UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

DANIELA FERNANDA DA SILVA BARBOSA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO SOBRE A RESPOSTA CARDIORRESPIRATÓRIA DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADEMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
CURSO DE BACHARELADO EM EDUCAÇÃO FÍSICA
NÚCLEO DE EDUCAÇÃO FÍSICA E CIÊNCIAS DO ESPORTE

DANIELA FERNANDA DA SILVA BARBOSA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO SOBRE A RESPOSTA CARDIORRESPIRATÓRIA DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de bacharel em educação física.

Orientador: Dr. João Henrique da Costa Silva
Coorientadora: Ms. Debora Santos Alves

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2017

Catalogação na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE – Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Giane da Paz Ferreira Silva, CRB-4/977

B238a Barbosa, Daniela Fernanda da Silva.
Avaliação dos efeitos da microinjeção de L-glutamato no núcleo do trato solitário sobre a resposta cardiorrespiratória de ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal / Daniela Fernanda da Silva Barbosa.- Vitória de Santo Antão, 2017.
43 folhas: Il.tab., gráf.

Orientador: João Henrique da Costa Silva
Coorientadora: Débora Santos Alves
TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco. CAV, Bacharelado em Educação Física, 2017.

1. Desnutrição proteica. 2. Hipertensão. 3. Neurotransmissores. I. Silva, João Henrique da Costa (Orientador). II. Alves, Débora Santos (Coorientadora). I. Título.

612.3 CDD (23.ed.) **BIBCAV/UFPE-201/2017**

DANIELA FERNANDA DA SILVA BARBOSA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA MICROINJEÇÃO DE L-GLUTAMATO NO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO SOBRE A RESPOSTA CARDIORRESPIRATÓRIA DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Educação Física da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de bacharel em educação física.

Aprovado em: 24/11/2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Carol Virgínia Góis Leandro
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Rosana Christine Cavalcanti Ximenes
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. David Filipe de Santana (Examinador Externo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois sem Ele nada seria e não estaria onde estou e por toda ajuda que tem me dado nessa longa caminhada.

A os meus pais, **Aluzío Barbosa** (*in memoriam)* e **Irene Felisberto**, que sempre estiveram comigo e me mostraram a importância dos estudos e sempre me incentivam a nunca desistir.

As minhas irmãs, **Flávia** e **Bruna**, que sempre estiveram presentes me dando apoio.

Ao meu namorado, **Bruno Lucena**, pela paciência e apoio nos momentos mais difíceis e por sempre me incentivar a nunca desistir do que quero.

A todos os **professores** que tive, onde sou fruto do trabalho e empenho de cada um deles.

A todos os professores da minha graduação, que fizeram parte do profissional que sou hoje. Aos professores da anatomia humana, que me acolheram como monitora. Em especial a professora **Rosana Ximenes**, que além de professora é amiga. Ao professor **Antônio dos Santos**, que foi mais que um professor, é um exemplo de profissional e de ser humano que tomo como exemplo.

A todos do laboratório de **Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica** pela oportunidade e conhecimentos, em especial ao meu orientador, Prof. Dr. **João Henrique**. Minha coorientadora, **Débora Alves** e também a Viviane Nogueira que sempre se manteve presente e disposta a ensinar.

RESUMO

Estudos mostram que a desnutrição proteica durante os períodos críticos da vida (gestação e lactação) é capaz de promover alterações cardiovasculares e respiratórias, o que pode estar ligado ao surgimento de doenças na vida adulta, a exemplo da hipertensão. Porém, os mecanismos que levam a essas alterações ainda não estão totalmente esclarecidos. A partir disso, o presente trabalho se propôs a avaliar se a desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação é capaz de alterar a neurotransmissão glutamatérgica em neurônios de regiões de controle cardiorrespiratório, como por exemplo o núcleo de trato solitário (NTS). Para isso foram utilizados ratos *Wistar* provenientes de mães que receberam no período perinatal (gestação e lactação) dieta normoproteica (NP, 17% de proteína) ou hipoproteica (HP, 8% de proteína). Nas idades de 1, 22, 30 e 60 dias de vida foi verificada a massa corporal desses animais. Ao completarem 290g, conforme protocolo, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica, onde foram implantadas cânulas-guia em direção ao NTS. Após o descanso de 5 cincos dias, os animais foram submetidos a um novo procedimento cirúrgico para a implantação de um cateter na artéria femoral, para registro de pressão. Para comparação entre os grupos foi utilizado teste t-*Student* não pareado e considerado um nível de significância de $p<0,05$. Os dados estão expressos em média±EPM. Todos os procedimentos foram aprovados pelo CEUA/UFPE (processo nº 23076.047690/2015-77). Foi possível observar que a massa corporal da prole de ratos submetidos à desnutrição proteica no período de gestação e lactação foi inferior ao controle em todas as idades avaliadas. Além disso, foram observadas diminuição sérica de albumina e proteínas totais em ambas as idades e um aumento na glicose sanguínea aos 22 dias, houve uma diminuição dos triglicerídeos aos 22 dias seguido de um aumento aos 30 dias. Ademais, foi visto que a pressão arterial (PA) basal foi maior no grupo HP. Em relação à resposta dos grupos à microinjeção de L-glutamato, o grupo de animais desnutrição apresentou uma maior resposta. Esses dados sugerem que a prole de ratos provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica na idade adulta pode apresentar uma maior sensibilidade ao neurotransmissor L-glutamato e, tal fato, pode estar associado a uma maior resposta a esse neurotransmissor.

Palavras-chave: Desnutrição proteica. Hipertensão. Neurotransmissores. Pressão arterial.

ABSTRACT

Studies show that protein malnutrition during critical periods of life (gestation and lactation) is able to promote cardiovascular and respiratory changes, which may be related to the onset of diseases in adulthood, such as hypertension. However, the mechanisms that lead to these changes are not yet fully understood. From this, the present study aims to evaluate if protein malnutrition during pregnancy and lactation is able to alter glutamatergic neurotransmission in neurons of cardiorespiratory control regions, such as the nucleus of the solitary tract (NTS). Wistar rats were obtained from mothers who received a normoprotein (NP, 17% protein) or low proteic diet (HP, 8% protein) in the perinatal period (gestation and lactation). At the ages of 1, 22, 30 and 60 days of life the body mass of these animals was verified. After weighting 290 g, according to the protocol, the animals underwent stereotactic surgery, which guide cannulas were implanted toward the NTS. After 5 days, the animals were submitted to a new surgical procedure for the implantation of a catheter in the femoral artery for pressure recording. A non-paired Student t-test was used to compare the groups and a significance level of $p < 0.05$ was considered. Data are expressed as mean±SEM. All procedures were approved by CEUA / UFPE (dossier nº 23076.047690 / 2015-77). It was possible to observe that the body mass of offspring rats submitted to protein malnutrition in the perianaltal period was lower than the control at all ages evaluated. In addition, serum albumin and total protein levels were observed at both ages and an increase in blood glucose at 22 days, triglycerides decreased at 22 days followed by an increase at 30 days. In addition, it was seen that basal blood pressure (BP) was higher in the LP group. Regarding to microinjection response of L-glutamate, the LP group presented a greater response. These data suggest that the offspring rats from mothers subjected to protein malnutrition in adulthood may present a greater sensitivity to the neurotransmitter L-glutamate and, therefore, may be associated with a greater response to this neurotransmitter.

Keywords: Blood pressure. Hipertension. Neurotransmitter agents. Protein malnutrition.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN	Do inglês, *American Institute of Nutrition*
APH	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CEUA	Comitê de Ética de Uso Animal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPT1	CarnitinaPalmitoilTransferase1
CVLM	Área Bulbar VentrolateralCaudal
EPM	Erro Padrão da Média
FC	Frequência Cardíaca
FR	Frequência Respiratória
GLUT4	Transportador de Glicose Tipo 4
HK	Hexoquinase
HP	Hipoproteico
NP	Normoproteico
NTS	Núcleo do Trato Solitário
PAM	Pressão Arterial Média
PAP	Pressão Arterial Pulsátil
PDK4	Do inglês: *PyruvateDehydrogenaseKinase4*
RNA	Ácido Ribonucleico
RVLM	Área VentrolateralRostal do Bulbo
RVLM	Área Bulbar VentrolateralRostral
SNAP	Sistema Nervoso Parassimpático
SNAS	Sistema Nervoso Simpático
SNC	Sistema Nervoso Central
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
β-HAD	Do inglês: *Beta Hydroxyacyl-Coenzyme-ADehydrogenase*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO 13

2.1 Ambiente perinatal e plasticidade fenotípica 13

2.2 Principais mecanismos de regulação da pressão arterial 15

2.3 Desnutrição proteica perinatal e hipertensão arterial 16

2.4 Desnutrição proteica perinatal, glutamato e o SNC 17

3 JUSTIFICATIVA 20

4 HIPÓTESE 21

5 OBJETIVOS 22

5.1 Objetivo geral 22

5.2 Objetivos específicos 22

6 MÉTODOS 23

6.1 Animais e manipulação nutricional 23

6.2 Avaliação do peso da prole 24

6.3 Análise bioquímica 24

6.4 Procedimento cirúrgico estereotáxico 25

6.5 Procedimento cirúrgico para implante de cateter em artéria femoral 25

6.6 Protocolo de microinjeção no NTS 25

6.7 Perfusão transcardíaca, crioproteção e histologia 26

6.8 Análise dos dados 27

7 RESULTADOS 28

7.1 Massa corporal 28

7.3 Pressão arterial em ratos acordados 29

7.4 Resposta à microinjeção de L-glutamato 31

8 DISCUSSÃO 33

9 CONCLUSÃO 37

REFERÊNCIAS 38

1 INTRODUÇÃO

Globalmente, as doenças cardiovasculares representam cerca de 17 milhões de mortes por ano, o que simboliza quase um terço do total. Dentre esses valores, a hipertensão representa 9,4 milhões de mortes a cada ano. Outro dado importante que a OMS nos traz é de que no ano de 2008, aproximadamente 40% dos adultos maiores de 25 anos foram diagnosticados com hipertensão (WHO, 2013). Deficiências nutricionais e modificações no ambiente durante os períodos de gestação e lactação, períodos que são considerados críticos do desenvolvimento, geram riscos consideráveis para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta (ALVES *et al.*, 2014; LUCAS, 1998; VICTORA *et al.*, 2008; VON EHR; VON VERSEN-HÖYNCK, 2016; WELLS, 2012). A desnutrição proteica é um exemplo prevalente de distúrbio nutricional nos países em desenvolvimento, sendo um dos fatores não genéticos que mais interfere no desenvolvimento normal de órgãos e tecidos (BARKER, 1990).

Alterações nutricionais como a desnutrição proteica, parecem estar associadas ao aparecimento de doenças cardiovasculares na vida adulta, também levando às alterações na massa corporal de animais que passaram por uma restrição de proteínas durante o período perinatal. Essas alterações podem ser explicadas através da plasticidade fenotípica, que pode ser definida como a habilidade de um organismo alterar o fenótipo de acordo com alterações ambientais, sem que haja alterações genéticas (WEST-EBERHARD, 2005**)**. Entretanto, as adaptações geradas sobre o sistema cardiorrespiratório, através das alterações ambientais, ainda não estão totalmente compreendidas.

Estudos experimentais com animais mostram uma relação consistente entre a existência de um vínculo de causa e efeito entre as condições de estresse e desnutrição no útero, ou durante o período inicial do desenvolvimento, o que pode ser um importante fator de risco para o surgimento de doenças crônicas e degenerativas associadas, como a síndrome metabólica na idade adulta (SAWAYA; LEANDRO; WAITZBERG, 2013).

É mostrado que nos vertebrados o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC (FOLEY, 1998; MELDRUM, 2000; ZHOU; DANBOLT, 2014), A ativação simpática, assim, é dada através da ativação de receptores glutamatégicos a partir da presença do neurotransmissor glutamato. Através de indícios, pode-se suspeitar que o aumento pressórico é dado através da hiperativação simpática, o que pode ser desencadeado através de uma maior quantidade desse neurotransmissor. As informações sobre a PA são recebidas e interpretadas no SNC (MACHADO *et al.*, 1997), através de núcleos que estão localizados no

tronco cerebral e também no cérebro. Esses núcleos são responsáveis por receberem as informações dos barorreceptores e quimiorreceptores, e de levarem as informações ao NTS, que é o primeiro núcleo que irá receber as informações aferentes (URBANSKI; SAPRU, 1988), para posteriormente as informações seguirem para outros núcleos do SNC.

O NTS é um núcleo localizado no tronco encefálico, onde é divido em 3 porções que são: NTS rostral, NTS intermediário e o NTS comissural ou caudal. Em todas as porções do NTS estão envolvidas na participação do controle cardiorrespiratório, no entanto, as porções intermediárias e comissural do NTS são as que mais atuam no controle cardiovascular e respiratório, isso porque as porções posteriores são as primeiras a receberem as aferências de quimiorreceptores e barorreceptores (LOEWY, 1990). A partir disto, o presente estudo busca entender os mecanismos subjacentes à desnutrição proteica perinatal sobre o controle central do sistema cardiorrespiratório e sua relação com o surgimento da hipertensão arterial.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Ambiente perinatal e plasticidade fenotípica

Estudos epidemiológicos mostram uma associação entre eventos durante o início da vida, período considerado “sensível” ao desenvolvimento, e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas na idade adulta (LUCAS, 1998; VICTORA *et al.*, 2008; VON EHR; VON VERSEN-HÖYNCK, 2016; WELLS, 2012). A ingestão inadequada de nutrientes durante o período fetal está associada a várias alterações na prole a partir do nascimento até idades posteriores, tais como o baixo peso ao nascer e déficit de maturação e crescimento, bem como a predisposição às doenças cardiometabólicas na vida adulta (BATESON *et al.*, 2004). Os fenômenos de crescimento e desenvolvimento dos sistemas fisiológicos são influenciados de forma relevante por diversos fatores, como estresse, álcool, fumo, fármacos, hipóxia, atividade física e condição nutricional (CLAPP, 2006; GLUCKMAN; HANSON, 2007; GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007).

O organismo possui necessidades nutricionais, cada tecido possui sua necessidade energética específica, e essas necessidades variam de acordo com a fase do desenvolvimento em que o indivíduo se encontra e também às diversas situações ambientais. O cérebro, por exemplo, possui uma necessidade energética voltada ao metabolismo glicolítico, uma vez que os ácidos graxos não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica, para serem utilizados como fonte energética. As fontes energéticas surgem de várias formas, porém depende do período do desenvolvimento. Durante o período de gestação e lactação a fonte de substratos energéticos necessária para o desenvolvimento depende do aporte nutricional da mãe (CONTRERAS *et al.*, 2008). Durante a restrição alimentar materna, pode ocorrer um prejuízo na trajetória fetoplancentária do crescimento, o que resulta na modificação do padrão de crescimento do feto. A desnutrição proteica materna pode levar a uma alteração do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (APH) do feto, assim podendo desenvolver um aumento da pressão arterial na vida adulta (GEORGIEFF, 2007) e também alterações como o aumento do tônus simpático (BARROS *et al.*, 2015).

No entanto, as influências ambientais não interferem no padrão genético, e sim no fator transcricional dos genes, que são responsáveis pela produção de proteínas específicas. Assim, o ambiente encontra-se intimamente relacionado e pode modelar o comportamento humano (SAWAYA; LEANDRO; WAITZBERG, 2013). Essas alterações no desenvolvimento podem ser explicadas através da plasticidade fenotípica, que pode ser

definida como a habilidade de um organismo reagir a mudanças do meio ambiente interno e externo, como forma, estado, movimento e alterações na atividade sem alterações genéticas (WEST-EBERHARD, 2005).

O termo “plasticidade fenotípica” é usado para explicar a ontogênese, ou seja, o desenvolvimento de um organismo onde os fatores ambientais podem gerar ajustes no fenótipo que permanecem por toda vida (GLUCKMAN; HANSON, 2007). Associa-se frequentemente às alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos como coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos e também às alterações metabólicas, com consequente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não fatais (MALTA *et al.*, 2014). Esses acontecimentos podem ser explicados através do conceito de “fenótipo poupador”, em que, o feto é capaz de se adaptar e sobreviver em um ambiente nutricional pobre, mesmo que para isso seja necessário reduzir o seu crescimento somático (HALES; BARKER, 2001). Essas adaptações são benéficas ao curto prazo, por garantir a sobrevivência da espécie, porém podem gerar alguns custos ao longo prazo, através de alterações fenotípicas erisco de aparecimento de doenças cardiometabólicas (GLUCKMAN *et al.*, 2009).

A plasticidade fenotípica é importante em todas as fases da vida, por fornecer ao indivíduo a habilidade de reorganizar os sistemas de regulação em resposta às pressões imediatas de mudanças ambientais, conferindo uma vantagem adaptativa ao organismo. O efeito da subnutrição materna sobre o filho, por exemplo, implica posteriormente em uma suscetibilidade para o aparecimento precoce de obesidade. Até então se sabe que vários insultos ambientais podem ocasionar esse fenômeno adaptativo, no entanto os mecanismos que promovem as mudanças pré-natais que podem desenvolver alterações funcionais na vida pós-natal ainda não estão bem esclarecidos (HSIAO; PATTERSON, 2012).

Um adequado suprimento nutricional é imprescindível para a manutenção apropriada do crescimento de todos os sistemas orgânicos, bem como o pleno desenvolvimento de suas respectivas funções, visto que a disponibilidade e a utilização de nutrientes interferem no padrão de divisão celular, determinado geneticamente. A nutrição se faz importante para a formação do cérebro, sendo a base para o desenvolvimento das capacidades cognitivas, motoras e sócio-emocionais, sendo importante especialmente durante o período de gestação e infância, consistindo períodos crucias do desenvolvimento (PRADO; DEWEY, 2014).

Há anos a desnutrição proteica vem sendo associada a alterações na prole e também a alterações na vida adulta, bem como o aparecimento de determinadas doenças. Segundo Widdowson e Mccance (1960) a desnutrição nos períodos de gestação e lactação é capaz de alterar o tamanho de ratos adultos. Snoeck *et al.* (1990) nos mostram que esse evento, da

desnutrição proteica perinatal, também é capaz de diminuir a vascularização no pâncreas, e os autores Garofano, Czernichow e Bréant (1997) sugerem que a desnutrição proteica é capaz de reduzir o número de ilhotas e células β-pancreática, bem como diminuir a produção de insulina. Alterações no tamanho, vascularização do pâncreas e nas células pancreáticas, bem como outras alterações, podem gerar alterações nos mecanismos de regulação da PA, assim podendo levar ao aumento da PA.

2.2 Principais mecanismos de regulação da pressão arterial

O controle da PA é dado por vários mecanismos, porém o mais importante dos mecanismos reflexos são os barorreceptores, também chamados de pressorreceptores. Eles são constituídos por terminações nervosas livres, que se situam na adventícia de grandes vasos, artéria aorta e artéria carótida, onde são estimulados por deformações das paredes desses vasos, normalmente provocadas pela onda de pressão e pelas características mecano-elásticas da parede (IRIGOYEN; CONSOLIM-COLOMBO; KRIEGER, 2001).

Os barorreceptores são o mecanismo nervoso mais conhecido. Ele atua através do reflexo de receptores de estiramento, que estão localizados em pontos específicos das paredes de diversas grandes artérias sistêmicas, estando principalmente no seio carotídeo e no arco aórtico. O aumento da PA desencadeia um estiramento nos barorreceptores fazendo com que essa informação seja transmitida para o SNC. A resposta do SNC, sobre esse acontecimento, é dada através de sinais de *"feedback"* que é enviada do SNC até que haja a normalização da PA. As respostas dos barorreceptores aórticos são semelhantes às dos receptores carotídeos (GUYTON; HALL, 2011).

Os barorreceptores respondem rapidamente às variações da PA. O primeiro núcleo que recebe os sinais de barorreceptores no SNC é o NTS, que está localizado no bulbo. Para que haja o controle da PA os sinais secundários inibem o centro vasoconstritor bulbar e excitam o centro parassimpático vagal. Os efeitos dessa resposta são vasodilatação das veias e arteríolas em todo o sistema circulatório periférico e também diminuição da FC e da força de contração cardíaca. A queda de pressão nos barorreceptores provoca um reflexo imediato, resultando em uma descarga simpática em todo o corpo, dessa forma regulando a PA (GUYTON; HALL, 2011).

A PA também é regulada pela ação dos quimiorreceptores, que são células sensíveis à redução de oxigênio e ao excesso de dióxido de carbono e íons de hidrogênio. Estes tem um íntimo contato com o sangue arterial, e tem o papel de excitar as fibras nervosas, que junto

com as fibras barorreceptoras, passam pelos nervos de Hering e pelos nervos vagos, dirigindo-se para o centro vasomotor do tronco encefálico. Os quimiorreceptores são estimulados através da redução do fluxo sanguíneo, dessa forma provocando a redução dos níveis de oxigênio e o acúmulo de dióxido de carbono de íons hidrogênio que não são removidos pela circulação (GUYTON; HALL, 2011).

A complexa interação dos sistemas fisiológicos depende de fatores genéticos e ambientais como, por exemplo, a atividade física ou a variação de dieta. Os mecanismos de regulação ao curto prazo englobam os reflexos cardiovasculares. Dessa forma, a informação periférica detectada por receptores específicos, é processada no SNC e volta à periferia por subdivisões eferentes do sistema nervoso autônomo (SNA): sistema nervoso simpático (SNAS) e sistema nervoso parassimpático (SNAP), para manter a homeostase (MACHADO *et al.*, 1997). Estudos do nosso laboratório mostram um aumento na pressão de ratos aos 90 dias (ALVES *et al.*, 2014, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015), o que é sugerido através de um aumento do tônus simpático, nessa idade (BARROS *et al.*, 2015). No entanto, os mecanismos fisiopatológicos da hipertensão em indivíduos que sofreram desnutrição proteica perinatal ainda não estão totalmente esclarecidos.

2.3 Desnutrição proteica perinatal e hipertensão arterial

As proteínas são moléculas de grande importância celular que se configuram como componentes estrutural e funcional em todas as células. Assim, uma vez adquiridas por meio da dieta, as mesmas fornecem aminoácidos, que são unidades básicas da estrutura molecular, as quais participam de diversos eventos, conforme a demanda orgânica. No tecido nervoso, os neurônios e células da glia realizam, dentre outras atividades celulares, síntese de moléculas a partir dos aminoácidos são elementos essenciais para a síntese de neurotransmissores ou sinalizadores químicos (SAWAYA; LEANDRO; WAITZBERG, 2013).

A desnutrição proteica materna neonatal está associada com o menor estoque de nutrientes maternos e, consequentemente, a menor transferência de nutrientes para os filhotes (ZHAN *et al.*, 2007). As alterações que podem ser geradas através de evento no período perinatal estão relacionadas ao decréscimo do crescimento pós-natal (ZHAN *et al.*, 2007) e também está relacionado a alterações no metabolismo e funcionamento de órgãos desses animais.

Diversos estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado que a desnutrição proteica, durante o período de gestação e lactação, tem forte relação com o surgimento da

hipertensão na vida adulta (FRANCO *et al.*, 2008; JOHANSSON *et al.*, 2007; LANGLEY-EVANS; WELHAM; JACKSON, 1999). O surgimento da hipertensão arterial na vida adulta é sugerido pelo aumento da atividade simpática (BARROS *et al.*, 2015; FRANCO *et al.*, 2008), dessa forma gerando um aumento da pressão arterial aos 90 dias (ALVES *et al.*, 2014), o que posteriormente pode levar a instalação da hipertensão. A hiperatividade simpática, que é sugerida como uma causadora do amento pressórico na idade adulta, pode estar relacionada com o controle exercido pelo NTS, uma vez que é o primeiro núcleo a receber as informações aferentes de controle cardiorrespiratório (URBANSKI; SAPRU, 1998). Além disso, também é discutido a participação de outros mecanimos que podem estar associados a esse aumento pressórico, como disfunções renais (KEIJZER-VEEN, 2005), redução da filtração glomerular e disfunções no sistema renina-angiotensina-aldosterona (CHEN *et al.*, 2010; SIDDIQUE *et al.*, 2014), que a longo prazo pode gerar um aumento pressórico.

Alterações no ambiente perinatal, como a desnutrição proteica, pode estar relacionada com alterações neuronais, que podem levar ao aumento da atividade simpática e posteriormente um aumento da pressão arterial. Essas alterações neuronais decorrentes da desnutrição protéica perinatal, que podem levam ao aumento da atividade simpática, pode ter relação com a neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que o glutamato é principal neurotransmissor excitatório do SNC (FOLEY *et al.*, 1998; MELDRUM, 2000; ZHOU, DANBOLT, 2014).

2.4 Desnutrição proteica perinatal, glutamato e o SNC

O crescimento e desenvolvimento dos constituintes do sistema nervoso, como neurônios e células da glia, dependem do aporte adequado de todos os nutrientes, porém alguns parecem ter maior efeito durante a vida fetal tardia e durante a fase neonatal (JORDAN; KÖNNER; BRÜNING, 2010). A nutrição é especialmente importante durante a gestação e infância, que são os períodos cruciais para a formação do cérebro. Uma nutrição adequada é um aspecto esperado pelo cérebro, para que haja o desenvolvimento normal (NELSON, 2007), sendo necessária desde o início para a formação da placa neural e do tubo neural (PRADO; DEWEY, 2014).

O tronco cerebral é considerado o principal local de integração de informações para uma ação tônica ou fáscia sobre o sistema cardiovascular. A regulação da atividade cardíaca e da circulação periférica pelo SNC, sendo acompanhada pela ativação de grupos de neurônios localizados principalmente, mas não exclusivamente, no tronco cerebral (RASIA-FILHO; RIGATTO; LAGO, 2004). Em ratos, a desnutrição imposta durante o período crítico de

desenvolvimento, como a lactação, induz efeitos permanentes sobre o número de neurônios, tamanho do cérebro, comportamento, aprendizagem e memória (BARRETO-MEDEIROS *et al.*, 2004, 2005, 2012).

As aferências dos barorreceptores arteriais, quimiorreceptores periféricos e receptores cardiopulmonares, fazem as suas primeiras sinapses no NTS, localizado no tronco cerebral (PALKOVITS; ZÁBORSZKY, 1977). O primeiro núcleo que recebe as respostas aferentes no SNC é o NTS, sendo uma região chave na modulação da atividade cardiovascular e respiratória (MACHADO *et al.*, 1997).

O glutamato é um aminoácido não essencial, utilizado como neurotransmissor por mais da metade das terminações nervosas do cérebro. Na maior parte das vezes atua como sinalizador excitatório. A disponibilidade de nutrientes no início da vida é capaz influenciar não apenas o aspecto estrutural e a neuroanatomia, mas também a neuroquímica e a neurofisiologia (SAWAYA; LEANDRO; WAITZBERG, 2013). Estudos mostraram que a microinjeção do L-glutamato no NTS de ratos anestesiados promove respostas semelhantes àquelas quando da ativação dos barorreceptores, ocasionando uma hipotensão seguida de bradicardia, sugerindo então que o L-glutamato é o neurotransmissor liberado pelos aferentes barorreceptores no NTS (COLOMBARI; TALMAN, 1995; TALMAN; PERRONE; REIS, 1980).

Diversas evidências experimentais sugerem que as vias neurais ativadas pela excitação dos quimiorreceptores periféricos envolvem uma projeção direta do NTS para o RVLM (via simpato-excitatória), a qual promove resposta pressora (URBANSKI; SAPRU, 1988), enquanto que outra via neural ativada pelos quimiorreceptores periféricos envolve uma projeção do NTS para o núcleo ambíguo, promovendo uma resposta de bradicardia (parassimpato-excitatória). Um dos mais estudados neurotransmissores, que está envolvido nas vias aferentes cardiovasculares é o L-glutamato, um aminoácido excitatório. A partir do NTS, neurônios projetam-se para outras estruturas bulbares, tais como a área bulbar ventro lateral rostral (RVLM), área bulbar ventro lateral caudal (CVLM) (URBANSKI; SAPRU, 1988) e núcleo ambíguo (STUESSE; FISH, 1984), as quais são responsáveis pela geração da atividade autonômica.

Alterações na PA também têm sido associadas a alterações respiratórias, em animais que sofreram desnutrição proteica perinatal. Ambas as alterações, de pressão arterial e respiratória, podem ser desencadeadas por um aumento na atividade simpática (ALVES *et al.*, 2015). Também tem sido demonstrado que a modulação respiratória pode ter participação no surgimento da hipertensão (ALVES *et al.*, 2014, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015). Estudos

sugerem que os neurônios respiratórios, que estão no tronco encefálico poderiam modular o sistema cardiovascular, o que aumentaria a respiração e posteriormente levaria ao aumento pressórico através do SNC (COSTA-SILVA; ZOCCAL; MACHADO, 2012). O glutamato tem participação na modulação da atividade simpática dos sistemas cardiovascular e respiratório, uma vez que é o principal neurotransmissor excitatório, essa modulação pode ser gerada através da presença do glutamato e a sua relação com o seu receptor, assim a neurotransmissão glutamatérgica pode ter relação com o aumento da atividade simpática, o que pode levar ao aumento pressórico e a alterações respiratórias em animais que sofreram desnutrição proteica no período de gestação e lactação.

3 JUSTIFICATIVA

Distúrbios nutricionais são prevalentes nos países que estão em processo de desenvolvimento. Segundo Barker (1990), a desnutrição é um dos fatores não genéticos que mais interfere no desenvolvimento normal de órgãos e tecidos. Através da relevância que a nutrição adequada tem como fator decisivo para o desenvolvimento normal e também da funcionalidade do mesmo é indispensável o esclarecimento dos mecanismos que proporcionam o aumento da PA e posteriormente leva a instalação da hipertensão (ALVES *et al.*, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015), além do surgimento de doenças metabólicas na vida adulta (VON EHR; VON VERSEN-HÖYNCK, 2016). Através da forte relação que há entre os eventos durante o período perinatal e o aparecimento de doenças na vida adulta, se faz importante o entendimento dos mecanismos que geram alterações que levam às doenças na vida adulta.

A partir disso, se faz importante o entendimento dos processos que levam ao surgimento de doenças cardiometabólicas para que hajam melhores estratégias que levem ao tratamento e prevenção das mesmas. Uma vez que a hipertensão é uma doença de alta prevalência é importante o entendimento dos seus mecanismos etiológicos. O presente trabalho pretende avaliar a relação entre o neurotransmissor glutamato e o NTS. Através do conhecimento e do entendimento dos mecanismos que levam ao surgimento da hipertensão é de grande importância para a criação de métodos para o tratamento e prevenção dessa condição, que possui uma alta prevalência no Brasil e no mundo. Além de melhorar a qualidade de vida desses indivíduos, também poderá haver uma melhora na utilização do dinheiro público destinado à população com essa condição.

4 HIPÓTESE

A desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação induz ao aumento da neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário da prole de ratos adultos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a neurotransmissão glutamatérgica do núcleo do trato solitário da prole de ratos adultos provenientes de mães que receberam dieta hipoproteica durante a gestação e lactação.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o ganho de massa corporal dos animais nas seguintes idades: 1º, 22º, 30º e 60 dias de vida, para fins de comparação entre os grupos.
- Analisar os parâmetros bioquímicos de albumina, proteínas totais, glicose, colesterol total e triglicerídeos, nas idades de 22 e 30 dias.
- Investigar a resposta da microinjeção de L-glu no NTS sobre variáveis hemodinâmicas (PAP, PAM e FC) e ventilatórias de ratos adultos (FR).

6 MÉTODOS

6.1 Animais e manipulação nutricional

Ratas albinas primíparas da linhagem *Wistar*, provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória da UFPE, foram acasaladas com ratos machos na proporção de 1:1. A observação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal foi usada para definir o 1° dia de prenhez. A partir da determinação da prenhez, as ratas foram colocadas em gaiolas individuais e alocadas aleatoriamente em suas respectivas dietas.

Para a manipulação nutricional foram utilizados dois tipos de dieta de acordo com a AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993):

- Grupo NP: recebeu dieta normoproteica (17% de proteína) durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e de lactação (21 dias);
- Grupo HP: recebeu dieta hipoproteica (8% de proteína) durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e de lactação (21 dias).

As dietas confeccionadas foram isocalóricas, com alteração no conteúdo de proteína e suas composições químicas estão descritas na **TABELA 1**. A prole proveniente destas fêmeas foi reduzida a 8 ratos machos por ninhada. Nos casos da ninhada ter sido composta por menos de 8 ratos machos, ratas fêmeas foram utilizadas para padronização do tamanho da ninhada. Após o desmame (ao 22° dia de vida), os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com água e ração padrão de biotério (Presence, São Paulo, Brasil) *ad libitum.* Após o desmame as ratas fêmeas e os machos utilizados para obtenção da prole foram eutanasiados com uma overdose de anestésico (tiopental 50mg/Kg), bem como a prole de fêmeas.

A temperatura e a umidade foram mantidas dentro dos limites de 22 a 25 °C e 55 a 65%, respectivamente. Os experimentos de microinjeção foram realizados na prole entre 70-90 dias de vida. Após os protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico (tiopental 50mg/Kg).

Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal (CEUA) de nº 23076.047690/2015-77 (Anexo 1) e seguiu as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

TABELA 1 – Composição das dietas (g/100g de dieta)

Nutriente (g)	Normoproteica (17% de proteína)	Hipoproteica (8% de proteína)
Caseína (85%)*		
Amido dextrinizado	20	9,41
Celulose	13	13,2
Sacarose	5	5
Amido	10	10
Óleo de soja	39,74	50,34
Colina	7	7
Metionina	0,25	0,25
Mix vitamínico	1	1
Mix mineral	3,5	3,5
Densidade energética (kcal/g)	3,94	3,94

Fonte: AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993)
Nota: * A caseína utilizada continha 85% de pureza, analisada pelo método de Kjeldahl.

6.2 Avaliação do peso da prole

A partir do 19º dia de prenhez até o parto, as mães foram observadas três vezes por dia (às 9h, 14h e 18h), a fim de registrar a data do nascimento dos filhotes. No 1º, 22º, 30º e 60º dias de vida foram registrados o peso das proles para comparação dos grupos e verificação da indução de desnutrição.

A partir do 70º até o 90º dia de vida, os animais foram pesados 3x/sem, com a finalidade de dar início as avaliações funcionais, idade média que os animais atingiam a massa corporal de aproximadamente 290g, mas sem fins de comparação.

6.3 Análise bioquímica

Aos 22 e 30 dias de idade, os animais de ambos os grupos passaram por jejum *overnight* e, em seguida, foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg)

i.p. para coleta de amostras de sangue através de perfuração do plexo retro-orbital, visando à comparação dos grupos e verificação da indução de desnutrição. As amostras de soro foram coletadas para quantificação de proteínas totais, albumina, glicose de jejum, triglicerídeos e colesterol total, utilizando-se, para isso, kits comerciais (Labtest Diagnóstica SA).

6.4 Procedimento cirúrgico estereotáxico

Cinco dias antes dos experimentos de microinjeção, os animais do grupo NP ou HP entre 70-90 dias de vida foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) i.p. e posicionados em aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA) e duas cânulas-guia em aço inox (15 mm de extensão) foram implantadas em direção ao NTS (ântero-posterior: -14 mm; latero-lateral: +/-0.5 mm; e dorso-ventral: -9 mm em relação ao bregma) de acordo com as coordenadas descritas no atlas de Paxinos e Watson (1997). As cânulas-guia foram fixadas ao osso com resina acrílica odontológica e um fio de aço foi mantido dentro de cada cânula-guia para evitar a oclusão das mesmas. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção profilática subcutânea (1mL/kg) de antibiótico (Pentabiótico veterinário - 2400 UI) e intramuscular de antiinflamatório (Cetoprofeno – 0,1mL) (MACHADO *et al.*, 2004).

6.5 Procedimento cirúrgico para implante de cateter em artéria femoral

Após recuperação cirúrgica de cinco dias da estereotaxia, os animais foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.), e em seguida, foi realizada uma cirurgia para implante de cateter de polietileno em artéria femoral para registro da pressão arterial. Os registros da pressão arterial e da frequência cardíaca foram realizados em animais não-anestesiados por meio da conexão da cânula da artéria femoral com o transdutor mecanoelétrico de pressão, cujo sinal foi devidamente amplificado (ML866/P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Austrália), digitalizado por meio de uma interface analógico/digital e amostrado a 2000 Hz em um microcomputador equipado com um *software* apropriado (LabChartTM Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), para posterior análise. A PAM e FC foram derivadas da PAP por meio deste sistema de aquisição.

6.6 Protocolo de microinjeção no NTS

Após repouso cirúrgico de 18-24h da canulação, foi iniciado o protocolo de microinjeção onde, inicialmente, os animais do grupo NP ou HP passaram por um período de 1 hora de adaptação nas câmaras de registro e, em seguida, receberam microinjeções bilaterais de L-glutamato (0.5 nmol/50 nL; MORAES *et al.*, 2011) no NTS, com um intervalo de 10 minutos entre elas. As microinjeções foram feitas utilizando-se uma seringa de Hamilton de 1 µl conectada a uma cânula injetora (30 G curta, Unoject, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por meio de um tubo de polietileno PE-10. A cânula injetora utilizada foi de 2,0 a 2,5mm mais longa que a cânula-guia, com o intuito de que as microinjeções fossem realizadas exatamente no sítio pretendido. Os efeitos sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca e a ventilação pulmonar foram continuamente registrados e analisados posteriormente. Após o término do procedimento experimental, foi microinjetado o corante azul de metileno para averiguação das regiões onde ocorreram as microinjeções.

6.7 Perfusão transcardíaca, crioproteção e histologia

Os animais foram profundamente anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilasina (10 mg/kg) i.p. O efeito do anestésico foi confirmado através do reflexo palpebral passando-se a pinça oftálmica de secção curva em frente ao olho do animal, o não piscar, somado à ausência dos reflexos de preensão, foi o sinal para o início da cirurgia. Esta foi realizada com o animal deitado com a região ventral voltada para cima e devidamente fixado pelos membros anteriores em superfície apropriada.

Suspenso o tecido da região ventral na linha mediana, um corte foi realizado a partir da região abdominal até a torácica. A partir do processo xifóide foi efetuado um corte em forma de “V” na musculatura e costelas, abrindo a cavidade torácica de maneira que expusesse o coração e permitindo o acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida a cânula para a perfusão a qual estava presa à área por uma pinça de *keller*. Afastando-se os pulmões, a aorta descendente foi pinçada impedindo, assim, que toda a sua área de irrigação fosse perfundida. A bomba peristáltica, na qual a cânula estava acoplada, foi acionada mantendo-se a velocidade de infusão da solução compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Foram infundidos 100mL de solução salina (NaCl, 0,9%) inicialmente à temperatura ambiente para remoção sanguínea dos vasos, evitando a formação de coágulos e proporcionando a correta penetração do fixador nos tecidos. Em seguida, foram infundidos 400 mL de solução fixadora (4% de paraformoldeído, pH 7,4), em uma velocidade de 120mL/min. A chegada do fixador na região dos membros anteriores foi constatada pela

contração destes, então foi adicionado gelo sobre a cabeça do animal para minimizar a degradação proteica.

Ao final da infusão os troncos fixados foram retirados do crânio e imersos na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (20%) durante 4 horas. Em seguida, foram armazenados em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio PBS - mais sacarose 20%) por 24 h. Posteriormente os troncos foram criosseccionados em cortes coronais de 40µm utilizando-se criostato de congelamento (Leica) e corados com azul de toluidina.

6.8 Análise dos dados

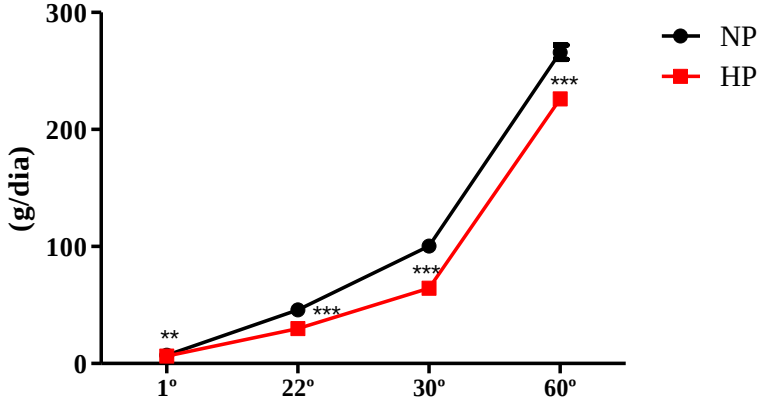
Os resultados foram expressos como média ± EPM. A análise de normalidade da amostra foi realizada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. A comparação entre os dados do grupo NP e do grupo HP foi realizada pelo teste "*t*" de *Student*não-pareado. O nível de significância foi considerado quando $p<0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Massa corporal

Avaliando a massa corporal da prole de ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal, observou-se que os animais que sofreram a desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação, apresentaram uma menor massa corporal desde o 1º dia de vida (HP: 6,3±0,2 g, n=23 *vs.* NP: 7,1±0,2 g, n=17; p=0,0024), quando comparado ao grupo normoproteico. Essa alteração se manteve no 22º dia (HP: 30±0,5 g, n=23 *vs.* NP: 45,9±1,6 g, n=21; p<0.0001), 30º dia (HP: 64,3±1,1 g, n=23 *vs.* NP: 100,4 ± 2,2 g, n=17; p<0,0001) e 60º dia (HP: 226,2±4 g, n=23 *vs.* NP: 266±6,1 g, n=20; p<0,0001) de vida **(Gráfico 1)**.

Gráfico 1 – Avaliação do ganho de massa corporal da prole no 1º, 22º, 30º e 60º dias de vida provenientes de mães que receberam dieta NP ou HP durante a gestação e lactação.



Os valores estão expressos em média ± EPM, n=17-23. **Diferença do NP, p<0,003. ***Diferença do NP, p<0,0001 (teste t de *Student* não-pareado). NP, prole de ratos cuja as mães receberam dieta normoproteica (17% de proteína); HP, prole de ratos experimentais cuja as mães receberam dieta hipoproteica (8% de proteína).
Fonte: BARBOSA, D. F. S., 2017.

7.2 Parâmetros bioquímicos

Nota-se que a desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação influenciou nos parâmetros bioquímicos analisados no 22º e 30º dia de vida dos animais **(Tabela 2)**. Também percebe-seque a dieta hipoproteica (8% de proteína), utilizada para a indução da desnutrição proteica, foi eficiente para induzir um quadro de desnutrição proteica nesses animais.

No 22º dia de vida, os animais do grupo HP apresentaram menores níveis plasmáticos de albumina (HP: 2,6±0.2 g/dL, n=11 *vs.* NP: 3,2±0,1 g/dL, n=16; p=0.0070), proteínas totais (HP: 5,2±0,2 d/dL, n=11 *vs.* NP: 6,2±0,2 g/dL, n=26; p=0.0025) e triglicerídeos (HP: 64,6±5,1 mg/dL, n=11 *vs.* NP: 115,7±7,8 mg/dL, n=17; p<0.0001) quando comparado ao grupo controle. No entanto, houve um aumento nos valores de glicose (HP: 132±17,1 mg/dL, n=11 *vs.* NP: 103±3,6 mg/dL, n=25; p=0.0254) nessa idade. Não foi observada diferença e nos níveis de colesterol total (HP: 127,6±6,4 mg/dL, n=4 *vs.* NP: 212,6±23,2 mg/dL, n=11; p=0,0512) entre os grupos.

Aos 30 dias de vida, os parâmetros de albumina (HP: 2,8±0,1 g/dL, n=27 *vs.* NP: 3,1±0,1 g/dL, n=28; p=0,0299) e proteínas totais (HP: 5,6±0,2 d/dL, n=29 *vs.* NP: 6,3±0,2 g/dL, n=29; p=0,0321) se mantiveram baixos, assim como aos 22 dias de vida. Porém, os níveis de triglicerídeos se apresentaram aumentados (HP: 276±19,3 mg/dL, n=14 *vs.* NP: 150,1±11,5 mg/dL, n=24; p<0,0001) nessa idade. A glicose de jejum (HP: 93,2±2,9 mg/dL, n=28 *vs.* NP: 104,9±5,6 mg/dL, n=25; p=0,0632) e colesterol (HP: 82,2±4,9 mg/dL n=24 *vs.* NP: 88,8±5,2 mg/dL, n=25; p=0,3643), não diferiram entre os grupos no 30º dia de vida.

Tabela 2 – Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos aos 22 e 30 dias de vida submetidos a dieta NP ou HP durante a gestação e lactação (g/dL).

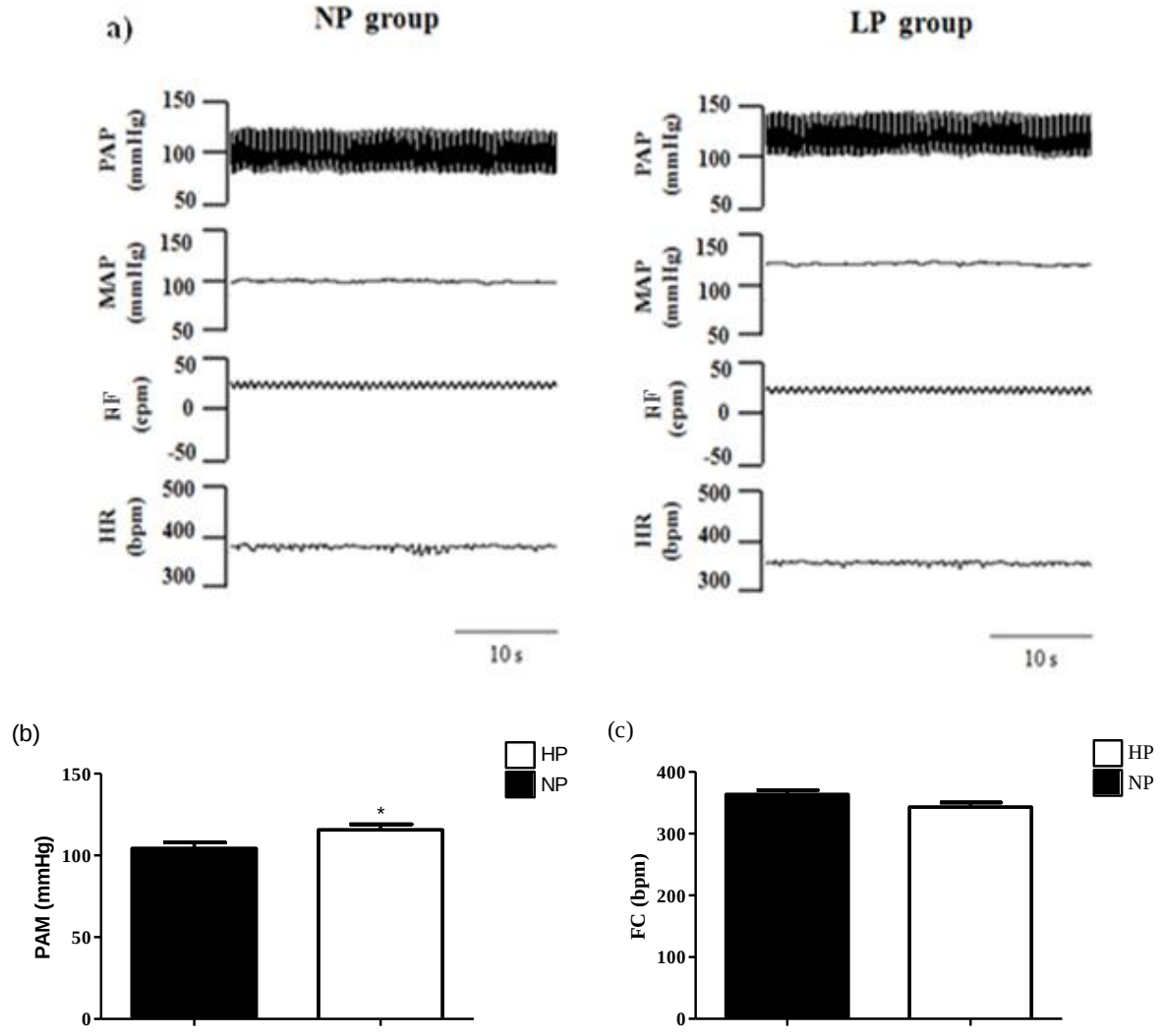
Bioquímica	**22 dias**		**30 dias**	
	NP	**HP**	**NP**	**HP**
Albumina (g/dL)	3,2±0.1 n=16	2,6±0,2** n=11	3,1±0,1 n=28	2,8±0,1* n=27
Proteínas totais (g/dL)	6,2±0,2 n=26	5,2±0,2** n=11	6,3±0,2 n=29	5,6±0,2* n=29
Glicose (g/dL)	103±3,6 n=25	132±17,1* n=11	104,9±5,6 n=25	93.200±2,9 n=28
Colesterol (g/dL)	212,6±23,2 n=11	127,6±6,4 n=4	88,8±5.239 n=25	82,2±4,9 n=24
Triglicerídeos (g/dL)	115,7±7,8 n=17	64,6±5,1*** n=11	150,1±11,5 n=24	276±19,3*** n=14

Fonte: BARBOSA, D. F. S., 2017.
Nota: *Diferença do NP, p<0,05.

7.3 Pressão arterial em ratos acordados

Os animais expostos a uma restrição de proteínas durante o período de gestação e lactação, grupo HP, apresentaram uma pressão arterial sistólica basal (HP: 142,9±4.9 mmHg, n=15 *vs.* NP: 128,6±4.7 mmHg, n=18; p=0,04) e PAM (HP: 115,7±3 mmHg, n=15 *vs.* NP: 104,3±3,7 mmHg, n=18; p=0,03) mais elevadas, quando comparado com o grupo controle **(Gráfico 2b)**. Os grupos não apresentaram diferença estatística para os parâmetros basais de FC (HP: 343,1±7,5 bpm *vs.* NP: 363,6±6.7 bpm, n=18; p=0,05) **(Gráfico 2c)** e FR (HP: 100,7±5,7 cpm, n=13 *vs.* NP: 100,8±2,7 cpm, n=17; p=0,989).

Gráfico 2 – (a) Registro representativo dos parâmetros de PAP, PAM, FR e FC, (b) diferença do valor basal da PAM e (c) FC.

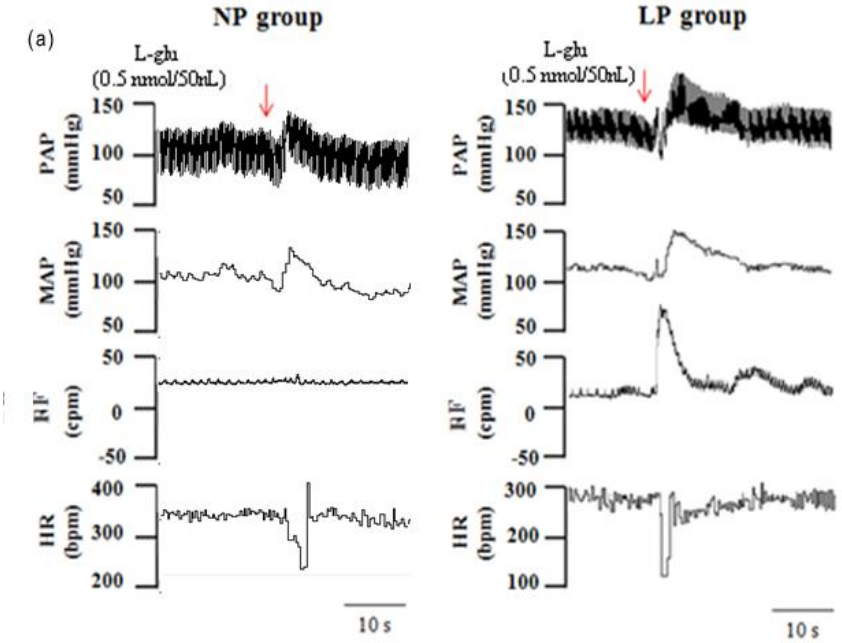


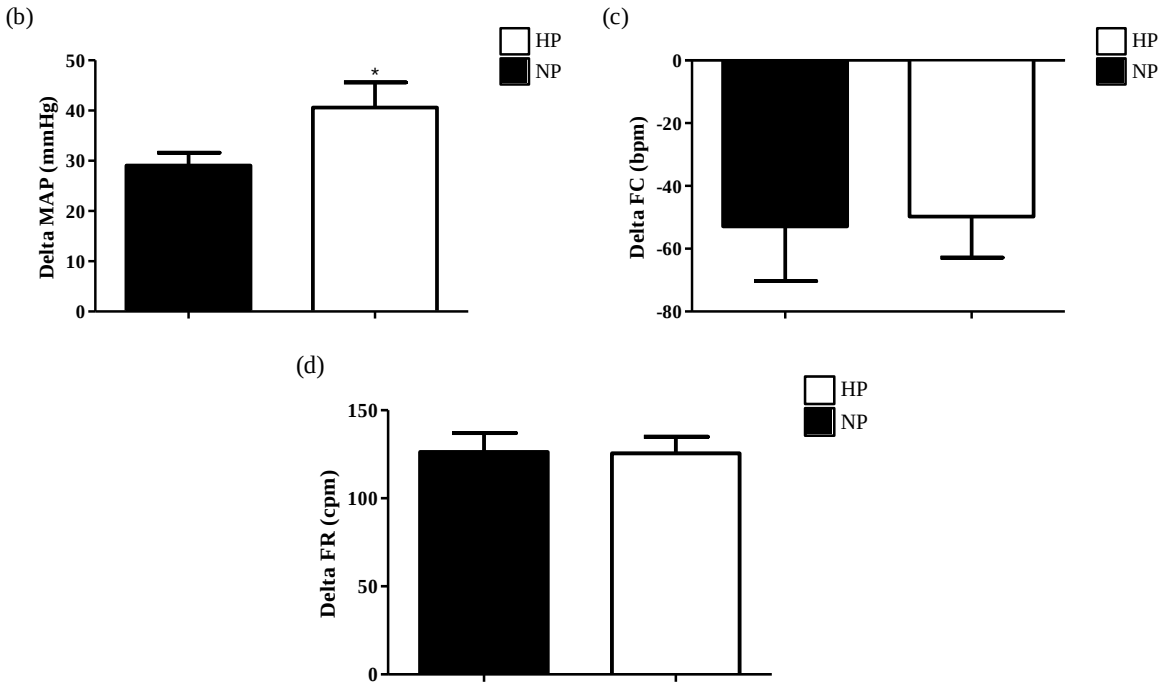
Os valores estão expressos em média ± EPM, n=13-18. *Diferença do NP, p<0,04 (teste t de *Student* não-pareado). NP, prole de ratos cujas mães receberam dieta normoproteica (17% de proteína); HP, prole de ratos experimentais cujas mães receberam dieta hipoproteica (8% de proteína).
Fonte: BARBOSA, D. F. S., 2017.

7.4 Resposta à microinjeção de L-glutamato

Ambos os grupos HP e NP não apresentaram diferença estatística em resposta à microinjeção de veículo (salina) sobre os parâmetros de ΔPAM (HP: 6,5±1,8 mmHg, n=12 *vs.* NP: 10,8±1,8 mmHg, n=16; p=0,114), ΔFC (HP: -23,1±13,7 bpm, n=13 *vs.* NP: -35,5±11,9 bpm, n=16; p=0,5) e ΔFR (HP: 13,7±3,3 cpm, n=10 *vs.* NP: 9,9±2,8 cpm, n=12; p=0,38). No entanto, o grupo HP mostrou uma maior resposta à microinjeção de L-glu no ΔPAM (HP: 40,6±5 mmHg, n=14 *vs.* NP: 29±2,5 mmHg, n=14; p=0,04) **(Gráfico 4b)**. Entretanto, não foram encontradas respostas similares no ΔFC (HP: -49,77±13 bpm, n=14 *vs.* NP: -52,9±17,3 bpm, n=14; p=0,88) **(Gráfico 4c)** e ΔFR (HP: 26,4±6,4 cpm, n=11 *vs.* NP: 23,4±2,7 cpm, n=11; p=0.502) **(Gráfico 4d)**, entre os grupos analisados.

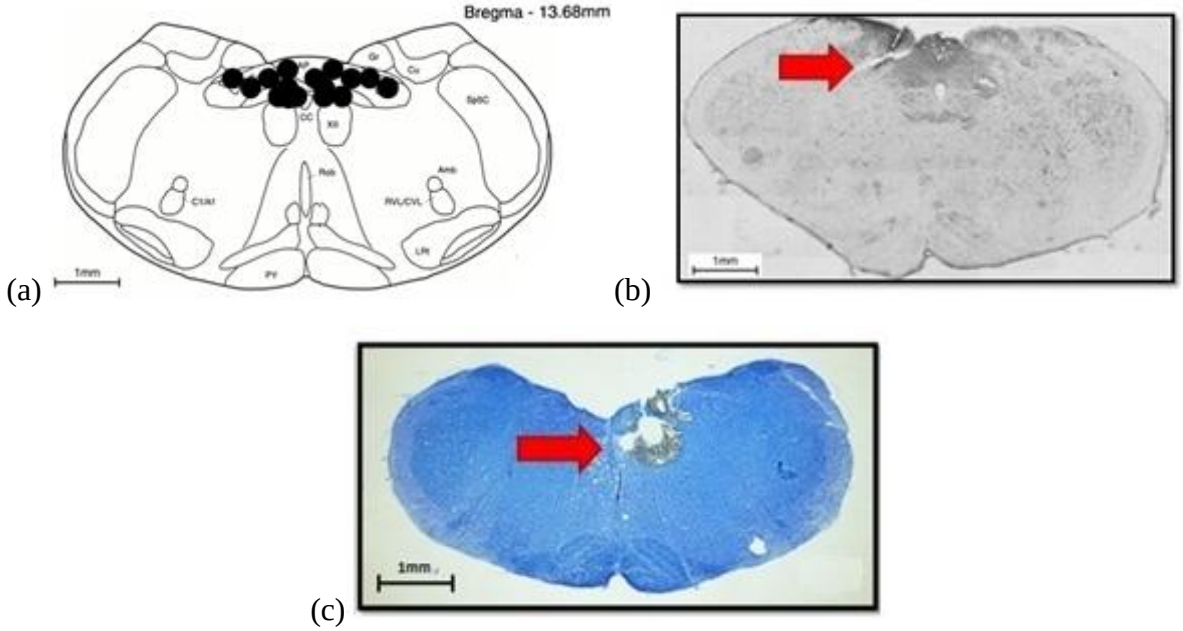
Gráfico 3 – (a) Registro representativo dos grupos HP e NP mostrando o ΔPAP, ΔPAM, ΔFC e ΔFR, no momento da microinjeção de L-glutamato. Alterações geradas através da microinjeção no NTS de ratos acordados no (b) ΔPAM, (c) ΔFC e (d) ΔFR.





Os valores estão expressos em média ± EPM, n=10-16. *Diferença do NP, p<0,04 (teste t de *Student* não-pareado). NP, prole de ratos cuja as mães receberam dieta normoproteica (17% de proteína); HP, prole de ratos experimentais cuja as mães receberam dieta hipoproteica (8% de proteína).
Fonte: BARBOSA, D. F. S., 2017.

Gráfico 4 – (a) Desenho representativo de onde ocorreram as microinjeções bilaterais, (b) (c) micrografia representativa, mostrando que foi microinjetado o L-glu no NTS.



NP, prole de ratos cujas mães receberam dieta normoproteica (17% de proteína); HP, prole de ratos experimentais cujas mães receberam dieta hipoproteica (8% de proteína).
Fonte: BARBOSA, D. F. S., 2017.

8 DISCUSSÃO

Foi encontrado nos animais do grupo HP uma menor massa corporal, quando comparado com o grupo NP. Sabe-se que a desnutrição proteica perinatal é capaz de induzir uma série de mudanças metabólicas, fisiológicas e também alterações nos parâmetros estruturais, como por exemplo, a redução na massa corporal, podendo persistir até a vida adulta. Animais que passaram por um episódio de desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação, apresentam uma menor massa corporal (ALVES *et al.*, 2014). A placenta é conhecida como reguladora-chave na interação ou ligação que há entre mãe e feto, desempenhando uma função de regulação de transporte de nutrientes, além de possuir função endócrina e imunológica (HSIAO; PATTERSON, 2012).

O aporte proteico materno insuficiente pode estar intimamente relacionado com uma diminuição da oferta de aminoácidos para o feto, através da placenta e leite materno nos períodos de gestação e lactação, o que acarreta em uma diminuição da massa corporal da prole. A menor oferta de proteínas para o feto pode gerar um efeito onde os aminoácidos são mobilizados com prioridade para os tecidos vitais, que mais necessitam desses aminoácidos, dessa forma os músculos poderão ter a quantidade de suas fibras musculares reduzidas, além de mudanças no padrão da expressão de genes que envolvem a sinalização da insulina e metabolismo glicolítico (JONES; OZANNE, 2009; TOSCANO; MANHÃES-DE-CASTRO; CANON, 2008).

Em ratos recém-nascidos, a absorção de aminoácidos e carboidratos pode ser prejudicada na prole de ratas submetidas à desnutrição proteica durante o período perinatal, dando a entender o motivo pelo qual indivíduos frequentemente possuem uma menor massa corporal que os indivíduos nutridos, mesmo após a normalização da dieta (FITZGERALD; FERDINANDUS, 1975). Já é demonstrado que a desnutrição proteica durante os períodos de gestação e lactação é capaz de causar alterações na função mitocondrial e na capacidade glicolítica e oxidativa do músculo esquelético em ratos adultos (ARAGÃO *et al.*, 2013).

Alterações em diversos parâmetros bioquímicos foram apresentadas, o que corrobora com outros estudos, que também encontraram alterações bioquímicas em animais desnutridos (ALVES *et al.*, 2014; BARKER, 1990). A submissão de ratos a uma dieta pobre em proteínas, pode gerar um aumento na PA (ALVES *et al.*, 2014; COSTA-SILVA *et al.*, 2015), em seguida alterações na função renal, comparado ao grupo controle (VILLAR-MARTINI *et al.*, 2009). Alterações renais ocasionadas pela desnutrição proteica perinatal podem estar associada a diminuição de albumina e proteínas totais (KEIJZER-VEEN, 2005). A diminuição

dos parâmetros de albumina e proteínas totais, em ambas as idades analisadas, nos sugere um quadro de desnutrição proteica (ALVES *et al.*, 2014). Os parâmetros de albumina e proteínas totais, que apresentaram uma diminuição, pode ter sido acarretado por uma menor oferta de proteínas, via placenta e leite materno, o que irá resultar em uma diminuição de aminoácidos para o feto utilizar para que haja o desenvolvimento e funções fisiológicas normais (HSIAO; PATTERSON, 2012). Um estudo de Alves e *cols*. (2014), nos mostrou que os parâmetros de albumina e proteínas totais apresentaram menores valores, comparado ao grupo controle, em animais ainda jovens. Tem se observado que crianças com baixo peso ao nascer apresentam altos níveis de colesterol e glicose sérica, também podendo estar relacionado com uma menor quantidade de insulina circulante (BARKER, 1990).

Alterações na expressão gênica de algumas enzimas-chave do metabolismo glicolítico e oxidativo podem estar relacionadas com alterações nos parâmetros bioquímicos analisados. A desnutrição proteica perinatal pode alterar o padrão do mRNA da enzima PDK4, enzima que está relacionada com a conversão de piruvato em acetil-CoA, no entanto, uma diminuição da atividade dessa enzima pode afetar o metabolismo glicolítico e lipídico (HIRABARA *et al.*, 2006) da prole de ratas que sofreram desnutrição proteica perinatal. Entretanto uma redução, da enzima PDK4 no início da vida desses animais, pode acarretar uma inibição da oxidação de ácidos graxos, e em consequência, uma maior utilização de glicose (ZHANG *et al.*, 2014) como fonte de energia, resultante da maior conversão de piruvato em acetil-CoA, assim gerando uma maior quantidade de malonil-CoA, o que irá diminuir a oxidação de ácidos graxos. Posteriormente, é notado que no início da vida do animal há uma diminuição da atividade da CPT1, o que irá dificultar a oxidação de ácidos graxos e irá privilegiar a utilização de glicose como fonte de energia. É mostrado um aumento do mRNA da β-HAD, o que irá proporcionar uma maior utilização de ácidos graxos pela β-oxidação (ALVES *et al.*, 2017). Os valores de glicose sanguíneas, aos 22 dias de vida, apresentam um aumento, comparado ao grupo controle, o que pode estar relacionado com uma diminuição da maturação das células β-pancreáticas, o que irá resultar em uma diminuição da secreção de insulina (GAROFANO; CZERNICHOW; BRÉANT;1997). Também apresentando uma regulação negativa do GLUT4 e da via de sinalização da PI3K/AKT, um evento esperado em animais que sofreram desnutrição proteica materna (JONES; OZANNE, 2009).

Segundo Alves e cols. (2017), se percebe um aumento da transcrição da β-HAD, em animais do grupo HP, o que nos sugere que posteriormente o animal tenha preferência pela utilização de ácidos graxos, como fonte energética, ao invés de glicose sanguínea. Dessa forma podendo elevar os níveis de triglicerídeos, uma vez que o organismo do animal estará

mobilizando ácidos graxos para serem utilizados. A principal função da PGC1α está relacionada com a biogênese mitocondrial e também ao metabolismo lipídico, através disso se pode sugerir que uma adaptação ao curto prazo, pode envolver uma maior oxidação de aminoácidos (CARBONE; MCCLUNG; PASIAKOS, 2012). Através de alterações em enzimas chave do metabolismo lípidico e glicolítico, pode-se sugerir que a preferência pelo metabolismo glicolítico aos 22 dias pode gerar uma menor utilização de vias lipídicas e consequentemente menores valores de triglicerídeos, e aos 30 dias de vida uma maior preferência pelo metabolismo lípidico, o que pode gerar uma maior mobilização de ácidos graxos na corrente sanguínea e, em consequência, maiores valores de triglicerídeos nessa idade.

Nosso estudo observou que há um aumento da PA aos 90 dias de vida, o que também é encontrado em outros estudos anteriores (ALVES *et al.*, 2014, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015). Uma forma experimental de indução do aumento da PA em ratos é a desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação. Várias variáveis podem ter relação com o aumento da PA e posteriormente a instalação da hipertensão arterial, em animais nessa condição experimental. Esse aumento pode estar relacionado com o aumento da atividade simpática (BARROS *et al.*, 2015; FRANCO *et al.*, 2008), disfunções renais (KEIJZER-VEEN, 2005), redução da filtração glomerular e disfunções no sistema renina-angiotensina-aldosterona (CHEN *et al.*, 2010; SIDDIQUE *et al.*, 2014). Entretanto, pouco se sabe os mecanismos que levam a disfunções fisiológicas que geram esses efeitos. É sugerido que a desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação é capaz de induzir alterações no corpo carotídeo e no controle respiratório da prole (ALVES *et al.*, 2014, 2015).

Alterações respiratórias podem estar ligadas ao aumento da PA, nessa condição experimental, uma vez que ambas as alterações podem ser desencadeadas através de um aumento na atividade simpática (ALVES *et al.*, 2015). A participação da modulação respiratória também pode contribuir para o desenvolvimento da hipertensão (ALVES *et al.*, 2014, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015). No tronco encefálico é onde estão localizados os neurônios respiratórios, que podem modular o SNS e também os níveis de PA através de vias centrais. Os neurônios, localizados no tronco cerebral, são de grande importância na regulação da resposta simpática, através da interpretação de quimiorreceptores e barorreceptores, que estão localizados no arco aórtico e no seio carotídeo (COSTA-SILVA *et al.*, 2009; COSTA-SILVA; ZOCCAL; MACHADO, 2010; MORAES *et al.*, 2014). Dessa forma, o aumento pressórico é sugerido através do eixo central, ou seja, uma hiperatividade simpática desencadeada após um evento de restrição proteica durante o período de gestação e lactação.

As respostas de receptores à presença de neurotransmissores neuronais podem estar relacionadas com o surgimento desse aumento da atividade simpática, porém ainda não estão totalmente esclarecidos. No que diz respeito a mecanismos centrais de controle cardiorrespiratório deve-se citar o NTS, por ser considerado um núcleo chave para o controle cardiorrespiratório. Segundo Talman, Perrone e Reis (1980), a microinjeção de L-glutamato no NTS gera respostas semelhantes à ativação de barorreceptores, em ratos anestesiados, assim gerando uma resposta de queda de pressão e bradicardia (COLOMBARI; TALMAN, 1995; TALMAN; PERRONE; REIS, 1980). No entanto tem se sugerido que a microinjeção de L-glutamato no NTS de ratos não anestesiados, pode estar associado a uma simulação da ativação quimiorreflexa (MACHADO *et al.*, 1997). A presença do L-glutamato promove uma excitação em núcleos do SNC, inclusive no NTS, o que irá gerar um aumento da PA a partir da excitação de núcleos localizados no SNC. Os animais do grupo HP apresentaram uma maior resposta, quando comparado ao grupo NP. Essa resposta pode estar relacionada com uma maior quantidade do neurotransmissor glutamato ou com uma maior sensibilidade de receptores glutamatérgicos à presença desse neurotransmissor, ou seja, os neurônios envolvidos na geração e modulação do tônus simpático e respiratório parecem estar mais excitáveis em decorrência da desnutrição proteica materna.

A maior resposta, apresentada pelo grupo HP após a microinjeção de L-glutamato, pode sugerir que a desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação altera a resposta pressora e a relação entre o neurotransmissor L-glutamato e receptores no tronco encefálico, na vida adulta. Entretanto, mais estudos são necessários para que haja uma melhor compreensão entre os mecanismos excitatórios e inibitórios do SNC, e também a sensibilidade dos receptores glutamatérgicos. Dessa forma, o entendimento sobre os mecanismos centrais envolvidos na alteração do sistema autonômico, encontrados em indivíduos que sofreram desnutrição, pode levar ao desenvolvimento de estratégias governamentais com a finalidade de melhoria na saúde pública e também novas medidas de tratamento para essa condição.

9 CONCLUSÃO

Foi observado que houve uma diminuição no crescimento e na massa corporal da prole de mães que foram submetidas a desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação, isso pode ser explicado pela menor oferta para o feto de proteínas e aminoácidos, via placenta e leite materno. Também houveram a diminuição da albumina, proteínas totais e triglicerídeos aos 22 dias de vida. E aos 30 dias os parâmetros de albumina e proteínas totais se mantiveram baixos, também havendo um aumento nos triglicerídeos, nessa idade, o que nos sugere uma modificação no controle metabólico, nesses animais ainda jovens. Com relação a neurotransmissão glutamatergica, ela pode estar aumentada no NTS de ratos provenientes de mães submetidas a desnutrição proteica durante o período de gestação e lactação, principalmente no que diz respeito ao componente simpato-excitatório e de aumento de pressão arterial. Este pode ser um dos mecanismos que contribuem para um maior nível de pressão arterial média que foi observado nesses animais.

REFERÊNCIAS

ALVES, J. L. *et al.* Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. **Journal Of Nutrition**, Cambridge, v. 145, n. 5, p.907-914, 2015.

ALVES, J. L. *et al.* Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O2/CO2 chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **British Journal Of Nutrition**, Wallingford, v. 111, n. 04, p.606-615, 2014.

ALVES, J. L. *et al.* Transcriptional response of skeletal muscle to a low protein perinatal diet in rat offspring at different ages: The role of key enzymes of glucose-fatty acid oxidation. **The Journal Of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 41, p.117-123, 2017.

ARAGÃO, R. S. *et al.* Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. **Acta Physiologica**, Oxford, v. 210, n. 1, p.70-83, 2013.

BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ:** British Medical Journal, London, v. 301, n. 6761, p. 1111, 1990.

BARRETO-MEDEIROS, J. M. *et al*. Early malnourished rats are not affected by anorexia induced by a selective serotonin reuptake inhibitor in adult life. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p.211-214, 2002.

BARRETO-MEDEIROS, J. M. *et al.* Short communication. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p.49-52, 2004.

BARRETO-MEDEIROS, J. M. *et al.* The expression of an intraspecific aggressive reaction in the face of a stressor agent alters the immune response in rats. **Brazilian Journal Of Biology**, São Carlos, v. 65, n. 2, p.203-209, 2005.

BARROS, M. A. V. *et al.* Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutrition, Metabolism And Cardiovascular Diseases**, Roma, v. 25, n. 1, p.123-130, 2015.

BATESON, P. *et al.* Developmental plasticity and human health. **Nature**, London, v. 430, n. 6998, p.419-421, 2004.

CARBONE, J. W.; MCCLUNG, J. P.; PASIAKOS, S. M. Skeletal muscle responses to negative energy balance: effects of dietary protein. **Advances In Nutrition:** An International Review Journal, Bethesda, v. 3, n. 2, p.119-126, 2012.

CHEN, J. H. *et al.* Maternal protein restriction affects gene expression profiles in the kidney at weaning with implications for the regulation of renal function and lifespan. **Clinical Science**, London, v. 119, n. 9, p.373-387, 2010.

CLAPP, J.F. Influence of endurance exercise and diet on human placental development and fetal growth. **Placenta**, London, v. 27, n. 6-7, p.527-534, 2006.

COLOMBARI, E.; TALMAN, W. T. Denervation supersensitivity to glutamate in the nucleus tractus solitarii after removal of the nodose ganglion. **Brain research**, Amsterdam, v. 677, n. 1, p. 110-116, 1995.

CONTRERAS, M. A. *et al.* Chronic nutritional deprivation of n-3 α-linolenic acid does not affect n-6 arachidonic acid recycling within brain phospholipids of awake rats. **Journal Of Neurochemistry**, Oxford, v. 79, n. 5, p.1090-1099, 2008.

COSTA-SILVA, J. H. *et al.* New insights on the maternal diet induced-hypertension: potential role of the phenotypic plasticity and sympathetic-respiratory overactivity. **Frontiers In Physiology**, Lausanne, v. 6, p.1-6, 2015.

COSTA-SILVA, J. H.; ZOCCAL, D. B.; MACHADO, B. H. Chronic intermittent hypoxia alters glutamatergic control of sympathetic and respiratory activities in the commissural NTS of rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Pittsburgh, v. 302, n. 6, p. R785-R793, 2012.

FITZGERALD, J. F.; FERDINANDUS, L. D. Effect of maternal protein deprivation on in vitro neonatal intestinal function in rats. **The Journal Of Nutrition**, Cambridge, v. 105, n. 11, p. 1476-1480, 1975.

FOLEY, C. M. *et al.* Glutamate in the nucleus of the solitary tract activates both ionotropic and metabotropic glutamate receptors. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 275, n. 6, p. R1858-R1866, 1998.

FRANCO, M. C. P. *et al.* Circulating renin–angiotensin system and catecholamines in childhood: is there a role for birthweight? **Clinical Science**, London, v. 114, n. 5, p.375-380, 2008.

GAROFANO, A.; CZERNICHOW, P.; BRÉANT, B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. **Diabetologia**, Berlin, v. 40, n. 10, p.1231-1234, 1997.

GEORGIEFF, M. K. Nutrition and the developing brain: nutrient priorities and measurement. **The American Journal Of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 85, n. 2, p. 614S-620S, 2007.

GLUCKMAN, P. D. *et al.* Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. **The Lancet**, London, v. 373, n. 9675, p.1654-1657, 2009.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental plasticity and human disease: research directions. **Journal Of Internal Medicine**, Oxford, v. 261, n. 5, p. 461-471, 2007.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, A. S. Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. **American Journal Of Human Biology**, New York, v. 19, n. 1, p.1-19, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Regulação Nervosa da Circulação e o Controle Rápido da Pressão Arterial. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Brasil: Elsevier, 2011. Cap. 18. p. 213-223.

HIRABARA, S. M. *et al.* Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, Los Angeles, v. 1757, n. 1, p.57-66, 2006.

HSIAO, E. Y.; PATTERSON, P. H. Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development. **Developmental Neurobiology**, Hoboken, v. 72, n. 10, p.1317-1326, 2012.

IRIGOYEN, M. C.; CONSOLIM-COLOMBO, F. M.; KRIEGER, E. M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 1, p. 55-62, 2001.

JOHANSSON, S. *et al*. Increased catecholamines and heart rate in children with low birth weight: perinatal contributions to sympathoadrenal overactivity. **Journal Of Internal Medicine**, Oxford, v. 261, n. 5, p.480-487, 2007.

JONES, R; OZANNE, S. Fetal programming of glucose–insulin metabolism. **Molecular And Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 297, n. 1-2, p.4-9, 2009.

JORDAN, S. D.; KÖNNER, A. C.; BRÜNING, J. C. Sensing the fuels: glucose and lipid signaling in the CNS controlling energy homeostasis. **Cellular And Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 19, p.3255-3273, 2010.

KEIJZER-VEEN, M. G. Microalbuminuria and lower glomerular filtration rate at young adult age in subjects born very premature and after intrauterine growth retardation. **Journal Of The American Society Of Nephrology**, Washington, v. 16, n. 9, p.2762-2768, 2005.

LANGLEY-EVANS, S. C.; WELHAM, S. J. M; JACKSON, A. A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. **Life Sciences**, New York, v. 64, n. 11, p.965-974, 1999.

LOEWY, A. D. Central autonomic pathways. **Central regulation of autonomic functions**, Oxford, p. 88-103, 1990.

LUCAS, Alan. Programming by early nutrition: an experimental approach. **The Journal Of Nutrition**, New York, v. 128, n. 2, p. 401S-406S, 1998.

MACHADO, B. H. *et al.* Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 4, p.533-5, 1997.

MALTA, D. C. *et al.* Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 23, n. 4, p.599-608, 2014.

MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **The Journal Of Nutrition**, New York, v. 130, n. 4, p. 1007S-1015S, 2000.

MORAES, D. J. A. *et al.* Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **The Journal Of Physiology**, London, v. 592, n. 9, p.2013-2033, 2014.

NELSON, C. A. A Neurobiological perspective on early human deprivation. **Child Development Perspectives**, Malden, v. 1, n. 1, p.13-18, 2007.

PALKOVITS, M.; ZÁBORSZKY, L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. **Progress In Brain Research**, Amsterdam, v. 47, p. 9-34, 1977.

PRADO, E. L.; DEWEY, K. G. Nutrition and brain development in early life. **Nutrition Reviews**, Oxford, v. 72, n. 4, p.267-284, 2014.

RASIA FILHO, A. A.; RIGATTO, K. V.; LAGO, P. D. Mecanismos neurais centrais e periféricos da gênese e controle a curto prazo da pressão arterial: da fisiologia à fisiopatologia. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul,** [s. l.], v. 14, n. 3, p. 1-5, 2004.

REEVES, P. G. *et al.* AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal Of Nutrition**, Rockville, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

SAWAYA, A. L.; LEANDRO, C. G.; WAITZBERG, D. L. **Fisiologia da Nutrição na Saúde e na Doença–Da Biologia Molecular ao Tratamento**. São Paulo: Atheneu, 2013.

SIDDIQUE, K. *et al.* Effect of postnatal maternal protein intake on prenatal programming of hypertension. **Reproductive Sciences**, Thousand Oaks, v. 21, n. 12, p.1499-1507, 2014.

SNOECK, A. *et al.* Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. **Neonatology**, Cambridge, v. 57, n. 2, p.107-118, 1990.

STUESSE, S. L.; FISH, S. E. Projections to the cardioinhibitory region of the nucleus ambiguus of rat. **Journal of Comparative Neurology**, Hoboken, v. 229, n. 2, p. 271-278, 1984.

TALMAN, W.; PERRONE, M.; REIS, D. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science**, New York, v. 209, n. 4458, p.813-815, 1980.

TOSCANO, A. E.; MANHÃES-DE-CASTRO, R.; CANON, F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. **Nutrition**, Los Angeles, v. 24, n. 3, p.270-278, 2008.

URBANSKI, R. W.; SAPRU, H. N. Evidence for a sympatho excitatory pathway from the nucleus tractus solitarii to the ventrolateral medullary pressor area. **Journal Of The Autonomic Nervous System**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p.161-174, 1988.

VICTORA, C. G. *et al.* Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **The Lancet**, London, v. 371, n. 9609, p.340-357, 2008.

VILLAR-MARTINI, V. C. *et al.* Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. **Journal Of Hypertension**, New Delhi, v. 27, n. 6, p.47-51, 2009.

VON EHR, J.; VON VERSEN-HÖYNCK, F. Implications of maternal conditions and pregnancy course on offspring's medical problems in adult life. **Archives Of Gynecology And Obstetrics**, Berlin, v. 294, n. 4, p.673-679, 2016.

WELLS, J. C. K. Obesity as malnutrition: The role of capitalism in the obesity global epidemic. **American Journal Of Human Biology**, New York, v. 24, n. 3, p.261-276, 2012.

WEST-EBERHARD, M. J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **Journal Of Experimental Zoology Part B:** Molecular and Developmental Evolution, Hoboken, v. 304, n. 6, p.610-618, 2005.

WIDDOWSON, E. M.; MCCANCE, R. A. Some effects of accelerating growth. I. General somatic development. **Proceedings Of The Royal Society B:** Biological Sciences, London, v. 152, n. 947, p.188-206, 1960.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A global brief on Hypertension:** Silent killer, global public health crisis. [s.l.]: Virtual Books, 2013. Disponível em: < http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/79059/1/WHO_DCO_WHD_2013.2_eng.pdf >. Acesso em: 20 ago. 2017, 21:34:00

ZHAN, X. A. *et al.* Effect of early feed restriction on metabolic programming and compensatory growth in broiler chickens. **Poultry Science**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 654-660, 2007.

ZHANG, S. *et al.* The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. **Nutrition & Metabolism**, London, v. 11, n. 1, p.10-19, 2014.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **Journal Of Neural Transmission**, Vienna, v. 121, n. 8, p.799-817, 2014.

ANEXOS

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 08 de março de 2016.

Ofício nº 09/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof. João Henrique da Costa Silva**
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.047690/2015-77

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Avaliação da neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário de ratos submetidos à desnutrição protéica perinatal."**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do CAV – UFPE; Animais: ratos isogênicos; Idade: 70-90 dias; Peso: 270g; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 20 (14 machos e 6 fêmeas).

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584