



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA**

**JULIANA DA SILVA RIBEIRO**

**DESNUTRIÇÃO E AMBIENTE ENRIQUECIDO:  
efeitos sobre a modulação hipotalâmica do comportamento alimentar**

**Vitória de Santo Antão**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**  
**CURSO DE BACHARELADO EM NUTRIÇÃO**  
**NÚCLEO DE NUTRIÇÃO**

**JULIANA DA SILVA RIBEIRO**

**DESNUTRIÇÃO E AMBIENTE ENRIQUECIDO:**  
**efeitos sobre a modulação hipotalâmica do comportamento alimentar**

TCC apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Nutrição.

**Orientador:** Dr.<sup>a</sup> Rhowena Jane  
Barbosa de Matos

**Vitória de Santo Antão**

**2016**

Catálogo na Fonte  
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.  
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4: 2018

R484d Ribeiro, Juliana da Silva  
Desnutrição e ambiente enriquecido: efeitos sobre a modulação  
hipotalâmica do comportamento alimentar/Juliana da Silva Ribeiro. - 2016.  
62 folhas: fig.; tab.

Orientadora: Rhowena Jane Barbosa de Matos  
TCC (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Núcleo de  
Nutrição, 2016.  
Inclui bibliografia e anexos

1. Nutrição pré-natal - Ratos. 2. Hábitos alimentares - Ratos. 3. Desnutrição  
Proteico-Calórica - Ratos. I. Matos, Rhowena Jane Barbosa de (Orientadora). II.  
Título.

612.65 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-062/2016

**JULIANA DA SILVA RIBEIRO**

**DESNUTRIÇÃO E AMBIENTE ENRIQUECIDO:**

**efeitos sobre a modulação hipotalâmica do comportamento alimentar**

TCC apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de bacharel em Nutrição.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

\_\_\_\_\_  
Profº. Dr. Rhowena Jane Barbosa de Matos (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Profº. Dr. Sebastião Rogério de Freitas Silva (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Profº. Dr. Matilde Cesiana da Silva (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

\_\_\_\_\_  
Profº. Ms. Julliet Araújo de Souza (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à ciência da nutrição, à minha família e a minha orientadora,  
Rhowena.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por ter me permitido realizar esse grande sonho. Obrigada por ouvir minhas preces e me dar sempre muita força, coragem e saúde para conseguir vencer essa jornada. Obrigada Senhor por iluminar minha mente, meu corpo e coração e me permitir sabedoria para lidar com as tristezas e com as alegrias que aparecem no nosso caminho.

À minha família, meus pais, Severino e Marlene, e as minhas irmãs, Jacilene e Macilene que me apoiaram, me compreenderam, acreditaram no meu sucesso, e acima de tudo obrigada pelo amor que sempre me conforta e recarrega minhas energias.

Ao meu irmão e companheiro, Leandro (leozinho), obrigada por me acompanhar nessa jornada, noites, dias e madrugadas. Obrigada por aguentar meus estresses e aflições desde meu primeiro dia de graduação. Cada vitória sua é uma vitória minha! À minha orientadora Prof<sup>a</sup>.Rhowena, por quem tenho grande admiração, com quem tenho aprendido diariamente através de sua imensa sabedoria. Obrigada por acreditar em mim quando eu já não acreditava, por me fazer sentir capaz. Sinto muito orgulho de ter convivido e ter podido aprender um pouco com uma pessoa que é um universo de sabedoria.

Meu grupo de pesquisa, PLASMAC, muito obrigada por contribuírem para a finalização desse trabalho, por participarem dessa conquista. Foram muitos estresses, risos, lágrimas, noites mal dormidas, conhecimentos compartilhados, felicidades... Obrigada por me proporcionarem esses momentos. Que Deus ilumine o caminho de vocês.

Ao meu grande amigo Odair, um irmão que Deus me deu de presente, meu parceiro.

Obrigada por estar comigo desde o início, por ser meu suporte na pesquisa. Obrigada por me ensinar o que é amizade, sua companhia foi fundamental em todos os momentos. Torço muito pelo seu sucesso!

Obrigada aos meus amigos de graduação, com quem convivemos e torcemos pela vitória um do outro como se fosse a nossa.

Obrigada a todos que contribuíram para a teoria, a prática, execução e finalização desse trabalho.

Aos animais, por quem tenho muito amor e respeito, responsáveis pela realização de tantas pesquisas e descobertas a favor da vida.

Obrigada à UFPE e aos órgãos de fomento: FACEPE e CNPq, que também proporcionaram a execução deste trabalho.

Enfim, obrigada a todos que participaram dessa caminhada junto comigo.

Obrigada pela confiança.

Até que enfim, juntos conseguimos...

Ler é como alimentar-se: sabor aos olhos, nutrição à alma, força aos pensamentos.

Iky Fonseca

## RESUMO

Desnutrição proteica perinatal pode modificar áreas do controle do comportamento alimentar homeostático, como o hipotálamo. Entretanto, o ambiente enriquecido, um outro fator ambiental, pode reverter as alterações causadas por tal insulto nutricional. Objetivou-se com esse trabalho, avaliar o efeito a longo prazo de uma dieta hipoproteica ofertada no período de gestação e lactação e da estimulação ambiental sobre a sequência comportamental de saciedade e a expressão gênica do *npv*, *bdnf* e *trkb* no hipotálamo dos ratos adultos. Foram utilizados 64 ratos machos *Wistar*, alocados em grupos de acordo com a dieta materna recebida na gestação e lactação: controle (C, caseína a 17%, n= 32) e desnutridos (D, caseína a 8%, n= 32). Após o desmame, os filhotes receberam dieta (Presence®), formou-se subgrupos, segundo a exposição ao ambiente enriquecido: controle sem (CSAE, n=16) ou com (CSAE, n= 16) ambiente; desnutrido sem (DSAE, n=16) ou com (DAE, n=16) ambiente. Nos 30 e 75 dias, realizou-se análise de consumo alimentar e teste de sequência comportamental de saciedade (SCS). Aos 90 dias, eles foram eutanasiados por decapitação, dissecou-se o hipotálamo para análise da expressão gênica. Assim, verificou-se que a desnutrição provocou diminuição de peso ao nascer até os 90 dias, no entanto, o AE provocou redução de peso aos 80 dias no grupo controle. Na SCS, o grupo experimental mostrou aumento na ingestão alimentar aos 30 dias, além de retardo na saciedade. Aos 90, o grupo desnutrido manteve o aumento de consumo alimentar, porém não houve diferença nos outros comportamentos. Para a expressão gênica, o *npv* apenas no grupo desnutrido exposto ao ambiente enriquecido apresentou-se aumentada, todavia não houve diferença para o *bdnf* e *trkb*. Dessa forma, esses resultados indicam que um organismo desnutrido na idade precoce permanece resistente a mudanças externas em relação ao ganho de peso. Além disso, a desnutrição precoce modifica o comportamento alimentar, porém não altera a expressão do peptídeo orexígeno na idade adulta. Contudo, o AE pode ser um fator externo que promove modificações no balanço energético em normonutridos e provoca mudanças na expressão desse neuropeptídeo em animais que tiveram uma restrição proteica precoce, porém sem a modulação do BDNF.

**Palavras-chave:** Desnutrição. Ambiente enriquecido. Neuropeptídeos. Comportamento alimentar.

## ABSTRACT

The perinatal protein malnutrition can affect the homeostatic pathway controls energy balance and feeding behavior, such as the hypothalamus. However, the enriched environmental enrichment, another environmental aspect, can roll back changes caused by such nutritional insult. Therefore, it was evaluated the long-term effect of a low protein diet offered in the early age and environmental enrichment stimulation on behavioral satiety sequence and gene expression of *npv*, *bdnf* and *trkb* in the hypothalamus of adult rats. 64 *Wistar* rats were used, allocated in groups according to the received maternal diet during pregnancy and lactation: control (C, casein 17%, n = 32) and undernourished (D, casein 8%, n = 32). After weaning, the pups received a diet (Presence®), it was formed subgroups according to exposure to environmental enrichment: control with (CSAE, n = 16) or without (CSAE, n = 16) environment; undernutrition with (DSAE, n = 16) or without (DAE, n = 16) environment. In 30 to 75 days, it was analysed food intake and behavioral satiety sequence of test (SCS). At 90 days, they were killed by decapitation and hypothalamus was dissected to gene expression analysis. Thus, it was found that malnutrition caused decreased birth weight up to 90 days, however, the AE caused weight loss after 80 days in the control group. In the SCS, the experimental group showed an increase in food intake at 30 days, and delayed satiety. At 90, the malnourished group maintained the increase in food intake, but there was no difference in other behaviors. For gene expression, *npv* only in the undernourished group exposed to the environment enriched presented is increased, but there was no difference for *bdnf* and *trkb*. Thus, these results indicate that a malnourished body in early age remains resistant to external changes in the weight gain. Moreover, early undernutrition modifies eating behavior, but does not alter the expression of orexigenic peptide in adulthood. However, the AE can be an external factor that promotes changes in the energy balance in control animals and causes changes in the expression of this neuropeptide in animals that had an early protein restriction, but without modulation of BDNF.

**Keywords:** Malnutrition. environment enriched. Neuropeptides. Feeding behavior.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Desenho experimental	27
Figura 2 – Gaiola de ambiente enriquecido	30
Figura 3 – Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do peso neonatal de ratos	35
Figura 4 – Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do peso corporal de ratos a partir de 40 dias de vida, após a exposição ao ambiente enriquecido	37
Figura 5 – Efeitos da restrição proteica perinatal sobre o consumo alimentar diário espontâneo	39
Figura 6 – Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a Sequência Comportamental de Saciedade de ratos machos 30 dias de vida	40
Figura 7 – Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a Sequência comportamental de saciedade após exposição ao ambiente enriquecido de ratos com 75 dias de vida	41
Figura 8 – Efeitos da restrição proteica sobre a expressão gênica do <i>npv</i> no hipotálamo de ratos machos com 90 dias de vida após exposição ao ambiente enriquecido.	42
Figura 9 – Efeitos da restrição proteica sobre a expressão gênica do <i>bdnf</i> , <i>trkb</i> no hipotálamo de ratos machos com 90 dias de vida após exposição ao ambiente enriquecido.	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dietas normoproteica e hipoproteica	28
Tabela 2 – Distribuição calórica das dietas	29
Tabela 3 – Sequência de primers	33
Tabela 4 – Médias do peso corporal neonatal dos grupos submetidos a desnutrição proteica perinatal e controle.	36
Tabela 5 – Médias do peso corporal dos grupos Controle e Desnutrido após a exposição ao ambiente enriquecido.	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Ambiente enriquecido
AgRP	Peptídeo relacionado ao Agouti
ARC	Núcleo arqueado
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
C	Controle
CAE	Controle com ambiente enriquecido
CART	Transcrito relacionado à cocaína e anfetamina
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CSAE	Controle sem ambiente enriquecido
CT	Cycle threshold
D	Desnutrido
DAE	Desnutrido com ambiente enriquecido
DMH	Hipotálamo dorso medial
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DSAE	Desnutrido sem ambiente enriquecido
GH	Hormônio do crescimento
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NPY	Neuropeptídeo Y
NVP	Núcleo paraventricular
PCD	Período crítico do desenvolvimento
PCR-RT	Reverse transcription polimerase chain reaction
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
POMC	Pro-opiomelanocortina
RNAse	Ribonuclease
SCS	Sequência comportamental de saciedade
TrkB	Receptor de tirosina quinase B
VMH	Núcleo ventro medial

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Nutrição e neurodesenvolvimento	17
2.2 Hipotálamo e comportamento alimentar	18
2.3 BDNF e homeostase energética	20
2.4 Ambiente enriquecido	21
3 HIPÓTESE	23
4 JUSTIFICATIVA	24
5 OBJETIVOS	25
6 MATERIAIS E MÉTODOS	26
7 RESULTADOS	35
8 DISCUSSÃO	44
9 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53
ANEXO A	60
APÊNDICE A	61
APÊNDICE B	63

## 1 INTRODUÇÃO

Em humanos, vários fatores ambientais podem interferir no desenvolvimento do sistema nervoso (PRADO; DEWEY, 2014), essa fase é conhecida como período crítico de desenvolvimento e acontece durante a gestação, lactação e primeira infância (CARLOSON *et al.*, 2007). A nutrição, sendo um deles, é indispensável durante esse período (CARLOSON *et al.*, 2007), no qual ocorre a consolidação das bases cognitivas (PRADO; DEWEY, 2014). Nesse momento, o cérebro está mais susceptível as mudanças ambientais (GOMIZ-PINILLA; VAYNMAN, 2005), podendo gerar impactos durante toda a vida (WANG *et al.*, 2012; PRADO; DEWEY, 2014).

As principais hipóteses científicas indicam que o feto adapta-se às modificações ambientais ainda na vida intrauterina ou no período pós-natal precoce (VELKOSKA; MORRIS, 2011) e que doenças na vida adulta podem surgir a partir de uma incompatibilidade entre o ambiente pós-natal real e o que é previsto pelo organismo fetal durante a fase de desenvolvimento (HOWIE *et al.*, 2009). Essa adaptação pode induzir efeitos permanentes sobre a estrutura e função dos órgãos e tem sido a base da área de estudo da Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD) (GLUCKMAN; HANSON, 2004). Estudos têm mostrado que a desnutrição, especialmente proteica pode induzir o surgimento de doenças na vida tardia, como por exemplo, as doenças crônicas não transmissíveis (WANG *et al.*, 2012), sendo a desnutrição materna uma das causas da programação fetal (GALI ROMAMOORTHY *et al.*, 2015).

Dependendo da gravidade do insulto nutricional e da fase em que ele ocorre, o indivíduo pode desenvolver diferentes respostas adaptativas (PRADO; DEWEY, 2014). A literatura mostra que restrição proteica durante os períodos gestacional e pós-gestacional pode induzir ao desenvolvimento de proles com padrão de comportamento alimentar alterado, caracterizado pela presença de hiperfagia e retardo da saciedade (LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008), além de alterações na expressão gênica de neuropeptídeos hipotalâmicos responsáveis pelo balanço de nutrientes e gasto de energia (OROZCO-SÓLIS *et al.*, 2009).

O hipotálamo, uma das regiões de controle homeostático do comportamento alimentar, regula a ingestão alimentar e o gasto energético. Em roedores, inicia seu desenvolvimento no final da gestação e completa-se após o nascimento

(VELKOSKA; MORRIS, 2011), podendo sofrer alterações em seus mecanismos de controle quando a prole é exposta a um insulto nutricional (MOURA; OLIVEIRA, 2013). O hipotálamo possui neurônios que formam as vias orexígenas e anorexígenas as quais estimulam ou inibem a ingestão alimentar, respectivamente. Os neurônios da via orexígena liberam neurotransmissores como o neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado ao Agouti (AgRP), por outro lado, a via anorexígena atua através do neuropeptídeo proopiomelanocortina (POMC) e do transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART) (MOURA; OLIVEIRA, 2013). Estudos com roedores indicam que restrição proteica durante a gestação e lactação pode favorecer a preferência por alimentos mais palatáveis, além do aumento da ingestão alimentar (DA SILVA *et al.*, 2013).

Outro neuropeptídeo, que tem função de neurotrofina, mas também pode regular a homeostase energética é o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Essa neurotrofina atua em seu receptor tirosina quinase B (TrkB), tendo importante função na modelagem neural, plasticidade sináptica e diferenciação neuronal (OZEK, 2015). Segundo a literatura, o estresse uterino pode levar ao aparecimento de alterações nos níveis de BDNF no cérebro, além de mudanças estruturais (DIENI; REES, 2004), assim como, a deficiência do BDNF pode repercutir no aparecimento de um fenótipo obeso com presença de hiperfagia (OZEK *et al.*, 2015).

Entretanto, sugere-se que a estimulação física e social do ambiente, a partir de uma exposição ao ambiente enriquecido (AE) pode ser capaz de aumentar a neurogênese (GAROFALO *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2014), e reverter os efeitos deletérios de estímulos estressores maternos sobre a liberação hormonal hipotalâmica (FRANCIS *et al.*, 2002). Além de modular a plasticidade em outras regiões encefálicas, como o hipocampo (BAAMONDE *et al.*, 2011).

Diante disso, é de suma importância compreender os mecanismos subjacentes em áreas do controle do comportamento alimentar após uma desnutrição proteica precoce e após uma estimulação sensório-motora crônica em ambiente enriquecido na vida adulta para que possam ser elaboradas estratégias capazes de atenuar os efeitos da restrição de nutrientes e seus danos ao longo da vida no sistema nervoso. Uma vez que, a má nutrição precoce pode favorecer doenças neurodegenerativas na vida adulta (OSBORNE-NIJNIK; LANE, 2013).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Nutrição e neurodesenvolvimento

A nutrição adequada é essencial para o desenvolvimento do organismo como um todo e principalmente para a formação cerebral, que ocorre no período fetal e pós nascimento (CARLSON *et al.*, 2007). Esse período é crucial para a formação do sistema nervoso central no qual são estabelecidas as bases cognitivas, motoras e sócio-emocionais (PRADO; DEWEY, 2014). Estudos em animais evidenciam a necessidade de oferta adequada de nutrientes durante o desenvolvimento dos processos neurológicos (PRADO; DEWEY, 2014; WANG *et al.*, 2012). Entretanto, existem inúmeros fatores que podem influenciar a ocorrência de deficiências nutricionais, seja ela de macro ou micronutrientes, como por exemplo, oferta materna de alimentos restrita e dificuldade de absorção intestinal. E essas deficiências podem afetar a cognição, o comportamento e a produtividade de humanos ao longo dos anos (PRADO; DEWEY, 2014), além de ser um dos fatores responsáveis pelo aparecimento de doenças crônicas na vida adulta (WANG *et al.*, 2012).

Esse período de desenvolvimento do organismo, também chamado de período crítico do desenvolvimento (PCD), é caracterizado por um rápido crescimento e maturação de órgãos e sistemas, replicação e diferenciação celular (DOBBING; SANDS, 1985). No qual, o indivíduo requer água, aminoácidos, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais em quantidades adequadas para o seu crescimento saudável (WANG *et al.*, 2012). Durante essa fase de organização do sistema nervoso, o cérebro encontra-se vulnerável aos efeitos ambientais (GOMES-PINILLA; VAYNMAN2014; ADAMS *et al.*,2000), podendo desenvolver respostas adaptativas morfo-funcionais aos estímulos externos no meio intrauterino (MOURA; OLIVEIRA, 2013).

As principais hipóteses científicas indicam que o feto adapta-se às modificações ambientais ainda na vida intrauterina ou no período pós-natal precoce (VELKOSKA; MORRIS, 2011), e que doenças na vida adulta podem surgir a partir de uma incompatibilidade entre o ambiente pós-natal real e o que é previsto pelo organismo fetal durante a fase de desenvolvimento (HOWIE *et al.*, 2009). Este fenômeno biológico é conhecido como programação metabólica (LUCAS, 1991;

BARKER, 1995) e atualmente, o termo “plasticidade fenotípica” vem sendo utilizado, que corresponde à capacidade do indivíduo de modificar o fenótipo em resposta às alterações ambientais e às repercussões na vida adulta (GLUCKMAN; HANSON; PINAL, 2005; JANG; SERRA, 2014; OSBORNE-MAJNIK; LANE, 2013).

Para explicar o processo pelo qual uma agressão ambiental, como a desnutrição, pode ter efeitos permanentes sobre a estrutura e função dos órgãos, a Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença (DOHaD) é uma área que tenta compreender essa relação entre desnutrição durante a vida fetal e infância e o surgimento de alterações orgânicas na vida adulta, como a síndrome metabólica caracterizada por doenças coronárias, obesidade, diabetes tipo 2 e hipertensão (GLUCKMAN; HANSON, 2004).

É necessário lembrar que não apenas insultos nutricionais durante a fase de plasticidade do desenvolvimento são capazes de induzir respostas adaptativas ao organismo, mas sim todos os estímulos externos de uma forma global, incluindo exposição as substâncias químicas, poluentes do ar, estresse materno, desregulação hormonal e má qualidade da água. Cada tipo de agente estressor pode atuar de forma independente, como também de forma integrada afetando respostas morfofuncionais e o risco de doença na vida adulta (HEINDEL *et al.*, 2015). Porém, muitas evidências em modelos animais e humanos têm revelado que insultos nutricionais, como a desnutrição proteica materna durante o período gestacional, têm grande impacto sobre o feto, podendo alterar o metabolismo e saúde do mesmo (WANG *et al.*, 2012; PRADO; DEWEY, 2014). Em outros estudos com ratos, foi verificado que a restrição proteica materna predispõe a prole a desenvolver hipertensão e disfunção vascular além de obesidade, um dos sinais da síndrome metabólica (WANG *et al.*, 2012), além de diabetes, doença coronariana, distúrbios esquizofrênicos (OSBORNE-MAJNIK; LANE, 2013) e do comportamento alimentar (DE MELO MARTIMIANO *et al.*, 2015).

## **2.2 Hipotálamo e comportamento alimentar**

Um conjunto de neurônios hipotalâmicos faz parte de núcleos que podem controlar a ingestão alimentar, mediante a sinalização central e periférica. E essa modulação resulta na liberação de neuromoduladores orexígenos e anorexígenos, como por exemplo, o NPY/AgrP e POMC/CART, respectivamente (MOURA; OLIVEIRA, 2013). Esses neurônios recebem sinalização endócrina periférica que

pode ser alterada de acordo com o ambiente que o organismo está exposto (CIFANI *et al.*, 2015; SWART *et al.*, 2002).

Em humanos o desenvolvimento das ramificações neurais do hipotálamo ocorre na fase fetal, em roedores esses circuitos neuronais são imaturos ao nascimento e seu desenvolvimento prolonga-se durante as primeiras semanas da vida pós natal (GALI RAMAMOORTHY *et al.*, 2015), sendo susceptíveis as mudanças ambientais (VELKOSKA; MORRIS, 2011). Uma das evidências na literatura científica mostrou que ratos expostos à desnutrição proteica no período perinatal são capazes de alterar a expressão de genes de vias de sinalização da homeostase energética e detecção de nutrientes, como por exemplo, o gene da enzima fosfatidinositol-3-quinase que além de estar envolvido na transdução do sinal de insulina, também participa da via de ativação de neurônios POMC, uma vez que a insulina atua no comportamento alimentar através na estimulação da via orexígena. Assim, a sinalização deficiente desse hormônio no hipotálamo pode resultar em alterações da homeostase de energia (OROZCO-SÓLIS *et al.*, 2010). Sendo assim, a nutrição tem papel fundamental desde a vida uterina, alterando a suscetibilidade do indivíduo de apresentar doenças na vida adulta (OSBORNE-MAJNIK; LANE, 2013).

No hipotálamo existem áreas que atuam no controle do balanço de energia, como por exemplo, o núcleo paraventricular (NPV) e o hipotálamo dorsomedial (DMH), além do núcleo arqueado (ARC). O ARC está localizado numa região que possui a barreira hemato-encefálica mais fenestrada, permitindo à passagem de sinalizadores periféricos que atuam sobre os neurônios das vias orexígenas e anorexígenas, assim as células desses circuitos detectam a sinalização periférica e respondem de acordo com a via estimulada, podendo induzir ou inibir a ingestão alimentar (GALI RAMOMOORTHY *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2016). O neuropeptídeo Y (NPY), é um dos peptídeos neuroendócrinos que atua através dos neurônios da via orexígena, podendo ter seus níveis alterados de acordo com a sinalização periférica, como por exemplo, da leptina, associados com fenótipos metabólicos. Tal neuropeptídeo, quando estimulado atua no comportamento alimentar induzindo a busca pelo alimento como também na redução do gasto de energia (TRAN *et al.*, 2016) a partir de sua ativação através dos neurônios AgRP (BELL; WALLEY; FROGUEL, 2005). Estudos mostram uma densidade elevada desse neuropeptídeo

no núcleo paraventricular e no núcleo arqueado do hipotálamo, sugerindo assim, sua participação na modulação de funções no sistema nervoso central (CHRONWALL *et al.*, 1985).

De acordo com a literatura, insultos nutricionais precoces favorecem o aparecimento de mudanças nos mecanismos de controle encefálico, por meio de alterações nos níveis de expressão gênica dos neuropeptídeos hipotalâmicos (IKENASIO-THORPE *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2013). Animais que foram submetidos a uma restrição calórica diária de 30% ao longo da gestação apresentaram uma maior ingestão alimentar na vida adulta, no entanto foi identificada uma baixa regulação da expressão gênica do AgRP, sem mudanças significativas em outros neuropeptídeos. Entretanto, quando submetidos a uma alimentação com um perfil nutricional no pós-natal diferente ao que foi ofertado na fase fetal, esse animais mostraram aumento de NPY e POMC e em contrapartida, uma diminuição da expressão do AgRP acompanhada de aumento da ingestão alimentar e níveis plasmáticos de leptina e insulina. Estudos evidenciam que a incompatibilidade entre a oferta nutricional no período de desenvolvimento e na fase adulta tem influência sobre a desregulação das vias hipotalâmicas, podendo determinar maior susceptibilidade ao desenvolvimento de obesidade (IKENASIO-THORPE *et al.*, 2007).

Da mesma forma que outros estudos também identificaram aumento da ingestão alimentar e da preferência por alimentos palatáveis em animais adultos que sofreram restrição protéica precoce, sendo resultado de um aumento da ativação neural de regiões como o núcleo paraventricular do hipotálamo, amígdala, e núcleo caudado os quais atuam no controle da ingestão alimentar através dos mecanismos de recompensa (DA SILVA *et al.*, 2013). Assim, distúrbios nos circuitos hipotalâmicos que controlam o comportamento alimentar e a homeostase de energia podem ser alterados por insultos nutricionais, favorecendo o desenvolvimento de distúrbios metabólicos (OROZCO-SÓLIS *et al.*, 2010).

### **2.3 BDNF e homeostase energética**

Outro ponto importante para o controle homeostático é o fator neurotrófico derivado do cérebro, também conhecido como BDNF (do inglês, “brain-derived neurotrophic factor”) (GELFO *et al.*, 2015). O BDNF é um fator de crescimento do

cérebro (GELFO *et al.*, 2011) e tem importante função nos padrões de modelagem neural, aprendizagem e memória (ROSSI *et al.*, 2006), o qual acompanha as mudanças estruturais através da sua expressão e de seu receptor da tirosina quinase B (TrkB) (GOMES-PINILLA; VAYNMAN, 2014), favorecendo o desenvolvimento, diferenciação, crescimento e maturação do sistema nervoso (LUI *et al.*, 2014). Quando o feto é exposto a um ambiente intra-uterino desfavorável, pode comprometer essas vias de sinalização (GOMES-PINILLA; VAYNMAN, 2014).

No hipotálamo, o BDNF pode ter como função o controlar do peso corporal e a homeostase da energia atuando sobre os neurônios hipotalâmicos e suprimindo a ingestão alimentar (URABI *et al.*, 2013). De acordo com a literatura, tem sido observado que a administração central de BDNF induz a supressão do apetite e perda de peso (WANG *et al.*, 2010). Estudos de Dieni e Rees (2004) mostraram que um ambiente materno comprometido pode ocasionar defeitos estruturais em regiões do cérebro, como o hipocampo, além de diminuição acentuada nos níveis de expressão proteica de BDNF e aumento do TrkB de sua prole. Resultados sugerem que ratos com deficiência congênita de BDNF desenvolvem obesidade, hiperfagia e resistência à insulina, propondo sua atuação na regulação da ingestão alimentar (OZEK *et al.*, 2015).

#### **2.4 Ambiente enriquecido**

Um fator externo que pode modular a expressão do BDNF e aumentar a plasticidade neural é o enriquecimento de estímulos ambientais (GOMES-PINILLA; VAYNMAN, 2014). O ambiente enriquecido (AE) é um fator de estimulação física e social, que pode modular o sistema nervoso, aumentando a neurogênese e provocando alterações anatômicas e funcionais em conexões sinápticas (GAROFALO *et al.*, 2015; CAO *et al.*, 2014). Além disso, dados científicos mostram a sua participação na modulação da plasticidade no hipocampo e em outras regiões corticais em roedores (BAAMONDE *et al.*, 2011; DI GARBO *et al.*, 2011), além de reduzir o tamanho e proliferação de células de tumores malignos alojados em ratos e favorecer o aumento da sobrevivência (GAROFALO *et al.*, 2015).

Sobre efeitos de outros fatores externos, como o estresse da separação materna, a exposição de ratos adultos ao AE promove uma reversão dos danos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, alterando a expressão da liberação de

hormônio de corticosterona (FRANCIS *et al.*,2002). Além de estimular a conversão elevada da proteína precursora do BDNF (pro-BDNF) em BDNF, aumentando assim os níveis de expressão dessa proteína no hipocampo de ratos (CAO *et al.*, 2014). Dependendo do núcleo em que ele seja expresso, pode ter funções diferenciadas, como mostra no estudo de Yang *et al.*, (2016). Nesse estudo foi identificado que os neurônios do NPV e do núcleo ventro medial (VMH), que produzem o BDNF, suprimem a ingestão de alimentos. No entanto, quando produzido apenas pelo NPV e por outro núcleo não identificado, o mesmo promove aumento da taxa metabólica de repouso, termogênese e aumento da atividade locomotora, expressando assim, sua participação no controle da homeostase energética.

Portanto, a deficiência nutricional fetal e infantil tem sido muito estudada devido aos seus efeitos de longa duração no desenvolvimento do cérebro, incluindo as sequelas permanentes na regulação da ingestão alimentar (CHEN; SIMAR; MORRIS, 2009). Todavia, tanto em termos clínicos quanto experimentais, é de particular interesse compreender os mecanismos subjacentes que envolvem a desnutrição na fase precoce da vida e os eventuais benefícios promovidos pelo ambiente enriquecido na fase adulta. Por conseguinte, podem-se elaborar ações atenuantes dos efeitos causados por uma má nutrição precoce para favorecer o estado saudável do indivíduo ao longo da vida.

### 3 HIPÓTESE

O ambiente enriquecido ameniza os efeitos da desnutrição proteica precoce sobre o comportamento alimentar, reduz a expressão gênica de um neuropeptídeo hipotalâmico, *npv*, e aumenta o fator neurotrófico do cérebro (*bdnf*).

#### **4 JUSTIFICATIVA**

Apesar de ter ocorrido uma grande diminuição nos últimos anos, a desnutrição ainda é um problema social que atinge países em desenvolvimento, como o Brasil, principalmente a região Nordeste. Quando a desnutrição ocorre no início da vida, seus efeitos sobre o desenvolvimento do sistema nervoso podem perdurar a longo prazo, através de modificações na expressão gênica de neuropeptídeos hipotalâmicos responsáveis pela homeostase energética e assim, pode provocar alterações comportamentais. Outro fator exógeno que pode modificar esses neuromoduladores seria a estimulação ambiental, cuja intervenção clínica pode favorecer a plasticidade neural em áreas de controle homeostático do comportamento alimentar.

## 5 OBJETIVOS

### Geral

Estudar o efeito a longo prazo da exposição ao ambiente enriquecido em animais submetidos a desnutrição proteica na fase de gestação e lactação sobre o controle homeostático do comportamento alimentar na idade adulta.

### Específicos

- Avaliar o efeito da desnutrição proteica precoce sobre a evolução ponderal antes e depois da exposição ao ambiente enriquecido;
- Identificar se ocorrem alterações na sequência comportamental de saciedade antes e depois da exposição ao ambiente enriquecido em animais desnutridos;
- Verificar se a desnutrição proteica precoce provoca variação na expressão gênica do neuropeptídeo orexígeno: *npv*, do *bdnf* e do receptor *trkb* no hipotálamo dos animais adultos;
- Determinar os efeitos do ambiente enriquecido sobre a expressão gênica do *npv*, *bdnf* e do receptor *trkb* no hipotálamo de ratos adultos que foram submetidos à desnutrição durante o período de gestação e lactação.

## 6 MATERIAIS E MÉTODOS

### Animais

Ratos machos *Wistar* provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco foram mantidos em biotério de experimentação do Centro Acadêmico de Vitória, com temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$ , ciclo claro-escuro de 12/12 horas normal (claro das 6:00h às 18:00, escuro das 18:00h às 6:00), com livre acesso à água e ração. O manejo e os cuidados estiveram de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), além de terem sido avaliados e aprovados pelo comitê de ética em uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo: 23076.018667/2012) (ANEXO A).

Para o acasalamento, após o tempo de 15 dias de adaptação ao novo ambiente, ratas primíparas com peso de aproximadamente 220-250g foram alocadas em gaiolas de poliestileno juntamente com machos (300-350g) na proporção de três ratas para um macho por um período máximo de 3 dias. Para detecção de prenhez positiva, realizou-se a técnica de esfregaço vaginal para coleta de muco e ao microscópio de luz observou-se a presença de espermatozóides. Em seguida, as ratas gestantes foram transferidas para gaiolas individuais e o seu ganho de peso semanal foi acompanhado. A escolha dos grupos que as ratas iriam pertencer foi de forma aleatória, dividiu-se então em 2 grupos experimentais de acordo com a dieta fornecida durante a gestação e lactação: controle (C, dieta com proteína a 17%, n= 7) e desnutridos (D, dieta com proteína a 8%, n= 8), desde o início da gestação até o desmame dos filhotes.

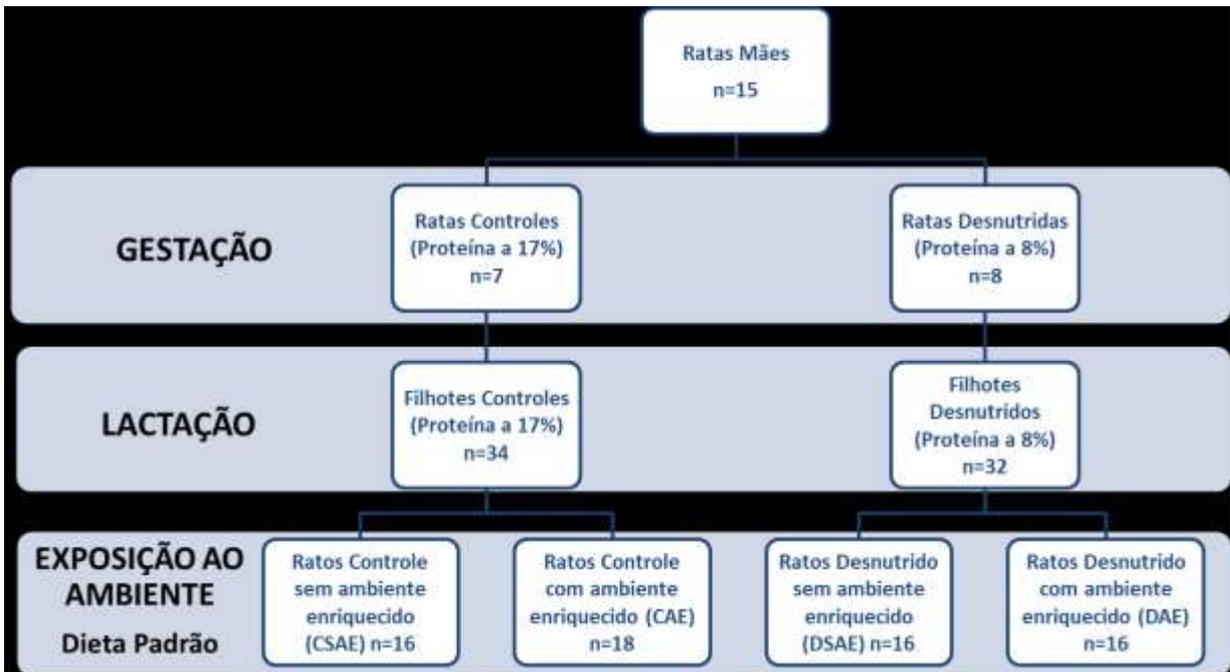
O dia de nascimento da ninhada foi considerado o dia zero e a manipulação para redução da ninhada para oito filhotes por ninhada foi realizada no 1° dia de vida, sendo apenas os filhotes machos utilizados nesse experimento. Aos 25 dias, os filhotes foram desmamados (OST'ADALOVA; BABICKY, 2012) e passaram a receber a dieta padrão de biotério Presence® *ad libitume*, em seguida, foram divididos em subgrupos aleatoriamente, segundo à exposição ao ambiente enriquecido: controle sem ambiente enriquecido (CSAE, n=16); controle com

ambiente enriquecido (CAE, n=18); desnutrido sem ambiente enriquecido (DSAE, n=16); desnutrido com ambiente enriquecido (DAE, n=16) (Figura 1).

Dos 26 aos 29 e dos 71 aos 74 dias de vida as proles foram submetidas a análise de consumo alimentar, sendo os dois primeiros dias de adaptação. Aos 30 e 75 dias de vida os animais foram submetidos ao teste de sequência comportamental de saciedade (SCS). A exposição ao ambiente enriquecido foi realizada da idade de 30 até 90 dias de vida. Todos os procedimentos foram feitos no início da fase escura do ciclo circadiano (período fictício: “*Zitgeber Time*” –ZT12: 18h às - ZT14: 20h), que corresponde o horário internacional, entre 7h às 9h da manhã.

Os animais foram eutanasiados aos 90 dias de vida, por decapitação e em seguida retirados os tecidos para análise de expressão gênica.

Figura 1 –Desenho experimental



Modelo experimental representando a formação dos diferentes grupos quanto à manipulação da dieta à base de caseína (grupo controle e grupo desnutrido) e quanto à exposição ao ambiente enriquecido de ratos após serem submetidos à desnutrição proteica precoce.

Fonte: Ferraz, Marília Freire Isidro, 2014.

## Composição da dieta

As dietas à base de caseína foram confeccionadas no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco baseada na composição de dieta da AIN-93G feita por Reeves; Nielsen e Fahey, (1993) (Tabela 1). Tais dietas são isocalóricas com alteração do conteúdo de proteínas e carboidratos (Tabela 2). Após o desmame os animais foram alimentados com a dieta padrão do biotério (Presence®) (Tabela 2).

Tabela 1 - Composição das dietas hipoproteica e normoproteica.

Ingredientes	Quantidade /kg de dieta	
	<i>Dieta hipoproteica (8% de caseína)</i>	<i>Dieta normoproteica (17% de caseína)</i>
Caseína (80%)	100,0g	212,5g
Mix de vitaminas*	10,0g	10,0g
Mix de sais minerais†	35g	35g
Celulose	50g	50g
Bitartarato de colina	2,5g	2,5g
DL-metionina	3,0g	3,0g
Óleo de soja	70ml	70ml
Amido	629,5g	516,9g
Sacarose	100g	100g
BTH	0,0014g	0,0014g

Dietas utilizadas no experimento durante as fases de gestação e lactação nos grupos desnutrido e controle.

\* Mistura de vitaminas contendo (em mg.kg<sup>-1</sup> de dieta): retinol, 12; colecalciferol, 0,125; tiamina, 40; riboflavina, 30; ácido pantotênico, 140; piridoxina, 20; inositol, 300; cianocobalamina, 0,1; menadiona, 80; ácido nicotínico, 200; colina, 2720; ácido fólico, 10; ácido p-aminobenzóico, 100; e biotina, 0,6.

† Mistura mineral contendo (em mg.kg<sup>-1</sup> de dieta): CaHPO<sub>4</sub>, 17200; KCl, 4000; NaCl, 4000; MgO, 420; MgSO<sub>4</sub>, 2000; Fe<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 120; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 200; e elementos-traço, 400 (MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O, 98; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 20; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 80; CoSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,16; e KI, 0,32; com amido para completar 40g [por kg de dieta].

Fonte: Reeves; Nielsen; Fahey, 1993.

Tabela 2 - Distribuição calórica das dietas.

	<b>Proteína a 8%</b>	<b>Proteína a 17%</b>	<b>Dieta padrão</b>
Carboidratos (g/100g)	64,77	54,98	55,49
Lipídeos (g/100g)	6,55	6,67	2,82
Proteínas (g/100g)	8	17	23,22
VCT (kcal/100g)	350	348	340,22
VCT (kcal/g)	3,5	3,5	3,4

Dietas utilizadas no experimento à base de caseína (proteína a 8 e 17%) durante a gestação e lactação dos animais; e da dieta padrão de biotério Presence® consumida após o desmame.

Fonte: Ferraz, Marília Freire Isidro, 2014.

### **Ambiente enriquecido (AE)**

Os grupos CAE e DAE foram expostos ao ambiente enriquecido, de 30 até 90 dias de vida. Foram colocados em média 8 animais por gaiola do AE para minimizar os efeitos do estresse e aumentar a interação social. O AE consistiu de uma gaiola contendo: escadas, tubos de plástico, suportes para escalar na posição vertical, bolas, bonecos e casa de plástico (Figura 2). Foram fornecidos diferentes objetos de plástico, de diferentes formas, posicionados em diferentes alturas e alguns objetos suspensos. Os brinquedos foram trocados e/ou rearranjados a cada 5 dias para nova estimulação e para minimizar os efeitos da habituação. A cada troca, utilizamos brinquedos de maior complexidade e que aumentassem o nível de estimulação gradativamente de acordo com protocolo pré-estabelecido (BEAUQUIS *et al.*, 2010).

Figura 2 - A e B - Gaiola de ambiente enriquecido.

A)



B)



Gaiola de ambiente enriquecido utilizada no estudo e suas dimensões 61 x 44 x 63 cm (Largura x profundidade x altura).

Fonte: Ferraz, Marília Freire Isidro, 2014.

### **Avaliação ponderal**

O peso dos animais foi acompanhado semanalmente desde o nascimento até o dia do sacrifício, onde foi avaliado em balança eletrônica digital (Marte, modelo S-1000, capacidade de 1kg e sensibilidade de 0,1g), no mesmo horário, no início da fase escura do ciclo.

### **Consumo alimentar diário**

O consumo alimentar foi avaliado dos 26 aos 29 e dos 71 aos 74 dias de vida, antes do teste de SCS, com a finalidade de verificar a quantidade de ingestão espontânea de alimentos (diferença do peso entre a quantidade (g) de ração oferecida e rejeitada) no período de 1h com a dieta padrão do biotério (Presence®). Para essa avaliação, os animais eram colocados em gaiolas individuais e a ração

padrão era fornecida no comedouro, de quantidade anteriormente mensurada. Os testes sempre eram realizados no mesmo horário, às 18h (ZT12), início da fase escura do ciclo. Após os animais permanecerem por 1 hora de jejum em seguida passaram 1 hora alimentando-se. Esse procedimento foi realizado durante quatro dias consecutivos, no início da fase escura do ciclo, sendo que os dois primeiros dias corresponderam aos dias de adaptação ao novo ambiente e manipulação. Assim quantificou-se o consumo em gramas (g) pela diferença do peso em gramas do rejeito e da quantidade do peso inicial da ração. Considerou-se a média dos dois últimos dias para análise de consumo. Os resultados estão representados pela média  $\pm$  DP de consumo em kcal de cada animal durante os dias de teste por 100 gramas de peso corporal (kcal/100g de peso corporal).

### **Sequência comportamental de saciedade**

Nos dias 30 e 75 pós-natal, a SCS foi realizada, o qual verificou-se a frequência e a duração de uma sequência de comportamentos progressivos em relação ao tempo, permitindo a identificação do processo de saciação (término da refeição) e o desenvolvimento da saciedade (inibição pós-ingestiva da alimentação). Para esta análise os animais foram transferidos para gaiolas individuais com dimensões adequadas para a análise da SCS. Os animais foram mantidos em privação alimentar prévia de 1 hora antes da oferta do alimento de peso conhecido. O peso dos animais também foi aferido antes do jejum, depois do jejum e ao final do teste. A ração utilizada no teste foi a padrão de biotério, consumida pelos animais desde o desmame. Os testes eram realizados sempre no início da fase escura do ciclo (ZT12: 18h). Com auxílio de luz vermelha de baixa intensidade, a SCS foi analisada por dois observadores cegos quanto à manipulação dietética durante o período de gestação e lactação e quanto à exposição ao ambiente após o desmame. Os mesmos eram devidamente treinados e a análise foi realizada durante o período de uma hora. Os observadores estavam a um metro de distância das gaiolas dos animais sem realizar movimentos bruscos, minimizando a interferência no comportamento analisado pela presença do observador. Vale ressaltar que os ratos

estavam habituados aos observadores, uma vez que as manipulações foram feitas desde o nascimento.

Registrou-se em uma planilha a frequência e duração (em segundos) dos comportamentos classificados como: a) Alimentação: o rato apresentava-se ingerindo alimento, roendo, mastigando e segurando a ração com as patas; b) Ingestão de água: quando o animal ingeria água direto do bebedouro; c) Exploração: realização de movimentos ao redor da gaiola ou cheirando o ambiente; d) Limpeza: apresentação de cuidados com o corpo, lambendo as patas anteriores e as movimentando sobre a cabeça, continuando com o lamber da região ventral, do dorso e das patas posteriores; e) Repouso: o rato apresentava-se em posição de descanso, apresentando o corpo repousado sobre o assoalho da gaiola ou dormindo. Ao finalizar esse período de teste o consumo alimentar era verificado, mensurando-se a ração rejeitada.

O objetivo da realização da SCS foi analisar o comportamento alimentar, verificando a presença de alterações nesse padrão induzidas pela desnutrição. A análise gráfica indicada pelo ponto de intersecção representa o momento em que os animais começam a descansar e diminuem a alimentação, representando o momento do aparecimento da saciedade (HALFORD; WANNINAYAKE; BLUNDELL, 1998).

Os resultados de comportamentos estão representados em média em minutos (min), ou percentual (%), a ingestão alimentar em g/100g de peso corporal do animal  $\pm$  DP.

### **Análise da expressão gênica do *npv*, *bdnf* e *trkb* através do PCR em tempo real**

Aos 90 dias de vida, os animais foram decapitados às 18h (ZT12), no início do ciclo escuro, em que começa o período de maior atividade dos roedores. Os crânios foram imediatamente dissecados e os encéfalos rapidamente congelados em gelo seco e armazenados num freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  para análise da expressão gênica pelo método de PCR.

O experimento de PCR em tempo real foi realizado com as amostras de hipotálamo seguindo as etapas descritas resumidamente a seguir. O método

consiste em três etapas: 1) Extração do RNA Total; 2) Conversão do RNA em cDNA e 3) Amplificação da reação em cadeia da polimerase. O RNA total foi extraído utilizando 1 ml do reagente Trizol (Invitrogen<sup>®</sup>, Carlsbad, CA, EUA) com um homogeneizador (Pellet Pestle with Cordless Motor, Fisher Scientific, EUA). O RNA total foi isolado seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante Invitrogen<sup>®</sup> e, subsequentemente, a quantidade e qualidade do RNA purificado foi avaliado utilizando-se o espectrofotômetro, NanoDrop ND-2000(Thermo Scientific, EUA). Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com solução de gDNA Wipeout (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Alemanha) para remover eficazmente a contaminação do DNA genômico durante 2 min a 42°C, e armazenados em gelo. Posteriormente, foi realizada a transcrição reversa de 2,0 microgramas de RNA purificado em cDNA, utilizando o kit de transcrição reversa QuantiTect (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Alemanha), a 42°C durante 15 min. A enzima foi inativada a 95°C durante 3 minutos. A preparação de cDNA foi, em seguida, armazenada a -20°C até a sua utilização.

Posteriormente, 5 ml de cada amostra diluída de cDNA foi utilizada como *template* para a amplificação por PCR em tempo real, utilizando SYBR Green (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Alemanha), como fluoróforo intercalante. Utilizou-se o sistema de detecção de PCR em tempo real: Rotor Gene HRM-2Plex (Qiagen<sup>®</sup>, Hilden, Alemanha). Os parâmetros do PCR foram: o primeiro passo de desnaturação inicial de 5 min a 95°C seguido de 45 ciclos de 5s a 95°C, e 10s a 60°C. Os oligonucleotídeos ou “primers” utilizados para a amplificação estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Sequência de *primers*

Primer	Forward	Reverse
<i>Bdnf</i>	5'-TCAGATCTCTTCTGTGTGCGTGAGT-3'	5'-GGAGATCTCTCCTGTTCTTCAGCAA-3'
<i>Npy</i>	5'-GTGGACTGACCCTCGCTCTAT- 3'	5'-ATGAGATTGATGTAGTGTCGCAGA-3'
<i>Trkb</i>	5'-GCCATCAGCACCAAGCAGCAAGAG-3'	5'-GAAGCCCAAGACCAGCAAGCATAAGC-3'
<i>Gapdh</i>	5'-GCGAGATCCCGTCAAGATCA-3'	5'-CCACAGTCTTCTGAGTGGCAG-3'

Sequência de *primers* desenhados para estudo de *npy*, *bdnf* e *trkb* e do gene constitutivo de referência *gapdh*.

Os valores limites de ciclo (do inglês, “*cycle threshold*”, CT) das amostras foram determinados pela normalização a partir das curvas de fluorescência *versus* o número de ciclos do PCR durante a amplificação exponencial. As curvas padrão para todas as amplificações dos *primers* (ou oligonucleotídeos) foram geradas traçando os valores médios dos valores de CT em função do logaritmo da quantidade de moléculas *template* (molde) alvo. Todas as quantificações foram normalizadas para o gene de referência (ou *house-keeping*): *desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato* (GAPDH). O valor da quantificação relativa de cada gene alvo foi analisado utilizando um método CT comparativo (Livak e Schmittgen, 2001). A seguinte fórmula ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) foi usada para calcular a quantidade relativa do transcrito na amostra e normalizado com o de referência endógena GAPDH:  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde  $\Delta CT$  é a diferença entre a CT do gene de interesse e do GAPDH, e  $\Delta\Delta CT$  para a amostra é igual à média do  $\Delta CT$  da amostra do grupo experimental, menos a média do  $\Delta CT$  da amostra do grupo controle (utilizada como parâmetro para calibração).

### **Análise estatística**

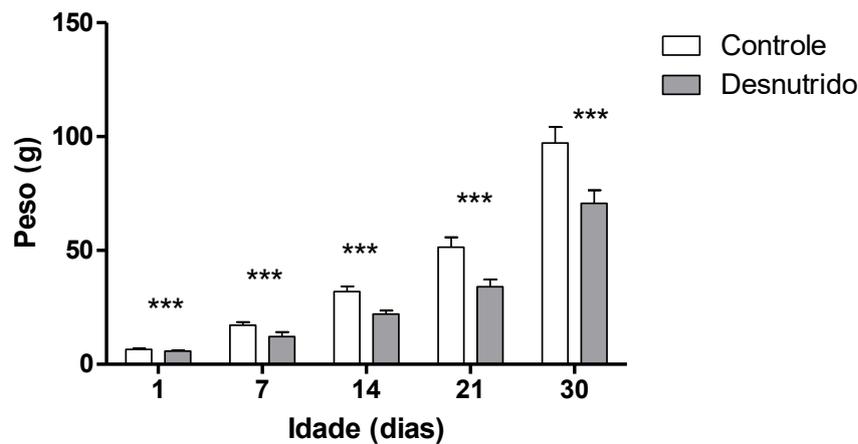
Inicialmente, foi aplicado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov). Quando os dados revelam normalidade e homogeneidade de variâncias, para comparação de parâmetros dos ratos nas idades estudadas, foram utilizados *t-test Student*, quando foi comparação de dois grupos. Para comparações múltiplas foi utilizada ANOVA two-way seguida do teste *post-hoc* de Tukey. Os valores foram expressos em média e desvio padrão da média (DP). O nível de significância foi mantido em 5% ( $p < 0,05$ ) em todos os casos. As análises dos dados foram realizadas através do programa estatístico Graphpad Prisma 4® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

## 7 RESULTADOS

### Peso corporal dos animais controles e desnutridos antes da exposição ao ambiente enriquecido

Os dados de evolução ponderal neonatal mostraram que o grupo desnutrido apresentou redução de peso ao nascer em relação ao grupo controle (C=  $6,51 \pm 0,37g$ , n=24 vs D=  $5,83 \pm 0,41g$ , n=26;  $p < 0,001$ ), persistindo essa diferença até os 30 dias de vida (C=  $97,20 \pm 7,01g$ , n=26 vs D=  $70,65 \pm 5,79g$ , n=26;  $p < 0,001$ ) (Figura 3 e Tabela 4).

Figura 3 - Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do peso neonatal de ratos.



Os grupos controle (n= 24) e desnutrido (n=26) foram alimentados, respectivamente, com dieta 17% e 8% de proteína até o desmame. Teste t de Student, \*\*\* $p < 0,001$ .

Fonte: Matos, Rhowena. 2016.

Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Tabela 4 - Médias do peso corporal neonatal dos grupos submetidos desnutrição proteica perinatal e controle.

Dia	Controle (média em g $\pm$ DP)	Desnutrido (média em g $\pm$ DP)
1º dia	6,51 $\pm$ 0,37	5,83 $\pm$ 0,41***
7º dia	17,14 $\pm$ 1,37	12,22 $\pm$ 1,94***
14º dia	31,89 $\pm$ 2,34	22,04 $\pm$ 1,53***
21º dia	51,41 $\pm$ 4,35	34,07 $\pm$ 3,14***
30º dia	97,20 $\pm$ 7,01	70,63 $\pm$ 5,79***

Grupos Controle e Desnutrido n=24 e 26 em cada grupo, respectivamente. Teste t de Student, \*\*\*p<0.001.

Fonte: Matos, Rhowena. 2016.

Nota: Tabela elaborada pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

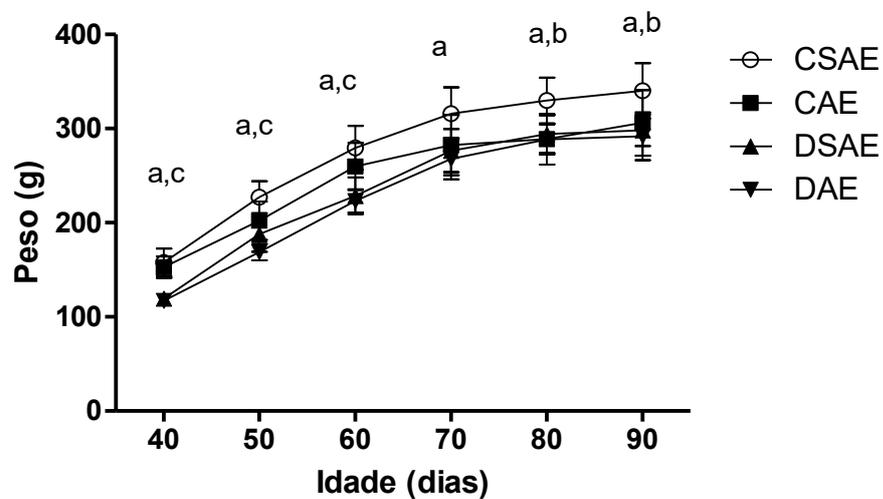
*Peso corporal dos animais controle e desnutridos após a exposição ao ambiente enriquecido*

De acordo com os resultados de evolução ponderal após os 30 dias, onde os animais foram submetidos à exposição ambiental ou permaneceram em gaiolas padrão de acordo com a subdivisão de grupos, a desnutrição proteica provocou uma redução de peso durante todo o estudo uma vez que o peso do grupo DSAE foi menor quando comparado com CSAE (1º dia: C= 6,51 $\pm$ 0,37gvs D= 5,83 $\pm$ 0,41g e 90º dias: CSAE= 340,05 $\pm$ 29,30g, n=12 vs DSAE= 298,30 $\pm$ 16,88g, n=11; p<0,001), Figuras 3 e 4 e Tabelas 4 e 5.

Nos animais controle após a exposição ao AE, o grupo CAE apresentou uma considerável perda de peso quando comparado ao grupo CSAE a partir dos 80 dias (CSAE= 329,85 $\pm$ 24,27g, n=13 vs CAE= 288,79 $\pm$ 26,82g, n=11; p<0,001) até os 90 dias (CSAE= 340,05 $\pm$ 29,30g, n=13 vs CAE= 306,03 $\pm$ 34,70g, n=11; p<0,001). No entanto, ao observarmos o efeito do AE sobre o peso dos animais que sofreram desnutrição proteica precocemente, não foi observado diferenças entre DSAE e DAE (DSAE= 298,30 $\pm$ 16,88g, n=11 vs DAE= 291,74 $\pm$ 25,39g, n= 12; p>0,05). Essa resposta do grupo CAE a exposição ao AE fez com que ele atingisse um peso

semelhante ao grupo DAE a partir dos 70 dias (CAE= 282,58±32,06g, n=12 vs DAE= 267,95±21,86g, n=12; p=0,99), com persistência desse padrão até os 90 dias de vida (CAE= 306,03±34,70g, n=12 vs DAE=291,74±25,39g, n=12; p=0,99) (Figura 4 e Tabela 5).

Figura 4 - Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a evolução do peso corporal de ratos a partir de 40 dias de vida, após a exposição ao ambiente enriquecido.



Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame. Os dados estão expressos em média do peso em gramas ± DP. CSAE (Controle sem ambiente enriquecido, n=12), DSAE (Desnutrido sem ambiente enriquecido, n=11), CAE (Controle com ambiente enriquecido, n=11) e DAE (Desnutrido com ambiente enriquecido, n=11), a= diferença entre grupos CSAE e DSAE; b= diferença entre grupos CSAE e CAE; e c= diferença entre os grupos CAE e DAE, p< 0,001. Teste Two-way ANOVA, post-hoc Tukey.

Fonte: Matos, Rhowena. 2016.

Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Tabela 5 - Médias do peso corporal dos grupos Controle e Desnutrido após a exposição ao ambiente enriquecido.

Dia	CSAE (média em g ± DP)	DSAE (média em g ± DP)	CAE (média em g ± DP)	DAE (média em g ± DP)
40º dia	157,87±14,72	119,66±7,58 ***	152,83±11,33	117,16±7,48 ###
50º dia	227,18±16,94	187,87±18,75 ***	202,05±20,35	168,87±8,60 ###
60º dia	279,49±23,25	228,54±19,51 ***	259,81±24,92	223,05±12,30 ###
70º dia	304,46±28,01	276,90±19,56 ***	282,58±32,06	267,95±21,86
80º dia	329,85±24,27	294,31±20,01 ***	288,79±26,82***	288,60±15,96
90º dia	340,05±29,30	298,30±16,88 ***	306,03±34,70***	291,74±25,39

CSAE (Controle sem ambiente enriquecido, n=11), DSAE (Desnutrido sem ambiente enriquecido, n=11), CAE (Controle com ambiente enriquecido, n=11) e DAE (Desnutrido com ambiente enriquecido, n=11). Two-way ANOVA, seguido de comparações múltiplas, teste *post-hoc* Tukey. \*\*\*p<0,001 (em relação ao grupo CSAE); ###p<0,001 (em relação ao grupo CAE).

Fonte: Matos, Rhowena. 2016.

Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

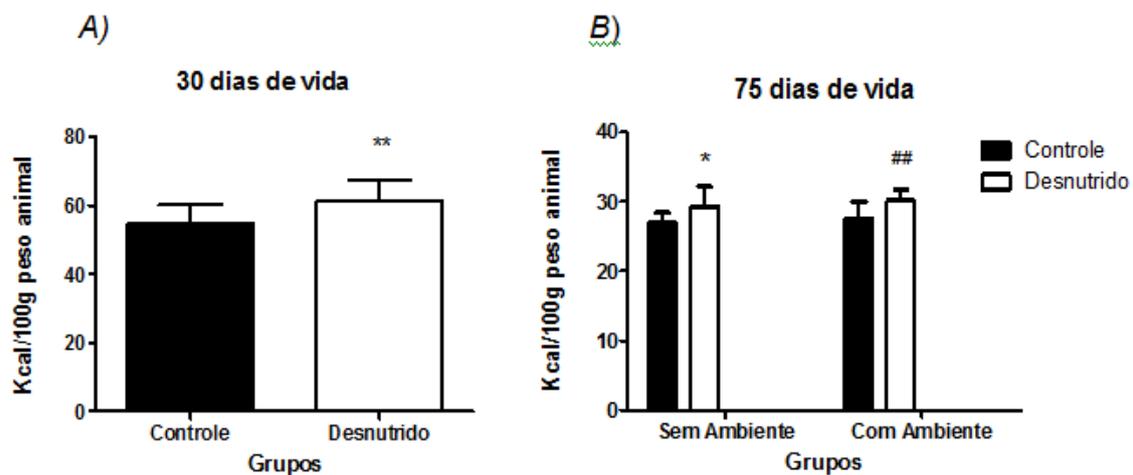
*Efeitos da restrição proteica perinatal no consumo alimentar diário espontâneo antes e após a exposição ao AE*

Como mostram os resultados, o grupo que foi submetido à desnutrição proteica precocemente apresentou um aumento do consumo alimentar diário aos 30 dias, mensurado através da relação em kcal/100g de peso corporal do animal, mostrando o aparecimento de hiperfagia nos animais (C=16,11± 1,48 kcal/100g de peso, n=27 vs D= 17,98± 1,83kcal/100g de peso corporal, n=28; p<0,001) (Figura 5A), uma vez que os mesmos consumiram uma maior quantidade de ração.

Aos 75 dias, o grupo DSAE permaneceu com esse padrão de consumo alimentar aumentado em relação ao grupo CSAE, (CSAE= 7,91±0,43kcal/100g de peso corporal, n=14 vs DSAE= 8,60±0,92kcal/100g de peso corporal, n=14; p=0,03). Assim como, ao serem submetidos à exposição ao ambiente enriquecido, o grupo

DAE também apresentou uma maior ingestão alimentar em relação ao grupo CAE (CAE=  $8,10 \pm 0,71$  kcal/100g de peso corporal, n=17; p=0,009 vs DAE=  $8,86 \pm 0,58$  kcal/100g de peso corporal, n=14; p=0,009) (Figura 5B). Dessa forma, sugere-se que o fator desnutrição proteica perinatal induziu o surgimento de um padrão de consumo alimentar espontâneo aumentado que persistiram ao longo do estudo, como também as influências do AE não foram suficientes para modificar esse padrão hiperfágico, uma vez que aconteceu independentemente da exposição ambiental o qual o animal foi submetido.

Figura 5 -Efeitos da restrição proteica perinatal sobre o consumo alimentar diário espontâneo.



Efeitos da restrição proteica perinatal sobre o consumo alimentar diário espontâneo em kcal por 100g de peso animal (kcal/100g peso). A) Consumo alimentar de ratos com 30 dias de vida. \*\*p<0,01, teste t de Student. Controle n=27 e Desnutrido n=28. B) Consumo alimentar de ratos com 75 dias de vida submetidos a desnutrição perinatal e expostos ou não ao ambiente enriquecido. CSAE (Controle sem ambiente enriquecido, n=14), DSAE (Desnutrido sem ambiente enriquecido, n=14), CAE (Controle com ambiente enriquecido, n=17) e DAE (Desnutrido com ambiente enriquecido, n=14). \* p<0,05 em relação ao CSAE. ## p<0,01 em relação ao grupo CAE. A) *test t Student*; B) Two-way ANOVA, seguido de comparações múltiplas, *post-hoc* Tukey.

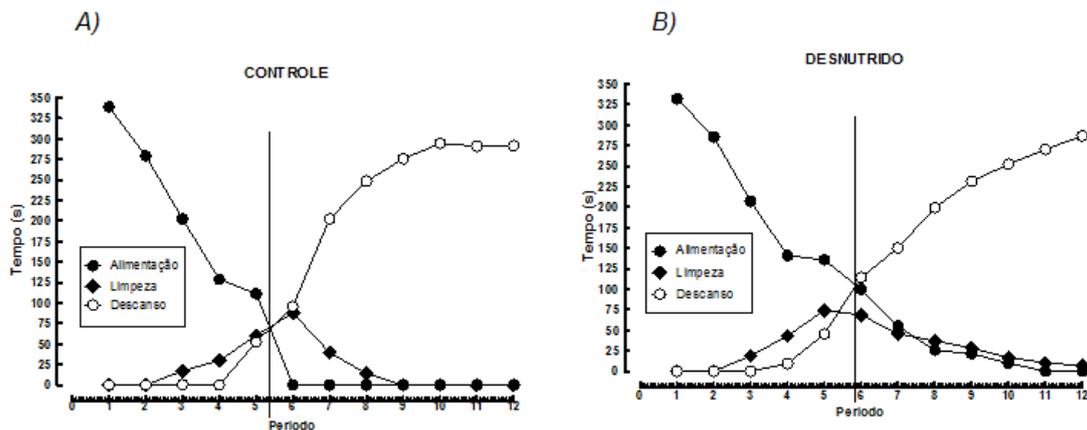
Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

*Efeitos da desnutrição proteica precoce sobre a Sequência Comportamental de Siedade aos 30 dias*

A sequência comportamental de siedade (SCS) foi realizada para verificar se o padrão de consumo alimentar aumentado apresentado pelos animais submetidos à desnutrição protéica era resultado de uma maior ingestão alimentar por refeição e/ou retardo no aparecimento do comportamento de siedade.

O ponto de intersecção entre a linha que representa o comportamento de alimentação e o de descanso representa o momento em que os animais ficam saciados e começam a passar mais tempo descansando que se alimentando. Os resultados indicam que o grupo desnutrido (Figura 6B) apresentou um deslocamento dessa linha para a direita em relação ao grupo controle (Figura 6A), revelando que esse grupo apresentou um atraso no disparo de siedade.

Figura 6 - Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a Sequência Comportamental de Siedade de ratos machos 30 dias de vida.



A, corresponde ao grupo controle e B, ao desnutrido. Na abscissa, os períodos de 1-12 correspondem aos intervalos de 5 min de tempo que compõem uma sessão de teste de 60 min, cujos gráficos ilustram o ponto de transição de alimentação ao descanso através da linha tracejada. Nos desnutrido (D), essa linha é deslocada para a direita em relação aos controles (B), indicando um retardo no aparecimento da siedade.

Fonte: Matos, Rhowena. 2016

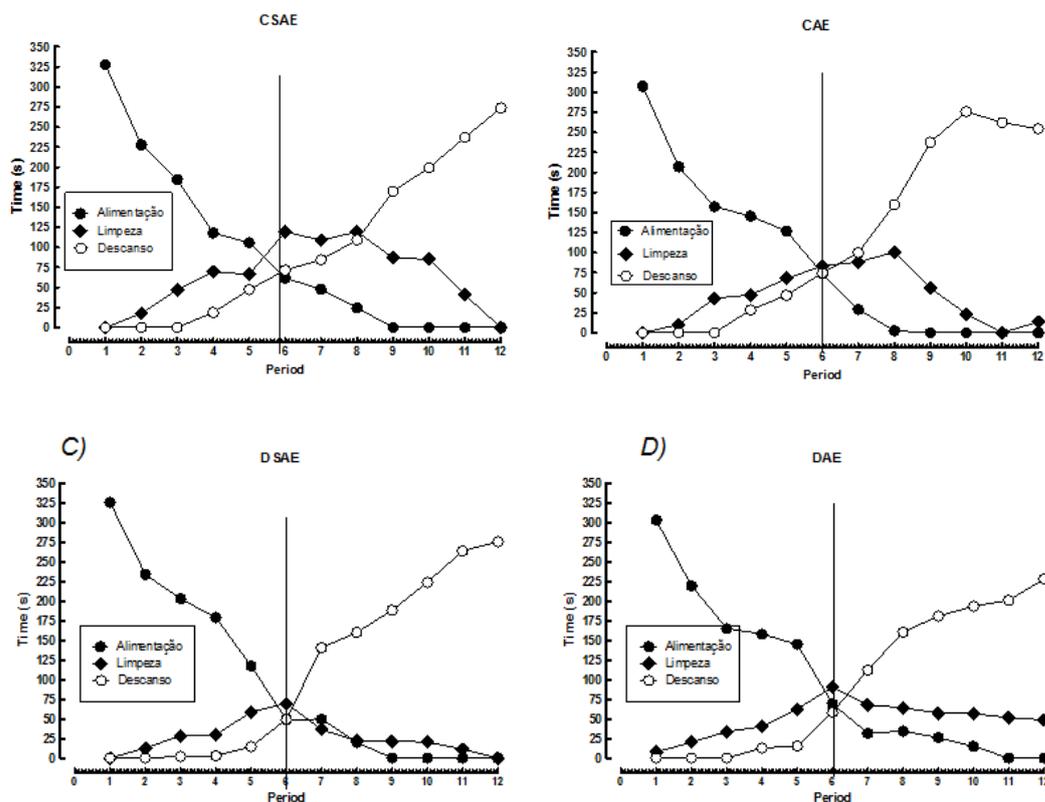
Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

Efeitos da desnutrição e do ambiente enriquecido sobre a Sequência Comportamental de Saciedade (SCS) aos 75 dias de vida

A SCS foi realizada na vida adulta, aos 75 dias de vida, após a exposição dos grupos controle e desnutridos expostos ao AE ou gaiola padrão com o objetivo de verificar se os resultados observados no padrão de alimentação aos 30 dias permaneciam na vida adulta e se o AE seria capaz de ter alguma influência sobre o comportamento alimentar.

No entanto, o ponto de intersecção do comportamento de alimentação para o descanso se encontrou em torno do mesmo momento (Figura 7), ou seja, não foram observadas diferenças do tempo de alimentação sobre os grupos.

Figura 7 - Efeitos da restrição proteica perinatal sobre a Sequência comportamental de saciedade após exposição ao ambiente enriquecido de ratos com 75 dias de vida.



Os períodos 1-12 correspondem aos intervalos de 5 min de tempo que compõem uma sessão de teste de 60 min. Os gráficos ilustram o ponto de transição da alimentação ao descanso através da linha tracejada, onde em todos os grupos (A, B, C e D) esse ponto de transição encontra-se em torno do período 6. CSAE (Controle sem ambiente enriquecido), DSAE (Desnutrido sem ambiente enriquecido), CAE

(Controle com ambiente enriquecido) e DAE (Desnutrido com ambiente enriquecido) com  $n= 14$  por grupo.

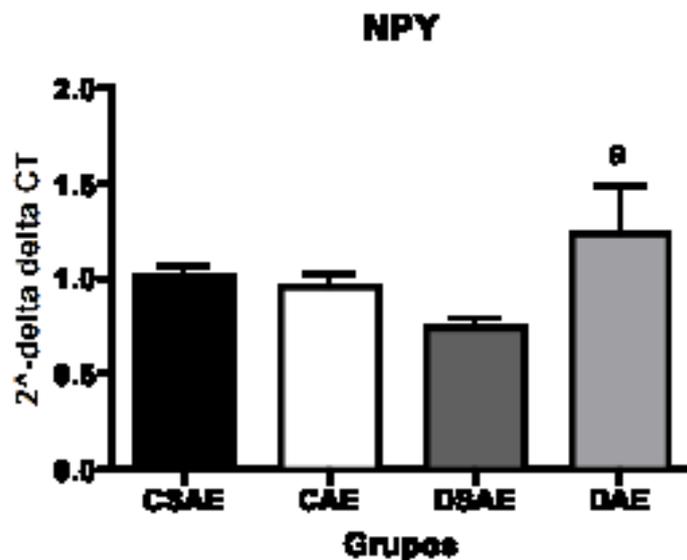
Fonte: Matos, Rhowena. 2016.

Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

*Efeitos da desnutrição e do ambiente enriquecido sobre a Expressão gênica de NPY, BDNF E TrkB no hipotálamo*

Os resultados obtidos mostram que a desnutrição não provocou alteração no nível de expressão gênica do neuropeptídeo Y aos 90 dias (CSAE= $1,01\pm 0,07$ ,  $n=5$  vs DSAE=  $0,70\pm 0,05$ ,  $n=4$ ;  $p=0,10$ ). Entretanto, o grupo submetido à restrição protéica e exposto ao ambiente enriquecido apresentou aumento na expressão desse neuropeptídeo aos 90 dias (DSAE=  $0,70\pm 0,05$ ,  $n=4$  vs DAE= $1,13\pm 0,13$ ,  $n=3$ ;  $p=0,03$ ) (Figura 8).

Figura 8 - Efeitos da restrição proteica sobre a expressão gênica do NPY no hipotálamo de ratos machos com 90 dias de vida após exposição ao ambiente enriquecido.



Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame. CSAE (Controle sem ambiente enriquecido), DSAE (Desnutrido sem ambiente enriquecido), CAE (Controle com

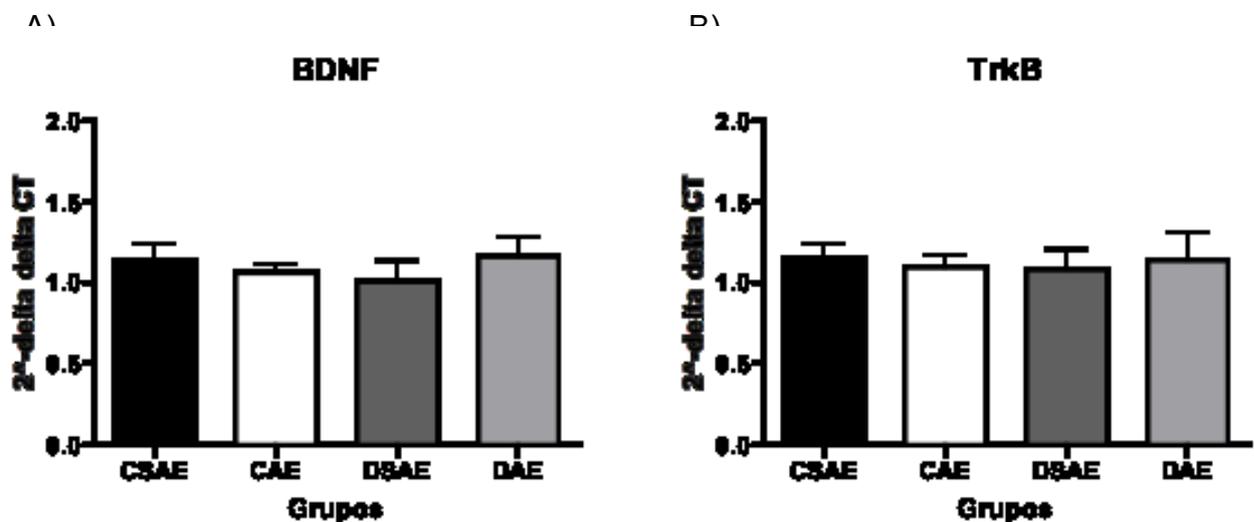
ambiente enriquecido) e DAE (Desnutrido com ambiente enriquecido).  $a = p < 0.05$ , comparação ao grupo CSAE. Two-way ANOVA, *post-hoc* Tukey,  $n = 5$ .

Fonte: Matos, Rhowena. 2016.

Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

No que diz respeito à expressão gênica do *bdnf* e seu receptor *trkb* não houve diferença significativa em nenhum dos grupos estudados (BDNF: CSAE=  $1,13 \pm 0,09$ ,  $n=4$  vs DSAE=  $1,00 \pm 0,12$ ,  $n=4$ ;  $p=0,84$ ; CAE=  $1,06 \pm 0,05$ ,  $n=4$  vs CAE=  $1,06 \pm 0,05$ ,  $n=4$ ,  $p=0,54$ ) (TrkB: CSAE=  $1,15 \pm 0,08$ ,  $n=4$  vs DSAE=  $1,07 \pm 0,12$ ,  $n=4$ ;  $p=0,97$ ; CAE=  $1,08 \pm 0,08$ ,  $n=4$  vs DAE=  $1,25 \pm 0,17$ ,  $n=4$ ;  $p=0,75$ ) (Figura 9).

Figura 9 - Efeitos da restrição proteica sobre a expressão gênica do BDNF, TrkB no hipotálamo de ratos machos com 90 dias de vida após exposição ao ambiente enriquecido.



Os grupos controle e desnutrido foram alimentados respectivamente, com dieta 17% de proteína e 8% de proteína até o desmame. CSAE (Controle sem ambiente enriquecido), DSAE (Desnutrido sem ambiente enriquecido), CAE (Controle com ambiente enriquecido) e DAE (Desnutrido com ambiente enriquecido). Two-way ANOVA, seguido de comparações múltiplas, *post-hoc* Tukey, com  $n = 15$ .

Fonte: Matos, Rhowena. 2016.

Nota: Gráfico elaborado pelo autor com base nos resultados obtidos na pesquisa.

## 8 DISCUSSÃO

### Peso

O presente estudo mostra que uma dieta com baixo teor de proteína durante a gestação e lactação afeta o peso corporal das proles machos ao longo da vida. Esses achados corroboram com outras pesquisas realizadas em diferentes espécies de animais que também evidenciaram o efeito da desnutrição proteica perinatal a curto prazo, no baixo peso ao nascer e a ao longo da vida (OROSCO-SÓLIS *et al.*, 2009; ANGUITA; SIGULEM; SAWAYA, 1993; BARROS *et al.*, 2006; KUWAHATA *et al.*, 2011; REHFELDT *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2007; SOHI *et al.*, 2011). Em animais submetidos à restrição calórica de 50% durante a gestação, nem todos os trabalhos verificam essa diferença significativa de peso (GEORGE *et al.*, 2012). Em contrapartida, Orozco-Sólis *et al.*, (2009) verificaram que ratos Sprague Dawley de restrição proteica perinatal apresentavam baixo peso até 180 dia de vida, porém aos 240 dias o desnutrido conseguia recuperar o peso corporal e igualar-se ao controle. Esses efeitos observados na evolução ponderal podem ser resultado de distúrbios metabólicos que através do aumento na função mitocondrial no músculo esquelético pode provocar um aumento no número de mitocôndrias no tecido adiposo branco e consequentemente o indivíduo apresenta um aumento no gasto de energia mínima associado a uma certa proteção contra o desenvolvimento da obesidade (JOUSSE *et al.*, 2014).

Em um modelo de animais com retardo no crescimento intrauterino, foi verificado que o grupo alimentado com uma dieta de baixa proteína não apresentou diferença significativa de peso ao nascer, no entanto no período de desmame eles apresentavam peso inferior 35% quando comparado ao grupo sem restrição. Essa diferença manteve-se em torno de 10-15% no período pós natal até a 9ª semana de vida, quando na décima semana o peso foi normalizado (VUCETIC *et al.*, 2010). Outro estudo, o de Remmers *et al.*, (2008) tiveram resultados semelhantes, mostram que os animais alimentados com uma dieta de baixa proteína tiveram menor peso ao nascer e ao longo da vida. Aos 380 dias, quando os animais foram sacrificados, eles apresentaram menor peso, menor comprimento e redução nos níveis de leptina no soro, o que pode estar relacionada com a baixa evolução ponderal.

Durante o período de desenvolvimento em que os animais sofreram o insulto nutricional, os circuitos neurais hipotalâmicos ainda não estão totalmente formados (GALI RAMAMOORTHY *et al.*, 2015) podendo sofrer alterações no desenvolvimento e na liberação de neurotransmissores que atuam no controle do comportamento alimentar (PLUN *et al.*, 2006) o que pode refletir no peso corporal, como apresentado em nosso estudo. Outros resultados também corroboram com nosso estudo que também identificaram que a manipulação nutricional materna durante o período crítico do desenvolvimento reduz o peso corporal da prole (LIRA *et al.*, 2014) podendo afetar permanentemente.

Assim, mesmo após a exposição ao ambiente enriquecido, o grupo experimental permaneceu com baixo peso, uma vez que a estimulação ambiental pode favorecer o aumento da atividade física involuntária por ter vários objetos e brinquedos. Tendo um aumento do gasto energético, o grupo controle submetido ao enriquecimento ambiental apresentou uma perda de peso a partir dos 70 dias atingindo peso semelhante aos desnutridos aos 80 dias. Analisamos que o peso dos animais desnutridos que foram expostos ao ambiente enriquecido foi semelhante ao do grupo desnutrido sem exposição durante todo o período de análise. Sugerindo, que a desnutrição pode favorecer o surgimento de um fenótipo resistente aos estresses ambientais após a lactação. Uma vez que, mesmo sendo induzido a ter uma maior atividade física e conseqüentemente um maior gasto energético, o grupo manteve-se com um padrão de peso corporal inferior ao grupo controle até a vida adulta.

Nesse contexto, mesmo não observando neste trabalho alterações hormonais, dados na literatura científica evidenciam que hormônios catabólicos estejam envolvidos na manutenção desse fenótipo, uma vez que restrição calórica durante a gravidez induz o aumento de corticosterona no plasma e superexposição do feto a esses níveis de glicocorticóides levando a um aumento do peso das adrenais das proles (LESAGE *et al.*, 2001) o que pode levar a uma maior liberação nos hormônios produzidos por tal glândula como resultado de perturbações no eixo hipotálmo-hipófise-adrenal. No entanto, o aumento nos níveis do hormônio cortisol, tanto materno como fetal reduz a expressão do receptor de glicocorticóides no hipotálamo e no hipocampo dos filhotes adultos (LINGAS; DEAN; MATTHEWS,

1999), favorecendo um maior metabolismo catabólico. Isso pode ser uma das causas da manutenção do baixo peso apresentado pelo grupo experimental.

Sabe-se também que um ambiente intrauterino desfavorável nutricionalmente pode comprometer as formações de estruturas e funções neurais que ocorrem nesse período, como a mielinização e proliferação de neurônios (PRADO; DEWEY, 2014). Essas modificações podem alterar regiões responsáveis pela homeostase energética, como o hipotálamo, o qual abriga várias populações de neurônios que fazem parte do mecanismo de controle da supressão e estimulação do apetite (SOHN, 2015). Tais comprometimentos podem ter ocasionado o desenvolvimento desse fenótipo resistente a variação de peso em diferentes ambientes pós-natais.

### Consumo alimentar

De acordo com as análises de consumo alimentar podemos identificar que a restrição protéica nas primeiras fases de vida induz a um padrão de alimentação caracterizado pela presença do comportamento de hiperfagia, uma vez que esses animais consumiram uma maior quantidade de ração quando comparado ao grupo controle. Assim como, estudos anteriores também identificaram esse aumento do consumo alimentar em animais com 35 dias de vida que sofreram insulto nutricional no período crítico do desenvolvimento (LIRA *et al.*, 2014).

Dessa mesma forma que o peso corporal apresentou-se diminuído nos animais que sofreram restrição proteica, a quantidade de tecido adiposo pode ter diminuído proporcionalmente tendo assim, uma menor liberação de leptina não ocorrendo a inibição da via anorexígena, o que pode justificar tal aumento na ingestão alimentar tanto a curto quanto a longo prazo. Como mostra o estudo de Remmerset *al.*, (2008), onde a leptina apresentou-se em baixos níveis no soro de animais desnutridos precocemente.

Apesar de não ter realizado análises sobre o comportamento hedônico, pode-se sugerir que o aumento da ingestão alimentar no grupo experimental pode estar associado também a uma maior ativação neural das vias hedônicas, como a amígdala, ligada a recompensa alimentar em resposta a dieta palatável (DA SILVA

*et al.*, 2013). Isso se deve a busca de bem estar gerado a partir da ingestão de um alimento agradável que pode diminuir os sinais de saciedade, favorecendo o consumo contínuo desses alimentos mesmo ultrapassando os níveis de necessidades energéticas (ERLANSON-ALBERTSSON, 2015). Essa desregulação da via hedônica pode ocorrer devido a um aumento na expressão do gene do receptor DRD1a no núcleo estriado ventral, como consequência de uma perturbação na oferta de nutrientes durante o desenvolvimento fetal e pós natal, favorecendo o aumento da ingestão alimentar (DE MELO MARTIMIANO *et al.*, 2015), uma vez que, ao serem ativos receptores D1 de dopamina contribui para o aumento do apetite e aquisição de alimentos (ROBINSON *et al.*, 2005). Porém, torna-se necessário avaliar áreas hedônicas para testar essa hipótese.

Estudos mostram que estresse materno está relacionado com respostas comportamentais e hormonais das proles adultas (BALE, 2015), assim como restrição de proteínas pode alterar circuitos neurais de dopamina e comportamentos relacionados com a recompensa alimentar através de alterações nos mecanismos neuroquímicos com aumento da atividade dopaminérgica no hipotálamo, corpo estriado e córtex pré-frontal. Por outro lado, a atividade serotoninérgica é diminuída no hipocampo, estando relacionada a perda da capacidade de sentir prazer como resultado de um estresse crônico moderado (BEKRIS *et al.*, 2005). Assim, com o mecanismo de dopamina deficiente os animais tendem a uma maior ingestão alimentar característico, como apresentado no presente estudo.

Mesmo após a estimulação ambiental através da exposição ao ambiente enriquecido os animais desnutridos permaneceram com esse padrão de alimentação, da mesma forma que o grupo desnutrido sem a estimulação. Esses resultados sugerem que o ambiente enriquecido, *per se*, não foi capaz de influenciar no comportamento de ingestão alimentar mesmo atuando como um estimulador sensorial e social. Apesar de haver evidências mostrando que a exposição a uma série de estímulos ambientais durante um período da vida pode ser capaz de modelar algumas alterações cerebrais (BEAUIQUES *et al.*, 2010), contudo, nesse estudo não alterou o comportamento alimentar.

Assim, sugere-se que apenas a manipulação nutricional compromete o desenvolvimento de vias neurais envolvidas no controle da homeostase de energia, uma vez que, os animais que sofreram desnutrição precocemente apesar de

apresentar um padrão de ingestão alimentar aumentado, permaneceram com o peso corporal inferior ao grupo controle durante todo período avaliado. Supondo que influências ambientais transitórias, no período de gestação e lactação podem ser capazes de provocar alterações neurais permanentes e podem induzir ao indivíduo desnutrido um perfil de resistência ao aumento do gasto energético. Talvez para preservar os estoques metabólicos celulares. Faz-se necessário estudos metabólicos para avaliar esse perfil.

### SCS

A sequência comportamental de saciedade foi realizada com a finalidade de identificar a presença de alterações no padrão de comportamento durante o processo de alimentação e revelou que há um retardo no aparecimento da saciedade aos 30 dias em animais desnutridos precocemente, associado à maior ingestão alimentar. Tal grupo apresentou um padrão de comportamento alimentar caracterizado pela presença da hiperfagia, mesmo apresentando peso inferior ao grupo controle. Esse aspecto sugere que pode haver distúrbios nos mecanismos de controle homeostático. Outros trabalhos também tiveram dados semelhantes tanto em 30 quanto em 75 dias, mostrando retardo no disparo de saciedade em animais que sofreram restrição proteica perinatal (OROZCO-SÓLIS *et al.*, 2009) acompanhada de aumento no tamanho da refeição (OROZCO-SÓLIS *et al.*, 2009; LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008),

De acordo com os nossos resultados aos 75 dias, o retardo da saciedade identificado aos 30 dias não permaneceu, sugerindo que a dieta ofertada na fase precoce da vida pode induzir um fenótipo alterado. Além disso, o ambiente ao qual o indivíduo é exposto na vida pós-natal, também pode provocar modificações nesse fenótipo, reduzindo os prejuízos de uma dieta restritiva, no aspecto comportamental.

Tais alterações podem ser resultado, talvez, de modificações epigenéticas ocorridas durante as fases do neurodesenvolvimento. Como processos de metilações, acetilações ou até mesmo adição de microRNA's ao DNA, resultando em inibição ou expressão de genes envolvidos na circuitaria hipotalâmica (GALI

RAMAMOORTHY *et al.*, 2015). Como vem sendo mostrado na literatura, a dieta inserida durante o período crítico do desenvolvimento pode influenciar no surgimento de fenótipos diferentes a partir das modificações durante a replicação do DNA ou compactação da cromatina, que também pode sofrer influência ambiental dependendo da exposição do indivíduo após o nascimento (JANG; SERRA, 2014).

Apesar de o ambiente enriquecido não ter sido suficiente para reverter o comportamento alimentar no parâmetro de ingestão, ele reduziu o tempo de alimentação caracterizado pelo disparo da saciedade. O grupo desnutrido que havia apresentado retardo no período de alimentação aos 30 dias, quando exposto ao ambiente enriquecido, não apresentou esse comportamento, igualando-se ao grupo controle.

Assim, as mudanças encontradas na alimentação provocadas pela desnutrição ocorreram devido a uma alteração no padrão alimentar durante o teste caracterizado por aumento do tamanho da refeição, como mostrado na ingestão alimentar diária e retardo no aparecimento da saciedade. Sendo o ambiente enriquecido um fator externo que pode modular o comportamento alimentar em relação à saciedade, como apresentado no presente estudo.

#### Expressão gênica do *npv*, *bdnf* e *trkb*

Nosso estudo mostrou que a desnutrição não foi capaz de alterar os níveis de expressão gênica do neuropeptídeo Y na vida adulta, no entanto quando exposto ao ambiente com estimulação, o grupo desnutrido apresentou uma elevação nessa expressão, justificando o maior consumo alimentar no grupo desnutrido submetido ao AE. Em relação ao grupo desnutrido sem estimulação, pode significar que apesar de apresentar uma ingestão aumentada, que pode ter ocorrido como consequência da desnutrição precoce, tal estresse não foi suficiente para provocar alterações em nível de expressão gênica, ou pode ter sido revertida ao longo do tempo, uma vez que essas análises foram feitas na vida adulta.

Estudos anteriores que também analisaram a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos em animais com restrição protéica precoce não identificaram diferença

significativa na expressão de *npv* e *agrp* em ratos jovens nem na idade adulta. No entanto, a expressão de *pomc* foi reduzida na idade adulta (24 semanas). Esse estudo sugere que não ocorre alteração de neuropeptídeos individualmente, mas sim na relação das vias anorexígena/orexígena, induzindo uma subregulação dos neuropeptídeos orexígenos sobre os anorexígenos como uma estratégia de sobrevivência e crescimento (IKENASIO-THORPE *et al.*, 2007). Entretanto, estudos mostram mudanças na expressão gênica como resposta à desnutrição precoce, como o aumento do neuropeptídeo Y e do peptídeo relacionado ao Agouti, como também um diminuição do proopiomelanocortina aos 35 dias (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2009).

Outros mecanismos podem estar envolvidos em distúrbios do metabolismo, como uma variedade de genes que controlam o metabolismo e os processos celulares em vez de uma cascata de sinalização independente. Estudos mostram regulação negativa de genes de enzimas envolvidas no metabolismo de glicose como a lactato desidrogenase C, além de outras enzimas que exercem funções de oxido-redutase (citocromo P450, NADH desidrogenase Fe-S, entre outras) afetando assim, vias de sinalização homeostática e detecção de nutrientes em animais desnutridos precocemente. Uma via alterada é a de detecção dos sinais de insulina que é feito através de uma cascata de reações enzimáticas, a qual a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e quinase 1 (PDK1) estão envolvidas (OROZCO-SOLIS *et al.*, 2010). Uma maior ativação da via regulada pela PI3K em neurônios da via anorexígena pode resultar em animais hiperfágicos e com resistência à leptina (PLUN *et al.*, 2006).

A leptina, por sua vez, também pode ter grande influência sobre o desenvolvimento dos circuitos neurais. Segundo a literatura, os circuitos do núcleo arqueado do hipotálamo são imaturos estruturalmente e funcionalmente até a terceira semana de vida após o nascimento, sendo esse hormônio um fator essencial para o desenvolvimento dessa área, no entanto perturbações na alimentação nesse período podem alterar os níveis de leptina no indivíduo, podendo causar consequências na formação e função desses circuitos hipotalâmicos que atuam na homeostase energética (BOURET, SIMERLY 2004). No entanto, deve-se avaliar esses parâmetros em trabalhos posteriores com o nosso modelo.

Outros estudos com restrição proteica precoce, mostram redução da expressão de POMC e CART em ratos de meia idade. No entanto, a expressão de peptídeos da via orexígena (NPY e AgRP) como também da via anorexígena (POMC e CART) estavam aumentadas quando os animais ainda estavam jovens, porém esse aumento não foi identificado na meia- idade. Sugerindo assim, que com a idade a expressão gênica pode ser normalizada à medida que ocorre maturação das vias hipotalâmicas (REMMERS; NIELSEN; FAHEY, 2008). Dessa forma, ao analisarmos a expressão gênica aos 90 dias de idade, os animais já poderiam ter estabelecido seus níveis normais de expressão de neuropeptídeos, mesmo na presença de um insulto nutricional precoce.

Com relação às outras expressões gênicas analisadas, não foi observada diferença na expressão do *bdnf* e de seu receptor *trkb*, sugerindo que estes não participam da ativação das vias hipotalâmicas na idade avaliada. Como a maturação do sistema hipotalâmico estudado, estabelece-se também após o nascimento, os níveis de expressão gênica do *bdnf* e do seu receptor *trkb* podem ter sido alterados quando os animais no período jovem e alcançado a normalidade durante o crescimento. Todavia, antes de haver a exposição ao ambiente enriquecido, sabendo que os animais que foram expostos a esta estimulação ambiental não tenham apresentado diferença nessa expressão, uma vez que essas análises ocorreram na vida adulta.

Assim, o ambiente intrauterino e a oferta de nutrientes durante o desenvolvimento fetal pode exercer importante influência sobre redes hipotalâmicas responsáveis pela regulação do controle alimentar, no entanto o ambiente enriquecido pode ser capaz de provocar mudanças na expressão gênica de neuropeptídeos orexígenos em animais desnutridos, porém sem alterar outras neurotrofinas. Sugere-se assim, que o padrão de alimentação induzido pela desnutrição precoce encontrado nesses animais não seja mediado pelo BDNF na idade avaliada.

## 9 CONCLUSÕES

O ambiente de vida precoce, bem como pós-natal, exerce uma importante influência na programação funcional dos circuitos neurais que integram o comportamento alimentar e o balanço energético. Sugere-se assim, que há uma resistência ao gasto energético nesses indivíduos após o período de insulto nutricional, mesmo com mudança ambiental na vida adulta.

A desnutrição proteica precoce, *per se*, não modifica a longo prazo a expressão do neuropeptídeo orexígeno, porém quando há mudança ambiental, esses indivíduos respondem às demandas ambientais externas para regular as reservas energéticas. Esse processo não é modulado pelo fator neurotrófico derivado do cérebro.

Dessa forma, é de fundamental importância um maior aprofundamento nos estudos a respeito de novas ferramentas de intervenções que possam ser usadas como medidas terapêuticas de prevenção e/ou tratamento de distúrbios do comportamento alimentar.

## REFERÊNCIAS

ANGUITA, R. M.; SIGULEM, D. M.; SAWAYA, A.L. Intrauterine food restriction is associated with obesity in young rats. **J Nutr**, v.123, p. 1421–1428, 1993.

BAAMONDE, C. *et al.* G-Protein-Associated Signal Transduction Processes Are Restored after Postweaning Environmental Enrichment in Ts65Dn, a Down Syndrome Mouse Model. **Developmental Neuroscience**, v.33, n. 5, p. 442-50, 2011.

BALE, T. L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n.6, p.332-44, 2015.

BARKER, D.J Fetal origins of coronary heart disease. **The BMJ**, v. 311, n. 6998, p. 171-174, 1995.

BARROS, K.M. *et al.* A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. **Nutr Neurosci.**, v. 9, n. 1-2, p. 99-104, 2006.

BEAUQUIS, J. *et al.* Short-Term Environmental Enrichment Enhances Adult Neurogenesis, Vascular Network and Dendritic Complexity in the Hippocampus of Type 1 Diabetic Mice. **PLoS One**, v. 5, n. 11, 2010.

BEKRIS, S. *et al.* Behavioural and neurochemical effects induced by chronic mild stress applied to two different rat strains. **Behavioural Brain Research**, v. 161, n.1, p. 45-59, jun. 2005.

BELL, C. G.; WALLEY, A. J.; FROGUEL,P. The genetics of human obesity. **Nat. Rev. Genet**, v. 6, n. 3, p. 221–234, mar. 2005.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. Minireview: Leptinanddevelopmentofhypothalamicfeedingcircuits. **Endocrinology**, v. 145, n. 6, p. 2621-6, jun. 2004.

CAO, W.*et al.* Early enriched environment induces an increased conversion of proBDNF to BDNF in the adult rat's hippocampus. **Behavioural Brain Research**, v. 15, p.76-83, maio, 2014.

CARLSON, E. S. *et al.* Perinatal iron deficiency results in altered developmental expression of genes mediating energy metabolism and neuronal morphogenesis in hippocampus. **Hippocampus**, v.17, n. 8, p.679–91, 2007.

CHEN, H.; SIMAR, D.; MORRIS, M. J. Hypothalamic Neuroendocrine Circuitry is Programmed by Maternal Obesity: Interaction with Postnatal Nutritional Environment. **Plos One**, v. 4, n.7, Jul. 2009.

CHRONWALL, B.M. *et al.* The anatomy of neuropeptide-Y-containing neurons in rat brain. **Neuroscience**, v. 15, n. 4, p. 1159-81, ago. 1985.

CIFANI, C. *et al.* Regulation of hypothalamic neuropeptides gene expression in diet induced obesity resistant rats: possible targets for obesity prediction? **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p.187, jun. 2015.

DA SILVA, A. A. *et al.* Perinatal undernutrition stimulates seeking food reward. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 5, p. 334-41, ago. 2013.

DAMS, J. *et al.* Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: neurobehavioral work group summary. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. 3, p. 535-44, jun. 2000.

DE MELO MARTIMIANO, P. H. *et al.* Perinatal malnutrition stimulates motivation through reward and enhances drd(1a) receptor expression in the ventral striatum of adult mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 134, p. 106-114, jul. 2015.

DI GARBO, A. *et al.* Environmental Enrichment Modulates Cortico-Cortical Interactions in the Mouse. **Plos One**, v. 6, n. 9, 2011.

DIENI, S.; REES, S. BDNF and TrkB protein expression is altered in the fetal hippocampus but not cerebellum after chronic placental compromise. **Exp. Neurol**, v. 192, n. 2, p. 265-73, abr. 2004.

DOBBING, J.; SANDS, J. Cell size and cell number in tissue growth and development. An old hypothesis reconsidered. **Archives Françaises de Pédiatrie**, v. 42, n. 3, p. 199-203, mar 1985.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. How Palatable Food Disrupts Appetite Regulation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 97, n. 2, p. 61-73, ago. 2005.

FRANCIS, D.D. *et al.* Environmental enrichment reverses the effects of maternal separation on stress reactivity. **Journal of Neuroscience**, v.22, n.18, p.7840-3, 2002.

GALI ROMAMOORTHY, T. *et al.* Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: impact on energy balance control. **Frontiers Neurocience**, v. 9, n. 126, abr. 2015.

GAROFALO, S. *et al.* Enriched environment reduces glioma growth through immune and non-immune mechanisms in mice. **Nature communication**, v.6, mar. 2015.

GELFO, F. *et al.* Intraperitoneal injection of neuropeptide Y (NPY) alters neurotrophin rat hypothalamic levels: Implications for NPY potential role in stress-related disorders. **Peptides**, v.32, n. 6, p. 1320–3, jun. 2011.

GEORGE, L. A. *et al.* Early maternal undernutrition programs increased feed intake, altered glucose metabolism and insulin secretion, and liver function in aged female offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 30, n. 7, p. 795-804, 2012.

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

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; PINAL, C. The developmental origins of adult disease. **Mat Child Nutr**, v. 1, n. 3, p. 130-41, jul 2005.

GOMEZ-PINILLA, F; VAYNMAN, S.A “deficient environment” in prenatal life may compromise systems important for cognitive function by affecting BDNF in the hippocampus. **Experimental Neurology**, v. 192, n. 2, p.235-243, abr. 2005.

HALFORD, J. C.; WANNINAYAKE, S.C.; BLUNDELL, J. E. Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 61, n. 2, p. 159-168, out. 1998.

HEINDEL, J. J. *et al.* Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. **Endocrinology**, v. 156, n. 10, p. 3416-21, ago. 2015.

HOWIE, G. J. *et al.* Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **J Physiol**, v. 587, n. 4, p. 905-915, 2009.

IKENSAIO-THORPE, B. A. *et al.* Prenatal influences on susceptibility to diet-induced obesity are mediated by altered neuroendocrine gene expression. **Journals of Endocrinology**, v. 193, n.1, p. 31-7, abr. 2007.

IRABI, H. *et al.* Haematopoietic cells produce BDNF and regulate appetite upon migration to the hypothalamus. **Nat Commun**, v. 4, 2013.

JANG, H.; SERRA, C. Nutrition, epigenetics, and diseases. **Clinical Nutrition Research**, v. 3, n. 1, jan. 2014.

JOUSSE, C. *et al.* Perinatal Protein Malnutrition Affects Mitochondrial Function in Adult and Results in a Resistance to High Fat Diet-Induced Obesity. **PLoS one**, v. 9, n. 8, ago. 2014.

KUWAHATA, M. *et al.* Dietary Medium-Chain Triglycerides Attenuate Hepatic Lipid. **J Nutr Sci Vitamino**, v. 57, p. 138-143, 2011.

LESAGE, J. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. **Endocrinology**, v. 142, n. 5, p. 1692-702, maio, 2001.

LINGAS, R.; DEAN, F.; MATTHEWS, S. G. Maternal nutrient restriction (48 h) modifies brain corticosteroid receptor expression and endocrine function in the fetal guinea pig. **Brain Res**, v.846, n. 2, p. 236-42, nov. 1999.

LIRA, L. A., *et al.* Perinatal undernutrition increases meal size and neuronal activation of the nucleus of the solitary tract in response to feeding stimulation in adult rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 38, p. 23-9, nov. 2014.

LIU, X. *et al.* Effects of Energy Status and Diet on *Bdnf* Expression in the ventromedial Hypothalamus of Male and Female Rats. **Physiol Behav**, v. 10, p. 99-107, maio, 2014.

LOPES DE SOUZA, S. *et al.* Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p.1400-8, mar. 2008

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp**, v. 156, p. 38-50, 1991.

MOURA, E. G.; OLIVEIRA, E. Regulação do comportamento alimentar. In: SAWAYA, A. L.; LEANDRO, C. G.; WAITZBERG, D. L. **Fisiologia da nutrição na saúde e na doença: da biologia molecular ao tratamento**. São Paulo: Editora Atheneu, 2013. p. 95-109.

OROSCO-SÓLIS, R. *et al.* Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. **Physiol Behav**, v. 96, n. 3, p. 481-492, mar. 2009.

OROZCO-SÓLIS, R. *et al.* Nutritional Programming in the Rat Is Linked to Long-Lasting Changes in Nutrient Sensing and Energy Homeostasis in the Hypothalamus. **PLoS One**, v. 5, n. 10, out. 2010.

OSBORNE-MAJNIK, A.; FU, Q.; LANE, R. H. Epigenetic Mechanisms in Fetal Origins of Health and Disease. **ClinObstetGynecol**, v. 56, n. 3, p. 622-32, set. 2013.

OST'ADALOVA, I.; BABICKY, A. Periodization of the early postnatal development in the rat with particular attention to the weaning period. **Physiol Res**, v. 61, n. 1, p. 1-7, 2012.

OZEK, C. *et al.* Ablation of intact hypothalamic and/or hindbrain TrkB signaling leads to perturbations in energy balance. **Molecular metabolism**, v. 4, n. 11, p. 867-80, ago. 2015.

PLUN, L. *et al.* Enhanced PIP<sub>3</sub> signaling in POMC neurons causes K<sub>ATP</sub> channel activation and leads to diet-sensitive obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p.1886-901, jul. 2006.

PRADO, E. L.; DEWEY, K. G. Nutrition and brain development in early life. **Nutricion Reviews**, v. 72, n.4, p. 267-84, abr. 2014.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C.JR. 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. **J Nutr**, v. 123, n.11, p.1939-51, nov. 1993.

REHFELDT C. *et al.* Limited and excess protein intake of pregnant gilts differently affects body composition and cellularity of skeletal muscle and subcutaneous adipose tissue of newborn and weanling piglets. **Eur J Nutr.**, v. 51, n. 2, p. 151-165, 2012.

REMMERS, F. *et al.* Hypothalamic Neuropeptide Expression of Juvenile and Middle-Aged Rats after Early Postnatal Food Restriction. **Endocrinology**, v. 149, n. 7, p. 3617-25, jul. 2008.

ROBINSON, S. *et al.* Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. **Behav Neurosci**, v. 119, n. 1, p. 5-15, fev. 2005.

ROSSI, C. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is required for the enhancement of hippocampal neurogenesis following environmental enrichment. **Europe Journal Neuroscience**, n. 24, v. 7, p. 1850-6, out.2006.

SILVEIRA, A.C. *et al.* Neurogenesis of GABAergic cells in the retina of malnourished rats. **Int J Dev Neurosci.**, v. 25, n. 5, 325-333, 2007.

SOHI, G. *et al.* Maternal protein restriction elevates cholesterol in adult rat offspring due to repressive changes in histone modifications at the cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase promoter. **Mol Endocrinol.**, v. 25, p. 785-798, 2011.

SOHN, J. W. Network of hypothalamic neurons that control appetite. **BMB Rep**, v. 48, n. 4, p. 229-33, abr. 2015.

SWART, I. *et al.* Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. **American Journal of Physiology**, v.283, n. 5, p.1020-6, nov. 2002.

TRAN, D. Q. *et al.* Diet-induced cellular neuroinflammation in the hypothalamus: Mechanistic insights from investigation of neurons and microgli. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 7207, n. 16, p.30164-2, maio, 2016.

URABE, H. *et al.* Haematopoietic cells produce BDNF and regulate appetite upon migration to the hypothalamus. **Nat commun**, v. 4, n. 1526, jan. 2013.

VELKOSKA, E.; MORRIS, M.J. Mechanisms behind early life nutrition and adult disease outcome. **World Journal of Diabetes**, v. 2, n. 8, p. 127-132, ago. 2011.

VUCETIC, Z. Protein restriction early life altering dopamine circuits. **Neuroscience**, v. 168, n. 2, p. 359-70, jun. 2010.

WANG, C. *et al.* Brain derived neurotrophic factor (BDNF) in the hypothalamic ventromedial nucleus increases energy expenditure. **Brain Research**, v.1336, p. 66–77, jun. 2010.

WANG, J. *et al.* Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. **Antioxidants & redox signaling**, v.17, n. 2, p.282-301, jul. 2012.

YANG, H. *et al.* Regulation of Energy Balance via BDNF Expressed in Nonparaventricular Hypothalamic Neurons. **Mol. Endocrinology**, v. 30, n.5, p.494-503, maio, 2016.

## ANEXO A

## Parecer do comitê de ética em pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson-Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8151  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ocb.ufpe.br



Recife, 30 de novembro de 2012.

Ofício nº 522/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Prof. Rhowena Jane Barbosa de Matos**  
Núcleo de Educação Física CAV- UFPE  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.018667/2012-22

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, **"Programação fenotípica induzida por desnutrição: Efeitos do ambiente enriquecido sobre a neurogênese e a plasticidade sináptica no hipocampo de ratos adultos"**.

Concluimos 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 Departamento de Nutrição-UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos; Número de animais previsto no protocolo: 64 ratos; Peso: a partir de 6 g até o padrão na idade adulta; Idade: 60 a 120 dias.

Atenciosamente,

  
Prof.ª Maria Teresa JB/UFPE  
Presidente do CEEA

## APÊNDICE A

### Disciplinas cursadas

Administração de unidade de alimentação e nutrição 2

Administração de unidade de alimentação nutrição 1

Anatomia

Avaliação do estado nutricional

Biologia celular e embriologia

Bioquímica 1

Bioquímica da nutrição

Bioquímica dos alimentos

Bromatologia

Ciências sociais e da saúde

Desenvolvimento de comunidade

Educação nutricional 1

Educação nutricional 2

Empreendedorismo

Epidemiologia aplicada à nutrição

Estágio de nutrição em saúde pública

Estágio em coletividade enferma

Estágio em coletividade sadia

Ética profissional

Farmacologia básica

Física e biofísica

Fisiologia da nutrição

Fisiologia geral

Genética humana

Higiene dos alimentos

Histologia

Métodos de investigação em nutrição

Microbiologia e imunologia

Nutrição clínica 1

Nutrição clínica 2

Nutrição em saúde pública 1

Nutrição em saúde pública 2

Nutrição experimental

Nutrição normal e dietética

Parasitologia

Processos patológicos gerais

Psicologia aplicada à nutrição

Técnica dietética

Tecnologia de alimentos

Trabalho de conclusão de curso 1

Trabalho de conclusão de curso 2

## APÊNDICE B

### Atividade Complementares

- Monitoria da disciplina de fisiologia geral (2 semestres).
- Monitoria da disciplina de nutrição materno-infantil (2 semestres).
- Estágio no laboratório de Neurobiologia Celular do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- Curso de extensão de Capacitação em Nutrição Esportiva – Faculdade de desenvolvimento e integração regional.
- Curso de Cronobiologia – Programa de pós-graduação em Nutrição e de Neuropsiquiatria da UFPE.
- I Ciclo internacional sobre nutrição, atividade física e plasticidade fenotípica – FACOL, 2016.
- Mini curso: Anatomia palpatória – FACOL, 2015.
- Evento sobre Zika vírus e microcefalia – FACOL, 2016.
- Congresso Brasileiro de Nutrição - CONBRAN, 2014.
- Encontro internacional de Pesquisa em Educação Física e Nutrição – EIPEN, 2013.
- Encontro de álcool e outras drogas- UFPE, 2013.
- Jornada FACEPE, 2015.
- Jornada FACEPE, 2016.
- Curso de Cuidados com Animais de Laboratório e Bioética – UFPE, 2014.
- Curso de nutrição no esporte e efeitos terapêuticos do exercício – Ativamente cursos, 2014.
- Curso Inglês Básico – SENAC, 2014.
- Grupo de Pesquisa sobre Plasticidade, meio ambiente e comportamentos – UFPE, 2013 – 2016.
- I Meeting de Nutrição e Estética, 2014.
- VIII Simpósio integrado de ciências da saúde e biológicas, VII Congresso de ensino, pesquisa e extensão, 2014.
- Encontro Vitória Saudável - ENVISA, 2013.
- III Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, 2013.
- IV Encontro de Nutrição do IMIP, 2013.