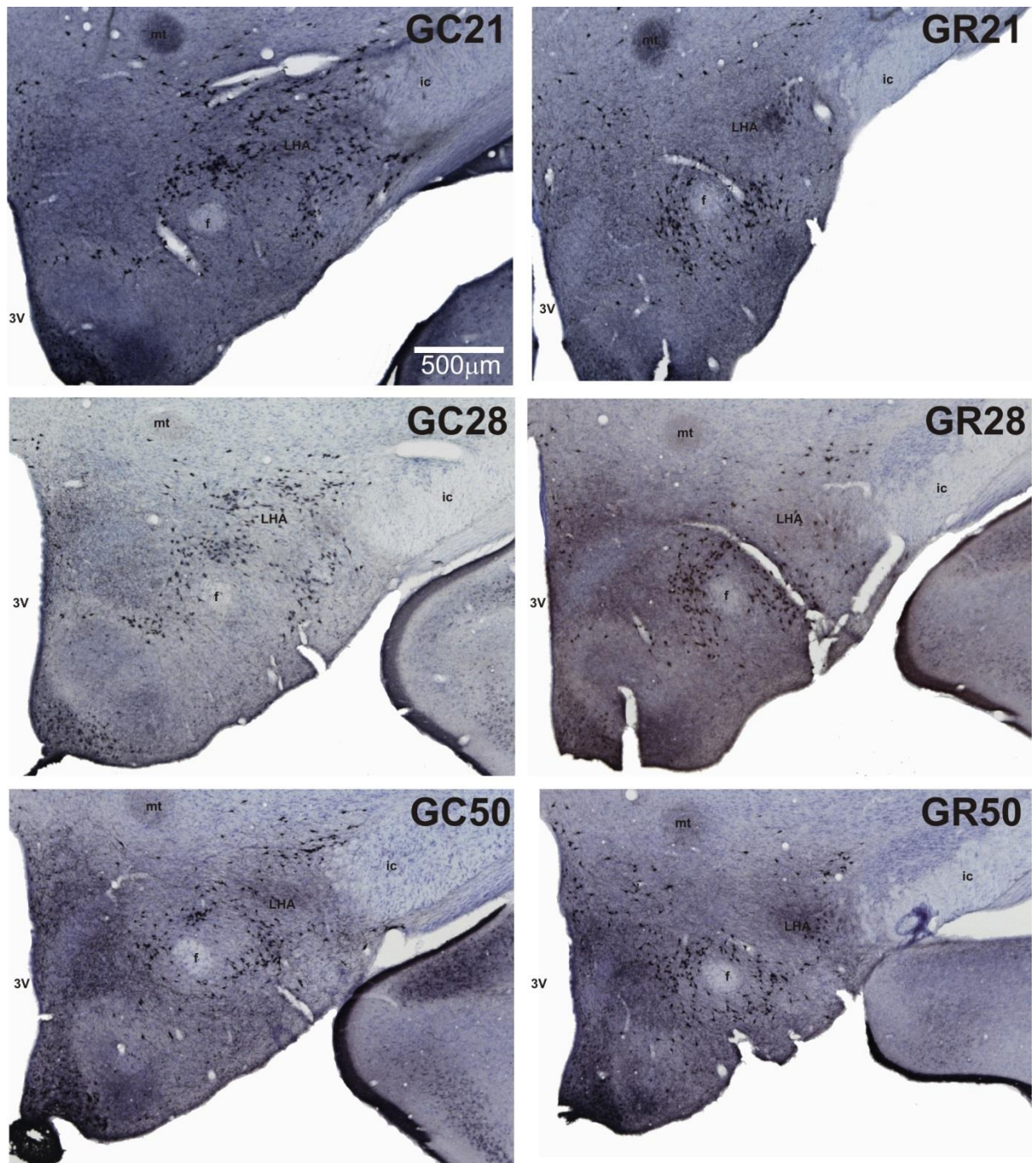


Figura 13. Fotomicrografias de neurônios CART da região tuberal da LHA, marcados por imuno-histoquímica em GC e GR nos DPNs 21, 28 e 50,. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

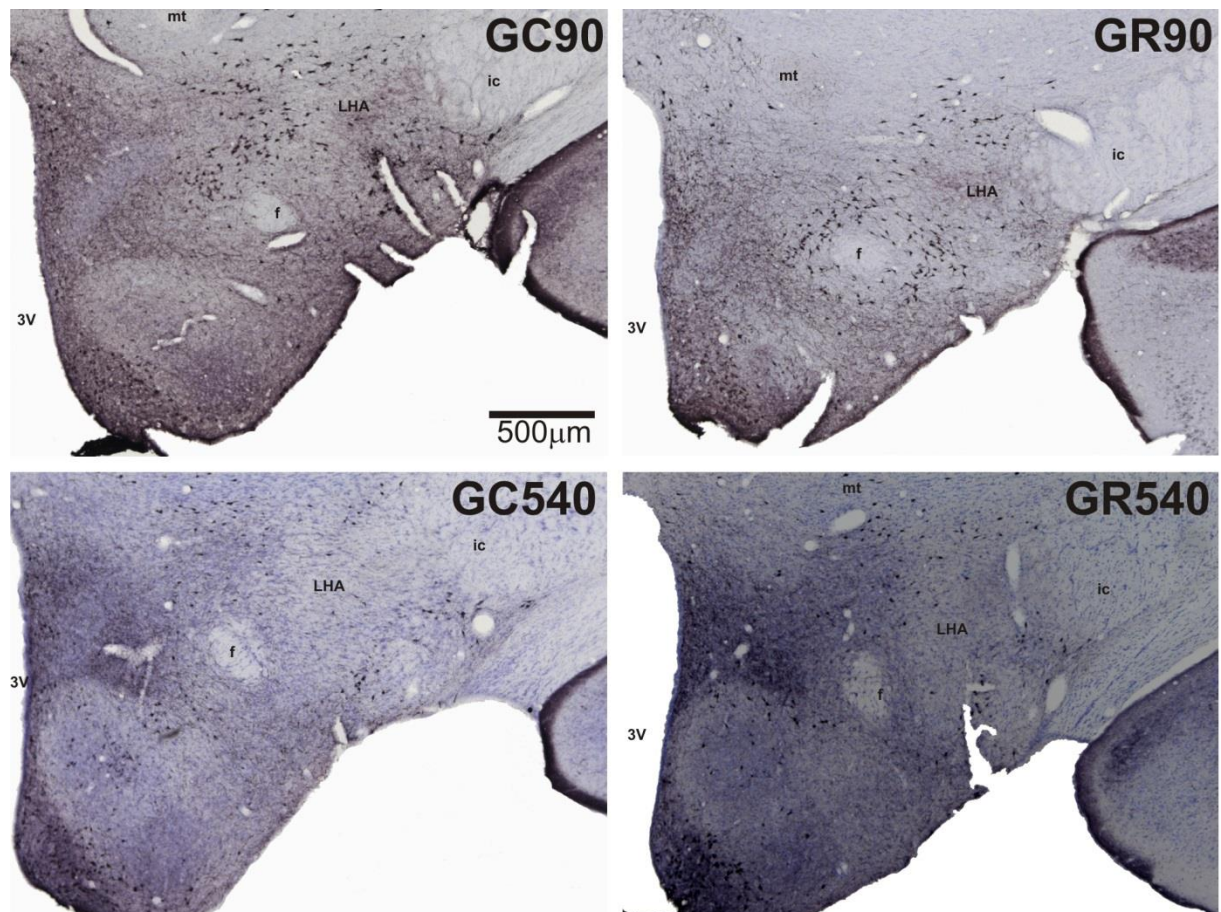


Figura 14. Fotomicrografias de neurônios CART da região tuberal da LHA, marcados por imuno-histoquímica em GC e GR nos DPNs 90 e 540,. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

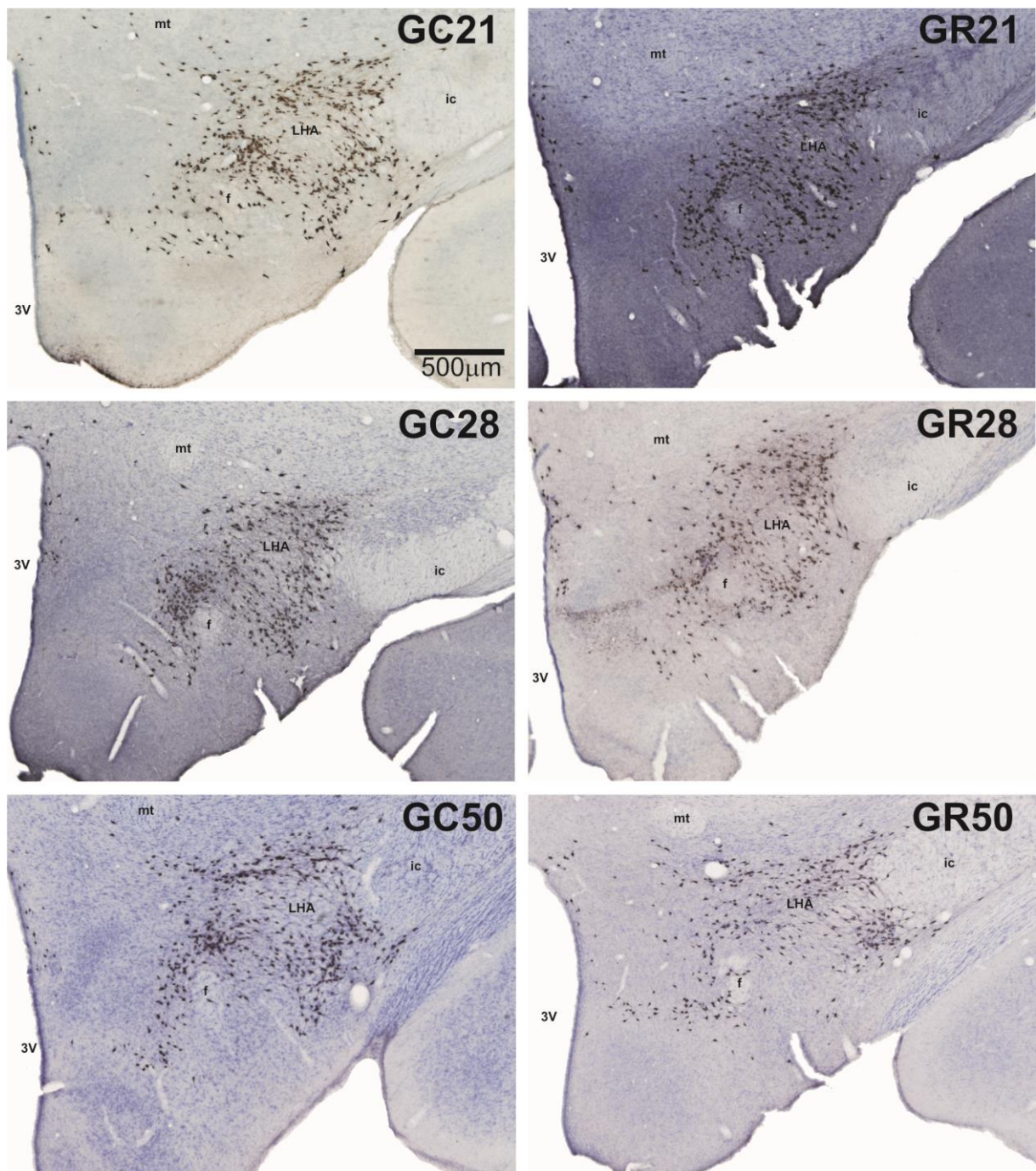


Figura 15. Fotomicrografias de neurônios MCH da região tuberal da LHA, marcados por imuno-histoquímica em GC e GR nos DPNs 21, 28 e 50,. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

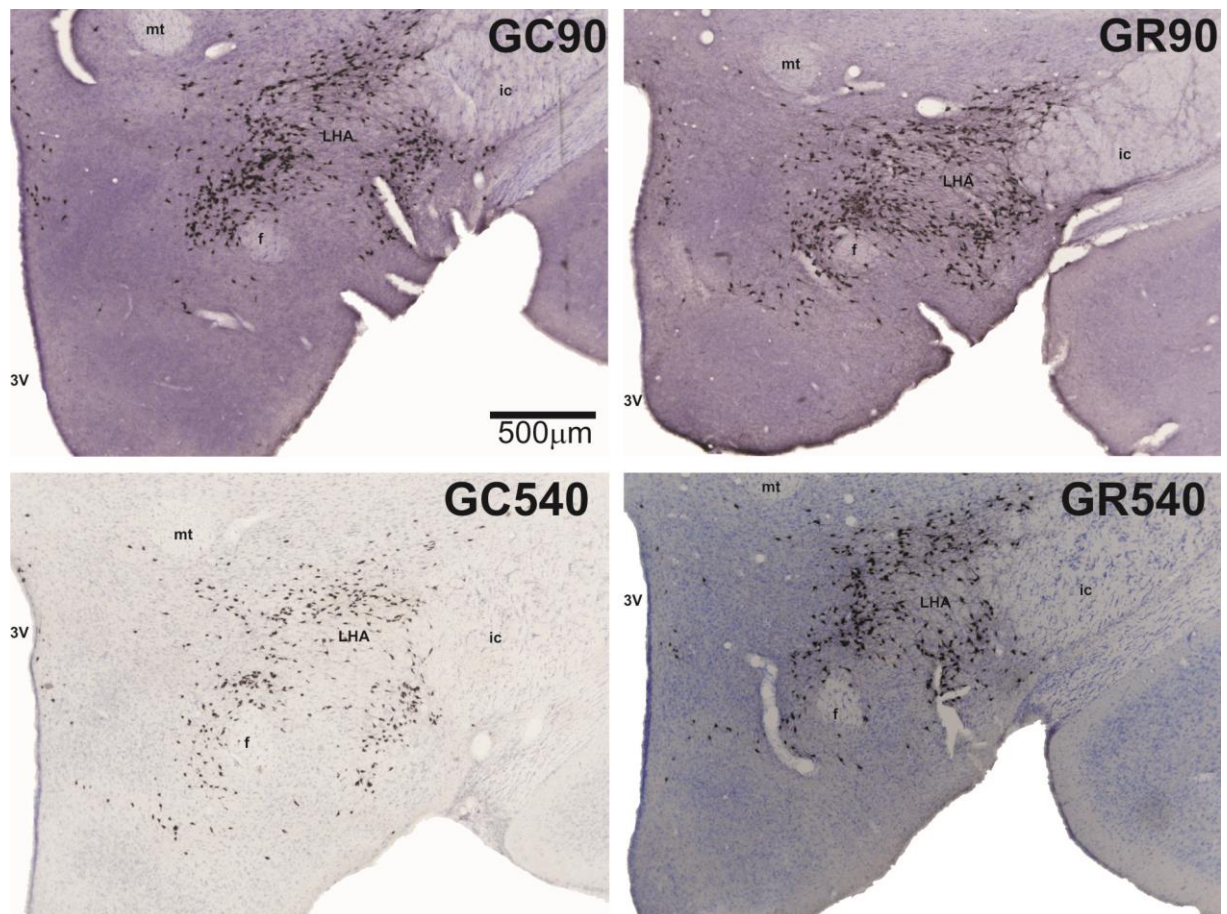


Figura 16. Fotomicrografias de neurônios MCH da região tuberal da LHA, marcados por imuno-histoquímica em GC e GR nos DPNs 90 e 540,. A barra de calibração em A é válida para todas as imagens.

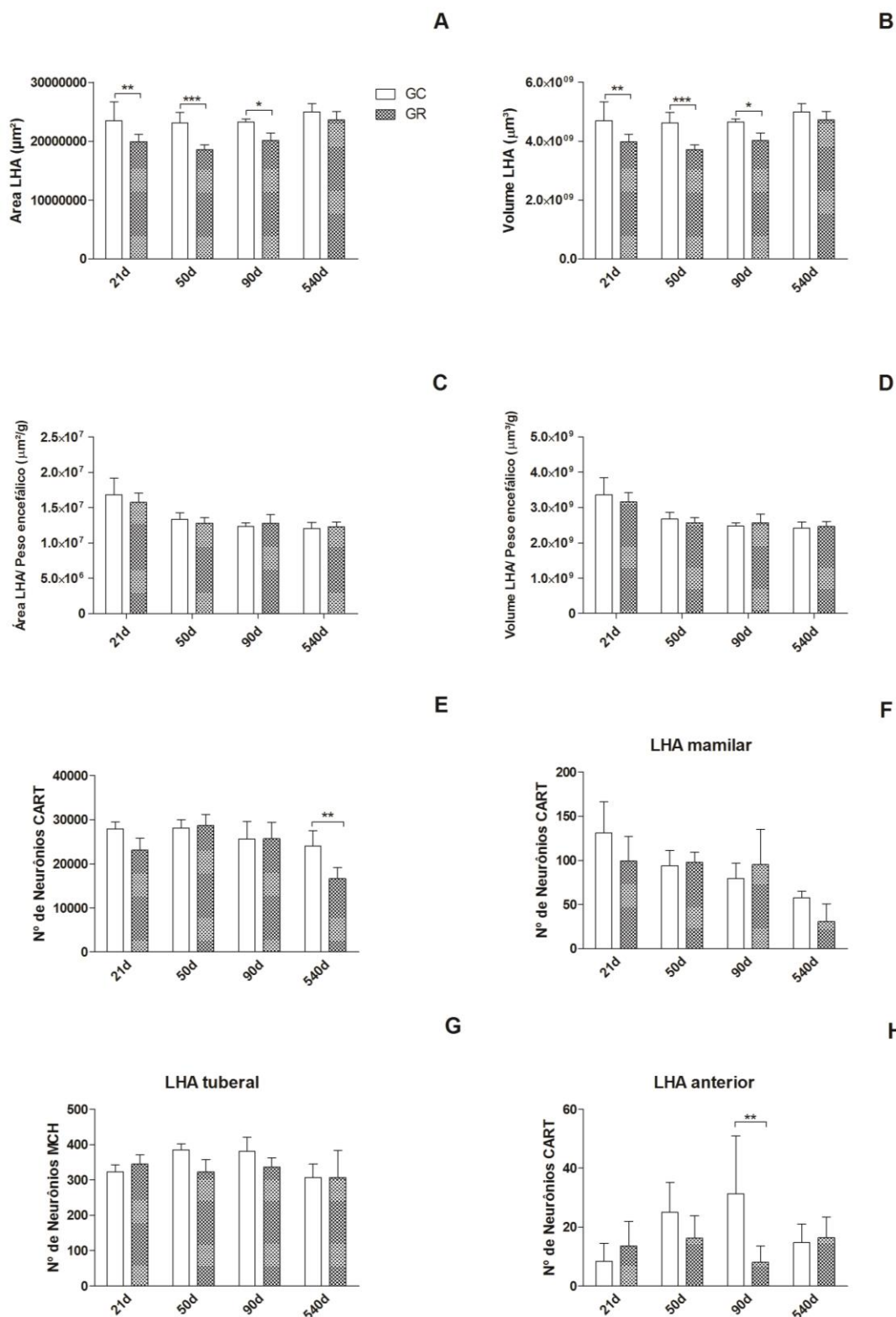


Figura 17. Gráficos da área e volume da LHA, e número de neurônios CART, nos DPN 21, 50, 90 e 540. (A) Área absoluta da LHA. Efeito de tempo e grupo ($F(3,32)=8,242$, $p<0,001$; $F(1,32)=36,17$, $p<0,001$, respectivamente). (B) Volume absoluto da LHA. Efeito de tempo e grupo ($F(3,32)=8,242$, $p<0,001$; $F(1,32)=36,17$, $p<0,001$, respectivamente). (C) Área relativa da LHA. Efeito de tempo ($F(3,32)=24,17$, $p<0,001$). (D) Volume relativo da LHA. Efeito de tempo ($F(3,32)=24,17$, $p<0,001$). (E) Número de neurônios CART da LHA como um todo. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(3,32)=13,27$, $p<0,001$; $F(1,32)=9,628$, $p<0,01$; $F(3,32)=4,469$, $p<0,01$, respectivamente). (F) Número de neurônios CART da LHA mamilar. Efeito de tempo ($F(3,32)=15,17$, $p<0,001$). (G) Número de neurônios CART da LHA tuberal. Efeito de tempo, grupo e interação tempo x grupo ($F(3,32)=5,47$, $p<0,01$; $F(1,32)=12,32$, $p<0,01$; $F(3,32)=3,217$, $p<0,05$, respectivamente). (H) Número de neurônios CART da LHA anterior. Efeito de grupo e interação tempo x grupo ($F(1,32)=4,178$, $p<0,05$; $F(3,32)=4,259$, $p<0,05$, respectivamente). Dados de A-H descritos em média e desvio-padrão e foram analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$. A legenda em A é válida para todos os gráficos.

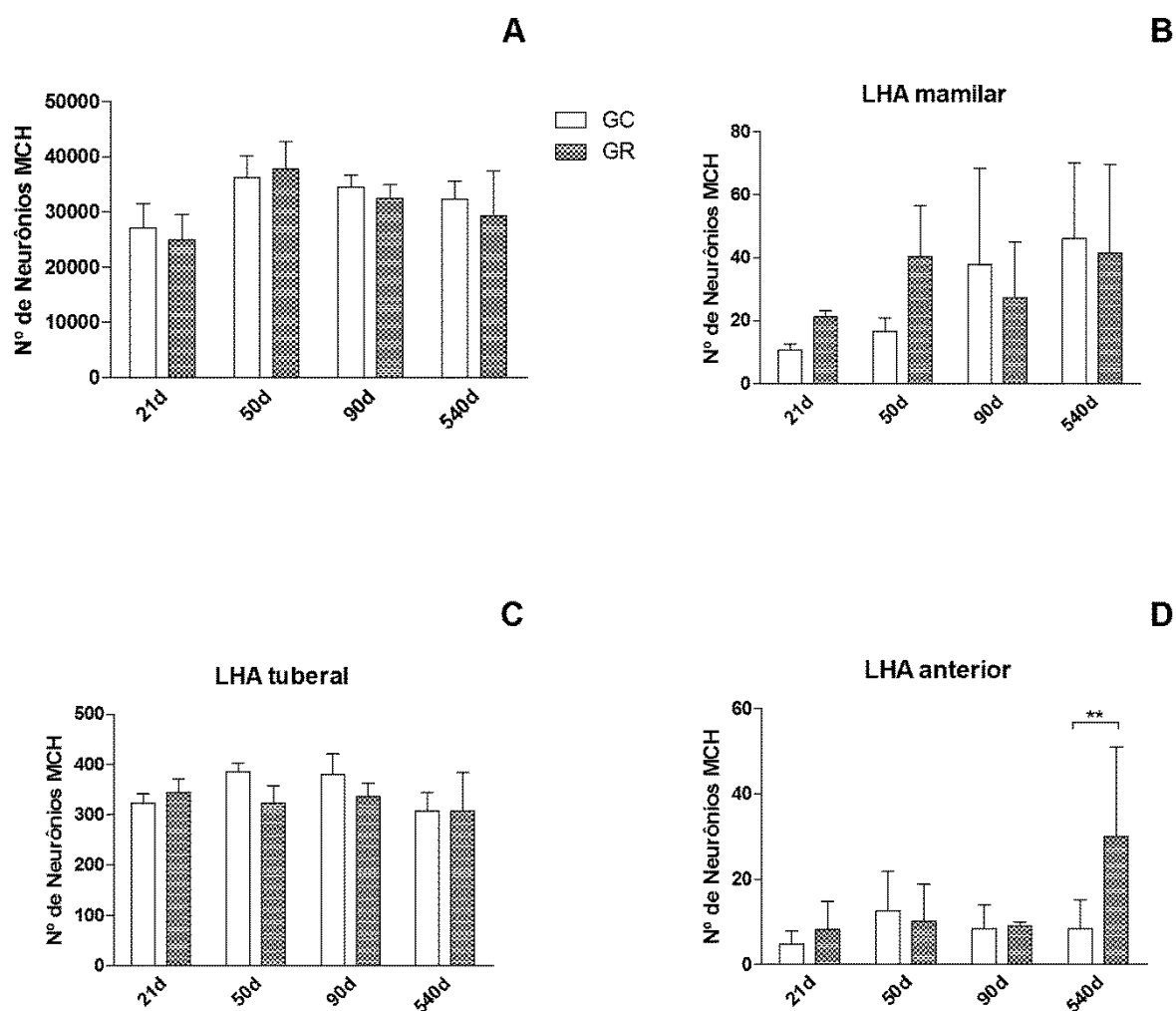


Figura 18. Gráficos do número de neurônios MCH na LHA no DPN 21, 50, 90 e 540. (A) Número total de neurônios MCH da LHA. Efeito de tempo ($F(3,32)=9,941$, $p<0,001$). (B) Número de neurônios MCH da LHA mamilar. Efeito de tempo ($F(3,32)=3,606$, $p<0,05$). (C) Número de neurônios MCH da LHA tuberal. ($F(3,32)=3,615$, $p<0,05$). (D) Número de neurônios MCH da LHA anterior. Efeito de tempo e interação tempo x grupo ($F(3,32)=3,37$, $p<0,05$; $F(3,32)=3,198$, $p<0,05$, respectivamente). Dados de A-D descritos em média e desvio-padrão e foram analisados por Two-way ANOVA seguido de teste de Bonferroni. ** = $p<0,01$. A legenda em A é válida para todos os gráficos.

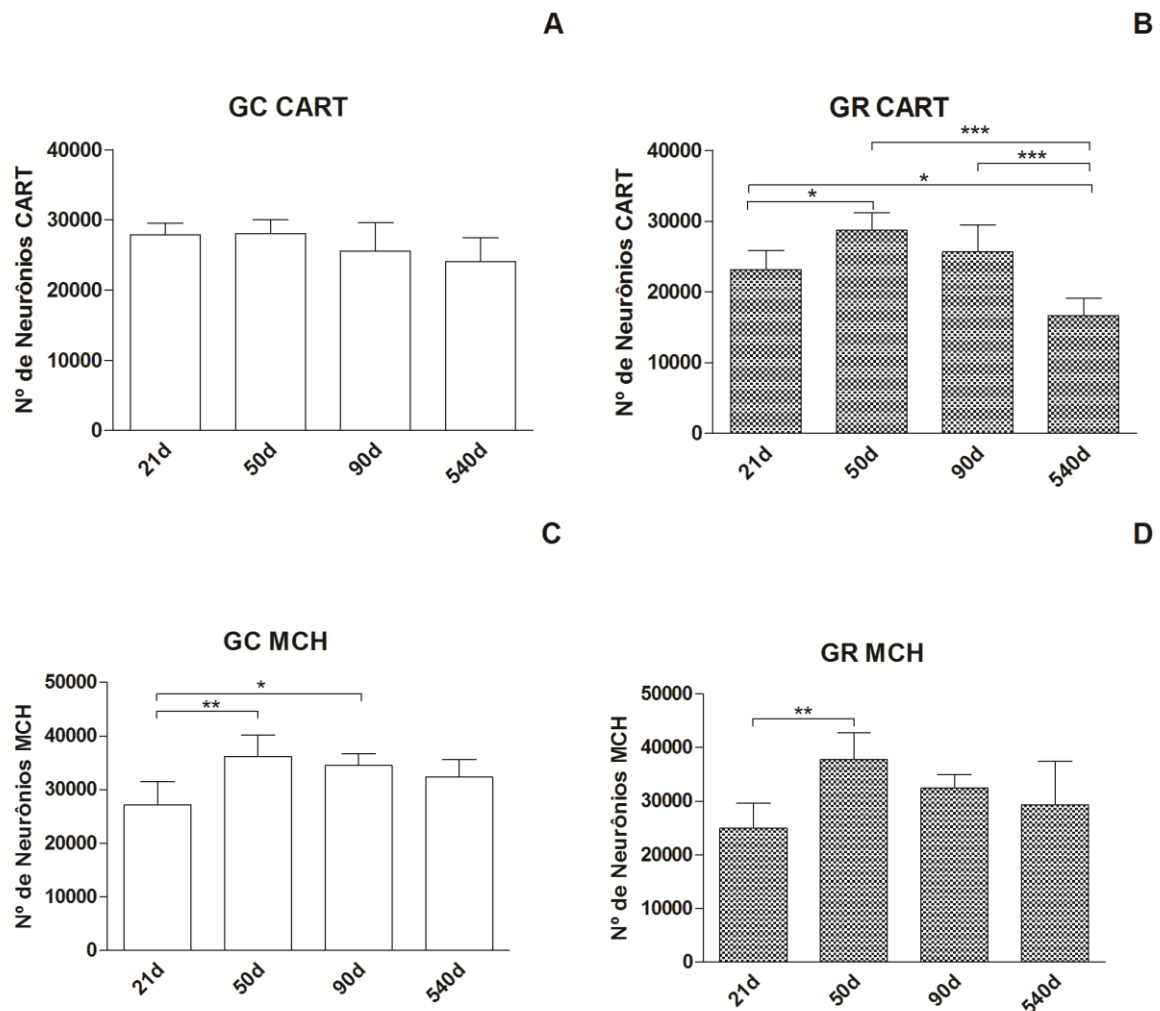


Figura 19. Gráficos dos neurônios CART e MCH na LHA durante o desenvolvimento pós-natal, nos DPN 21, 50, 90 e 540. (A) Número de neurônios CART da LHA do GC. (B) Número de neurônios CART da LHA do GR. ($F(3,16)=15,8$, $p<0,001$). (C) Número de neurônios MCH da LHA do GC. ($F(3,16)=6,076$, $p<0,01$). (D) Número de neurônios MCH da LHA do GR. ($F(3,16)=4,862$, $p<0,05$) Dados de A-D descritos em média e desvio-padrão e foram analisados por One-way ANOVA seguido de teste de Tukey. * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; *** = $p<0,001$.

6.2.2 Reconstrução tridimensional da LHA

A distribuição dos neurônios CART na LHA mantém-se semelhante tanto em GC quanto GR nos DPNS 21, 50 e 90, com maior densidade de células nas regiões mamilar e tuberal da LHA, destacando-se suas sub-regiões dorsolateral, central e ventrolateral (Figuras 20 a 28).

Nos animais de 540 dias, GR apresentou alterações na distribuição dos neurônios CART ao longo do eixo rostro caudal da LHA comparado ao GC, com menor concentração de células na região perifornical e secções mais caudais, que correspondem a região mamilar da LHA (Figuras 29 a 31). Os dados numéricos, obtidos dos modelos 3D nessa idade, mostraram uma maior distância média entre os neurônios CART dentro da LHA, indicando uma maior dispersão celular nessa região quando comparado com GC (Quadro 1). Além disso, GR apresentou uma menor porcentagem de neurônios CART na região mamilar, corroborando o que observamos no modelo 3D (Quadro 1)

Já a distribuição de neurônios MCH na LHA é semelhante entre GC e GR em todas as idades (21, 50, 90 e 540), assim como descrito por Bittencourt et al. (1992). A restrição calórica materna não alterou o número de neurônios MCH, bem como sua distribuição ao longo do eixo rostro-caudal da LHA, mantendo maior concentração de neurônios imunorreativos nas regiões mamilar e tuberal da LHA, em suas sub-regiões dorsolateral e perifornical (Figuras 32 a 43).

	Distância média entre os neurônios CART (µm)	Distribuição percentual dos neurônios CART na LHA		
		Mamilar	Tuberal	Anterior
GC540	48,9	23,50	72,33	4,17
GR540	60,8	5,42	81,43	13,15

Quadro 1. Distância média entre os neurônios CART na LHA (µm) e distribuição percentual dos neurônios CART nas regiões mamilar, tuberal e anterior da LHA. Dados quantitativos obtidos dos modelos 3D de GC e GR aos 540 dias.

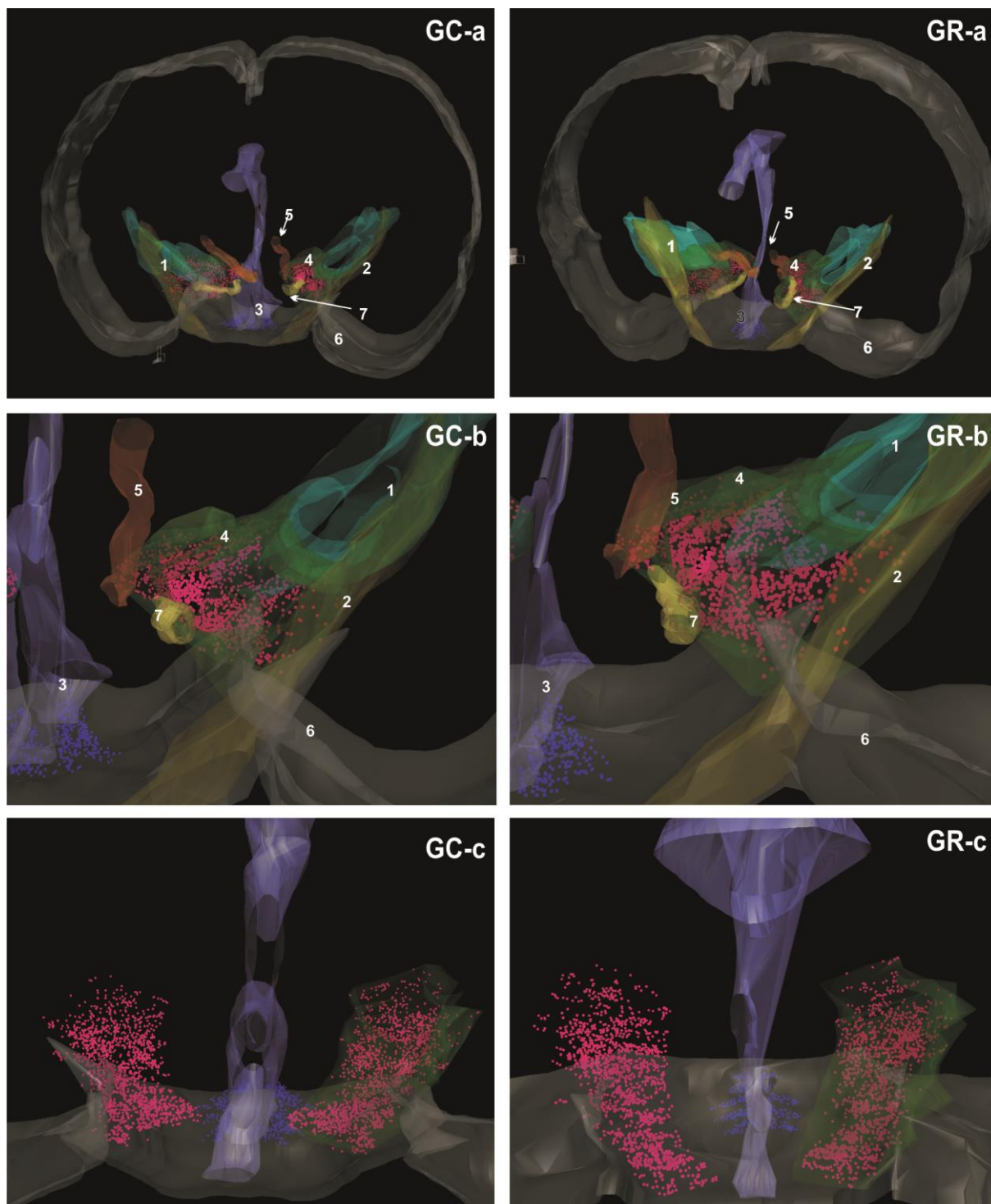


Figura 20. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios CART na LHA do GC21 e GR21. (a) Vista panorâmica com referências citoarquitetônicas e os neurônios CART representados pelas esferas rosas; (b) detalhe frontal da LHA, destacando estruturas citoarquitetônicas de referência para sua delimitação; (c) vista dorsal do modelo 3D, na qual é possível observar a distribuição dos neurônios CART ao longo do eixo rostro-caudal. 1, ic; 2, opt; 3, 3V; 4, LHA; 5, mt; 6, superfície do encéfalo; 7, f. Veja arquivos dos modelos interativos GC21 CART.pdf e GR21 CART.pdf. A barra de calibração no modelo vale 500µm.

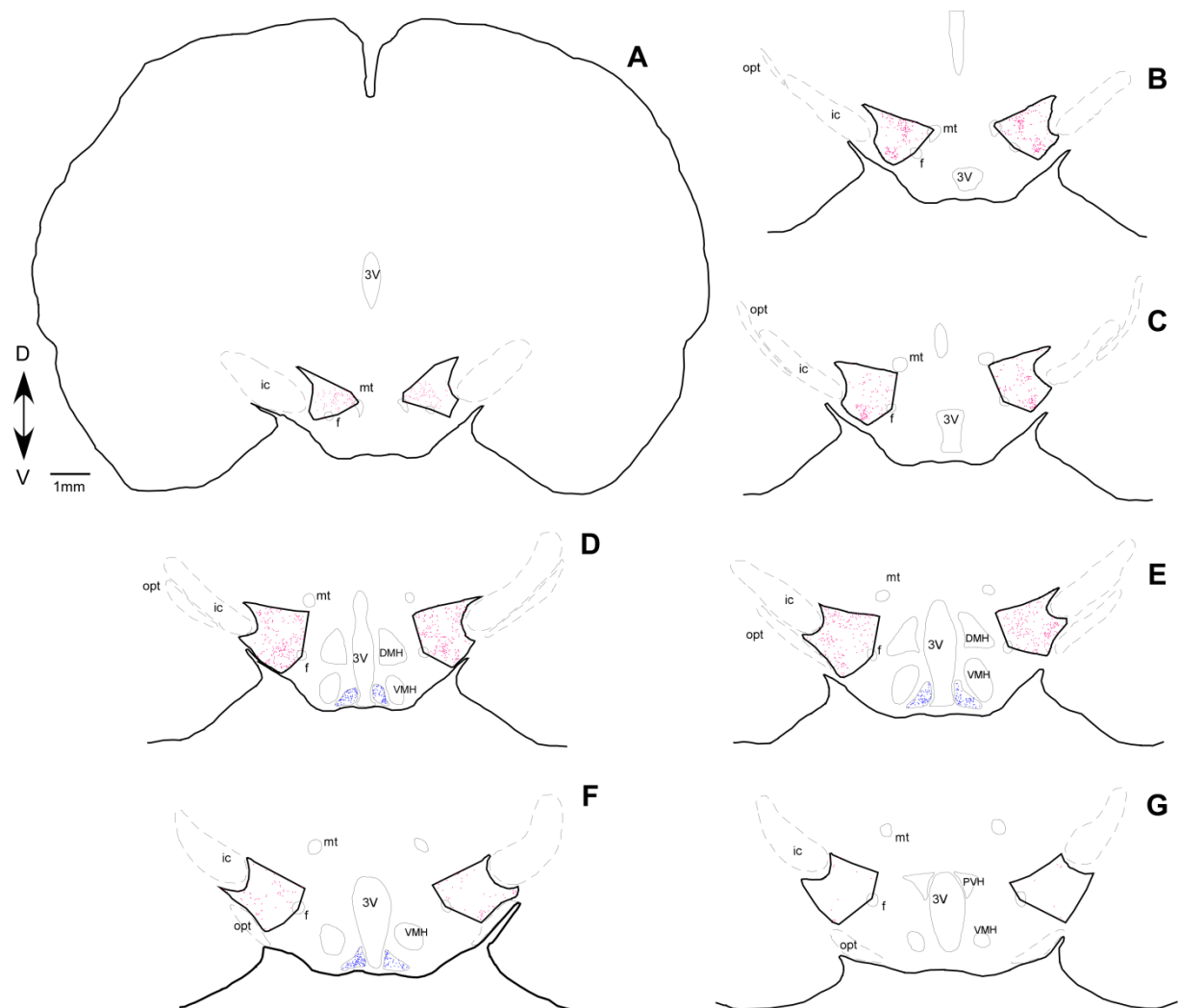


Figura 21. Mapeamento dos neurônios CART da LHA (esferas rosas) do GC21. Os esquemas representam seções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entre as seções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

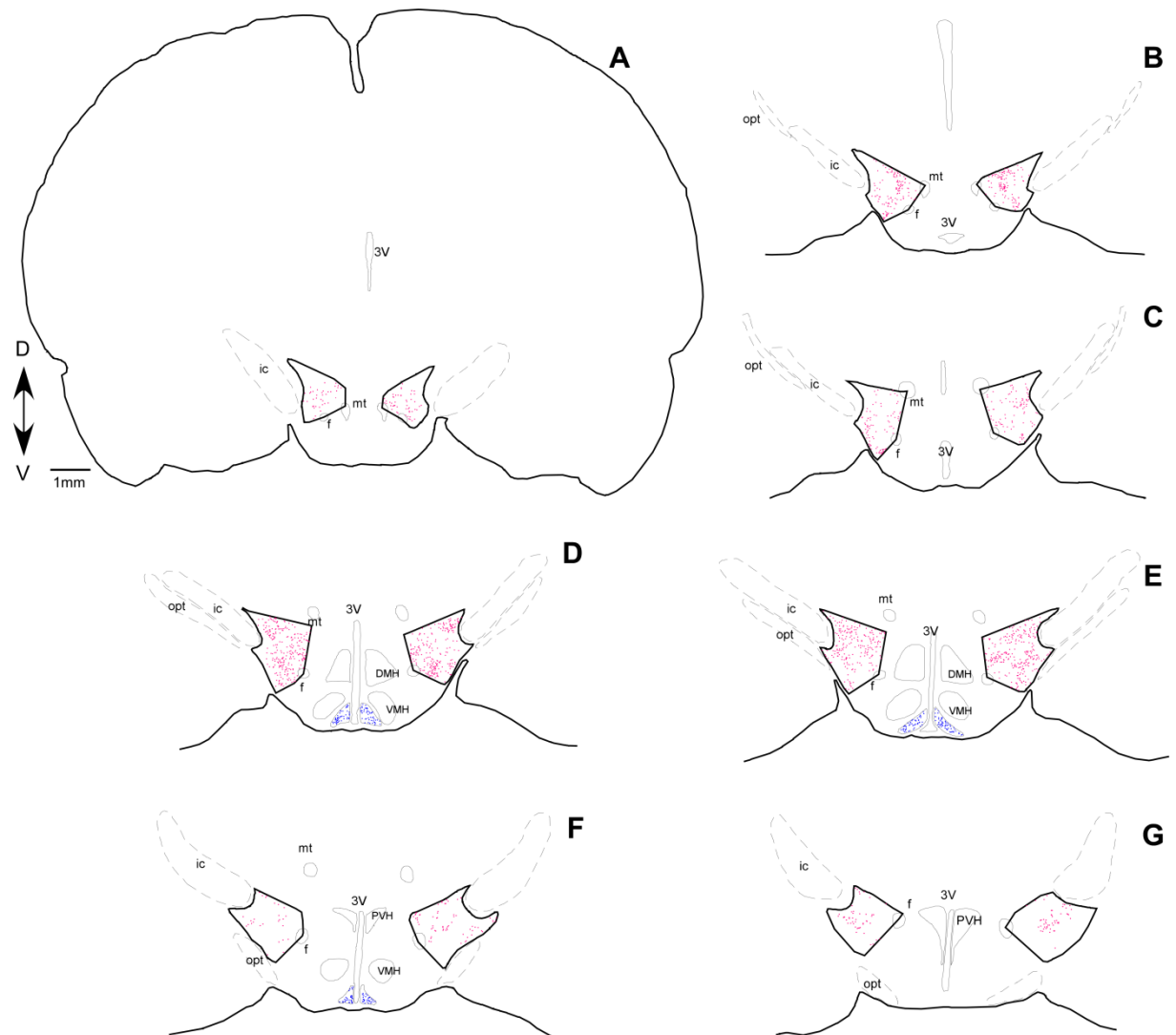


Figura 22. Mapeamento dos neurônios CART da LHA (esferas rosas) do GR21. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

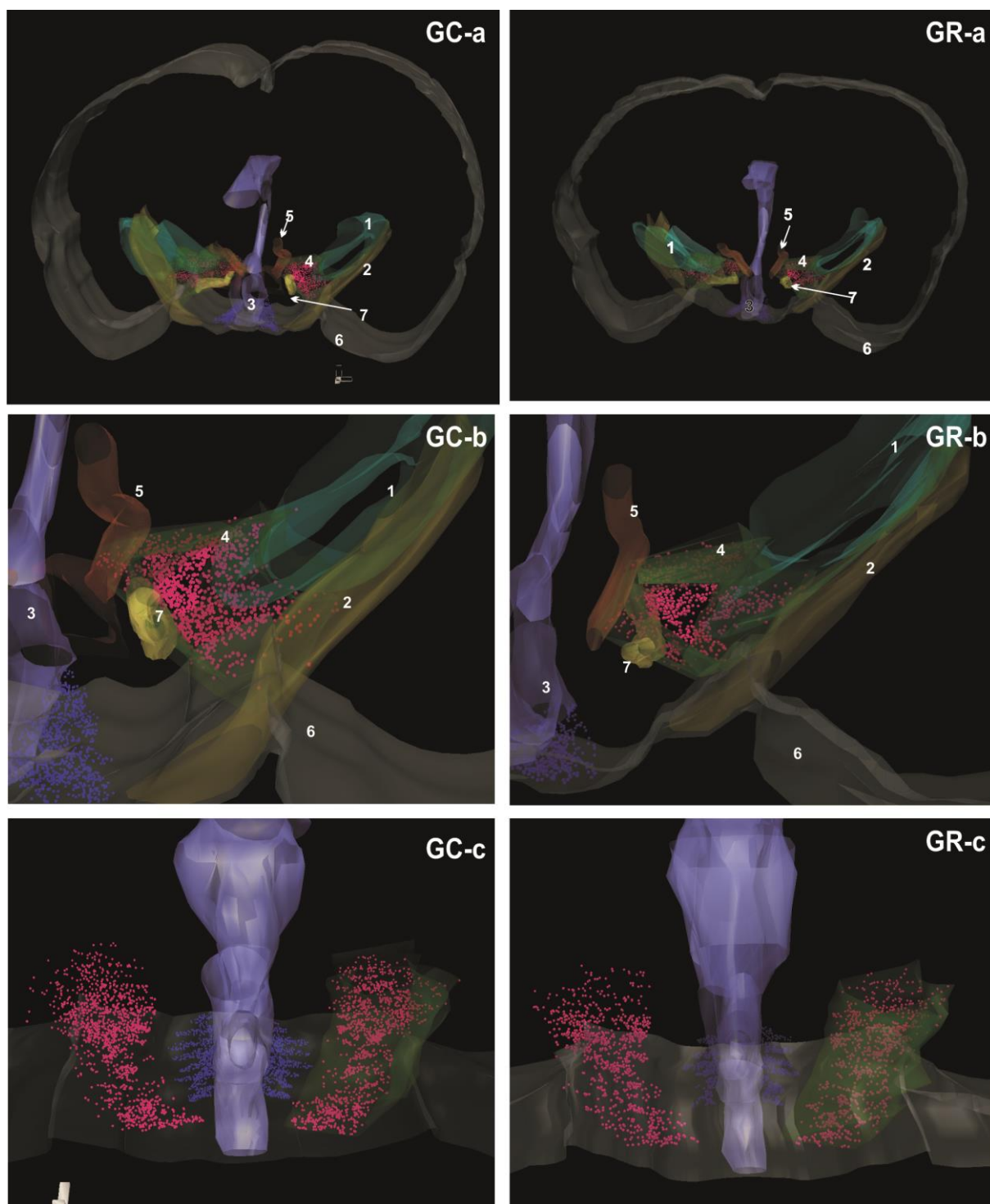


Figura 23. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios CART na LHA do GC50 e GR50. (A) Vista panorâmica com referências citoarquitetônicas e os neurônios CART representados pelas esferas rosas; (B) detalhe frontal da LHA, destacando estruturas citoarquitetônicas de referência para sua delimitação; (C) vista dorsal do modelo 3D, na qual é possível observar a distribuição dos neurônios CART ao longo do eixo rostro-caudal. 1, ic; 2, opt; 3, 3V; 4, LHA; 5, mt; 6, superfície do encéfalo; 7, f. Veja arquivos dos modelos interativos GC50 CART.pdf e GR50 CART.pdf. A barra de calibração no modelo vale 500µm.

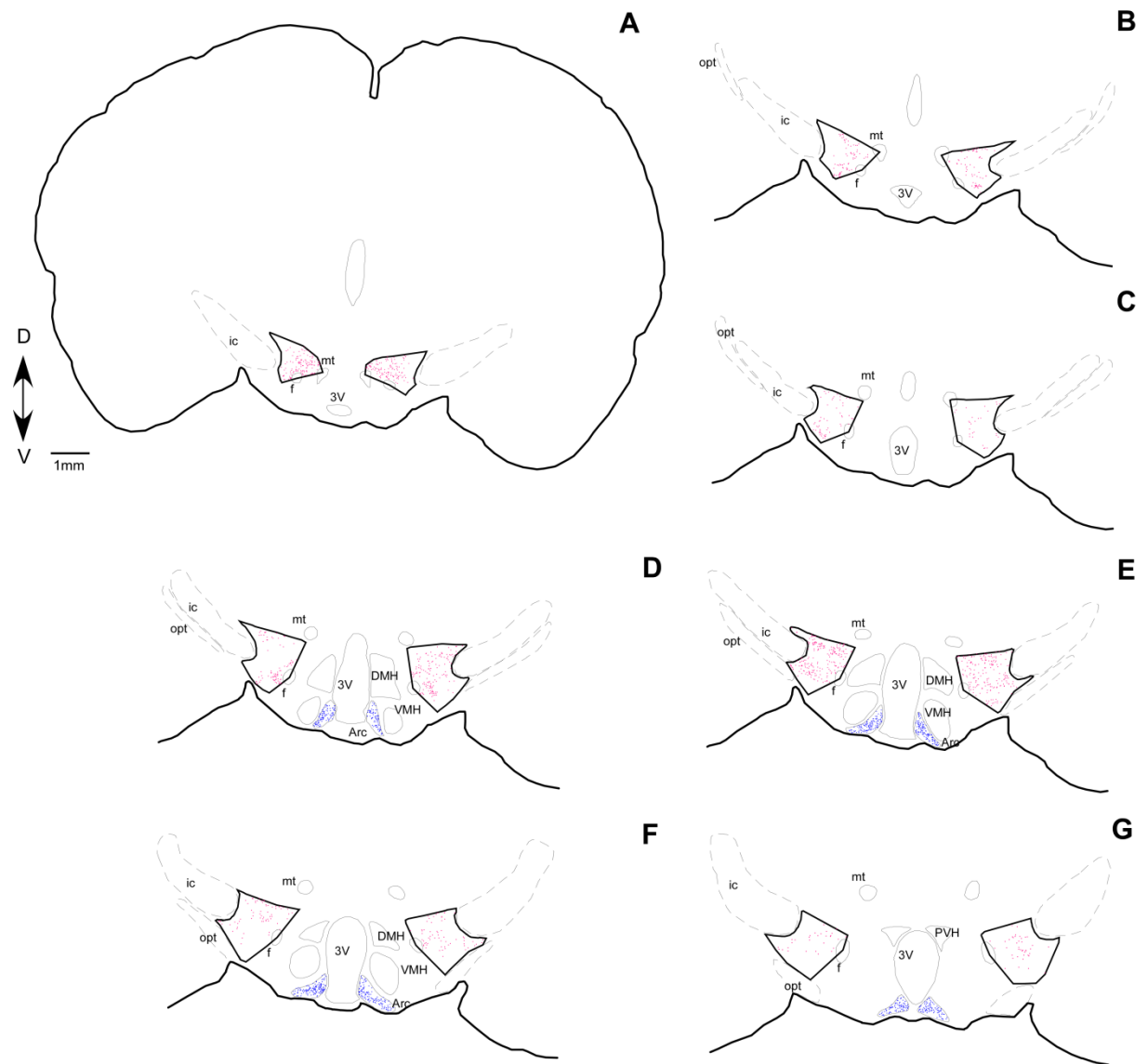


Figura 24. Mapeamento dos neurônios CART da LHA (esferas rosas) do GC50. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

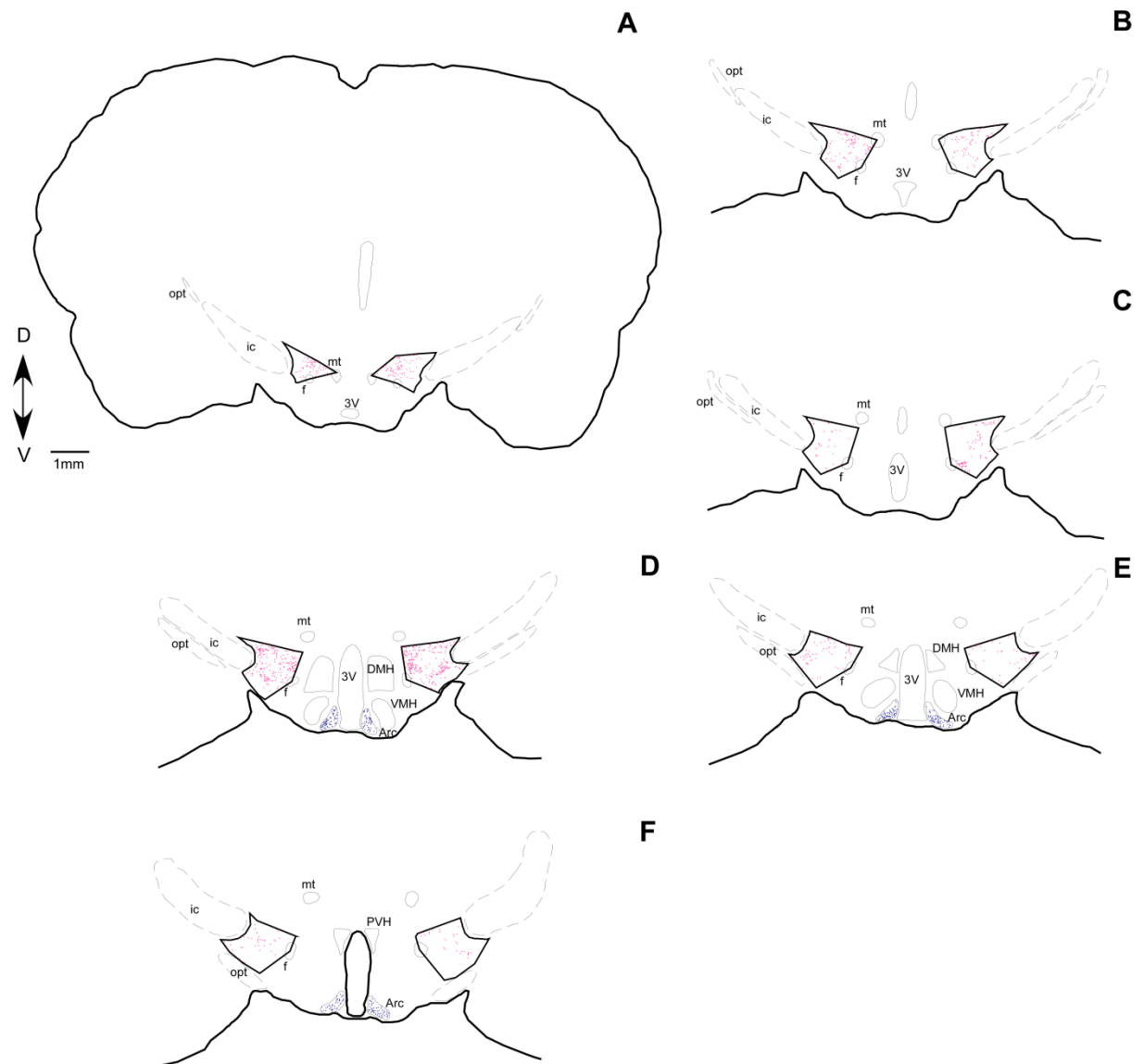


Figura 25. Mapeamento dos neurônios CART da LHA (esferas rosas) do GR50. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (F). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

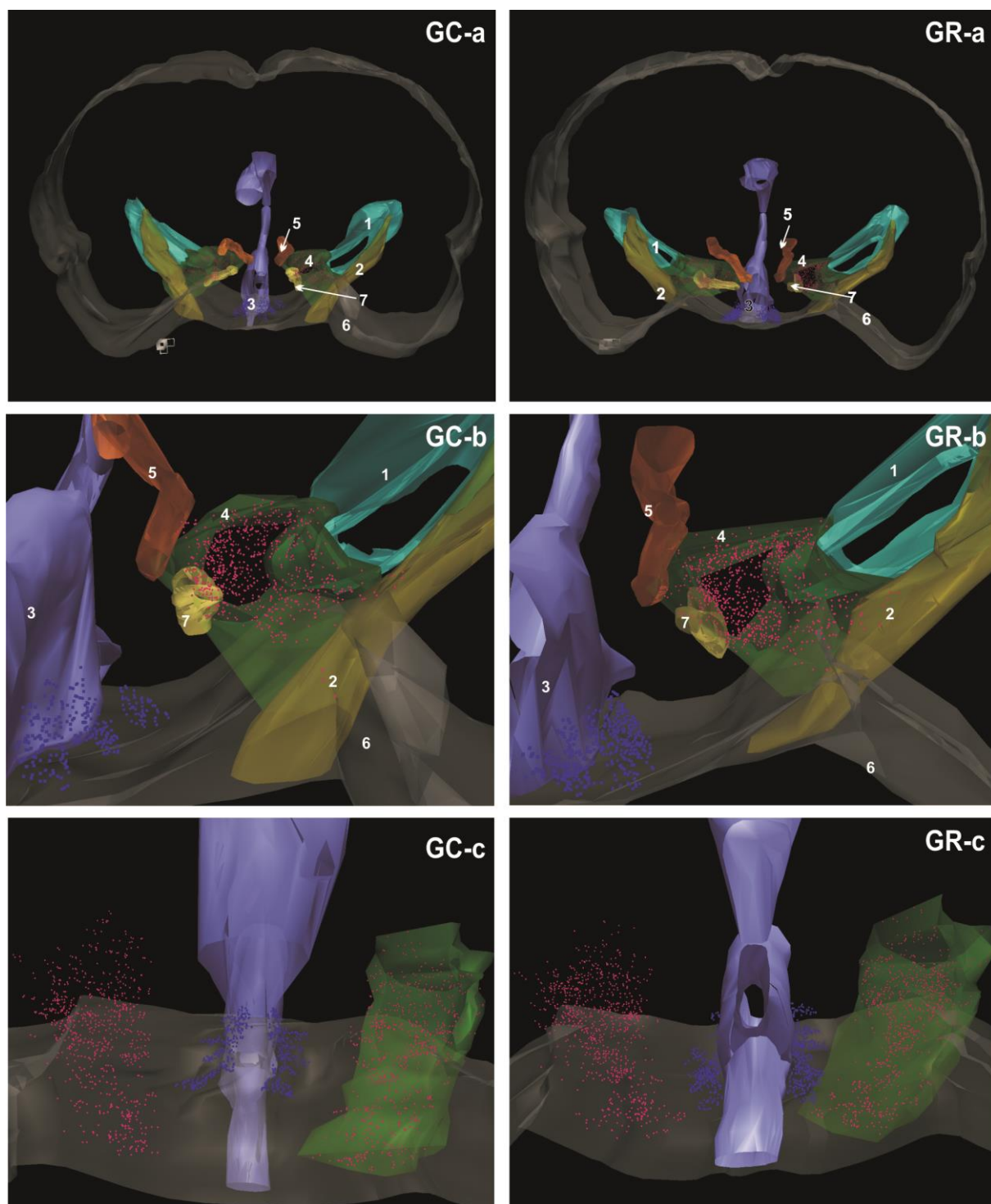


Figura 26. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios CART na LHA do GC90 e GR90. (A) Vista panorâmica com referências citoarquitetônicas e os neurônios CART representados pelas esferas rosas; (B) detalhe frontal da LHA, destacando estruturas citoarquitetônicas de referência para sua delimitação; (C) vista dorsal do modelo 3D, na qual é possível observar a distribuição dos neurônios CART ao longo do eixo rostro-caudal. 1, ic; 2, opt; 3, 3V; 4, LHA; 5, mt; 6, superfície do encéfalo; 7, f. Veja arquivos dos modelos interativos GC90 CART.pdf e GR90 CART.pdf. A barra de calibração no modelo vale 500µm.

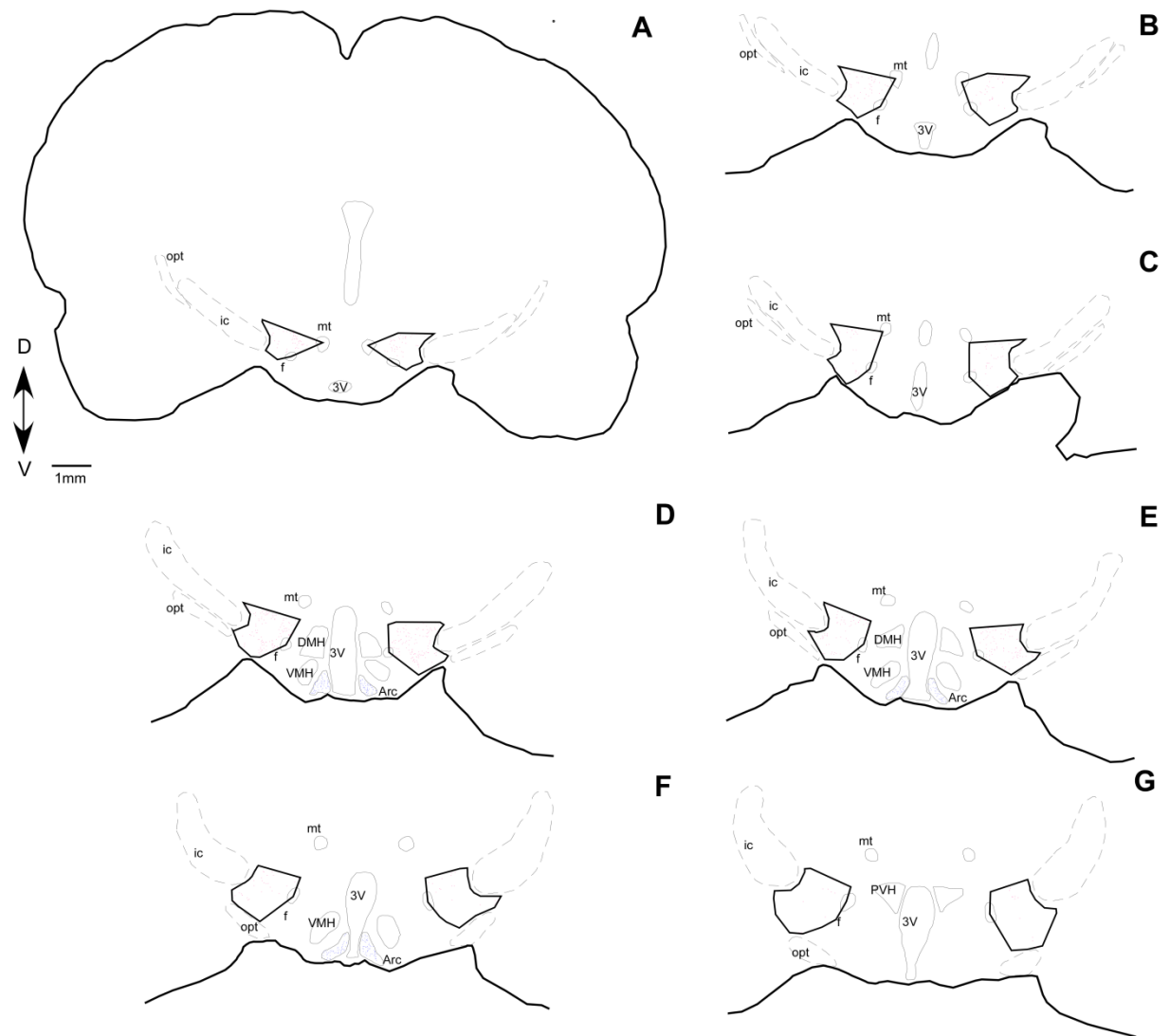


Figura 27. Mapeamento dos neurônios CART da LHA (esferas rosas) do GC90. Os esquemas representam seções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entre as seções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

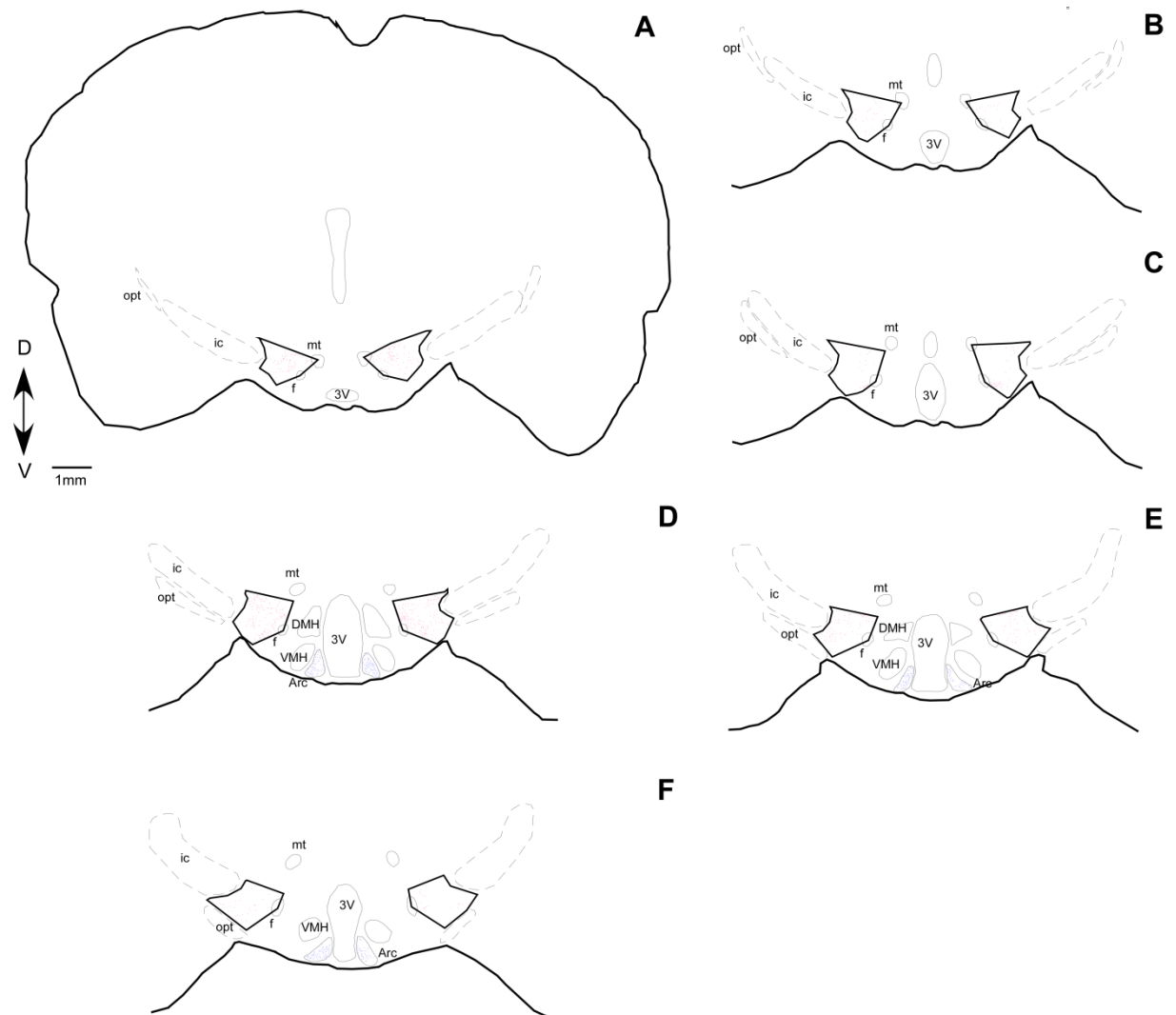


Figura 28. Mapeamento dos neurônios CART da LHA (esferas rosas) do GR90. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (F). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

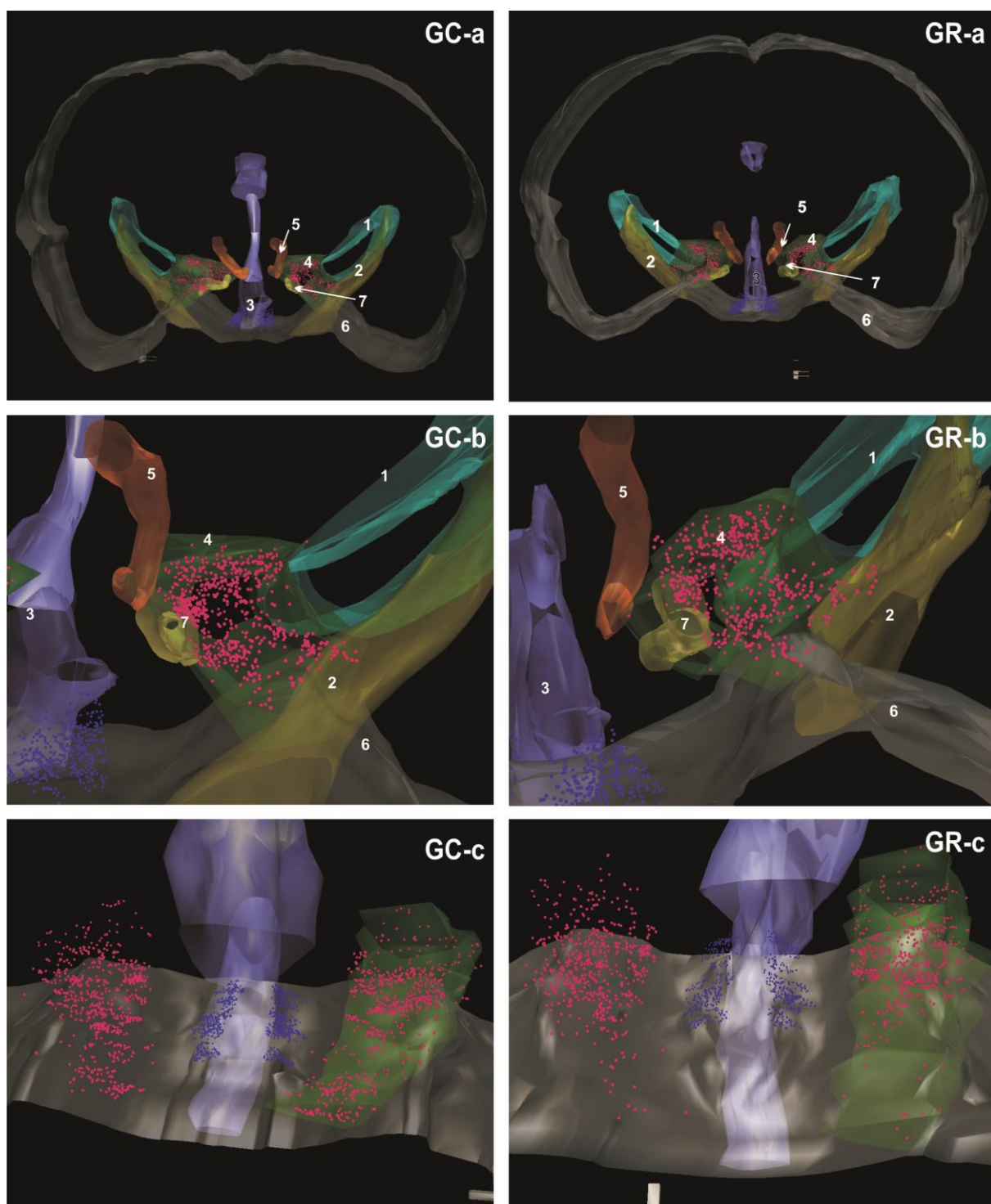


Figura 29. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios CART na LHA do GC540 e GR540. (A) Vista panorâmica com referências citoarquitetônicas e os neurônios CART representados pelas esferas rosas; (B) detalhe frontal da LHA, destacando estruturas citoarquitetônicas de referência para sua delimitação; (C) vista dorsal do modelo 3D, na qual é possível observar a distribuição dos neurônios CART ao longo do eixo rostro-caudal. 1, ic; 2, opt; 3, 3V; 4, LHA; 5, mt; 6, superfície do encéfalo; 7, f. Veja arquivos dos modelos interativos GC540 CART.pdf e GR540 CART.pdf. A barra de calibração no modelo vale 500µm.

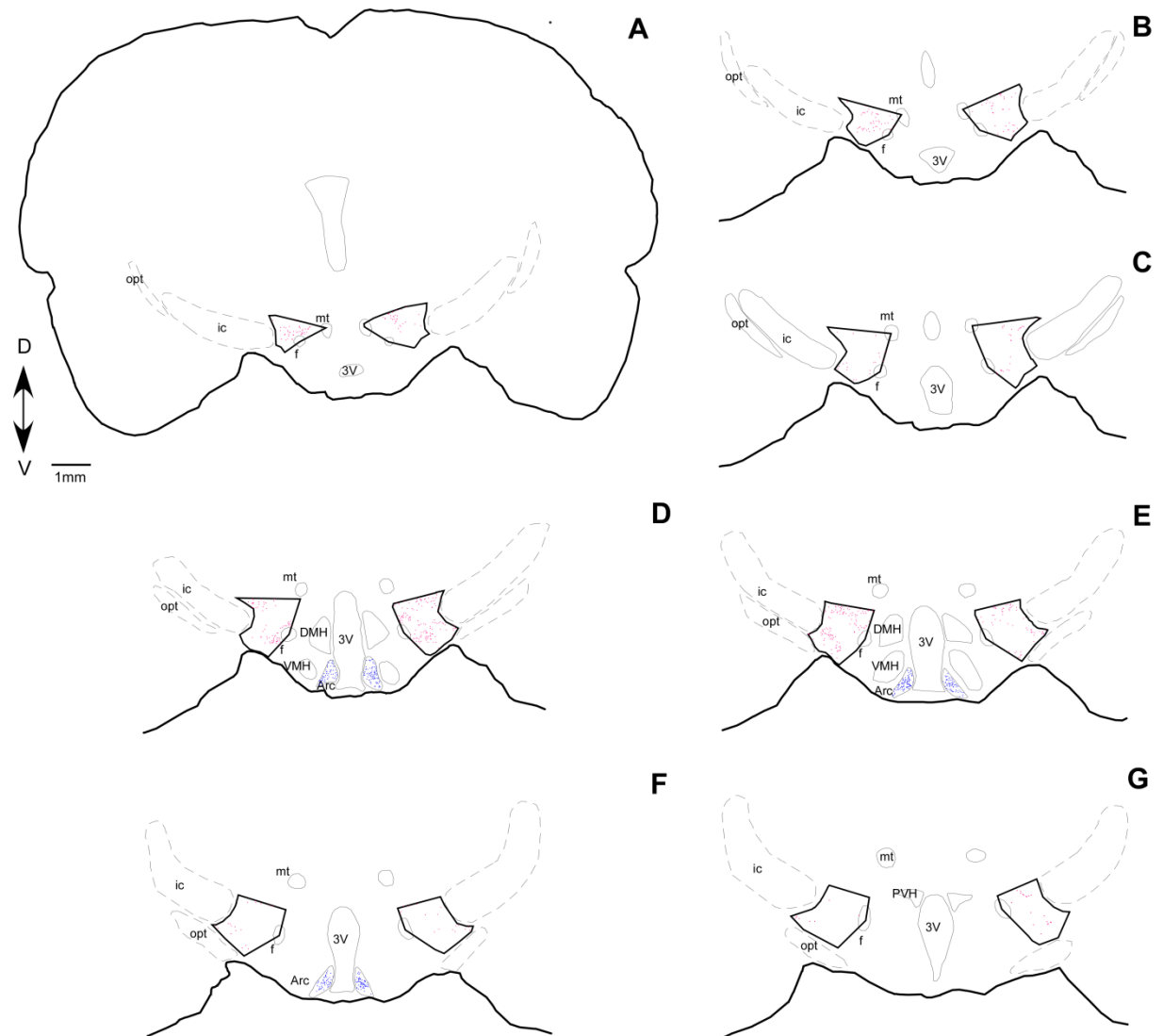


Figura 30. Mapeamento dos neurônios CART da LHA (esferas rosas) do GC540. Os esquemas representam seções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entre as seções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviações, consultar lista de abreviações.

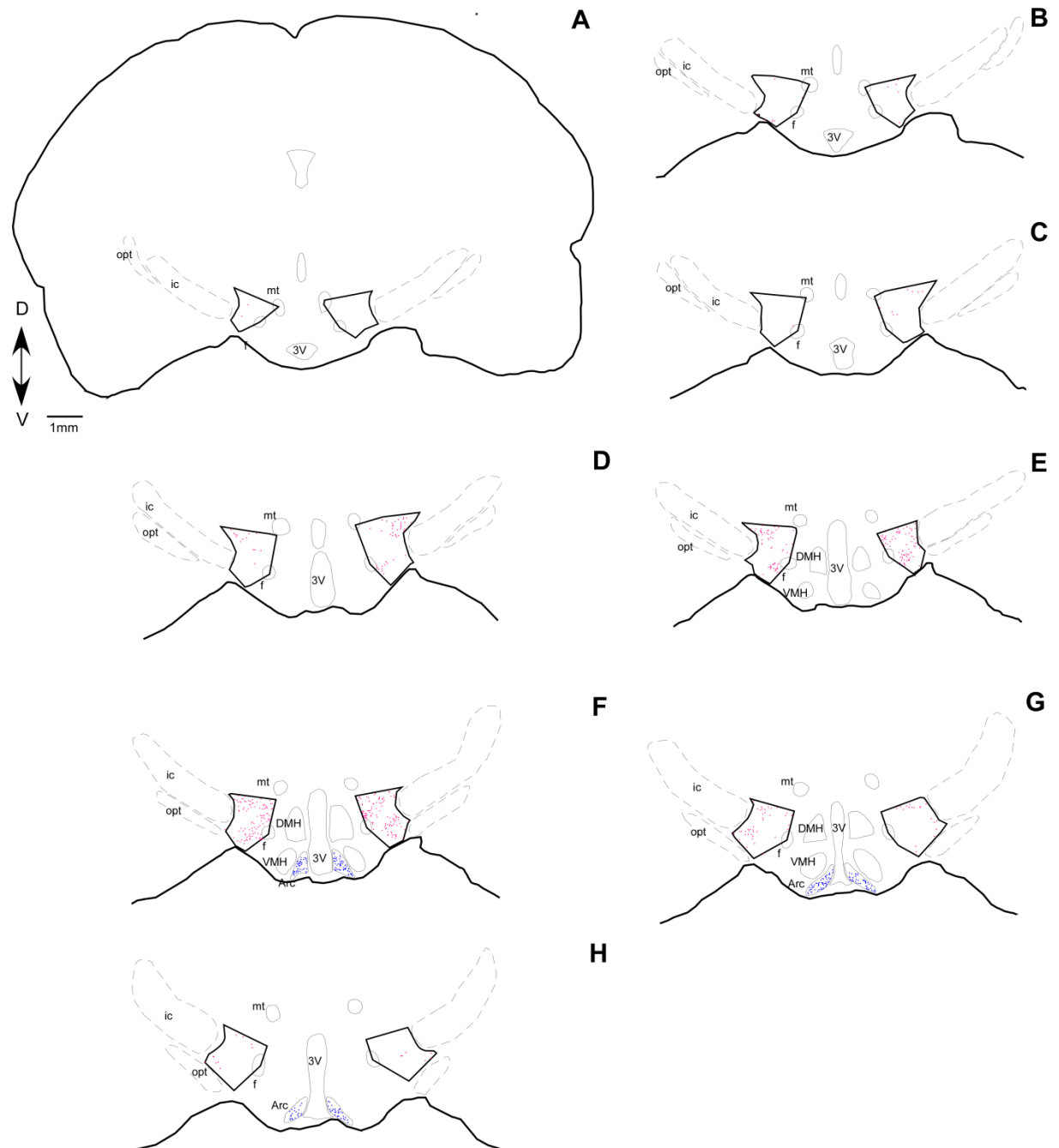


Figura 31. Mapeamento dos neurônios CART da LHA (esferas rosas) do GR540. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (H). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

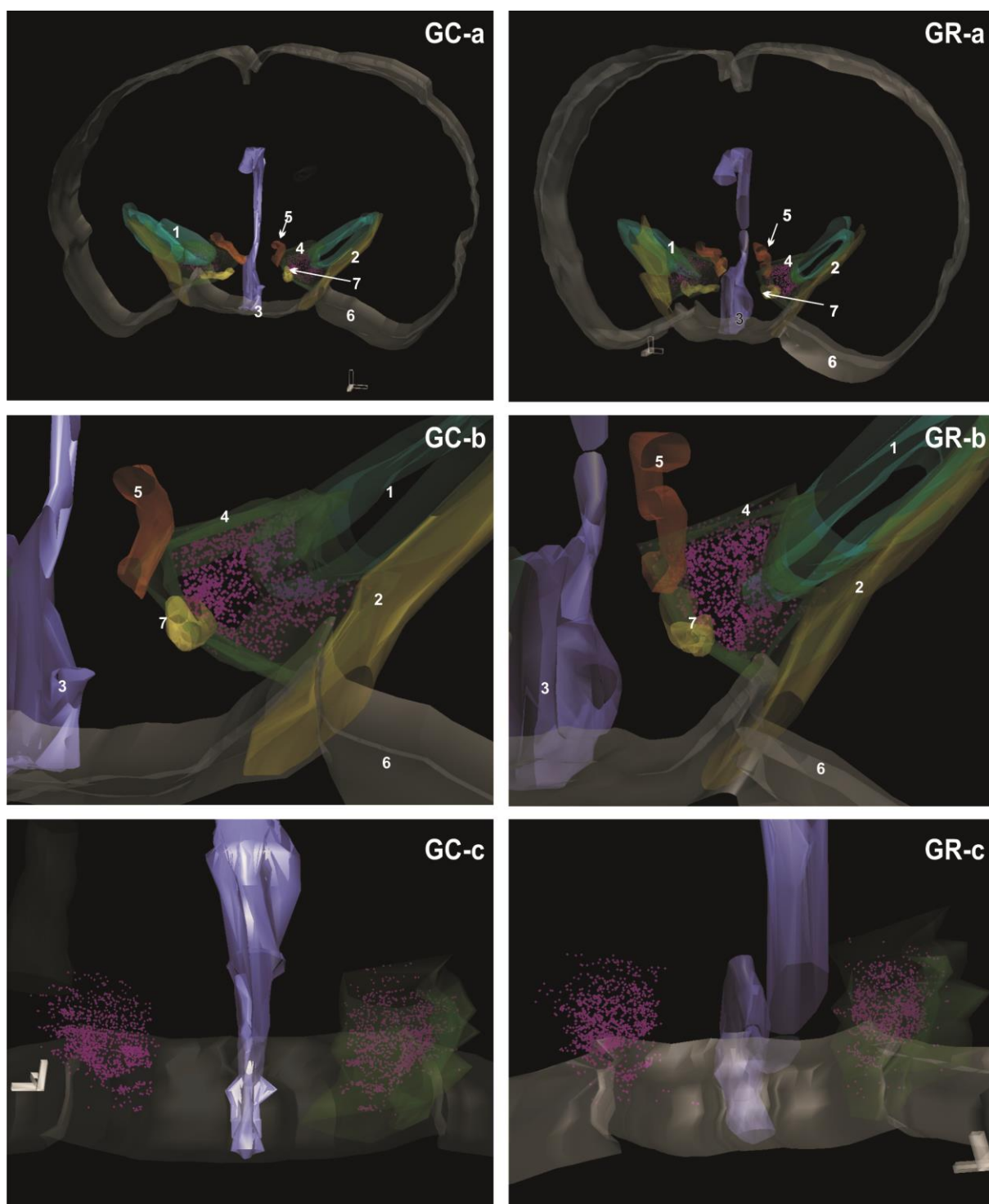


Figura 32. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH na LHA do GC21 e GR21. (A) Vista panorâmica com referências citoarquitetônicas e os neurônios MCH representados pelas esferas roxas; (B) detalhe frontal da LHA, destacando estruturas citoarquitetônicas de referência para sua delimitação; (C) vista dorsal do modelo 3D, na qual é possível observar a distribuição dos neurônios MCH ao longo do eixo rostro-caudal. 1, ic; 2, opt; 3, 3V; 4, LHA; 5, mt; 6, superfície do encéfalo; 7, f. Veja arquivos dos modelos interativos GC21 MCH.pdf e GR21 MCH.pdf. A barra de calibração no modelo vale 500µm.

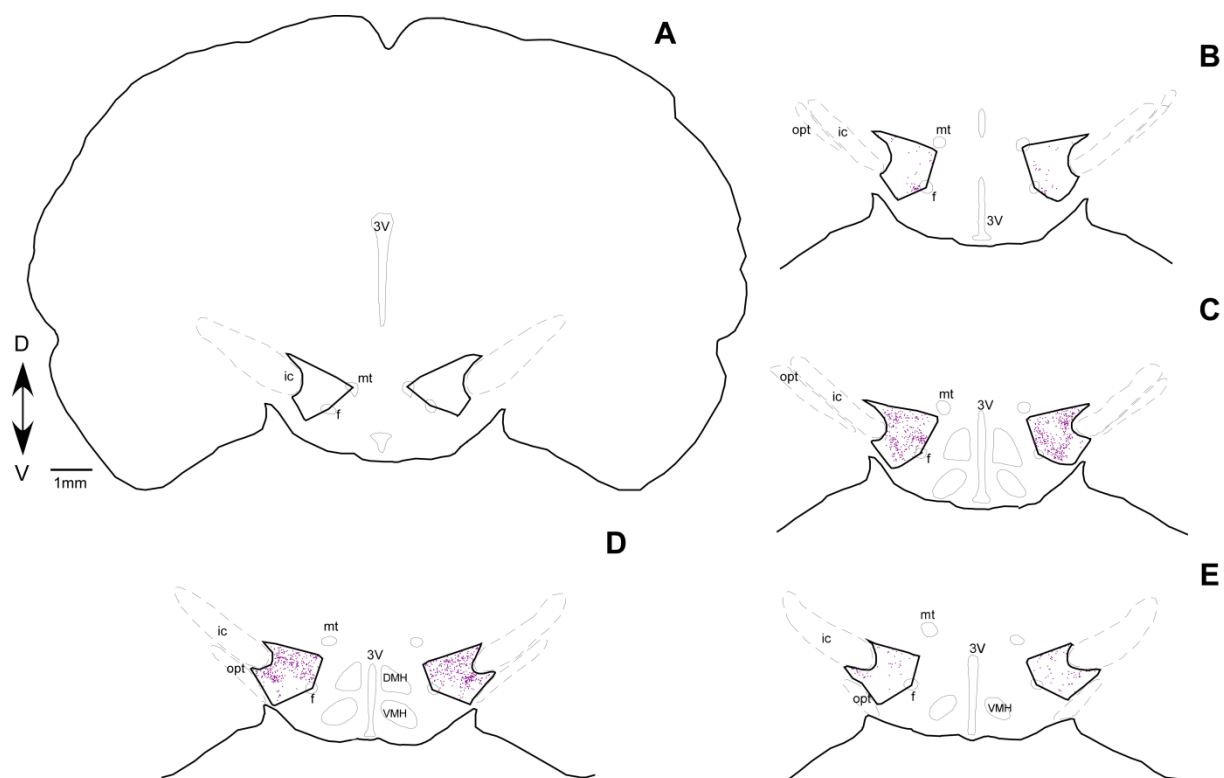


Figura 33. Mapeamento dos neurônios MCH da LHA (esferas roxas) do GC21. Os esquemas representam seções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (E). O intervalo entre as seções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

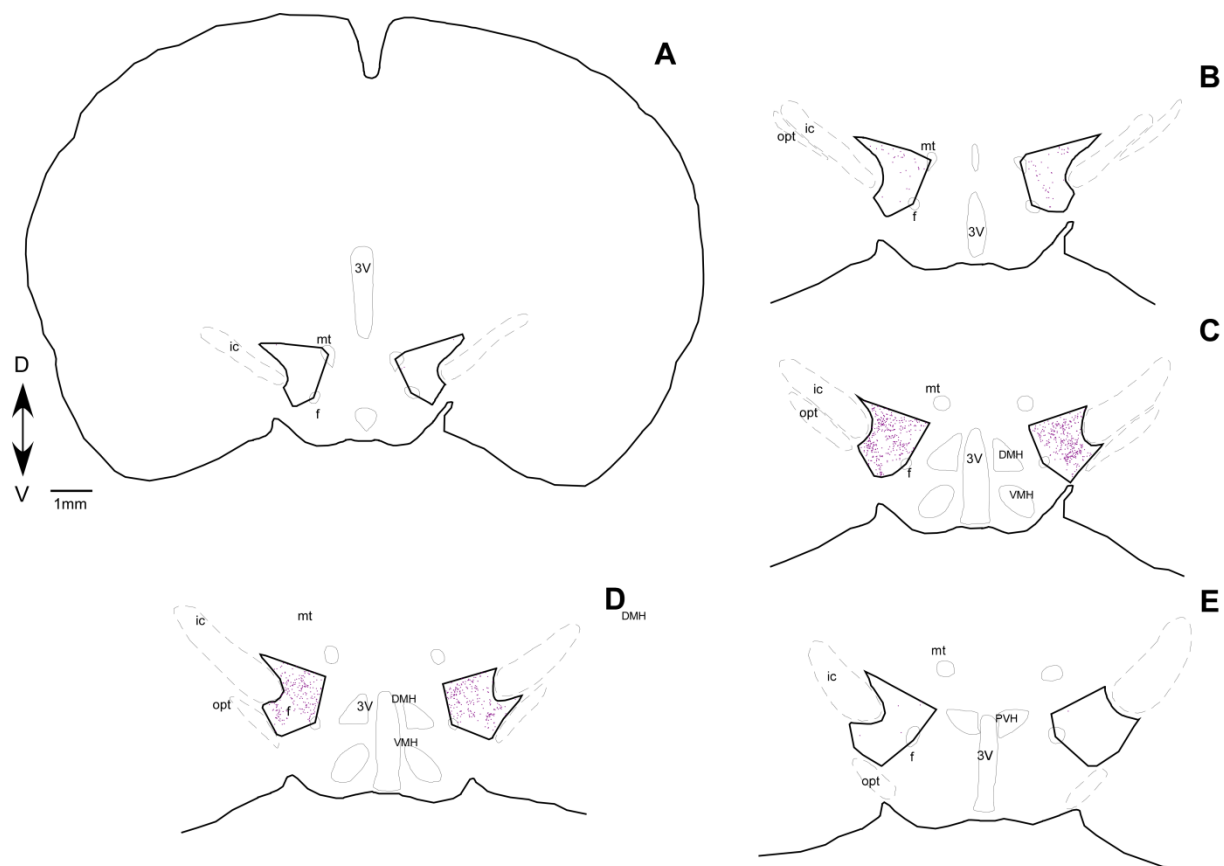


Figura 34. Mapeamento dos neurônios MCH da LHA (esferas roxas) do GR21. Os esquemas representam seções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (E). O intervalo entre as seções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

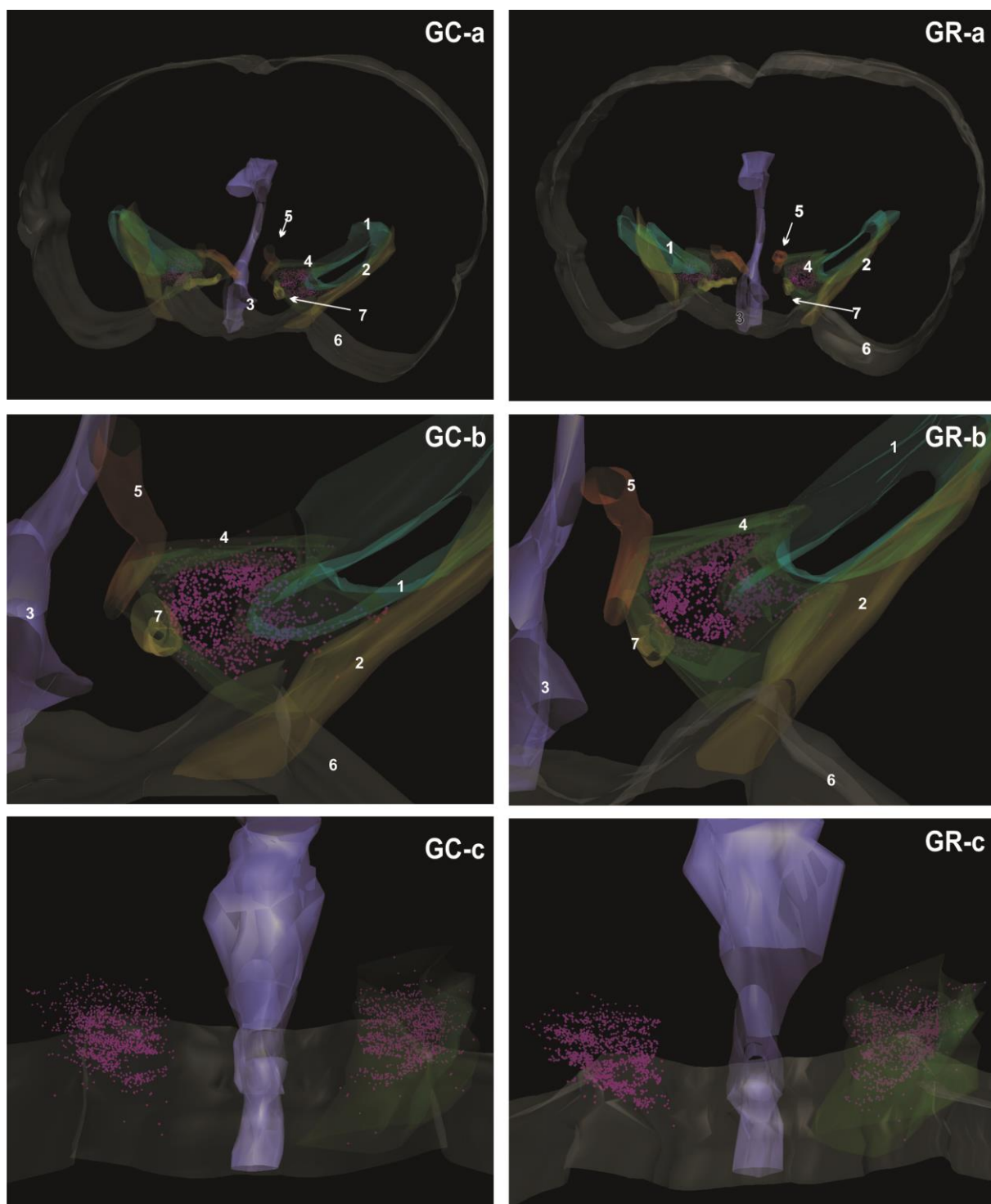


Figura 35. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH na LHA do GC50 e GR50. (A) Vista panorâmica com referências citoarquitetônicas e os neurônios MCH representados pelas esferas roxas; (B) detalhe frontal da LHA, destacando estruturas citoarquitetônicas de referência para sua delimitação; (C) vista dorsal do modelo 3D, na qual é possível observar a distribuição dos neurônios MCH ao longo do eixo rostro-caudal. 1, ic; 2, opt; 3, 3V; 4, LHA; 5, mt; 6, superfície do encéfalo; 7, f. Veja arquivos dos modelos interativos GC50 MCH.pdf e GR50 MCH.pdf. A barra de calibração no modelo vale 500µm.

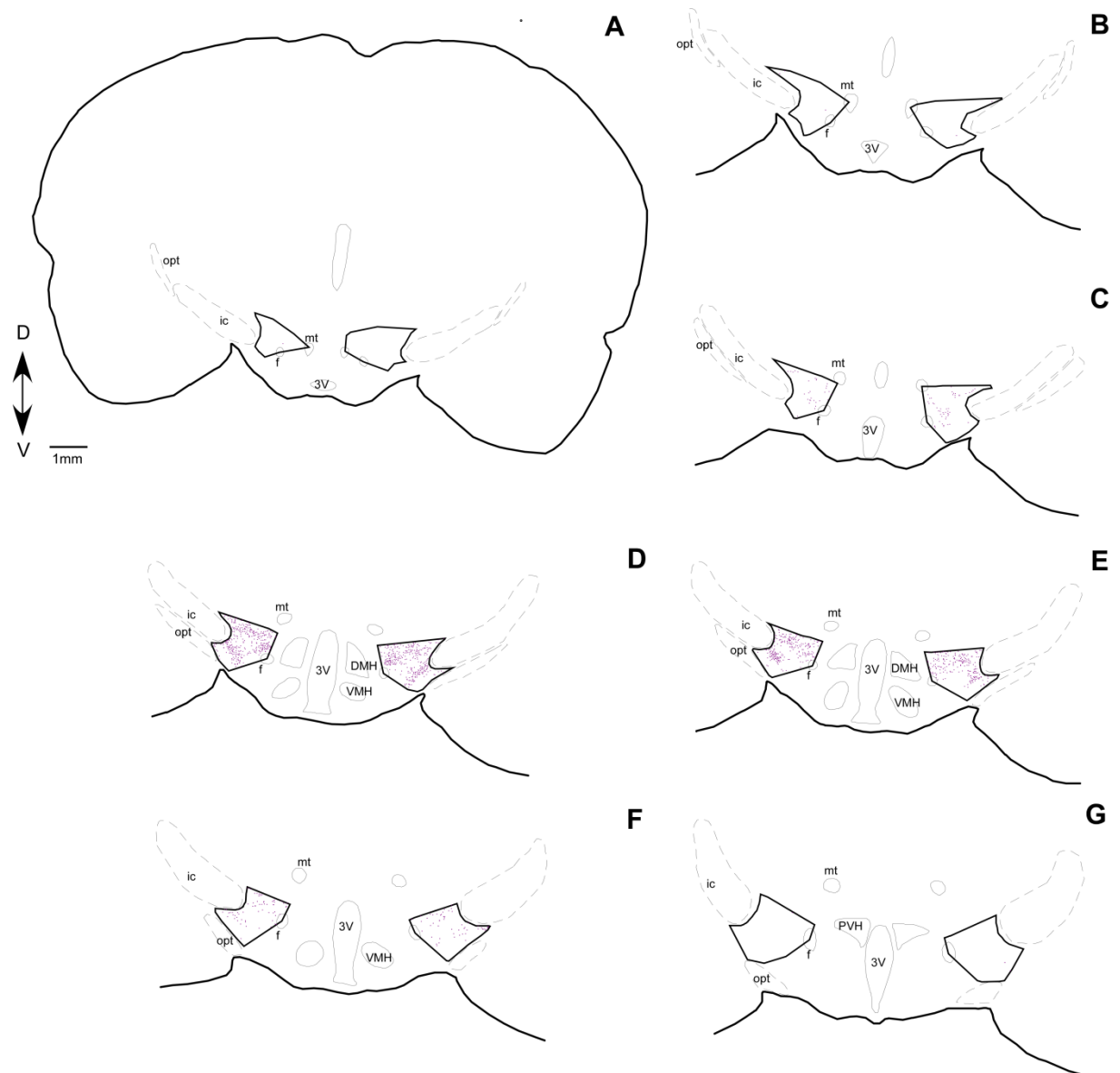


Figura 36. Mapeamento dos neurônios MCH da LHA (esferas roxas) do GC50. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entra as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

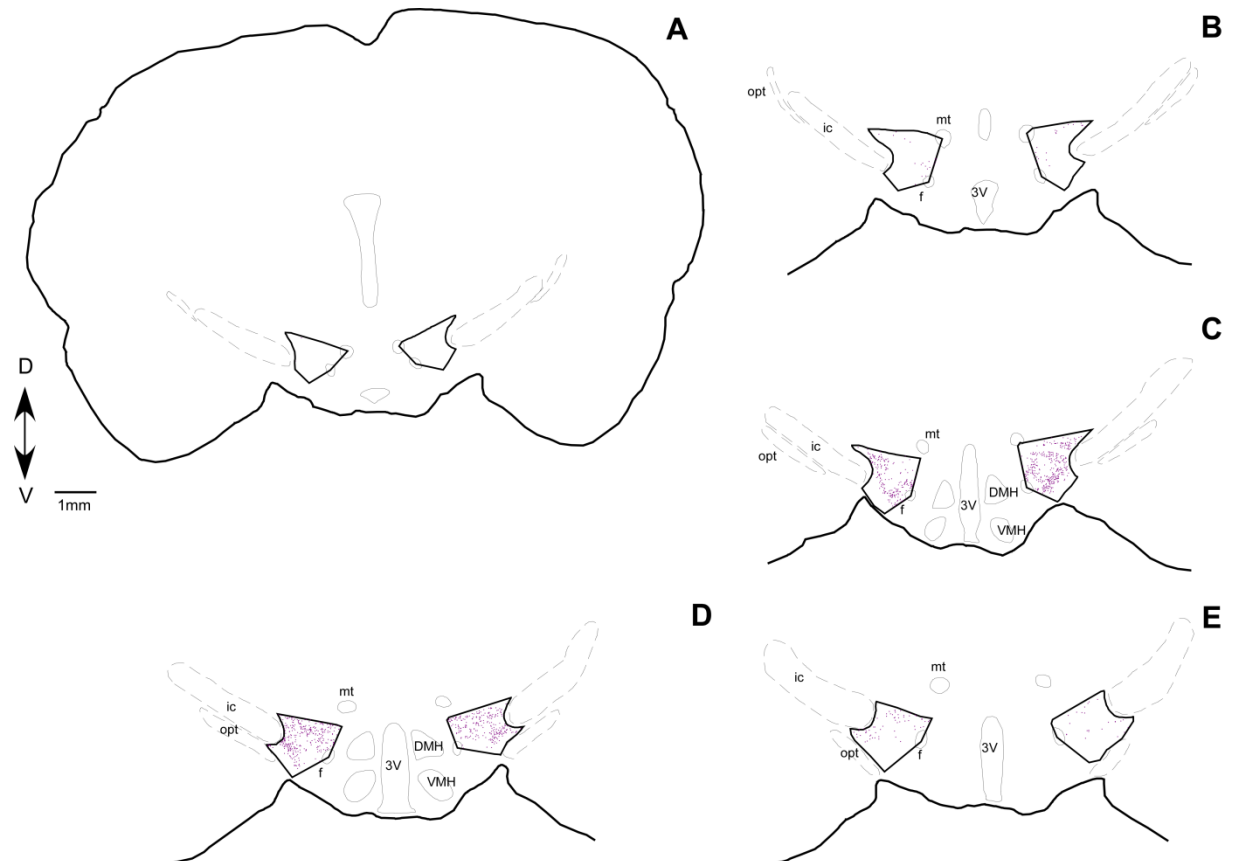


Figura 37. Mapeamento dos neurônios MCH da LHA (esferas roxas) do GR50. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

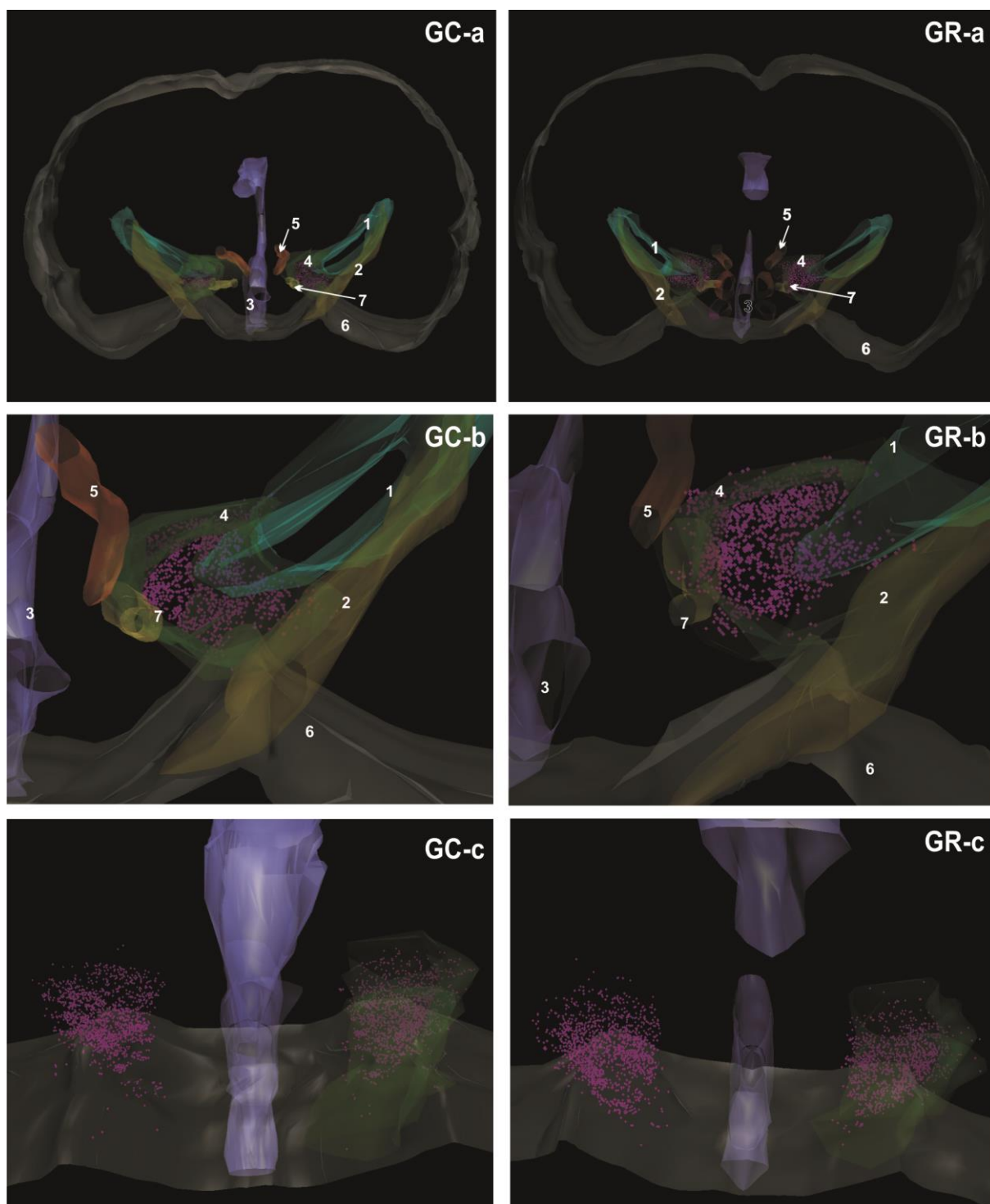


Figura 38. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH na LHA do GC90 e GR90. (A) Vistas panorâmica com referências citoarquitetônicas e os neurônios MCH representados pelas esferas roxas; (B) detalhe frontal da LHA, destacando estruturas citoarquitetônicas de referência para sua delimitação; (C) vista dorsal do modelo 3D, na qual é possível observar a distribuição dos neurônios MCH ao longo do eixo rostro-caudal. 1, ic; 2, opt; 3, 3V; 4, LHA; 5, mt; 6, superfície do encéfalo; 7, f. Veja arquivos dos modelos interativos GC90 MCH.pdf e GR90 MCH.pdf. A barra de calibração no modelo vale 500µm.

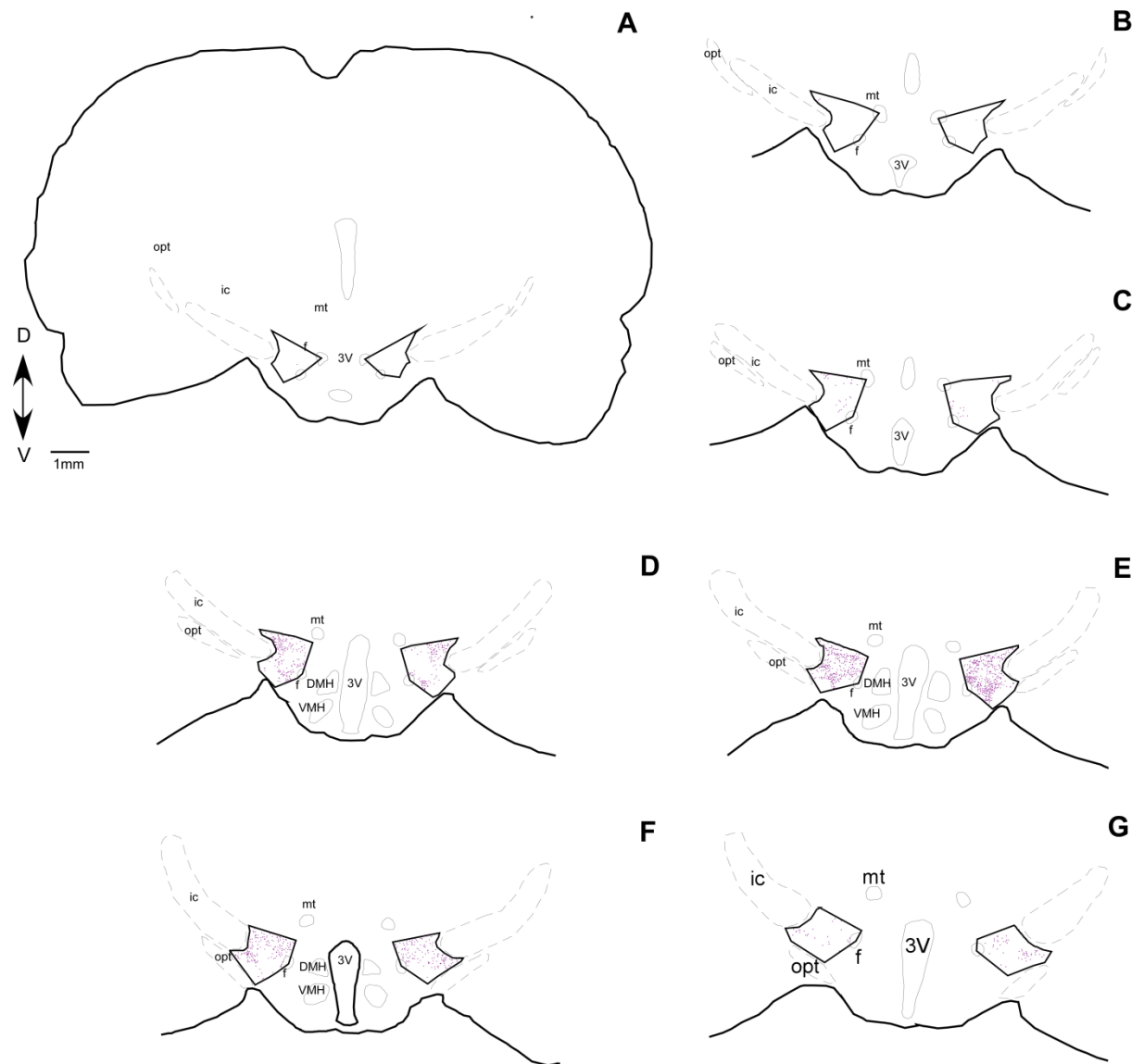


Figura 39. Mapeamento dos neurônios MCH da LHA (esferas roxas) do GC90. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (G). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

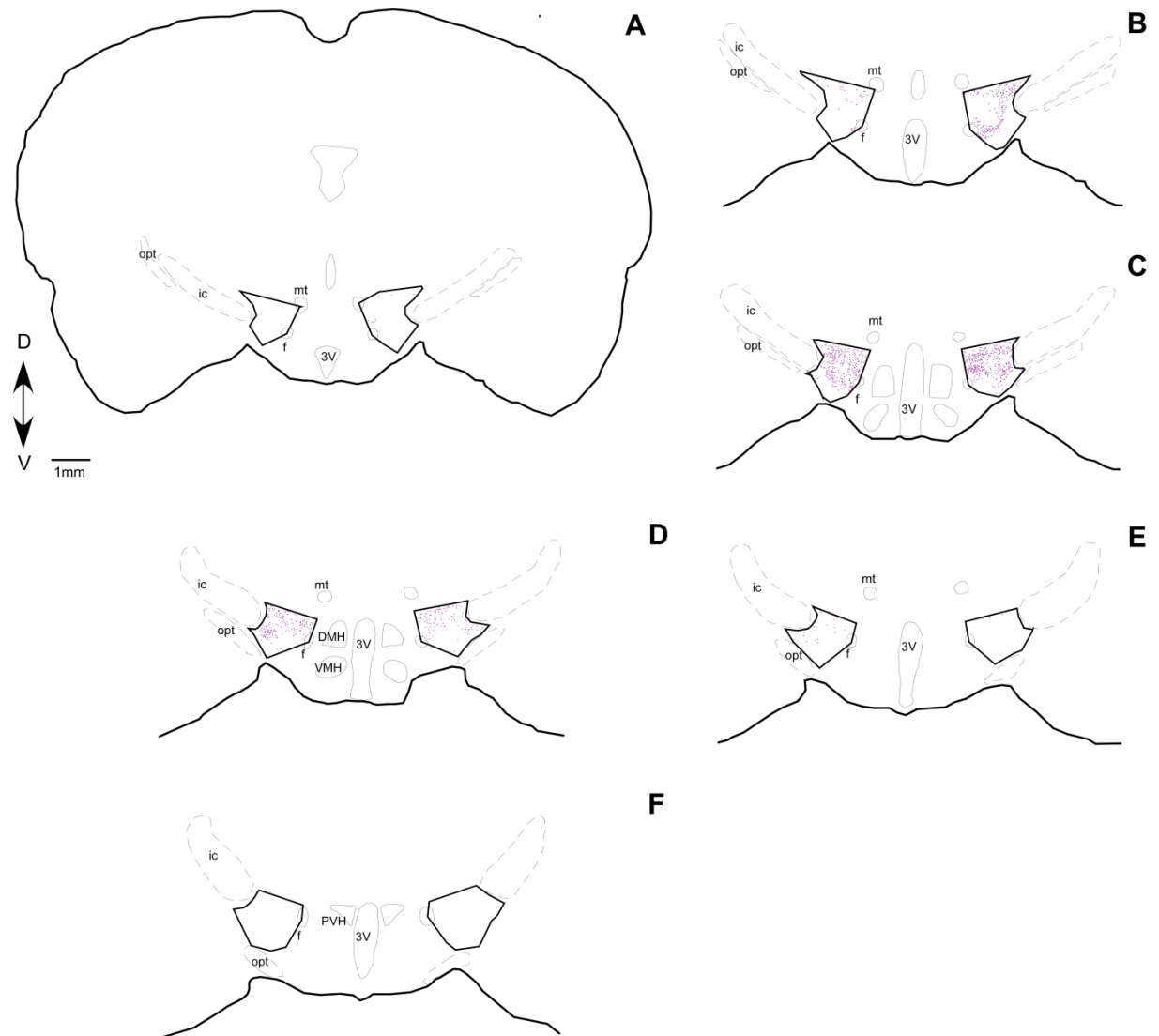


Figura 40. Mapeamento dos neurônios MCH da LHA (esferas roxas) do GR90. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (F). O intervalo entra as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

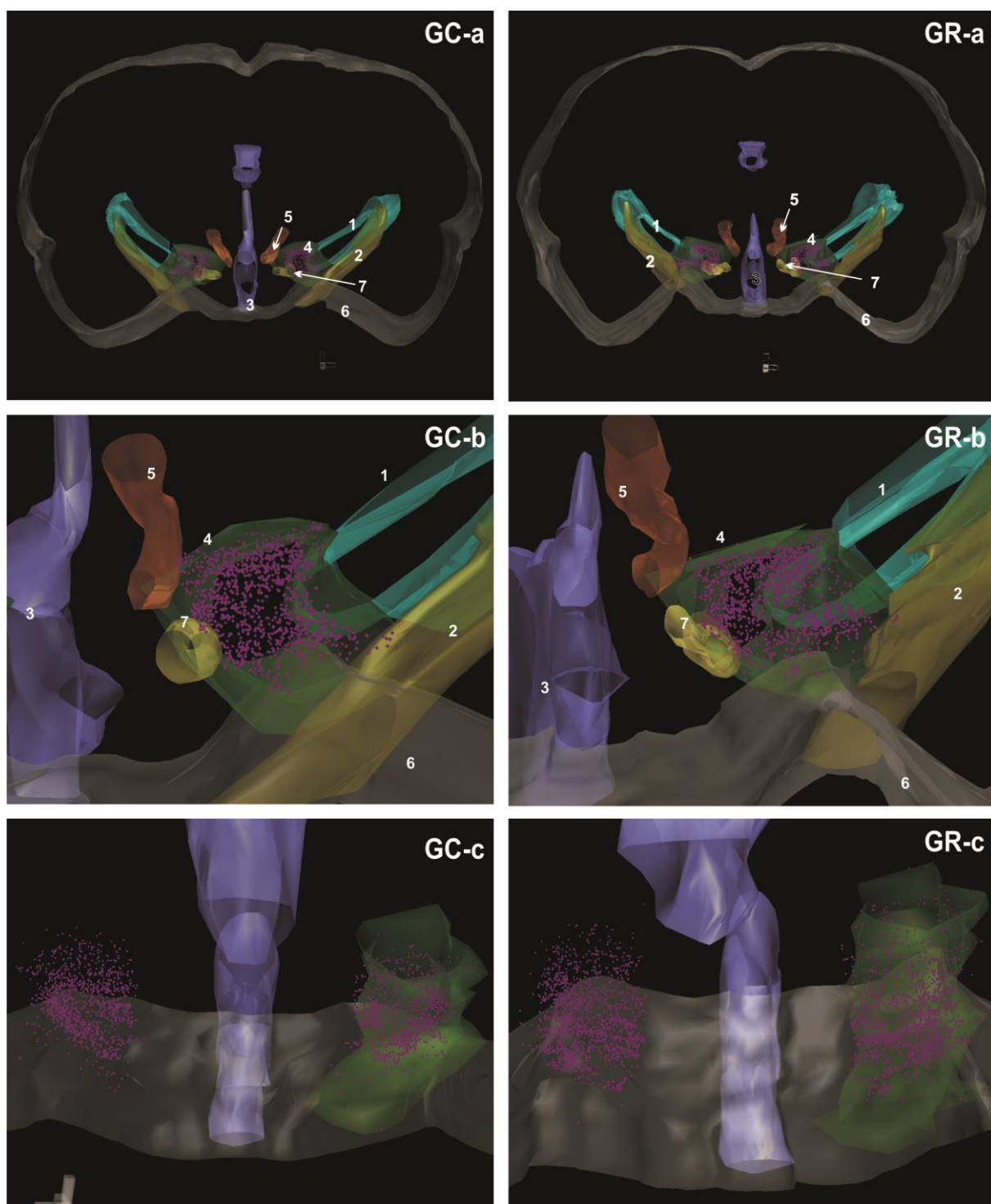


Figura 41. Reconstrução 3D do hipotálamo para estudo da distribuição dos neurônios MCH na LHA do GC540 e GR540. (A) Vistas panorâmica com referências citoarquitetônicas e os neurônios MCH representados pelas esferas roxas; (B) detalhe frontal da LHA, destacando estruturas citoarquitetônicas de referência para sua delimitação; (C) vista dorsal do modelo 3D, na qual é possível observar a distribuição dos neurônios MCH ao longo do eixo rostro-caudal. 1, ic; 2, opt; 3, 3V; 4, LHA; 5, mt; 6, superfície do encéfalo; 7, f. Veja arquivos dos modelos interativos GC540 MCH.pdf e GR540 MCH.pdf. A barra de calibração no modelo vale 500µm.

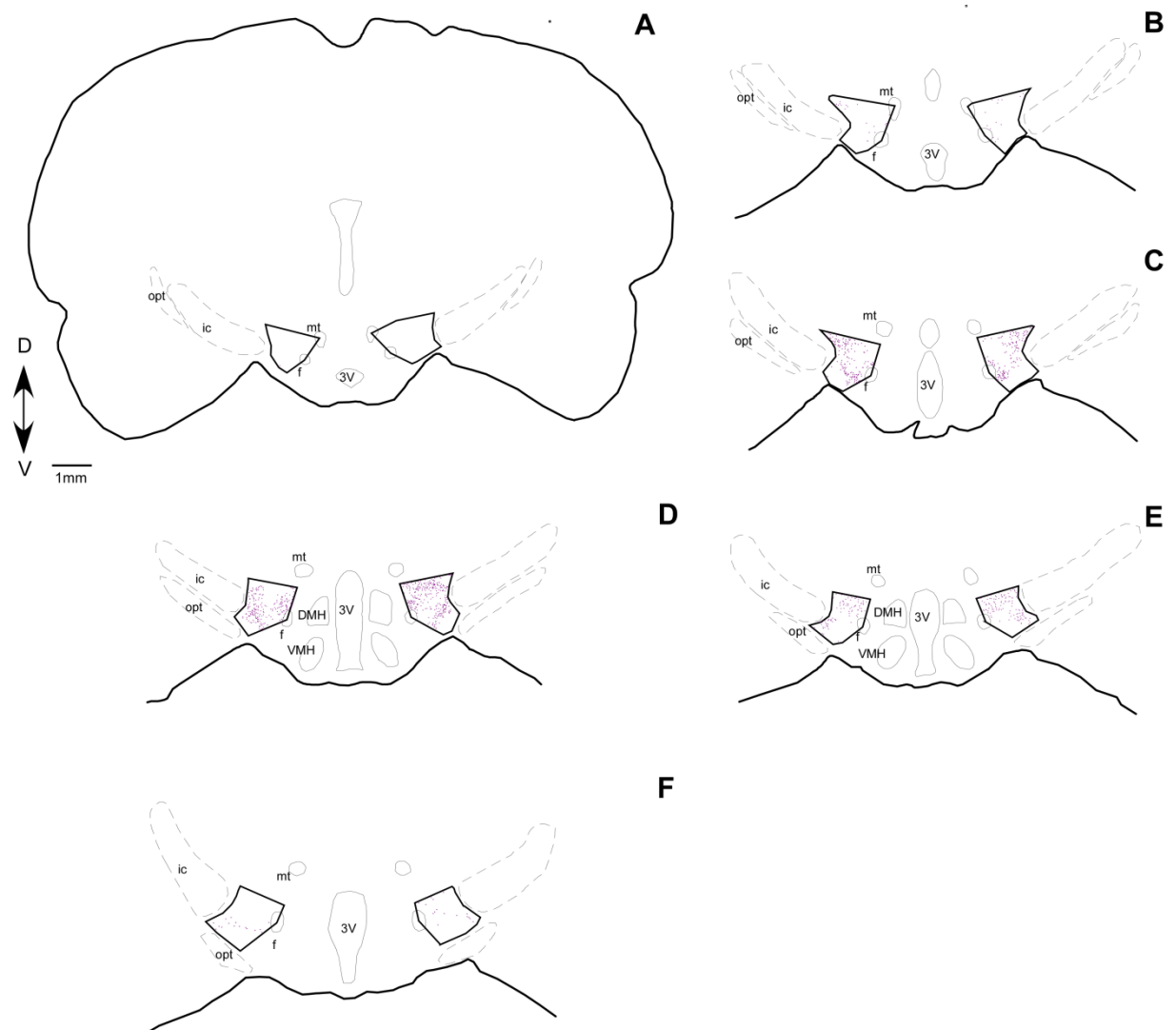


Figura 42. Mapeamento dos neurônios MCH da LHA (esferas roxas) do GC540. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (F). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

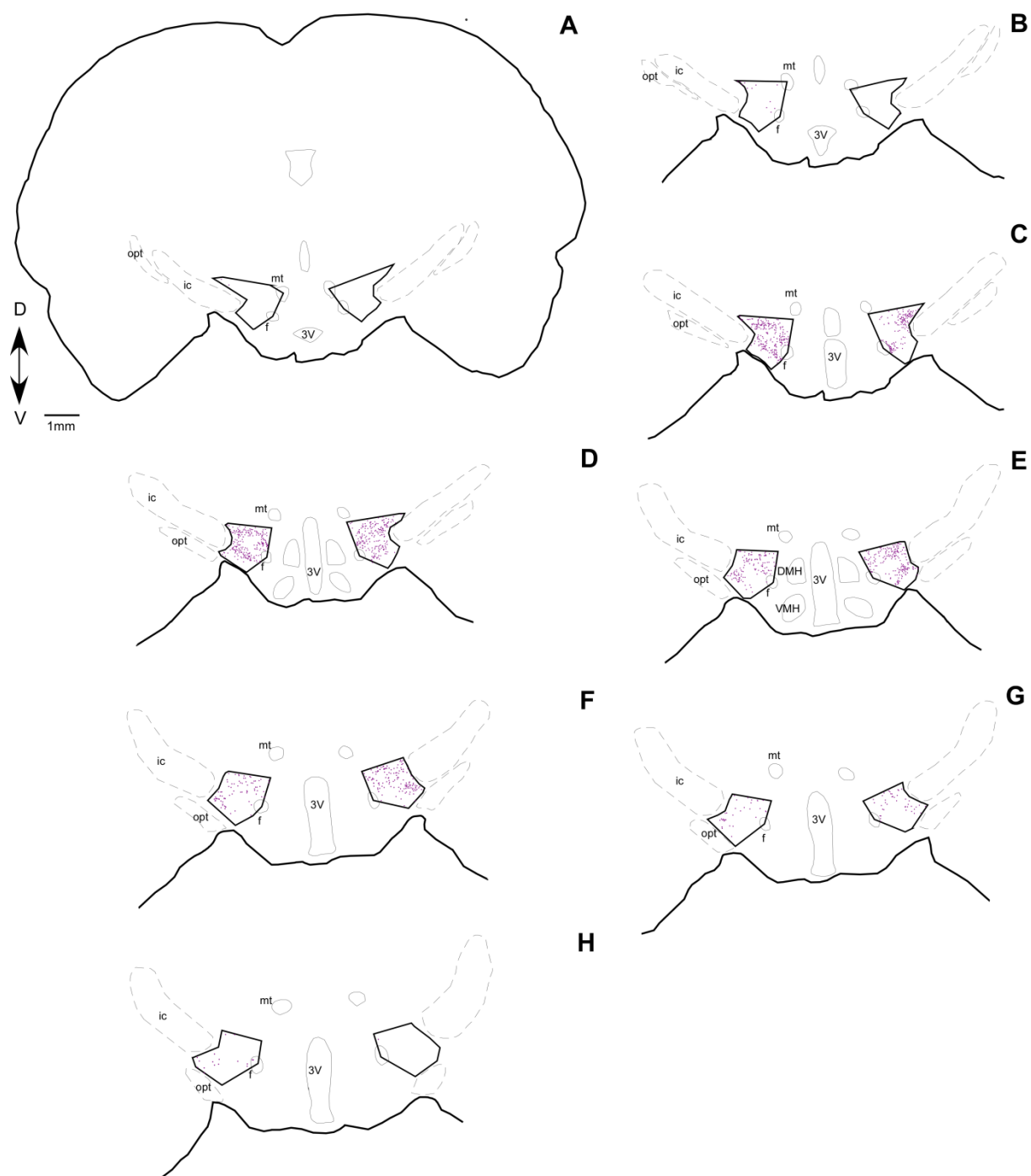


Figura 43. Mapeamento dos neurônios MCH da LHA (esferas roxas) do GR540. Os esquemas representam secções coronais do hipotálamo orientadas de caudal (A) para rostral (H). O intervalo entre as secções é de 400 μ m, a barra de calibração e as setas de orientação em A são válidas para todos os esquemas. Para as abreviaturas, consultar lista de abreviaturas.

6.3 Experimento II

Todos os grupos etários (21, 28, 50, 90 e 540 dias) foram processados segundo protocolo para microscopia eletrônica de transmissão e analisados tanto para CART quanto para MCH.

A ultraestrutura dos neurônios CART e MCH foi compatível com neurônios diferenciados em todas as idades analisadas, sem alterações marcantes entre GC e GR (Figuras 44 a 53). Assim, não foram observadas alterações ultraestruturais dos neurônios CART e MCH, provocadas pela restrição alimentar materna.

Em ambos os grupos experimentais, os neurônios CART e MCH apresentaram ultraestrutura típica de neurônios peptidérgicos, com núcleos apresentando cromatina descondensada com profundas invaginações da membrana nuclear e nucléolo evidente, além de citoplasma abundante com grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, poliribossomas livres e numerosos complexos de Golgi.

A imunorreatividade para esses dois neuropeptídeos foi observada nas vesículas arredondadas e achatadas do complexo de Golgi, contendo vesículas de grânulos densos maduras e imaturas, principalmente em sua face *trans*. Além disso, estruturas denominadas corpos multivesiculares, próximas ao complexo de Golgi, também apresentaram marcação positiva para ambos os neuropeptídeos. Imunorreatividade para CART e MCH também foi observada no retículo endoplasmático rugoso, que apresentou organização preservada de suas cisternas, e em grande quantidade de ribossomos livres distribuídos pelo citoplasma celular.

Quando analisamos a ultraestrutura dos neurônios CART e MCH ao longo do tempo, em ambos os grupos, a presença de grânulos de lipofucsina foi uma característica marcante encontrada no citoplasma dos neurônios no DPN 540 (GC ou GR), ausente nas demais idades (Figuras 48 e 53).

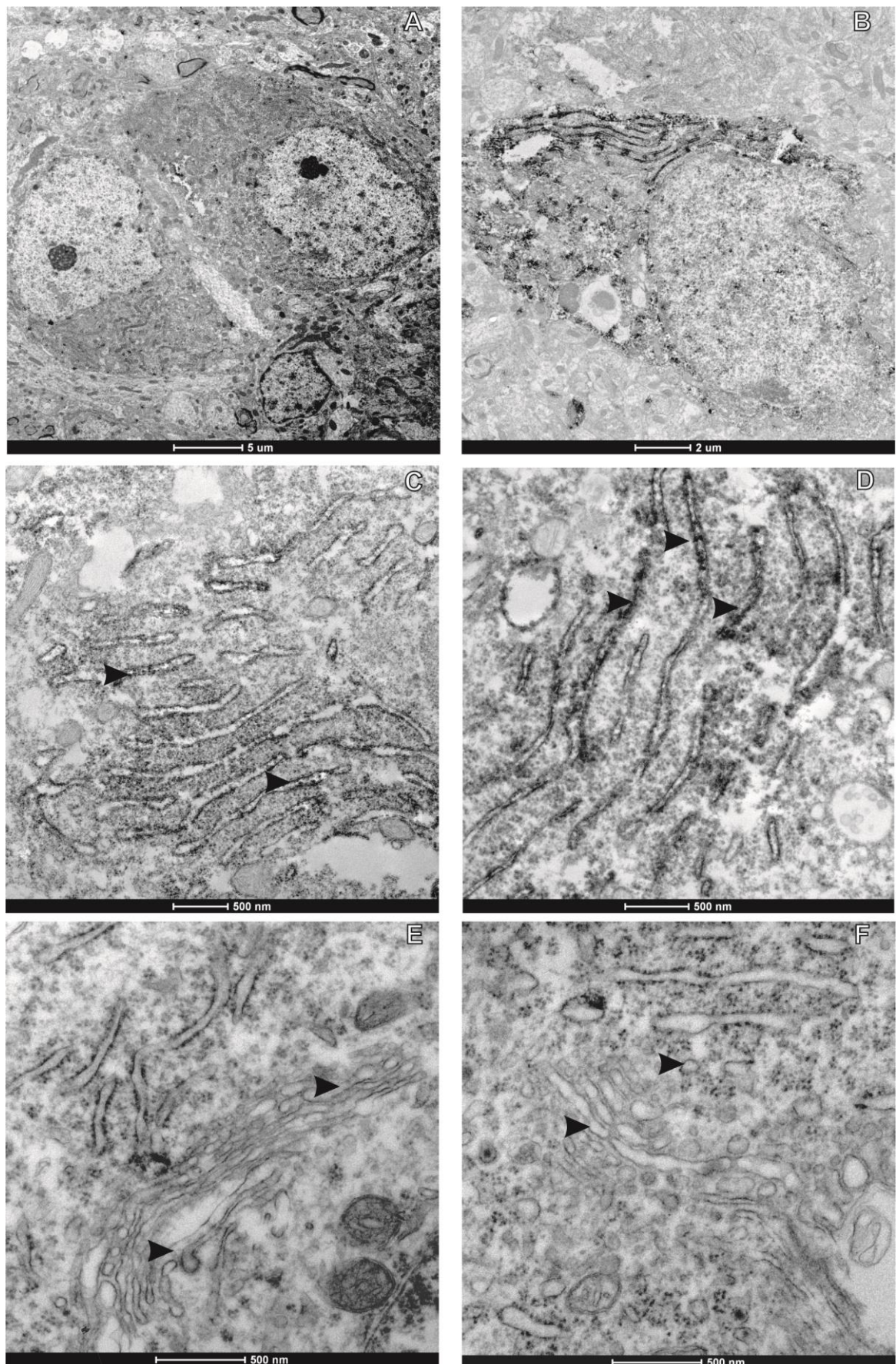


Figura 44. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC21(A, C e E) e GR21(B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio CART em menor aumento; (C e D) detalhe do retículo endoplasmático rugoso com regiões elétron-densas resultantes do processamento imuno-histoquímico (cabeça de seta); (E e F) detalhe do complexo de Golgi com cisternas e vesículas elétron-densas (cabeça de seta).

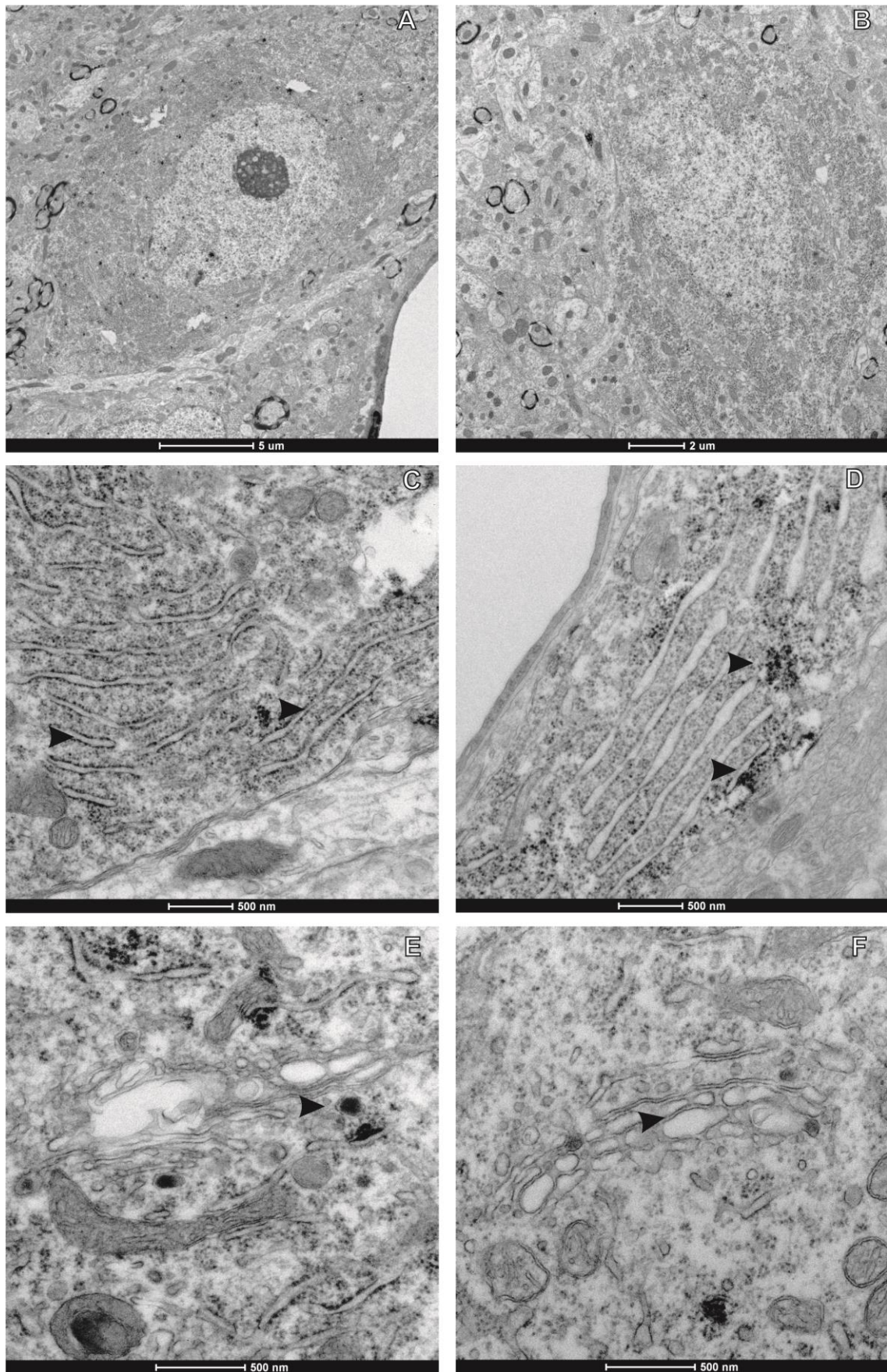


Figura 45. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC28 (A, C e E) e GR28 (B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio CART em menor aumento; (C e D) detalhe do retículo endoplasmático rugoso com regiões elétron-densas resultantes do processamento imuno-histoquímico (cabeça de seta); (E) detalhe do complexo de Golgi com cisternas e vesículas elétron-densas (cabeça de seta); (F) detalhe do complexo de Golgi com vesículas achatadas elétron-densas (cabeça de seta).

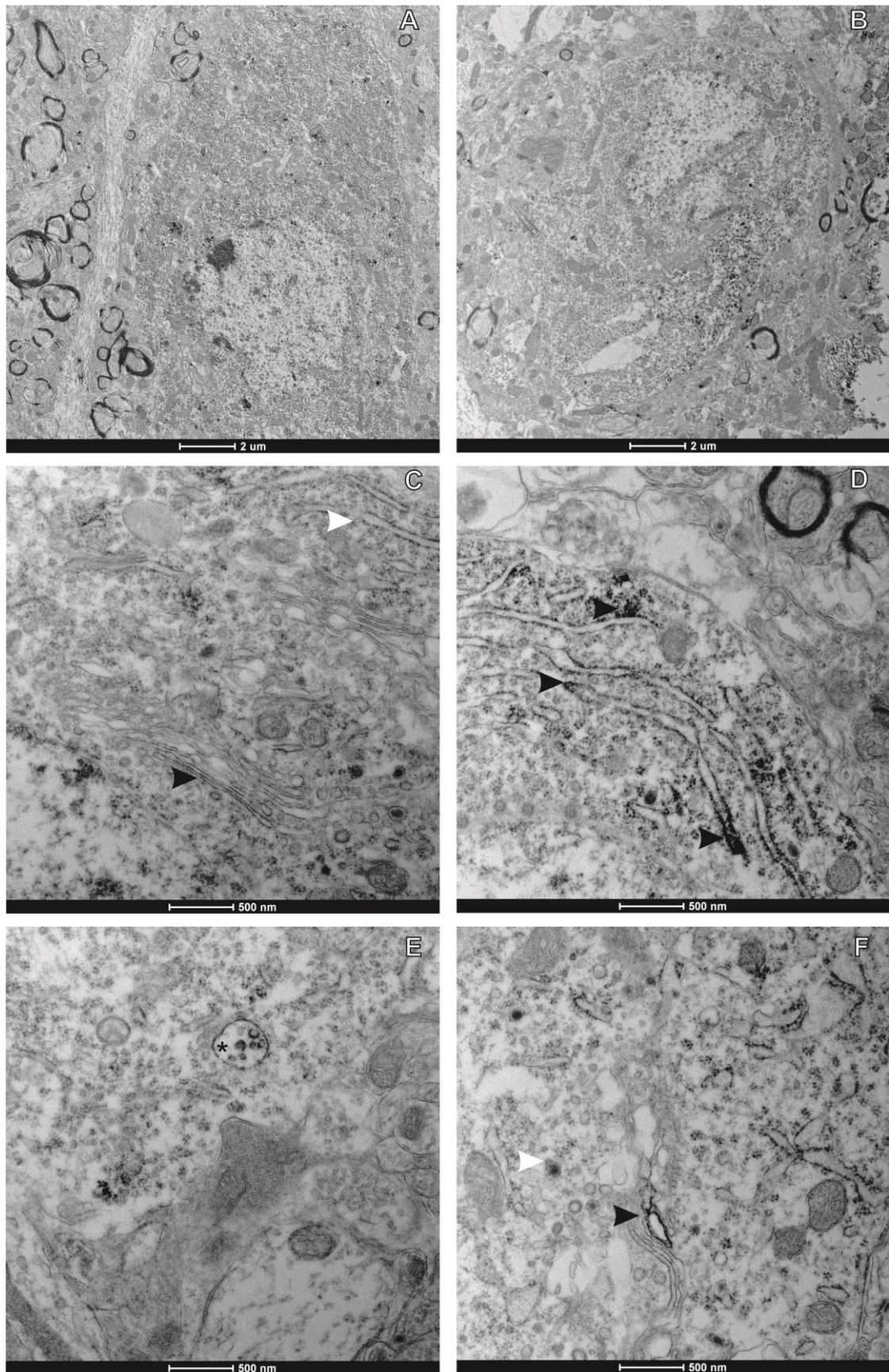


Figura 46. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC50 (A, C e E) e GR50 (B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio CART em menor aumento; (C) complexo de Golgi com destaque para vesículas achatadas (cabeça de seta preta) e retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta branca); (D) retículo endoplasmático rugoso com regiões elétrondensas (cabeça de seta); (E) corpo multivesicular positivo (*); (F) complexo de Golgi com destaque para vesículas achatadas (cabeça de seta preta) e de núcleo denso (cabeça de seta branca).

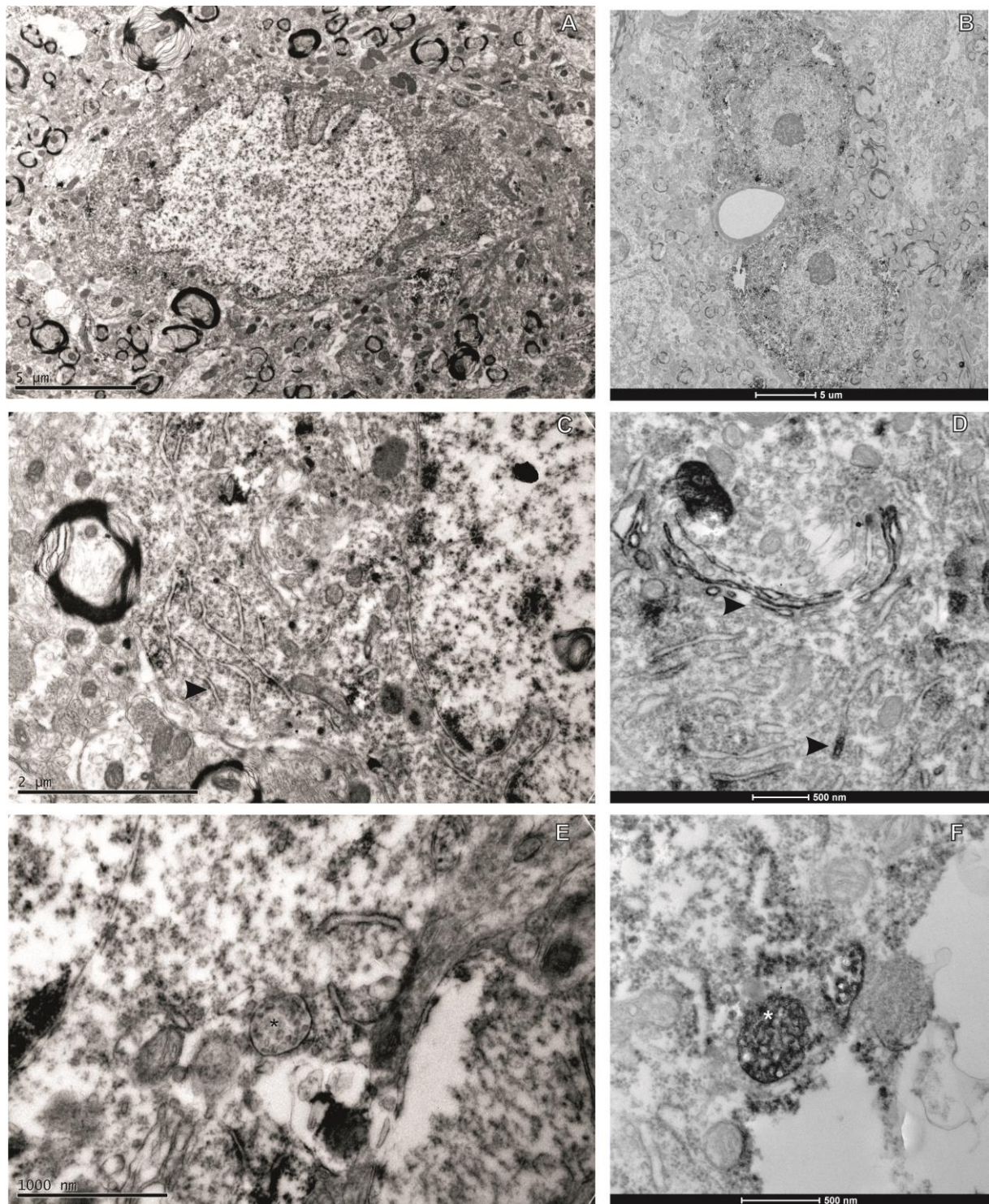


Figura 47. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC90 (A, C e E) e GR90 (B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio CART em menor aumento; (C) retículo endoplasmático rugoso com regiões elétrons-densas; (D) complexo de Golgi com destaque para vesículas achatadas; (E e F) corpo multivesicular.

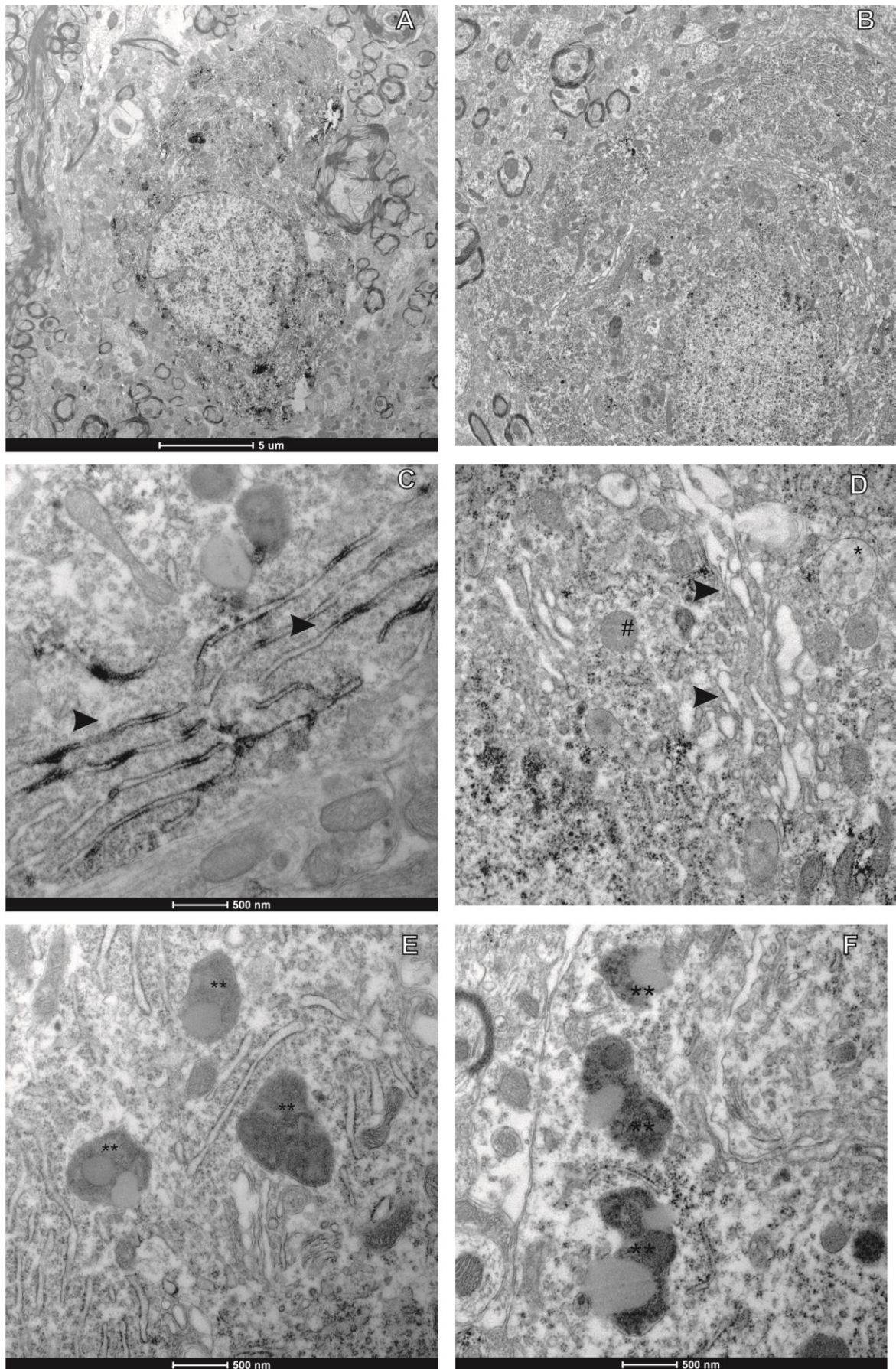


Figura 48. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios CART da LHA do GC540 (A, C e E) e GR540 (B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio CART em menor aumento; (C) retículo endoplasmático rugoso com regiões elétron-densas (cabeça de seta) (D) complexo de Golgi com destaque para vesículas achatadas e arredondadas (cabeça de seta) e inclusões fibrilares (#); (E e F) grânulos de lipofuscina (**).

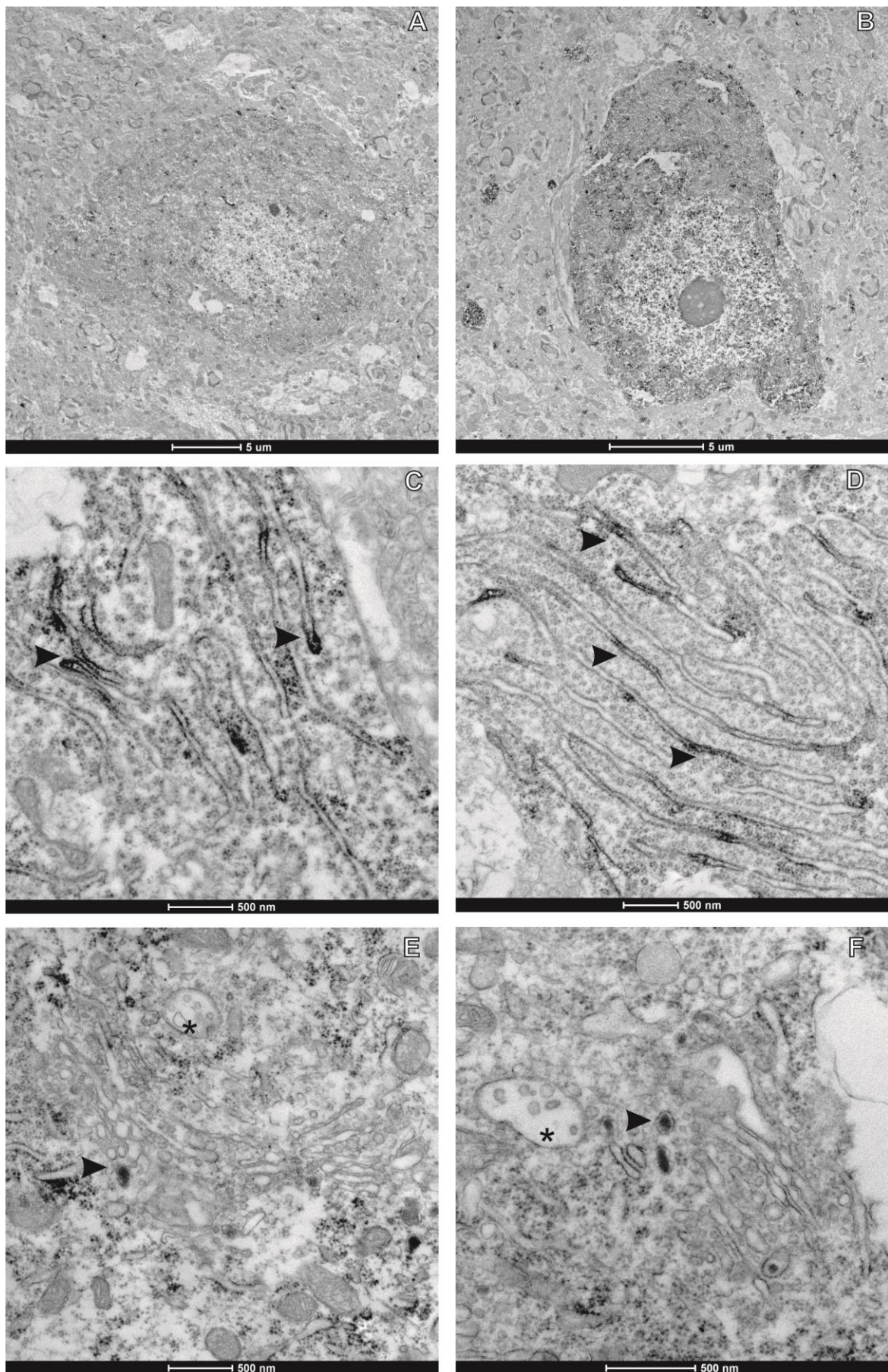


Figura 49. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC21(A, C e E) e GR21(B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio MCH em menor aumento; (C e D) detalhe do retículo endoplasmático rugoso com regiões elétron-densas resultantes do processamento imuno-histoquímico (cabeça de seta); (E e F) detalhe do complexo de Golgi com cisternas e vesículas elétron-densas (cabeça de seta).

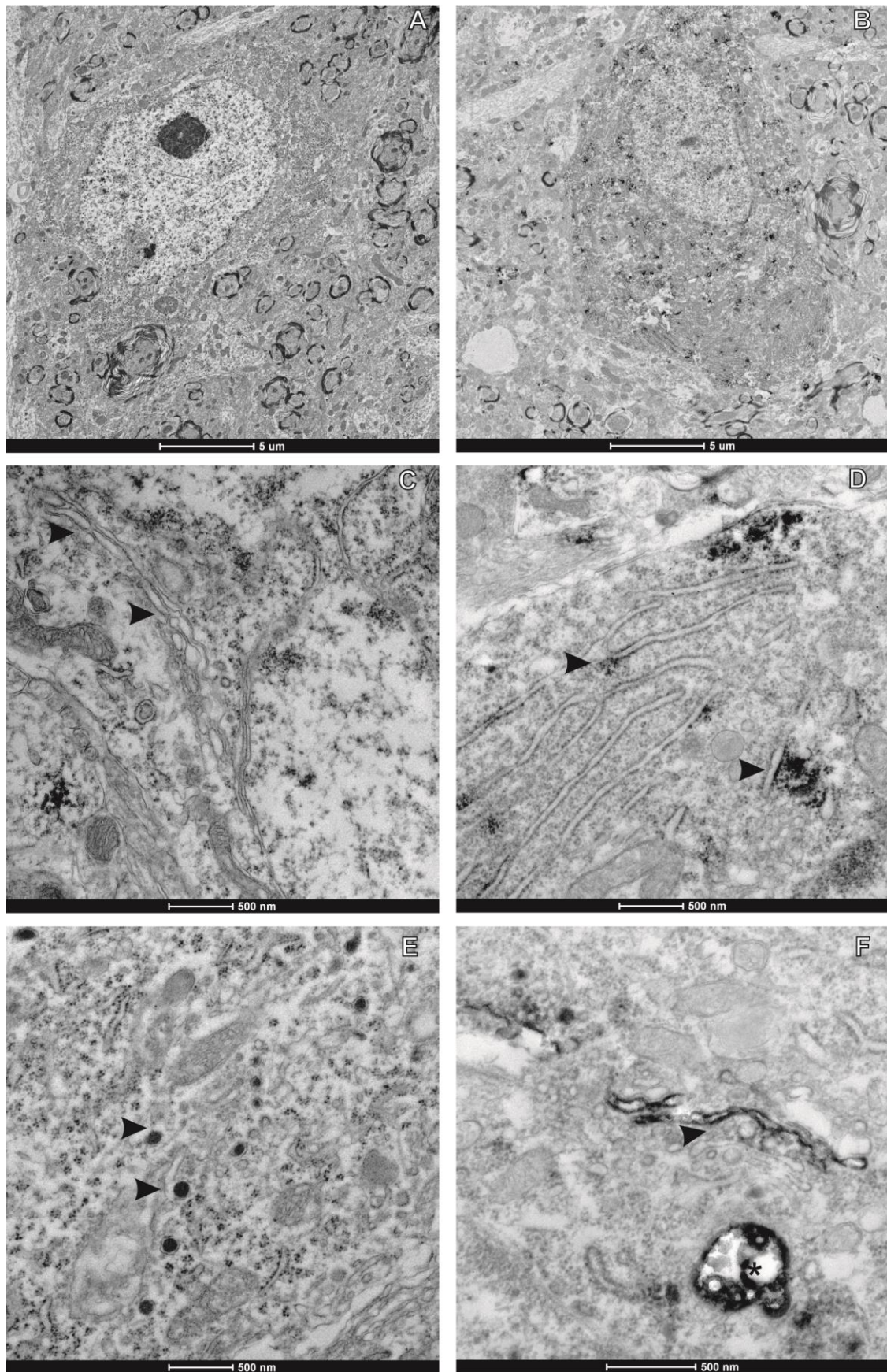


Figura 50. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC28 (A, C e E) e GR28 (B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio MCH em menor aumento; (C) detalhe do complexo de Golgi com vesículas achatadas marcadas (cabeça de seta); (D) detalhe do retículo endoplasmático rugoso com regiões elétron-densas resultantes do processamento imuno-histoquímico (cabeça de seta); (E) detalhe do complexo de Golgi com cisternas e vesículas elétron-densas (cabeça de seta); (F) detalhe do complexo de Golgi com vesículas achatadas marcadas (cabeça de seta) e o corpo multivesicular (*).

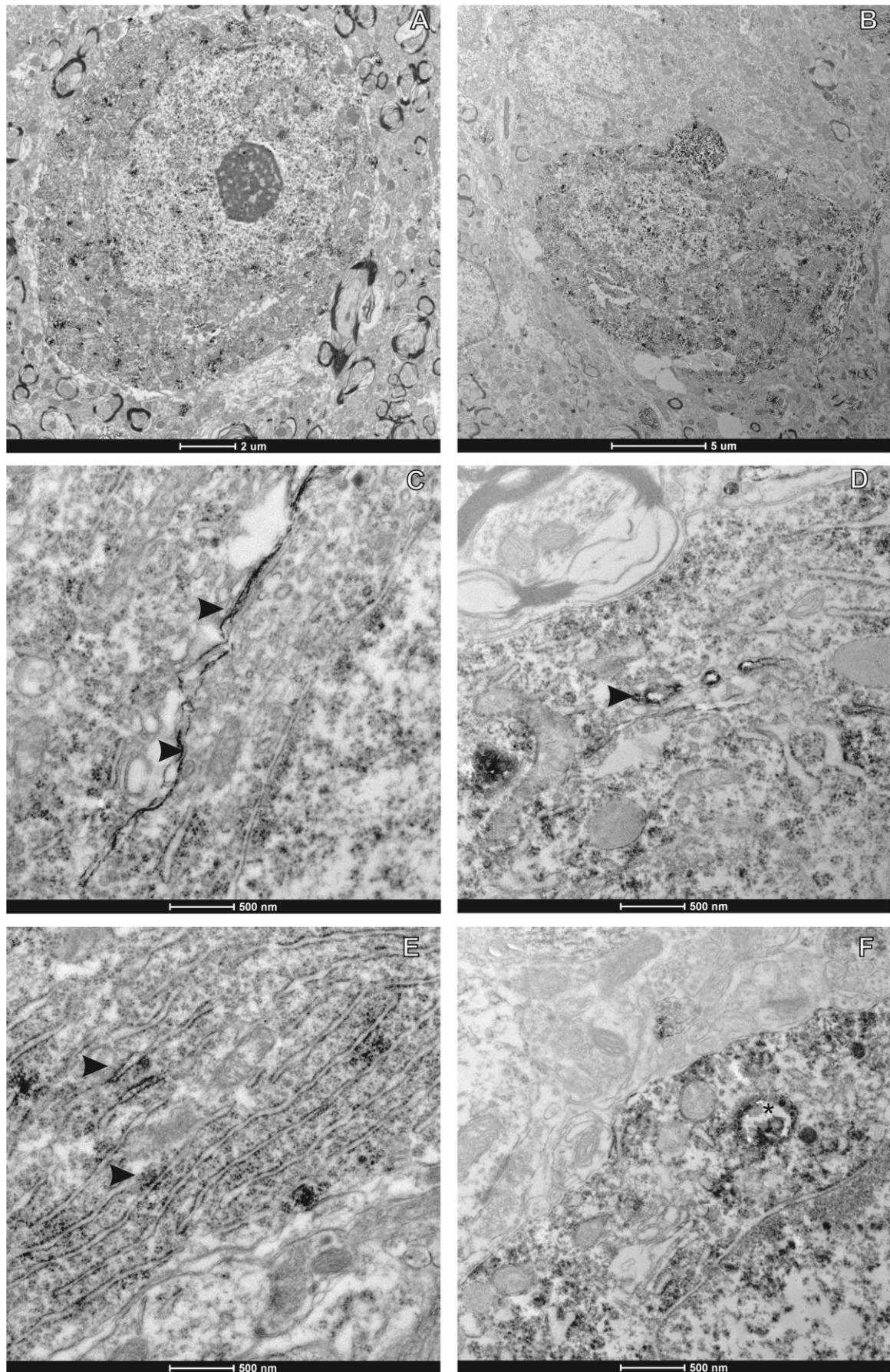


Figura 51. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC50 (A, C e E) e GR50 (B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio MCH em menor aumento; (C e D) detalhe do complexo de Golgi com vesículas achatadas marcadas (cabeça de seta); (E) detalhe do retículo endoplasmático rugoso com regiões elétron-densas (cabeça de seta); (F) detalhe do corpo multivesicular (*).

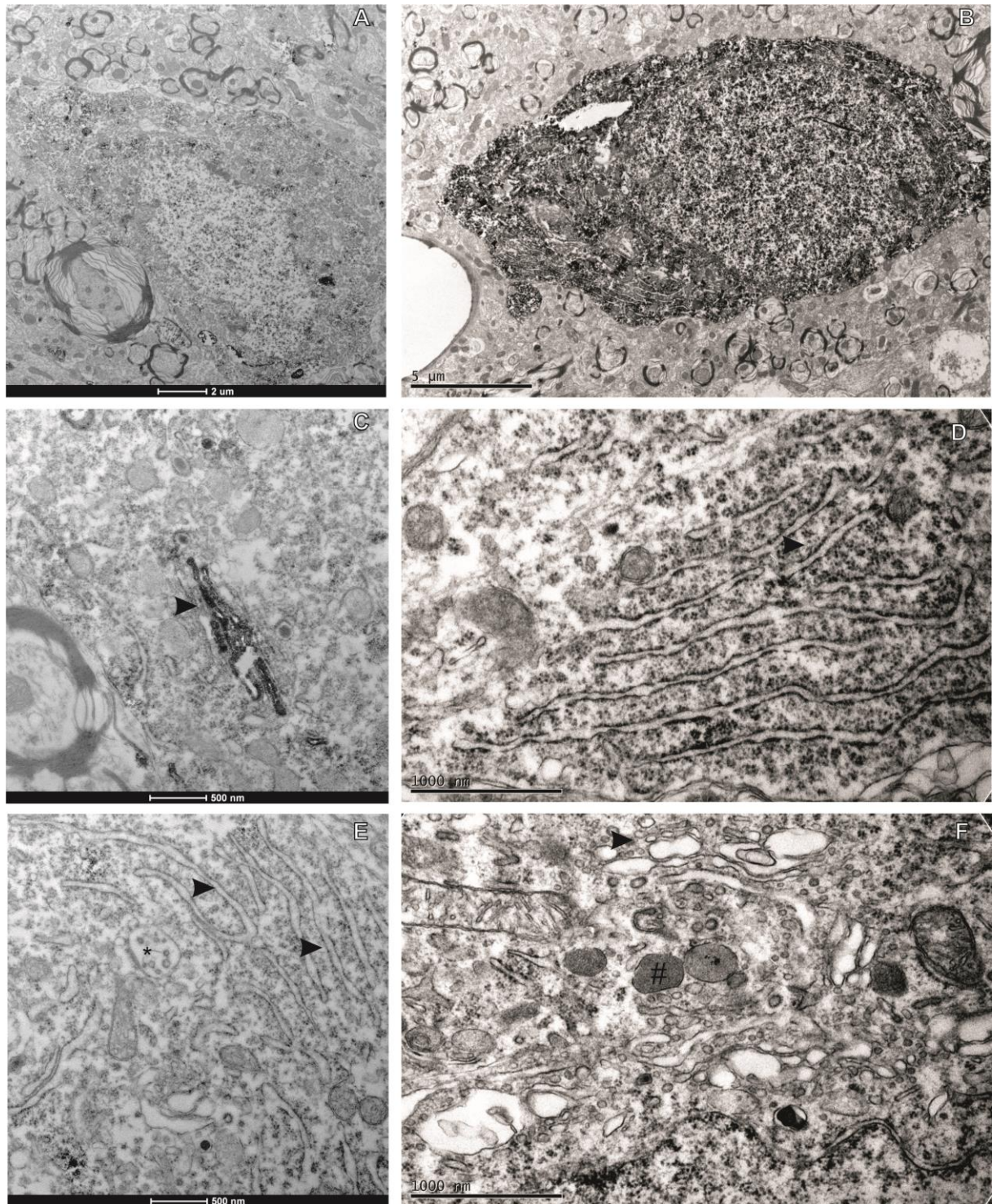


Figura 52. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC90 (A, C e E) e GR90 (B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio MCH em menor aumento; (C) detalhe do complexo de Golgi com vesículas achatadas marcadas (cabeça de seta); (D) detalhe do retículo endoplasmático rugoso com regiões elétron-densas (cabeça de seta); (E) retículo endoplasmático rugoso com regiões elétron-densas; (F) complexo de Golgi com vesículas achatadas marcadas (cabeça de seta) e inclusões fibrilares (#).

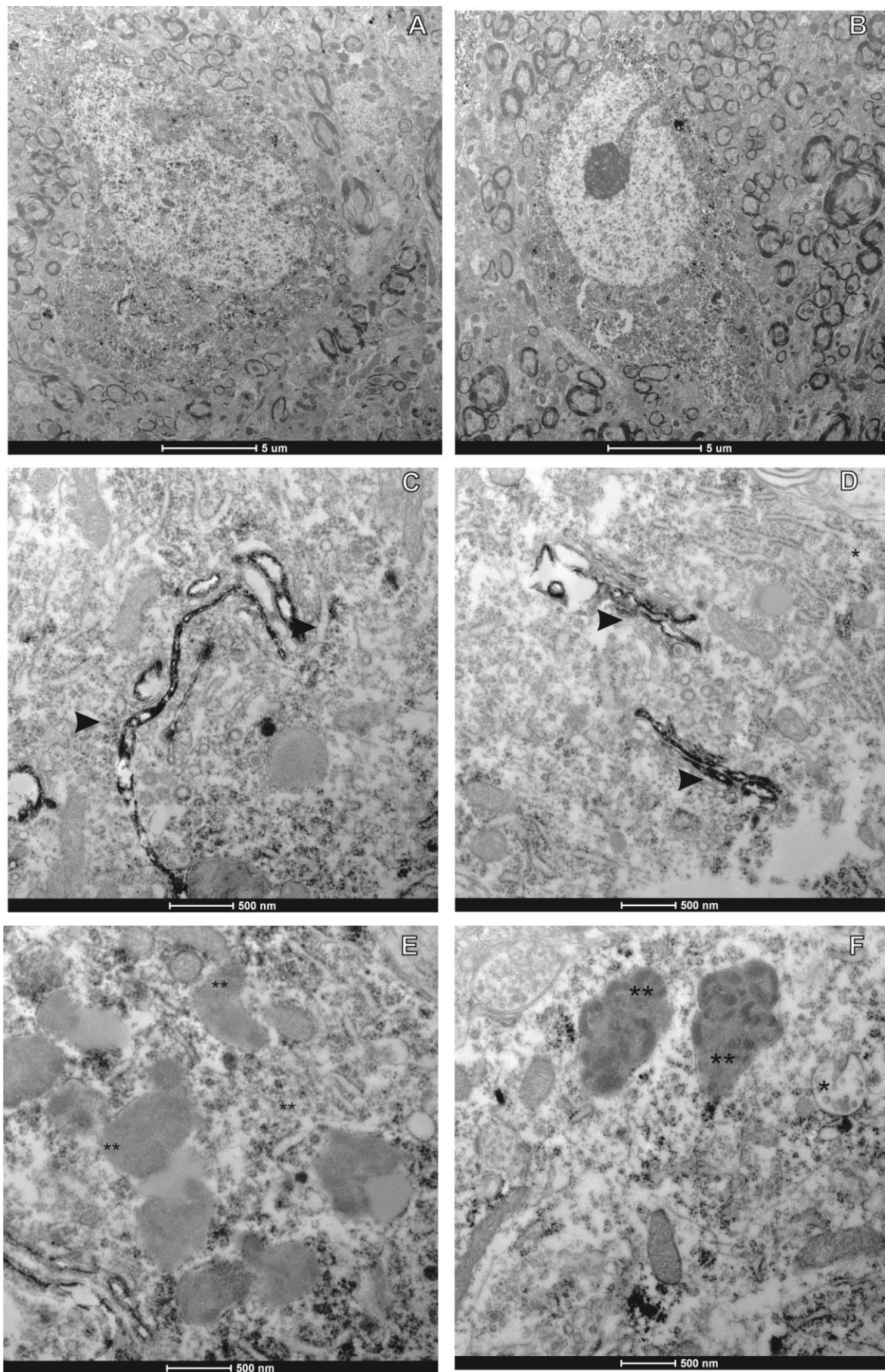


Figura 53. Eletromicrografias da ultraestrutura dos neurônios MCH da LHA do GC540 (A, C e E) e GR540 (B, D e F). (A e B) Corpo celular de um neurônio MCH em menor aumento; (C e D) detalhe do complexo de Golgi com vesículas achatadas marcadas (cabeça de seta); (E e F) grânulos de lipofuscina (**).

7 DISCUSSÃO

7.1 Parâmetros biométricos

Os dados biométricos e metabólicos obtidos indicam que a restrição calórica materna de 50%, durante a prenhez e lactação, provoca modificações na estrutura corporal dos descendentes que são permanentes, não havendo recuperação desse fenótipo. Além disso, a taxa de ingestão alimentar desses animais é maior ao longo de todo período, sem alterações importantes no metabolismo de glicose.

A ingestão alimentar durante a prenhez e lactação das mães do GC e, conseqüentemente, do GR refletiu o padrão esperado para esses períodos. Durante a prenhez, a ingestão alimentar materna aumenta progressivamente; mas, na lactação, esse aumento é acentuado, para suportar as necessidades energéticas da prole (WOODSIDE et al., 2012).

Entretanto, as curvas de peso corporal não foram semelhantes entre os dois grupos experimentais, visto que a partir do 8º dia de prenhez, as mães do GR já apresentaram menor peso corporal do que GC, fato que mostra o efeito precoce da restrição calórica. O mesmo efeito foi observado mesmo quando a restrição calórica de 50% foi iniciada mais tardiamente, como a partir do 7º dia de prenhez (ZHANG et al., 2010) o que levou a queda de peso das mães no GR a partir do 14º dia de prenhez, ou ainda quando o mesmo protocolo de restrição foi aplicado a partir do 10º dia de prenhez, o que levou as mães do GR a apresentarem menor peso a partir do 16º dia (CUNHA et al., 2015).

A ausência de diferença entre os grupos no tamanho da prole e no número de animais machos também foi observada por Breton et al. (2009) em modelo de restrição calórica mais severo (70% de restrição na prenhez). Estudos que avaliaram os efeitos da exposição à desnutrição durante o período da “Fome Holandesa” (*Dutch Famine*), concluíram que não houve redução da fertilidade de mulheres expostas à desnutrição intrauterina (LUMEY e STEIN, 1997). No entanto, quando a desnutrição ocorreu na infância, provocou alterações modestas, destacando-se um maior tempo entre o casamento e o nascimento do primeiro filho (ELIAS et al., 2005).

Assim como em nossos resultados, estudos prévios, que também empregaram restrição calórica de 50%, observaram baixo peso ao nascer, independentemente da duração e período da restrição, ou seja, prenhez, lactação ou ambas (DESAI et al., 2007a; ZHANG et al., 2010; CUNHA et al., 2015; WANG et al., 2017). Apenas um estudo com 20% de restrição durante os 12 primeiros dias de prenhez não foi capaz de provocar baixo peso da prole ao nascimento (PALOU et al., 2012).

A classificação do peso ao nascer dos filhotes machos mostrou que a maior parte dos animais do GR foi considerada pequena, corroborando os dados de peso no DPN 1 e confirmando restrição de crescimento intrauterino (RCIU) no GR. O baixo peso ao nascer da prole é uma característica importante quando se estudam os efeitos gerados por intervenções durante a prenhez e lactação, pois está associado a um maior risco no desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta, como doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e obesidade (BARKER, 2004).

O baixo peso ao nascer dos filhotes do GR, possivelmente, foi determinante para que as diferenças de peso entre os grupos persistissem ao longo de toda a vida. Tanto o peso corporal do GR quanto o comprimento foram menores do que GC em todas as idades experimentais. Mesmo quando o peso corporal foi avaliado ao longo das 74 semanas de período experimental, os animais

do GR mantiveram-se menores do que GC durante todas as semanas, sendo essa diferença mais acentuada a partir da 5ª semana pós-desmame, período que corresponde à fase de puberdade, na qual há acelerado crescimento corporal.

Esses dados concordam com estudos anteriores que utilizaram o modelo de restrição calórica de 50% durante a prenhez e lactação (DESAI et al., 2005; REMMERS et al., 2008a; ZHANG et al., 2010), com exceção de Cunha *et al.* (2015) que não observaram diferenças significativas nos pesos corporais entre os grupos experimentais. Além disso, nossos dados acrescentam informações novas a respeito dos efeitos a longo prazo da restrição alimentar materna, visto que, nos indivíduos mais velhos (540 dias), o peso corporal dos animais do GR permaneceu menor do que GC.

Os impactos da restrição calórica materna vão além da restrição de crescimento intrauterino e peso corporal. Em todas as idades avaliadas, o GR possui o encéfalo menor, em valores absolutos, do que GC; apesar disso, houve aumento da massa encefálica com tempo em ambos os grupos, indicando desenvolvimento e crescimento do órgão. Esses dados discordam dos encontrados por Wang *et al.* (2017), que não observaram diferenças nos pesos absoluto e relativo do encéfalo de neonatos, em detrimento de outros órgãos, após restrição de 50% durante a prenhez. Acreditamos que o período de restrição, que engloba prenhez e lactação, seja determinante para essa diferença entre GC e GR, especialmente em roedores, devido ao desenvolvimento pós-natal do encéfalo (RICE e BARONE, 2000).

Entretanto, o peso relativo do encéfalo é maior nos animais do GR nos DPN 21 e 28. Em modelo de restrição proteica, durante a prenhez e lactação, animais de 21 dias apresentam menor peso encefálico absoluto e maior peso relativo do que animais do GC, e, aos 11 meses de idade, a diferença no peso relativo não é mais identificada (DESAI et al., 1996), corroborando nossos dados. A partir disso, podemos inferir que o encéfalo sofre priorização em relação a outros órgãos durante o desenvolvimento, uma vez que o efeito da restrição sobre o peso corporal é mais acentuado do que o efeito sobre o peso do encéfalo, determinando o aumento peso relativo do encéfalo.

O comportamento alimentar da prole também sofreu influência da restrição alimentar materna. A curva de ingestão alimentar semanal e os dados de ingestão alimentar e ganho de peso total evidenciaram que, ao longo de todo período experimental, os animais do GR ingeriram menor quantidade de ração e ganharam menos massa corporal do que GC. Porém, quando se analisa a taxa de ingestão alimentar, ou seja, a ingestão alimentar relativa ao peso corporal, o padrão se inverte, com maior taxa de ingestão nos animais do GR. Apesar de outros estudos não terem um período experimental tão longo quanto 74 semanas, encontramos na literatura dados semelhantes aos nossos em relação à ingestão alimentar e à taxa de ingestão em animais restritos até a vida adulta (DESAI et al., 2005; DESAI et al., 2007b; BRETON et al., 2009; PALOU et al., 2012). Este parâmetro relativo de ingestão alimentar frente ao peso nos parece mais adequado para compararmos o comportamento alimentar de ambos os grupos. No entanto, não foi suficiente para determinar o catch up growth pois a eficiência alimentar e conversão energética entre os grupos foi a mesma o que inviabilizou que o ganho de peso absoluto do GR atingisse o GC.

Com a manutenção de menor peso corporal no GR em todas as faixas etárias estudadas, o fenômeno de *catch up growth* (OZANNE e HALES, 2004) não foi observado, fato ocorrido também em outros trabalhos (DESAI et al., 2005; REMMERS et al., 2008a; BRETON et al., 2009). Nossos resultados indicam que o GR apresenta menor ingestão que o GC com a mesma eficiência alimentar,

o que não torna possível a reversão do baixo peso encontrado desde o nascimento. Possíveis causas da ausência desse fenômeno são o baixo peso ao nascer, sem posterior recuperação ao longo da vida adulta; a severidade da restrição e também sua duração (prenhez e lactação). Estudos nos quais a restrição calórica foi realizada no período da prenhez, seguida de alimentação à vontade durante a lactação, observaram ganho de peso acelerado pelo GR na vida adulta e, assim, descrevem a presença de *catch up growth* (DESAI et al., 2007b; PALOU et al., 2012).

Para verificar os possíveis efeitos obesogênicos da restrição alimentar materna, duas medidas antropométricas foram utilizadas: relação peso/distância naso-anal e índice de Lee. O índice de Lee foi formulado a fim de promover uma medida antropométrica para roedor que fosse semelhante ao índice de massa corporal para o homem (LEE, 1929). Existe um debate na literatura, no qual alguns trabalhos questionam sua aplicabilidade devido à ausência de correlação desse índice com a porcentagem de gordura do animal e, ainda, sugerem a utilização da relação peso/distância naso-anal ou a fórmula do índice de massa corporal humano para roedores (STEPHENS, 1980; SIMSON e GOLD, 1982; NOVELLI et al., 2007). Entretanto, existem autores que também sugerem o índice de Lee como medida antropométrica adequada (BERNARDIS e PATTERSON, 1968).

Em nosso estudo, tanto a relação peso/distância naso-anal quanto o índice de Lee mensurados no GR foram iguais ou menores do que no GC. Assim, nenhum dos índices indicou o desenvolvimento de obesidade nos animais do GR, concordando com os dados obtidos para a gordura visceral e retroperitoneal, que foram normalizadas por esses índices.

Independentemente do índice biométrico utilizado, o GR sempre apresentou menos gordura visceral e retroperitoneal em relação ao GC, sendo essa diferença mais acentuada nos animais mais velhos. Dados na literatura mostram que, quando a restrição calórica é realizada somente durante a prenhez, animais adultos do GR tiveram valores de ambas as gorduras maiores que GC (PALOU et al., 2012) na vida adulta, ou sem diferenças para a gordura retroperitoneal (BRETON et al., 2009; GARCIA et al., 2010), diferentemente do que foi observado em nosso estudo. Assim, o período de restrição e sua duração também parecem ser determinantes para os resultados observados.

A restrição alimentar materna utilizada em nosso estudo foi suficiente para produzir efeitos agudos no metabolismo da prole, como observado pela diminuição da glicemia encontrada no GR no DPN 21. Ressalta-se que ambos os grupos experimentais, no DPN 21, não foram submetidos ao protocolo de jejum prévio à perfusão, que foi realizado para as demais idades, já que a dosagem foi feita imediatamente após o desmame. No entanto, a ausência de diferença na glicemia entre os grupos nas demais idades sugere que o animal consiga compensar normalmente o nível glicêmico, para preservação do balanço energético corretamente apesar das diferenças de peso e quantidade de gordura.

Nossos dados divergem de outros estudos que também realizaram restrição calórica de 50% durante a prenhez e lactação, nos quais o GR apresentou maior glicemia do que GC no DPN 60 e aos 9 meses de idade (DESAI et al., 2007a; CUNHA et al., 2015); porém, cabe ressaltar que ambos os trabalhos iniciaram a restrição de dieta materna a partir do 10º dia de prenhez. Já a restrição calórica durante toda a prenhez também não alterou a glicemia no GR, tanto em animais de 25 dias quanto em animais adultos (3 e 6 meses de idade) (DELAHAYE et al., 2008; BRETON et al., 2009; GARCIA et al., 2010; PALOU et al., 2012).

Um aspecto interessante do nosso trabalho foi o estudo do efeito acumulado da restrição alimentar na glicemia até os 540 dias de idade. Assim como nos DPN 28, 50 e 90, não houve diferença na glicemia dos animais idosos, demonstrando que a restrição calórica materna durante a prenhez e lactação não gerou alterações metabólicas permanentes. Nessa idade, também foram realizados os TTOG e TTI, nos quais também não observamos alterações significativas. Portanto, concluímos que nos nossos experimentos o metabolismo da glicose dos animais do GR não foi alterado pela restrição. No entanto, dados na literatura indicam que os animais do GR apresentam maior curva glicêmica que GC, em TTOG feito aos 120 dias (BRETON et al., 2009) e aos 9 meses de idade (DESAI et al., 2007a).

Um fator importante que pode influenciar a sensibilidade dos testes TTOG e TTI é a idade dos animais. Klimas (1968) analisou as curvas glicêmicas do TTOG de ratos entre 1 e 34 meses de idade, demonstrando que, a partir dos 6 meses, há uma diminuição da resposta dos animais à administração de glicose. Portanto, a semelhança das curvas glicêmicas em nosso estudo pode ser resultado da diminuição da responsividade à glicose oriunda da idade.

Assim como observado para as mensurações de glicemia, as dosagens séricas de insulina apresentaram diminuição no GR apenas no DPN 21, confirmando o efeito agudo da restrição alimentar materna no metabolismo da prole. Nossos dados concordam com os observados por Coupé et al. (2009) em modelo restrição proteica materna durante prenhez e lactação. Outro estudo com restrição calórica materna de 50% também mostrou diminuição dos níveis sanguíneos de insulina GR21, porém essa diferença se mantém em animais adultos (DESAI et al., 2007a). Já em modelo de restrição calórica mais severa (70%), os animais adultos de GR apresentaram aumento nos níveis sanguíneos de insulina em relação ao GC (BRETON et al., 2009).

A curvas dos níveis séricos de leptina, ao longo do experimento, foram semelhantes às de gordura visceral e retroperitoneal, com aumento mais expressivo aos 90 e 540 dias. No entanto, não foram encontradas diferenças estatísticas entre GC e GR nos níveis de leptina em todas as idades estudadas apesar das diferenças observadas para a quantidade de gordura.

Outros trabalhos que utilizaram restrição calórica materna de 50%, durante prenhez e lactação, também não observaram diferenças nos níveis sanguíneos de leptina a partir do DPN 30, sendo esses valores menores entre o DPN 4 e 21 (DESAI et al., 2005; DELAHAYE et al., 2008). Um aumento nos níveis de leptina foi observado nos animais adultos de GR com protocolos de restrição mais severa (BRETON et al., 2009). Por outro lado, quando a restrição calórica ocorreu no período lactação, o GR apresentou valores menores para leptina nos DPN 10, 25, 80 e 380 (REMMERS et al., 2008a).

Dessa forma, a partir de nossos dados, podemos concluir que a restrição alimentar durante a prenhez e lactação não provocou resistência à insulina ou alteração nos níveis de leptina nos descendentes, parâmetros importantes para identificar a presença de diabetes tipo 2 e obesidade nesses indivíduos, características que foram associadas ao baixo peso ao nascer em estudos anteriores (BARKER, 2004).

Portanto em nosso estudo, a restrição alimentar materna de 50%, nos períodos de prenhez e lactação, induziu programação nos animais machos da prole, e diferentemente da hipótese postulada pela teoria do “*thrifty phenotype*”, houve ajuste do metabolismo energético às necessidades do organismo, mesmo com livre acesso a oferta de alimentação equilibrada após o desmame.

7.2 Experimento I

A análise estereológica mostrou que a restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação provocou a diminuição da área e do volume da LHA nos DPN 21, 50 e 90. Esses dados concordam com o que foi observado para o peso do encéfalo, visto que os animais do GR também apresentaram menor peso absoluto do encéfalo que GC, sendo a LHA uma das regiões afetadas por esse menor crescimento. Os dados de área e volume relativos não mostraram diferenças entre GC e GR, indicando que a LHA não sofre priorização em relação a outras regiões encefálicas e tem desenvolvimento proporcional ao do encéfalo em ambos os grupos.

Em estudo utilizando restrição proteica durante prenhez e lactação, Plagemann *et al.* (2000) observaram, no DPN 20, diminuição do volume absoluto do PVH, aumento relativo do VMH e não encontraram diferenças significativas associadas à LHA, concordando com nossos dados.

A ausência de modificações no número de neurônios MCH da LHA pode estar associada ao seu papel orexígeno no comportamento alimentar e a boa adaptação desse sistema peptidérgico frente a estímulos indutores de programação durante o seu desenvolvimento. Dados em nosso laboratório já demonstraram que, em ratos controle, o número de neurônios MCH da LHA não foi alterado com processo de envelhecimento (MACHADO, 2015), assim como a restrição alimentar materna também não provocou alterações numéricas nos neurônios MCH da LHA ao longo do tempo. Da mesma forma, a exposição materna à dieta obesogênica, durante prenhez e lactação, não provocou alterações no número de neurônios MCH na LHA de primatas não-humanos adultos (TRUE *et al.*, 2018). Em conjunto estes resultados indicam que este sistema peptidérgico é bastante estável e esta estabilidade deve ser essencial para a homeostase (BITTENCOURT, 2011; DINIZ e BITTENCOURT, 2017).

Remmers *et al.* (2008b) mostraram que a restrição calórica materna durante a lactação aumenta a expressão do RNAm para MCH na LHA apenas no DPN 10, sem alterações nos DPN 25 e 380. Esses dados mostram que mesmo a expressão do MCH não é alterada pela restrição após o desmame. Apesar de não termos os dados de expressão de RNAm para o MCH em nosso estudo (experimentos em andamento, Figura 54), dados prévios do nosso grupo indicaram que para animais controle, da linhagem *Sprague Dawley*, foi observada uma diminuição significativa da expressão de RNAm do MCH a partir de 540 dias (MACHADO, 2015). Será interessante verificar se esta observação se repete na linhagem *Wistar* e os efeitos da restrição alimentar materna na expressão do RNAm do MCH no GR.

A menor quantidade de neurônios CART encontrada na LHA do GR no DPN 540 mostrou um efeito a longo prazo gerado pela restrição alimentar materna e uma maior suscetibilidade de programação dos neurônios CART comparados aos neurônios MCH. O efeito da programação ao longo da vida poderia resultar na diminuição da sinalização anorexígena no adulto senescente como estratégia de restaurar o balanço energético que, nessa idade, tende a ser negativo.

Dados na literatura já mostraram que os neurônios CART e MCH da LHA tem alta taxa co-localização (ELIAS *et al.*, 2001; JANCSEK *et al.*, 2018). A confirmação destes resultados em nossos experimentos não foi possível em vista dos anticorpos primários para o MCH e para o CART terem sido produzidos na mesma espécie de hospedeiro. Contudo, acreditamos que não houve perda neuronal no DPN 540, visto que os neurônios MCH não sofreram alteração em seu número, indicando que provavelmente houve uma diminuição na síntese de CART nessa idade. O estudo dos

níveis de expressão do RNAm do CART em nossos experimentos será interessante para contribuir na elucidação de possíveis alterações provocadas pela restrição alimentar materna.

Assim, a partir dos dados estereológicos e visando a analisar com mais detalhes essa questão, pretendemos processar secções de GC e GR segundo protocolo de hibridização *in situ* e mensurar a quantidade de RNAm para MCH e CART na LHA, com ênfase no grupo de 540 dias. O protocolo de hibridização *in situ* para MCH com sonda marcada com biotina foi recentemente padronizado após vários testes (Figura 54) e será realizado em colaboração com o Laboratório de Neuroanatomia Química do Departamento de Anatomia – ICB-USP..

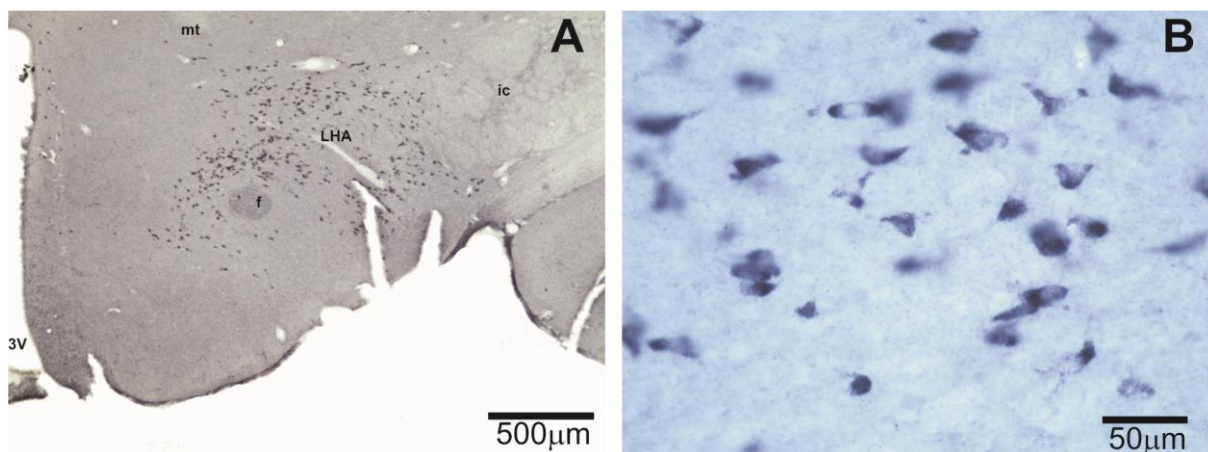


Figura 54. Fotomicrografias de neurônios MCH identificados pelo protocolo de hibridização *in situ* com sonda marcada com biotina. (A) Região tuberal da LHA. (B) Detalhe da marcação obtida com o protocolo de hibridização *in situ*.

Acreditamos que a diminuição no número de neurônios CART no GR entre os DPN 21 e 50, bem como ausência dessa diferença em GC, possa estar associada ou por um atraso no desenvolvimento do sistema CART-érgico da LHA ou por um efeito agudo da restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação. O desenvolvimento dos neurônios MCH e CART da LHA é finalizado no período pós-natal (STEININGER et al., 2004; RODRIGUES et al., 2011), e, portanto, ambos os sistemas peptidérgicos estavam em janelas vulneráveis durante o período de restrição calórica.

Além do menor número de neurônios CART da LHA do GR no DPN 540 observado pela análise estereológica, também foram observadas alterações na distribuição desses neurônios na LHA em modelo 3D. A diminuição no número de neurônios CART foi evidenciada pela menor quantidade células nas secções caudais e também na região perifornical da LHA.

Nas outras idades estudadas, a distribuição dos neurônios CART que observamos nos modelos tridimensionais concorda com a já descrita previamente (KOYLU et al., 1997). Os neurônios CART estão presentes na metade mais caudal da LHA, que corresponde às regiões mamilar e tuberal. Existe maior densidade de neurônios CART nas sub-regiões perifornical e dorsolateral da LHA, sendo que grande parte desses neurônios co-localizam com o MCH (BROBERGER, 1999; ELIAS et al., 2001; JANCSIK et al., 2018).

A restrição calórica materna durante a prenhez e lactação não alterou a distribuição dos neurônios MCH na LHA, concordando com nossos dados estereológicos. Assim como o CART, os neurônios MCH se concentram na metade mais caudal da LHA, desde níveis mais rostrais da região mamilar aos níveis mais caudais do PVH (BITTENCOURT et al., 1992; SWANSON et al., 2005; HAHN, 2010).

Na LHA, os neurônios MCH ocupam, principalmente, as sub-regiões dorsal, supraforncial e ventromedial (HAHN, 2010). Além disso, a distribuição dos neurônios MCH apresenta padrão bem preservado em vertebrados (CHOMETTON et al., 2015; DINIZ e BITTENCOURT, 2017), o que mostra mais uma vez que este sistema peptidérgico é muito constante e este pode ser um fator pelo qual não observamos alterações na distribuição dos neurônios MCH frente à restrição alimentar materna.

Não encontramos na literatura estudos que analisaram, durante o desenvolvimento pós-natal e envelhecimento, o número e distribuição de neurônios envolvidos no controle da homeostase energética, frente à exposição materna à restrição alimentar. Assim, nosso estudo é inédito e traz informações importantes dos efeitos em longo prazo na LHA dos descendentes, provocados pela restrição alimentar materna.

7.3 Experimento II

A restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação não foi capaz de promover alterações na ultraestrutura dos neurônios CART e MCH dos descendentes. Todos os grupos etários apresentaram a ultraestrutura preservada, semelhante à descrita para neurônios peptidérgicos, corroborando os dados já descritos na literatura. Os neurônios peptidérgicos foram descritos por Pickel (1985) e apresentam como características marcantes: membrana nuclear com grande quantidade de invaginações, complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvidos, e a presença de grande quantidade de vesículas de núcleo denso.

Em nível ultraestrutural, os neurônios CART já foram observados no PVH de primatas não-humanos e foram descritos com núcleo oval grande e invaginado, grande imunorreatividade no retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, podendo apresentar vesículas imunorreativas com grânulos densos (DALL VECHIA et al., 2000); além de terminais axônicos com vesículas com grânulos densos, fortemente imunorreativos (SMITH et al., 1997).

Os neurônios MCH da LHA foram descritos pela presença de membrana nuclear invaginada, retículo endoplasmático desenvolvido, com cisternas paralelas localizadas na periferia do citoplasma, complexo de Golgi com vesículas achatadas marcadas, principalmente em sua face *trans* (interna), e também pela presença de vesículas de núcleo denso (BITTENCOURT et al., 1992).

Além do que já foi descrito para a ultraestrutura dos neurônios CART e MCH, também observamos a presença de corpos multivesiculares positivos para os dois neuropeptídeos. Os corpos multivesiculares são estruturas compostas por dezenas de vesículas internas envoltas por uma membrana simples, comumente associados ao complexo de Golgi no corpo celular, e que estão envolvidos no transporte, armazenamento e secreção de proteínas (VON BARTHELD e ALTICK, 2011).

A presença de grânulos de lipofucsina no corpo celular dos neurônios CART e MCH no DPN 540 foi uma característica encontrada somente nessa faixa etária, diferenciando esses neurônios das outras faixas etárias estudadas. Os grânulos de lipofucsina são grandes aglomerados de partículas densas, envolvidos por uma membrana simples, que aumentam em quantidade com o envelhecimento (PORTA, 1991; SUGAYA et al., 2004; BAIZER et al., 2018).

Estudo feito por Castro-Chavira et al. (2015) observou que restrição materna de proteínas, durante prenhez, lactação e ao longo da vida do descendente, provocou maior densidade de corpos

multivesiculares e grânulos de lipofucsina em neurônios piramidais do hipocampo dorsal, em animais idosos (22 meses). Além disso, também foi descrita a presença de complexo de Golgi anormais e aumento da área citoplasmática desses neurônios.

Em nosso estudo, observamos a presença dos grânulos de lipofucsina nos subgrupos etários de 540 dias tanto no GC quanto no GR, mas não observamos um padrão de maior densidade de grânulos de lipofucsina. A duração e o tipo de dieta podem ser fatores determinantes para que modificações significativas nessas organelas não tenham sido observadas.

Nossos resultados mostraram que a ultraestrutura dos neurônios CART e MCH da LHA não foi afetada pela restrição alimentar materna durante prenhez e lactação, bem como acrescentam informações a respeito da descrição da organização desses neurônios ao longo do desenvolvimento e envelhecimento.

Em conjunto, nossos resultados indicaram que embora o protocolo de restrição alimentar materna empregado tenha sido capaz de induzir alterações estruturais nos parâmetros biométricos, no número e na distribuição dos neurônios CART da LHA com o envelhecimento, a ultraestrutura dos neurônios MCH e CART foi preservada ao longo do desenvolvimento pós-natal até a senescência.

8 CONCLUSÃO

A partir da análise dos nossos resultados, podemos concluir que a restrição alimentar materna durante a prenhez e lactação:

- Provocou modificações na estrutura corporal dos descendentes que são permanentes, não havendo recuperação desse fenótipo.
- Aumentou a taxa de ingestão alimentar, modificando o comportamento alimentar.
- Não alterou de forma permanente o metabolismo de glicose e os níveis de leptina.
- Diminuiu o número e modificou a distribuição de neurônios CART da LHA, sem alterações nos neurônios MCH.
- Não provocou modificações na ultraestrutura dos neurônios CART e MCH da LHA.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMOTO, S.; MIYASAKA, K. Age-associated changes of appetite-regulating peptides. **Geriatr Gerontol Int**, v. 10 Suppl 1, p. S107-19, 2010.
- ALLAËYS, I. et al. Characterization of mch-gene-overprinted-polypeptide-immunoreactive material in hypothalamus reveals an inhibitory role of pro-somatostatin1-64 on somatostatin secretion. **Eur J Neurosci**, v. 19, p. 925-36, 2004.
- ANDREOLLO, N. A. et al. Rat's age versus human's age: What is the relationship? **Arq Bras Cir Dig**, v. 25, p. 49-51, 2012.
- BAIZER, J. S. et al. Individual variability in the structural properties of neurons in the human inferior olive. **Brain Struct Funct**, v. 223, p. 1667-1681, 2018.
- BARKER, D. J. The developmental origins of chronic adult disease. **Acta Paediatr Suppl**, v. 93, p. 26-33, 2004.
- BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: Neuroanatomy, body weight regulation, neuroendocrinology and metabolism. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 141-193, 1993.
- BERNARDIS, L. L.; BELLINGER, L. L. The lateral hypothalamic area revisited: Ingestive behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 20, p. 189-287, 1996.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **J Endocrinol**, v. 40, p. 527-8, 1968.
- BERTHOUD, H. R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 26, p. 393-428, 2002.
- BHUTTA, Z. A. et al. What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. **Lancet**, v. 371, p. 417-40, 2008.
- BITTENCOURT, J. C. Anatomical organization of the melanin-concentrating hormone peptide family in the mammalian brain. **Gen Comp Endocrinol**, v. 172, p. 185-97, 2011.
- BITTENCOURT, J. C. et al. The melanin-concentrating hormone system of the rat brain: An immuno- and hybridization histochemical characterization. **J Comp Neurol**, v. 319, p. 218-45, 1992.
- BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition: Global and regional exposures and health consequences. **Lancet**, v. 371, p. 243-60, 2008.
- BRETON, C. et al. Maternal prenatal undernutrition alters the response of pomc neurons to energy status variation in adult male rat offspring. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, p. E462-72, 2009.
- BRISCHOUX, F.; FELLMANN, D.; RISOLD, P. Y. Ontogenetic development of the diencephalic mch neurons: A hypothalamic 'mch area' hypothesis. **Eur J Neurosci**, v. 13, p. 1733-44, 2001.
- BRISCHOUX, F. et al. Early and transient ontogenetic expression of the cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide in the rat mesencephalon: Correlation with tyrosine hydroxylase expression. **J Neurobiol**, v. 52, p. 221-9, 2002.
- BROBERGER, C. Hypothalamic cocaine- and amphetamine-regulated transcript (cart) neurons: Histochemical relationship to thyrotropin-releasing hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide y. **Brain Res**, v. 848, p. 101-13, 1999.
- BROBERGER, C. Brain regulation of food intake and appetite: Molecules and networks. **J Intern Med**, v. 258, p. 301-27, 2005.
- BROBERGER, C. et al. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the rodent lateral hypothalamus: Relationship to the neuropeptide y and agouti gene-related protein systems. **J Comp Neurol**, v. 402, p. 460-74, 1998.
- BROWN, J. A.; WOODWORTH, H. L.; LEININGER, G. M. To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. **Front Syst Neurosci**, v. 9, p. 9, 2015.
- CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal origins of adult disease. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, v. 41, p. 158-76, 2011.
- CASTRO-CHAVIRA, S. A. et al. Effects of chronic malnourishment and aging on the ultrastructure of pyramidal cells of the dorsal hippocampus. **Nutr Neurosci**, v. 19, p. 329-336, 2015.
- CHOMETTON, S. et al. The mch neuron population as a model for the development and evolution of the lateral and dorsal hypothalamus. **J Chem Neuroanat**, v. 75, p. 28-31, 2015.
- COUCEYRO, P. R.; KOYLU, E. O.; KUCHAR, M. J. Further studies on the anatomical distribution of cart by in situ hybridization. **J Chem Neuroanat**, v. 12, p. 229-41, 1997.
- COUPE, B. et al. The timing of "Catch-up growth" Affects metabolism and appetite regulation in male rats born with intrauterine growth restriction. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 297, p. R813-24, 2009.
- CRIPPS, R. L.; MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Fetal and perinatal programming of appetite. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, p. 1-11, 2005.
- CUNHA, F. S. et al. Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: The "Similarities in the inequalities" Model. **PLoS One**, v. 10, p. e0118586, 2015.
- DALL VECHIA, S. et al. Cart peptide immunoreactivity in the hypothalamus and pituitary in monkeys: Analysis of ultrastructural features and synaptic connections in the paraventricular nucleus. **J Comp Neurol**, v. 416, p. 291-308, 2000.
- DAMAJ, M. I. et al. Intrathecal cart (55-102) enhances the spinal analgesic actions of morphine in mice. **Brain Res**, v. 1024, p. 146-9, 2004.
- DEARDEN, L.; OZANNE, S. E. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. **Front Neuroendocrinol**, v. 39, p. 3-16, 2015.

- DELAHAYE, F. et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. **Endocrinology**, v. 149, p. 470-5, 2008.
- DESAI, M. et al. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. **Br J Nutr**, v. 76, p. 591-603, 1996.
- DESAI, M. et al. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: Modulation by newborn nutrition. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, p. R91-6, 2005.
- DESAI, M. et al. The timing of nutrient restriction during rat pregnancy/lactation alters metabolic syndrome phenotype. **Am J Obstet Gynecol**, v. 196, p. 555 e1-7, 2007a.
- DESAI, M. et al. Programmed hyperphagia due to reduced anorexigenic mechanisms in intrauterine growth-restricted offspring. **Reprod Sci**, v. 14, p. 329-37, 2007b.
- DINIZ, G. B.; BITTENCOURT, J. C. The melanin-concentrating hormone as an integrative peptide driving motivated behaviors. **Front Syst Neurosci**, v. 11, p. 32, 2017.
- DOUGLASS, J.; DAOUD, S. Characterization of the human cDNA and genomic DNA encoding cart: A cocaine- and amphetamine-regulated transcript. **Gene**, v. 169, p. 241-5, 1996.
- DOUGLASS, J.; MCKINZIE, A. A.; COUCEYRO, P. Pcr differential display identifies a rat brain mRNA that is transcriptionally regulated by cocaine and amphetamine. **J Neurosci**, v. 15, p. 2471-81, 1995.
- ELIAS, C. F. et al. Leptin differentially regulates npy and pomc neurons projecting to the lateral hypothalamic area. **Neuron**, v. 23, p. 775-86, 1999.
- ELIAS, C. F. et al. Leptin activates hypothalamic cart neurons projecting to the spinal cord. **Neuron**, v. 21, p. 1375-85, 1998a.
- ELIAS, C. F. et al. Characterization of cart neurons in the rat and human hypothalamus. **J Comp Neurol**, v. 432, p. 1-19, 2001.
- ELIAS, C. F. et al. Chemically defined projections linking the mediobasal hypothalamus and the lateral hypothalamic area. **J Comp Neurol**, v. 402, p. 442-59, 1998b.
- ELIAS, S. G. et al. Childhood exposure to the 1944-1945 dutch famine and subsequent female reproductive function. **Hum Reprod**, v. 20, p. 2483-8, 2005.
- FAN, W. et al. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. **Nature**, v. 385, p. 165-8, 1997.
- FEI, H. et al. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (ob-r) in mouse brain and other tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, p. 7001-5, 1997.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) et al. **The state of food security and nutrition in the world 2018: Building climate resilience for food security and nutrition**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2018.
- GARCIA, A. P. et al. Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus npy- and alphanms-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. **Diabetes Obes Metab**, v. 12, p. 403-13, 2010.
- GOMEZ DUMM, C. L.; PUCCIARELLI, H. M.; DRESSINO, V. Quantitative ultrastructural study of somatotrophic cells in malnourished weanling rats. **Acta Anat (Basel)**, v. 129, p. 200-2, 1987.
- GUNDERSEN, H. J. et al. The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Apmis**, v. 96, p. 857-81, 1988.
- GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. **J Microsc**, v. 147 (Pt 3), p. 229-63, 1987.
- HAHN, J. D. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin peptide expression patterns in a current parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. **Neurosci Lett**, v. 468, p. 12-7, 2010.
- HAKANSSON, M. L. et al. Leptin receptor immunoreactivity in chemically defined target neurons of the hypothalamus. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 559-572, 1998.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: The thrifty phenotype hypothesis. **Int J Epidemiol**, v. 42, p. 1215-22, 1992.
- HERVIEU, G. J. et al. The distribution of the mRNA and protein products of the melanin-concentrating hormone (mch) receptor gene, slc-1, in the central nervous system of the rat. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 1194-216, 2000.
- HORTA-JÚNIOR, J. A. C.; LÓPEZ, D. E. Microscopia eletrônica de transmissão aplicada à neurociência. In: BITTENCOURT, J. C.; ELIAS, C. F. **Métodos em neurociência**. São Paulo: Editora Roca, 2007. 81-114.
- HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics. **Am J Clin Pathol**, v. 75, p. 816-21, 1981.
- HSU, S. M.; SOBAN, E. Color modification of diaminobenzidine (dab) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. **J Histochem Cytochem**, v. 30, p. 1079-82, 1982.
- JANCSIK, V. et al. Sub-cellular organization of the melanin-concentrating hormone neurons in the hypothalamus. **Peptides**, v. 99, p. 56-60, 2018.
- JONES, D. G.; DYSON, S. E. The influence of protein restriction, rehabilitation and changing nutritional status on synaptic development: A quantitative study in rat brain. **Brain Res**, v. 208, p. 97-111, 1981.
- KADAR, A. et al. Improved method for combination of immunocytochemistry and nissl staining. **J Neurosci Methods**, v. 184, p. 115-8, 2009.
- KAPPELER, L. et al. Age-associated changes in hypothalamic and pituitary neuroendocrine gene expression in the rat. **J Neuroendocrinol**, v. 15, p. 592-601, 2003.
- KAWAUCHI, H. et al. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. **Nature**, v. 305, p. 321-3, 1983.
- KESSLER, B. A. et al. Age-related loss of orexin/hypocretin neurons. **Neuroscience**, v. 178, p. 82-8, 2011.

- KIMMEL, H. L.; CARROLL, F. I.; KUHAR, M. J. Dopamine transporter synthesis and degradation rate in rat striatum and nucleus accumbens using rti-76. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 578-85, 2000.
- KISS, A. C. et al. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of wistar rats. **Physiol Behav**, v. 107, p. 292-300, 2012.
- KLIMAS, J. E. Oral glucose tolerance during the life-span of a colony of rats. **J Gerontol**, v. 23, p. 31-4, 1968.
- KOLETZKO, B. et al. The power of programming and the early nutrition project: Opportunities for health promotion by nutrition during the first thousand days of life and beyond. **Ann Nutr Metab**, v. 64, p. 187-96, 2014.
- KOYLU, E. O. et al. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide immunohistochemical localization in the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 391, p. 115-32, 1998.
- KOYLU, E. O. et al. Immunohistochemical localization of novel cart peptides in rat hypothalamus, pituitary and adrenal gland. **J Neuroendocrinol**, v. 9, p. 823-33, 1997.
- KRILOWICZ, B. L.; SZYMUSIAK, R.; MCGINTY, D. Regulation of posterior lateral hypothalamic arousal related neuronal discharge by preoptic anterior hypothalamic warming. **Brain Res**, v. 668, p. 30-38, 1994.
- KRISTENSEN, P. et al. Hypothalamic cart is a new anorectic peptide regulated by leptin. **Nature**, v. 393, p. 72-6, 1998.
- KUHAR, M. J. et al. Cart peptides. **Neuropeptides**, v. 36, p. 1-8, 2002.
- KULESZA, J., RANDY J. et al. Unbiased stereological estimates of neuron number in subcortical auditory nuclei of the rat. **Hearing Research**, v. 168, p. 12-24, 2002.
- LARSEN, P. J.; HAY-SCHMIDT, A.; MIKKELSEN, J. D. Efferent connections from the lateral hypothalamic region and the lateral preoptic area to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 342, p. 299-319, 1994.
- LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. **Physiology**, v. p. 24-33, 1929.
- LIM, A. S. et al. Sleep is related to neuron numbers in the ventrolateral preoptic/intermediate nucleus in older adults with and without alzheimer's disease. **Brain**, v. 137, p. 2847-61, 2014.
- LUMEY, L. H.; STEIN, A. D. In utero exposure to famine and subsequent fertility: The dutch famine birth cohort study. **Am J Public Health**, v. 87, p. 1962-6, 1997.
- MCARDLE, H. J. et al. Fetal programming: Causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats -- a review. **Placenta**, v. 27 Suppl A, p. S56-60, 2006.
- MCGOWAN, M. K. et al. Chronic intrahypothalamic insulin infusion in the rat: Behavioral specificity. **Physiol Behav**, v. 54, p. 1031-4, 1993.
- MCMILLEN, I. C.; ADAM, C. L.; MUHLHAUSLER, B. S. Early origins of obesity: Programming the appetite regulatory system. **J Physiol**, v. 565, p. 9-17, 2005.
- NAHON, J. L.; ABBA, J. K. The melanin-concentrating hormone. In: **Handbook of biologically active peptides**. Burlington: Academic Press, 2006. 705-714.
- NAHON, J. L. et al. Characterization of mammalian melanin concentrating hormones and their precursors. In: CASANUEVA, F. A. D., C., . **Recent advances in basic and clinical neuroendocrinology**. ELSEVIER SCIENCE PUBL B V 1989. 15-23.
- NAITO, N. et al. Melanin-concentrating hormone-like immunoreactive material in the rat hypothalamus; characterization and subcellular localization. **Cell Tissue Res**, v. 253, p. 291-5, 1988.
- NOVELLI, E. L. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**, v. 41, p. 111-9, 2007.
- OZANNE, S. E. Metabolic programming in animals. **Br Med Bull**, v. 60, p. 143-52, 2001.
- OZANNE, S. E.; HALES, C. N. Lifespan: Catch-up growth and obesity in male mice. **Nature**, v. 427, p. 411-2, 2004.
- PALOU, M. et al. Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. **J Nutr Biochem**, v. 23, p. 1627-39, 2012.
- PARKES, D. G.; VALE, W. W. Contrasting actions of melanin-concentrating hormone and neuropeptide-e-i on posterior pituitary function. **Ann N Y Acad Sci**, v. 680, p. 588-90, 1993.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: The new coronal set - 161 diagrams**. San Diego: Academic Press, 2005.
- PICKEL, V. M. General morphological features of peptidergic neurons. In: BJÖRKLUND, A.; HÖKFEL, T. **Handbook of chemical neuroanatomy**. Amsterdam: Elsevier, 1985. 72-92.
- PICO, C. et al. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: Different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. **Front Physiol**, v. 3, p. 436, 2012.
- PLAGEMANN, A. et al. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. **J Nutr**, v. 130, p. 2582-9, 2000.
- PORTA, E. A. Advances in age pigment research. **Arch Gerontol Geriatr**, v. 12, p. 303-20, 1991.
- PRESSE, F.; NAHON, J. L. Differential regulation of melanin-concentrating hormone gene expression in distinct hypothalamic areas under osmotic stimulation in rat. **Neuroscience**, v. 55, p. 709-20, 1993.
- PRESSE, F. et al. Melanin-concentrating hormone is a potent anorectic peptide regulated by food-deprivation and glucopenia in the rat. **Neuroscience**, v. 71, p. 735-45, 1996.
- QU, D. et al. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behaviour. **Nature**, v. 380, p. 243-7, 1996.
- QUINN, R. Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, p. 775-7, 2005.
- REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocr Rev**, v. 32, p. 272-311, 2011.
- REMMERS, F.; FODOR, M.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. **Physiol Behav**, v. 95, p. 208-15, 2008a.

- REMMERS, F. et al. Hypothalamic neuropeptide expression of juvenile and middle-aged rats after early postnatal food restriction. **Endocrinology**, v. 149, p. 3617-25, 2008b.
- RICE, D.; BARONE, S., JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect**, v. 108 Suppl 3, p. 511-33, 2000.
- ROBERTS, S. B. Energy regulation and aging: Recent findings and their implications. **Nutrition Reviews**, v. 58, p. 91-97, 2000.
- RODRIGUES, B. C.; CAVALCANTE, J. C.; ELIAS, C. F. Expression of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the rat forebrain during postnatal development. **Neuroscience**, v. 195, p. 201-14, 2011.
- ROSSI, M. et al. Melanin-concentrating hormone acutely stimulates feeding, but chronic administration has no effect on body weight. **Endocrinology**, v. 138, p. 351-355, 1997.
- RUBIO, L. et al. Alterations in the solitary tract nucleus of the rat following perinatal food restriction and subsequent nutritional rehabilitation. **Nutr Neurosci**, v. 7, p. 291-300, 2004.
- SAITO, Y. et al. Expression of the melanin-concentrating hormone (mch) receptor mrna in the rat brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 435, p. 26-40, 2001.
- SAPER, C. B. Organization of cerebral cortical afferent systems in the rat. II. Hypothalamocortical projections. **Journal of Comparative Neurology**, v. 237, p. 21-46, 1985.
- SAPER, C. B. Image is everything. **J Comp Neurol**, v. 412, p. 381-2, 1999.
- SAPER, C. B.; AKIL, H.; WATSON, S. J. Lateral hypothalamic innervation of the cerebral cortex: Immunoreactive staining for a peptide resembling but immunochemically distinct from pituitary/arcuate $\pm$ -melanocyte stimulating hormone. **Brain Res Bull**, v. 16, p. 107-120, 1986.
- SAPER, C. B.; CHOU, T. C.; ELMQUIST, J. K. The need to feed: Homeostatic and hedonic control of eating. **Neuron**, v. 36, p. 199-211, 2002.
- SAPER, C. B.; SWANSON, L. W.; COWAN, W. M. An autoradiographic study of the efferent connections of the lateral hypothalamic area in the rat. **J Comp Neurol**, v. 183, p. 689-706, 1979.
- SATINOFF, E.; SHAN, S. Y. Loss of behavioral thermoregulation after lateral hypothalamic lesions in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 77, p. 302-312, 1971.
- SAWCHENKO, P. E. Toward a new neurobiology of energy balance, appetite, and obesity: The anatomists weigh in. **J Comp Neurol**, v. 402, p. 435-41, 1998.
- SCHENK, M. P.; MANNING, R. J.; PAALMAN, M. H. Going digital: Image preparation for biomedical publishing. **Anat Rec**, v. 257, p. 128-36, 1999.
- SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661-71, 2000.
- SHIMADA, M. et al. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. **Nature**, v. 396, p. 670-4, 1998.
- SIMERLY, R. B.; PAXINOS, G. Anatomical substrates of hypothalamic integration. In: **The rat nervous system (third edition)**. Burlington: Academic Press, 2004. 335-368.
- SIMSON, E. L.; GOLD, R. M. The lee obesity index vindicated? **Physiology and Behavior**, v. 29, p. 371-376, 1982.
- SITA, L. V.; ELIAS, C. F.; BITTENCOURT, J. C. Connectivity pattern suggests that incerto-hypothalamic area belongs to the medial hypothalamic system. **Neuroscience**, v. 148, p. 949-69, 2007.
- SLOMIANKA, L.; WEST, M. J. Estimators of the precision of stereological estimates: An example based on the ca1 pyramidal cell layer of rats. **Neuroscience**, v. 136, p. 757-67, 2005.
- SMITH, Y. et al. Ultrastructural localization of cart (cocaine- and amphetamine-regulated transcript) peptides in the nucleus accumbens of monkeys. **Synapse**, v. 27, p. 90-4, 1997.
- SOULIMANE-MOKHTARI, N. A. et al. Modulation of lipid metabolism by n-3 polyunsaturated fatty acids in gestational diabetic rats and their macrosomic offspring. **Clin Sci (Lond)**, v. 109, p. 287-95, 2005.
- SPARY, E. J.; MAQBOOL, A.; BATTEN, T. F. Changes in oestrogen receptor alpha expression in the nucleus of the solitary tract of the rat over the oestrous cycle and following ovariectomy. **J Neuroendocrinol**, v. 22, p. 492-502, 2010.
- STEININGER, T. L. et al. Comparison of hypocretin/orexin and melanin-concentrating hormone neurons and axonal projections in the embryonic and postnatal rat brain. **J Chem Neuroanat**, v. 27, p. 165-81, 2004.
- STEPHENS, D. N. Does the lee obesity index measure general obesity? **Physiol Behav**, v. 25, p. 313-5, 1980.
- SUBHEDAR, N. K. et al. Cart in the brain of vertebrates: Circuits, functions and evolution. **Peptides**, v. 54, p. 108-30, 2014.
- SUGAYA, A. et al. Experimental diabetes accelerates accumulation of fluorescent pigments in rat trigeminal neurons. **Brain Res**, v. 999, p. 132-4, 2004.
- SWANSON, L. W.; SANCHEZ-WATTS, G.; WATTS, A. G. Comparison of melanin-concentrating hormone and hypocretin/orexin mrna expression patterns in a new parceling scheme of the lateral hypothalamic zone. **Neurosci Lett**, v. 387, p. 80-4, 2005.
- SZEKELY, M.; SZELENYI, Z. Regulation of energy balance by peptides: A review. **Curr Protein Pept Sci**, v. 6, p. 327-353, 2005.
- SZYMUSIAK, R.; IRIYE, T.; MCGINTY, D. Sleep-waking discharge of neurons in the posterior lateral hypothalamic area of cats. **Brain Res Bull**, v. 23, p. 111-120, 1989.
- TAI, M. M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. **Diabetes Care**, v. 17, p. 152-4, 1994.
- TOUMANIANTZ, G.; BITTENCOURT, J. C.; NAHON, J. L. The rat melanin-concentrating hormone gene encodes an additional putative protein in a different reading frame. **Endocrinology**, v. 137, p. 4518-21, 1996.
- TOUMANIANTZ, G. et al. Differential neuronal expression and projections of melanin-concentrating hormone (mch) and mch-gene-overprinted-polypeptide (mgop) in the rat brain. **Eur J Neurosci**, v. 12, p. 4367-80, 2000.

- TRUE, C. et al. Early high-fat diet exposure causes dysregulation of the orexin and dopamine neuronal populations in nonhuman primates. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 9, p. 508, 2018.
- VAUGHAN, J. M. et al. Characterization of melanin-concentrating hormone from rat hypothalamus. **Endocrinology**, v. 125, p. 1660-5, 1989.
- VON BARTHELD, C. S.; ALTICK, A. L. Multivesicular bodies in neurons: Distribution, protein content, and trafficking functions. **Prog Neurobiol**, v. 93, p. 313-40, 2011.
- VRANG, N. et al. Neurochemical characterization of hypothalamic cocaine- amphetamine-regulated transcript neurons. **J Neurosci**, v. 19, p. RC5, 1999.
- VRANG, N. et al. Central administration of cocaine-amphetamine-regulated transcript activates hypothalamic neuroendocrine neurons in the rat. **Endocrinology**, v. 141, p. 794-801, 2000.
- WANG, C. et al. Intrauterine growth retardation promotes fetal intestinal autophagy in rats via the mechanistic target of rapamycin pathway. **J Reprod Dev**, v. 63, p. 547-554, 2017.
- WEST, M. J.; GUNDERSEN, H. J. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. **J Comp Neurol**, v. 296, p. 1-22, 1990.
- WEST, M. J.; SLOMIANKA, L.; GUNDERSEN, H. J. G. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. **The Anatomical Record**, v. 231, p. 482-497, 1991.
- WOODSIDE, B. et al. Many mouths to feed: The control of food intake during lactation. **Front Neuroendocrinol**, v. 33, p. 301-14, 2012.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION Malnutrition is an impediment to the progress (who reference number: Who/nmh/nhd/14.1). **World Health Organization**, v. p. 22, 2014.
- WURTMAN, J. J.; MILLER, S. A. Effect of litter size on weight gain in rats. **J Nutr**, v. 106, p. 697-701, 1976.
- ZELTSE, L. M. Feeding circuit development and early-life influences on future feeding behaviour. **Nat Rev Neurosci**, v. 19, p. 302-316, 2018.
- ZHANG, M.; HAN, L.; XU, Y. Roles of cocaine- and amphetamine-regulated transcript in the central nervous system. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 39, p. 586-92, 2012.
- ZHANG, Y. et al. Effects of maternal food restriction on physical growth and neurobehavior in newborn wistar rats. **Brain Res Bull**, v. 83, p. 1-8, 2010.
- ZHANG, Y.; WEI, J.; YANG, Z. Perinatal undernutrition attenuates field excitatory postsynaptic potentials and influences dendritic spine density and morphology in hippocampus of male rat offspring. **Neuroscience**, v. 244, p. 31-41, 2013.
- ZHANG, Y. H. et al. Effect of midbrain stimulations on thermoregulatory vasomotor responses in rats. **Journal of Physiology**, v. 503, p. 177-186, 1997.

Anexo

Informações nutricionais da ração para ratos**(Presence®, Invivo Nutrição e Saúde Animal LTDA.)****Níveis de Garantia**

Umidade (máx)	130,00 g/kg
Proteína bruta (mín)	230,00 g/kg
Extrato etéreo (mín)	40,00 g/kg
Fibra bruta (máx)	50,00 g/kg
Matéria mineral (máx)	100,00 g/kg
Cálcio (mín)	12,00 g/kg
Cálcio (máx)	13,00 g/kg
Fósforo (mín)	8.500,00 mg/kg
Sódio (mín)	2.700,00 mg/kg
Magnésio (mín)	500,00 mg/kg
Ferro (mín)	180,00 mg/kg
Cobre (mín)	30,00 mg/kg
Manganês (mín)	110,00 mg/kg
Zinco (mín)	110,00 mg/kg
Iodo (mín)	1,00 mg/kg
Cobalto (mín)	2,00 mg/kg
Selênio (mín)	0,20 mg/kg
Vitamina A (mín)	25.500,00 UI/kg
Vitamina D3 (mín)	4.000,00 UI/kg
Vitamina E (mín)	82,00 UI/kg
Vitamina K3 (mín)	6,40 mg/kg
Vitamina B1 (mín)	11,00 mg/kg
Vitamina B2 (mín)	12,00 mg/kg
Niacina (mín)	219,00 mg/kg
Ácido pantotênico (mín)	90,00 mg/kg
Vitamina B6 (mín)	11,00 mg/kg
Ácido fólico (mín)	13,00 mg/kg
Biotina (mín)	0,10 mg/kg
Vitamina B12 (mín)	40,00 mcg/kg
Colina (mín)	1.800,00 mg/kg
Lisina (mín)	12,50 g/kg
Metionina (mín)	3.500,00 mg/kg

Composição Básica

Farelo de soja*, milho integral moído, dextrina, casca de arroz, farelo de trigo, farelo de arroz, óleo de soja refinado*, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), óxido de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, lisina, metionina, ácido propiônico. Espécies doadoras do gene:

**Agrobacterium tumefaciens* e/ou *Arabidopsis thaliana* e/ou *Bacillus thuringiensis* e/ou *Streptomyces viridochromogenes* e/ou *Zea mays*.

APÊNDICES – PROTOCOLOS

APÊNDICE A - Protocolo padrão de imuno-histoquímica – MCH e CART**1º Dia**

Antes de iniciar a imuno verificar:

Data: _____ Horário do início: _____ Horário previsto para término: _____

Potinhos a serem utilizados: _____

Material necessário: pincéis, redinhas, becker para descarte de soluções e para dosar tampões, suporte para potinhos, agitador orbital, tampões, inibição de peroxidase, anticorpos (primário e secundário), soluções de bloqueio e reação histoquímica. (repassar todo o protocolo antes de iniciar!!)

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7.4 2 X 10 min. em agitação.

PB se prepara a partir da solução estoque 0,4M. Diluir 1 parte de PB 0,4M em 3 partes de H₂O destilada.

A solução estoque se prepara:

Tampão fosfato 0,4 M pH 7,4

- Na₂HPO₄ (M= 141,96 Merck 1.06586.0500).....45,12 g

- NaH₂PO₄ · H₂O (M= 137,99 Merck 1.06346.0500) 11,04g

- H₂O destilada.....1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl a 3M até pH 7,4

*Em 800ml de água, adicionar os sais aos poucos em agitador e então completar até 1000ml.

- Inibição da peroxidase endógena 1 X 20 min. em agitação.

A solução de inibição da peroxidase endógena se prepara adicionando 9 partes de PB 0,1M pH 7,4 e uma parte de H₂O₂ 33% (P.A.). Incubar 3 ml por potinho.

- PB (tampão fosfato) 0,1 M pH 7.4 5 X 5 min. em agitação.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,60 3 X 10 min. em agitação.

TBS-Tx se prepara diluindo 1 parte da solução estoque 10X em 9 partes de H₂O destilada ou:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 gr

- NaCl.....8,85 gr

- Triton X-100 (Merck - 1.08603.1000 C₃₄H₆₂O₁₁ PM 646,37) à 20%.....25 ml

- H₂O dest.....q.s.p. 1000 ml

*Ajustar o pH com solução de HCl 3M até 7,60

- Bloqueio de marcação inespecífica.....1 X 40 min. em agitação.

Incubar em solução de soro normal da espécie onde foi produzido o anticorpo secundário, em soro normal de cabra inativado. Preparar a solução a 2% em TBS-Tx 0,05 M pH 7,6. Incubar 1 ml por potinho.

- Anticorpo primário anti-MCH produzido em coelho, concentração 1:6000/ anti-CART feito em coelho 1:10000 24 horas à 4 °C em agitação.

2º Dia

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

- Anticorpo secundário: anti-IgG de coelho feito em cabra, concentração 120 min. temp. ambiente em agitação.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação

- Incubação em ABC 1/200 (Vector - Vectastain Standart Kit PK4000)..... 120 min. à temp. amb.

ou uma noite à 4 °C, em agitação.

Solução de incubação ABC Kit para 4 ml (4 potinhos, Incubar 1 ml por potinho):

- 4 ml TBS-Tx 0,05 M pH 7,6 + 20µl solução A (laranja)
- Agitar bem
- Adicionar 20µl solução B (marrom)
- Agitar bem e esperar 30 minutos para que o complexo se forme e possa ser usado.

*Importante: recuperar o complexo ABC usado por somente uma vez. Marcar e guardar em geladeira para ser utilizado mais uma vez.

- TBS-Tx 0,05 M pH 7,6.....2 X 10 min. em agitação.

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

Tris-HCl se prepara:

- Tris (Trisma - Sigma T-6066 C₄H₁₁NO₃ PM 121,1).....6,06 gr
- H₂O dest. q.s.p. 1000 ml

Ajustar o pH com solução de HCl até 7,6

- Revelação com DAB.....em baixa agitação e controle visual em microscópio.

Preparar as soluções imediatamente antes de usar e protege-las da luz, pois o DAB é fotossensível. Sempre usar luvas de látex e realizar o procedimento em capela, pois o DAB é carcinogênico.

Solução de revelação DAB (até 5 potinhos):

- 0,05g de níquel amônio sulfato
- 12,5 ml Tris-HCl 0,05 M pH 7,60
- Adicionar uma alíquota de 200µl de solução de DAB a 1% em H₂O_{dd} (pegar no freezer) DAB = Sigma D - 9015 PM 360,1
- Adicionar 2,5µl de água oxigenada P.A. imediatamente antes de incubar (H₂O₂ a 30% PM= 34,01 Merck 108597).

- Tris-HCl 0,05 M pH 7,6.....3 X 10 min. em agitação.

- Montagem dos cortes

Montar os cortes em lâminas, organizando-os em uma placa de Petri com gelatina (Merck 1.04078.0500, para material processado com DAB= Gelatina 0,4

Para preparar a gelatina 0,4% diluir 50 ml da solução estoque 4X, congelada nos tubos falcon, em 150 ml de H₂O dest. Para gelatina a 0,1% diluir 50 ml da solução estoque em 750 ml de H₂O dest. Obs: a gelatina diluída e em boas condições de uso pode ser identificada e armazenada em freezer.

Pode-se preparar também da seguinte forma:

- gelatina.....0,8g(0,4%) ou 0,2g(0,1%)
- Tris-HCl 0,05M q.s.p. 200 ml

Ajustar o pH até 7,60, filtrar após a montagem de cada potinho e guardar em freezer para utilização posterior, caso a solução ainda esteja límpida e transparente

- Cobertura com lamínula

Para material com DAB, cobrir adicionando um fio de Permont junto a borda inferior da lamínula e deitando a lâmina sobre a lamínula com cuidado para expulsar o ar e evitar a formação de bolhas. Checar a montagem contra uma superfície escura.

Para material com reagentes fluorescentes, cobrir usando meio de montagem específico de fluorescência. Armazenar as lâminas em geladeira envolvidas com papel alumínio.

APÊNDICE B - Protocolo de estereologia – contagem de células utilizando a ferramenta “optical fractionator” do sistema de estereologia “stereoinvestigator” (MBF Bioscience)

Para realizar a contagem de células no Stereoinvestigator, é necessário utilizar a ferramenta “optical fractionator”. Essa metodologia permite que a contagem seja feita sem nenhuma preferência, ou seja, todos os neurônios da região de interesse tem a mesma oportunidade de serem contados.

Através da pesquisa em literatura (papers e livros) é preciso determinar parâmetros importantes para toda a análise. Todos eles interferirão diretamente no valor do CE Gundersen (coeficiente de erro) e são determinantes para bons resultados na contagem.

Neste estudo, os seguintes dados foram definidos e preenchidos no programa:

Região de interesse: Área Hipotalâmica Lateral

Células de interesse: Neurônios Imunorreativos ao MCH/CART da LHA

Padrão de distribuição das células: Heterogêneo

Section Sampling fraction = Material dividido em 5 séries – intervalo de 150µm

Section Thickness: 30µm

Ferramenta que será utilizada: Optical Fractionator

Guard Zones: 2-3 µm

Dissector height: 5µm – dissector centralizado e com tamanho fixo

Counting Frame: 70µm x 70µm

Grid size: 189µm x 163µm

Target cell count: 500 a 1000 cell per animal

CE: Gundersen (m=1) : menor que 0,1 para cada caso experimental

Low Magnification: 4x

High magnification: 100x

Etapas Importantes para Estereologia:

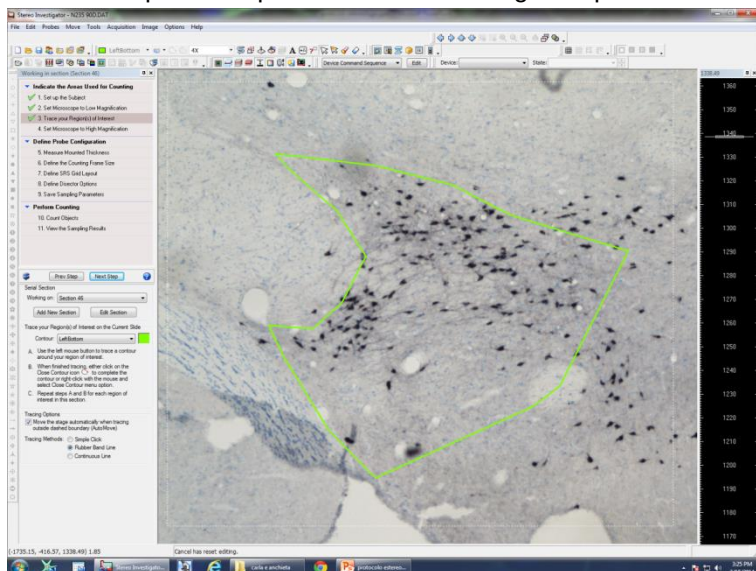
- 1) Ligar equipamentos na seguinte sequencia: estabilizador, platina motorizada, camera, microscópio. Obs: Desligar na ordem inversa. Não desligar a câmera antes do computador pois o mesmo será re-iniciado e os dados perdidos.
- 2) Abrir estereoinvestigator e o protocolo.
- 3) Checar configuração do driver da câmera acoplada ao microscópio
Option > câmera setup> selecionar câmera DC1394
- 4) Ajustar câmera de vídeo: checar balanço de cor e tempo exposição
Acquisition> Adjust câmera settings> White balance> automatic
Acquisition> Adjust câmera settings>General
- 5) Realizar a centralização da luz pelo método de kholler
- 6) Sempre lembrar de ajustar o *software* de acordo com a objetiva em uso. Para cada mudança da objetiva mudar também a calibração do *software*
- 7) Começar um experimento novo em file>new data file.
- 8) Selecionar o tipo de prova a ser utilizada em probes>optical fractionator. Seguir o passo a passo do *software*: introduzir os dados do experimento
- 9) Colocar a lâmina de interesse no microscópio com a superfície ventral em direção a estativa do microscópio. Visualizar material em objetiva de 4x.
- 10) Seguir o passo a passo do *software*: introduzir os dados do experimento:

10.1- Set up the subject: Digitar nome do usuário, número do caso a ser contado.

Em seguida, preencher Section Thickness: 40µm, Section Evaluation Interval (5,00), Starting section number (1). Clicar em next step.

10.2- Set the microscope Low Magnification: 4x

10.3- Trace your region(s) of interest



Selecionar contorno para cada área de interesse num mesmo corte. Delimitar a região por critérios pré-estabelecidos como citoarquitetura. Após delimitação é possível ir pra próxima etapa (next step) ou adicionar nova secção (add new section).

10.4- Set the microscope High Magnification: 100x

10.5- Measure Mounted Thickness

Selecionar as opções: *Measure the mounted thickness while counting* e *Measure mounted thickness at sampling sites*

Evaluation Interval measure every 1 site

10.6- Selecionar a opção *Force the counting frame to be square*

Counting frame size 70µm x 70µm

10.7- Preencher a opção *Determine grid size based on number of sampling sites: 30*, com a quantidade de campos a serem contados. Clicar em *Estimate Grid Size*. Em todos os casos o grid size foi de 214µm x 163µm

10.8- Define Disector Options

Selecionar Opção: *Center the disector between the guard zones*

Optical Disector Height: 5µm

10.9- Saving Sample Parameters

Digitar o nome do documento e clicar em *Save your Current Settings*

11) Counting Objects

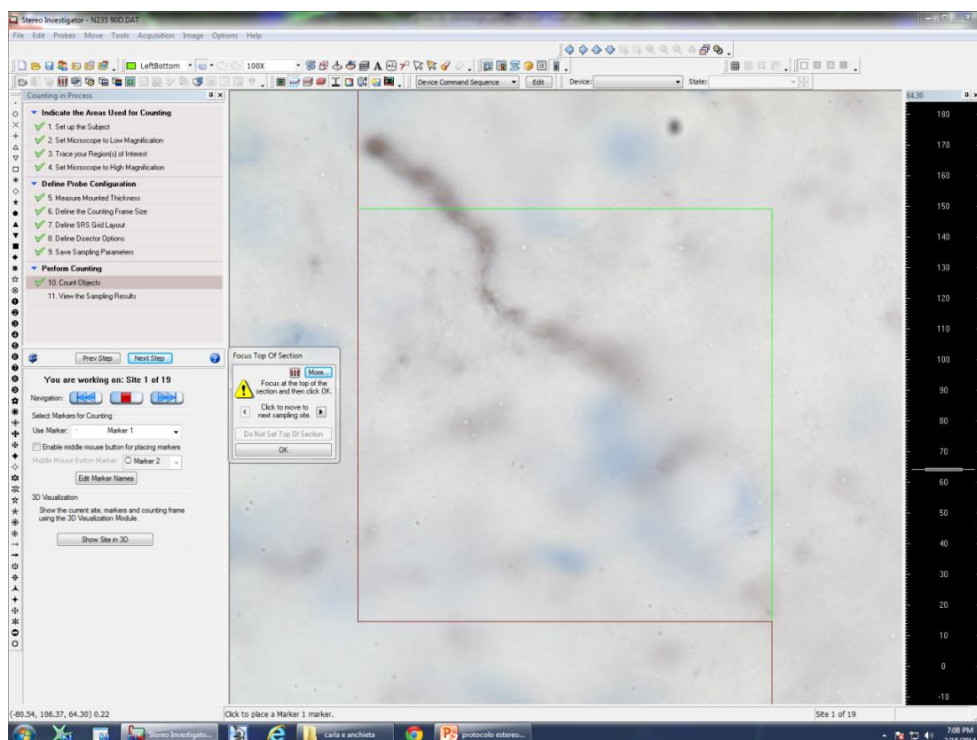
Para contar uma região de interesse previamente traçada, selecione na lista a secção e a região de interesse. Para cada região de interesse devemos posicionar o traçado sobre a secção com a objetiva de 4x. Para isto libere o joystick, posicione o traçado sobre o tecido, conecte o joystick e cheque se o traçado está bem posicionado utilizando o "go to" na janela macro view (clique com botão direito do mouse).

Se o traçado tiver que ser reposicionado, libere novamente o joystick e reposicione, se estiver correto, mude a objetiva no *software* e no microscópio para 100x, coloque a lâmina em imersão e inicie a contagem naquela região de interesse clicando em *start counting*.

12) Colocar em foco o topo do tecido e clicar em ok, em seguida selecionar a base do tecido e clicar em ok.

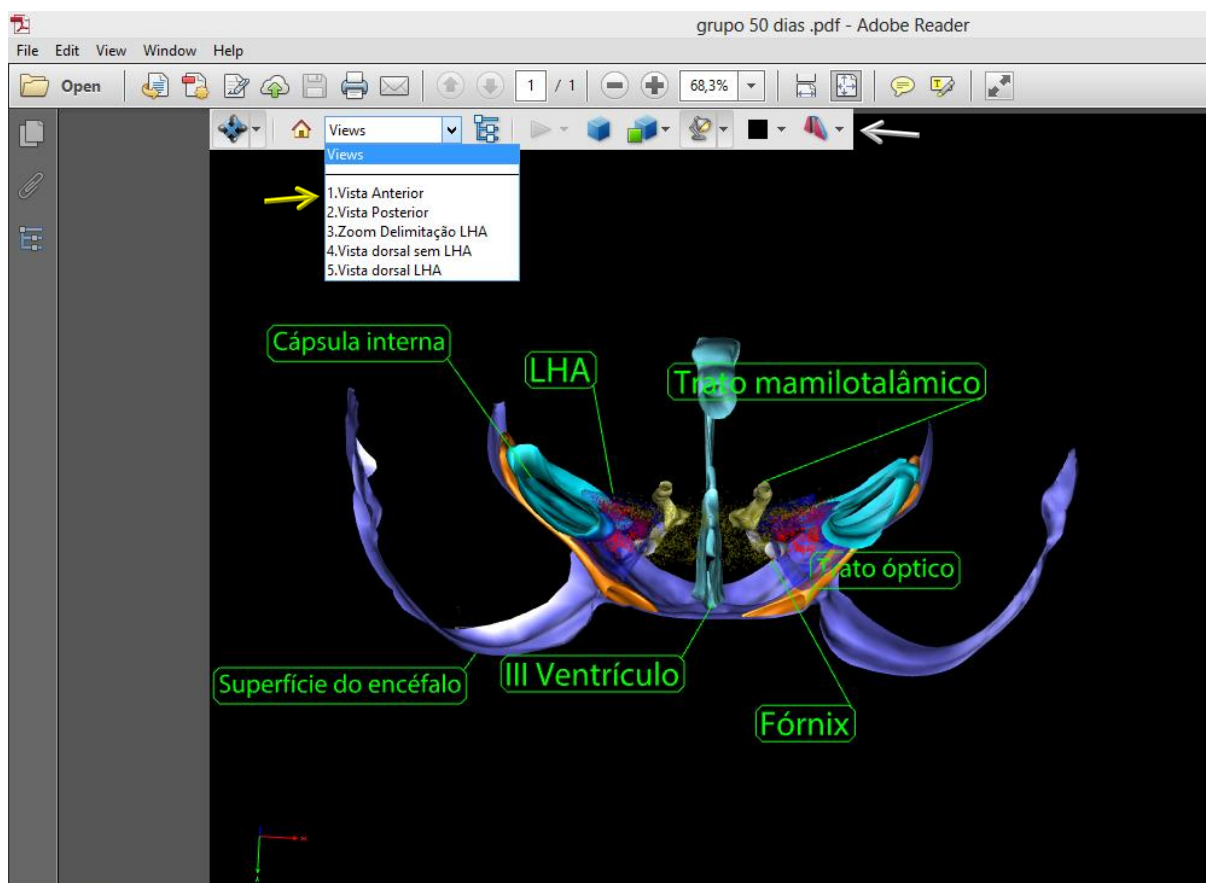
13) Caso haja alguma célula para ser marcada, selecionar um *Use Marker* e clicar sobre a célula.

14) Uma célula só pode ser marcada, se estiver dentro da região de interesse e dentro do counting frame, sem encostar nas linhas vermelhas do counting frame e em foco.



APÊNDICE C - Instruções para manipulação de pdf 3D interativo criado a partir do modelo de reconstrução tridimensional

- Baixar arquivos enviados por email.
- Abrir o arquivo .pdf no programa Adobe Reader® (versão 7 ou superior).
- Clique em cima da imagem do modelo para ativar as ferramentas de manipulação 3D. Caso seja exibida uma mensagem de alerta de segurança, ative os recursos..
- Após ativação do modelo, passe o *mouse* sobre a imagem para visualização do painel de controle 3D (Veja abaixo na imagem da janela do programa, indicado pela seta branca).
- No menu *pop-up* intitulado “visualizações”, clique na cabeça de seta e selecione uma das vistas pré-configuradas para facilitar a exploração do modelo.
Por exemplo: opção *1. Vista Anterior* (seta amarela).



- Em todas as vistas selecionadas, é possível realizar a movimentação do modelo em qualquer eixo do espaço, movimentando-se o *mouse* com o botão esquerdo pressionado.
- A seguir indicamos a legenda de cada uma das visualizações pré-configuradas:

1. **Vista Anterior:** Representação completa da reconstrução tridimensional do hipotálamo na região da LHA e a citoarquitetura utilizada como referência. Nesta vista, estão identificadas todas as estruturas citoarquitetônicas de referência e os neurônios MCH (esferas roxas) ou CART (esferas rosa) da LHA.
2. **Zoom Delimitação LHA:** Vista que destaca a delimitação da LHA e as estruturas citoarquitetônicas utilizadas para essa delimitação, o fórnix, trato mamilotalâmico e a cápsula interna. Também são identificados os neurônios MCH(esferas roxas) ou CART (esferas rosas).
3. **Vista Dorsal sem LHA:** Vista dorsal sem a delimitação da LHA em um dos antímeros, com destaque para a distribuição dos neurônios MCH (esferas roxas) ou CART (esferas rosas) ao longo do eixo anteroposterior