



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE

DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO - POSNUTRI

IALLY FABIANE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO RESPIRATÓRIO E CARACTERIZAÇÃO  
NEUROQUÍMICA DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO DE  
RATOS JOVENS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

Recife

2019

IALLY FABIANE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO RESPIRATÓRIO E CARACTERIZAÇÃO  
NEUROQUÍMICA DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO DE  
RATOS JOVENS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição.

**Área de concentração:** Bases  
Experimentais da Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

Coorientadores: Yves Tourneur

David Filipe de Santana

Recife

2019

Catálogo na Fonte  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586a Silva, Ially Fabiane da.  
Avaliação do padrão respiratório e caracterização neuroquímica de neurônios do núcleo do trato solitário de ratos jovens submetidos à desnutrição proteica perinatal / Ially Fabiane da Silva. – 2019.  
109 f.: il.; tab.

Orientador: João Henrique da Costa Silva.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2019.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Desnutrição proteica. 2. Hipóxia. 3. Sistema respiratório. I. Silva, João Henrique da Costa (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2019-217)

IALLY FABIANE DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PADRÃO RESPIRATÓRIO E CARACTERIZAÇÃO  
NEUROQUÍMICA DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO DE  
RATOS JOVENS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL**

Dissertação ou Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Aprovada em: 06/06/2019.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Monique Assis de Vasconcelos Barros  
Centro Acadêmico de Vitória-CAV/UFPE

---

Diogo Antônio Alves de Vasconcelos  
Centro Acadêmico de Vitória-CAV/UFPE

---

Professor Rubem Carlos Araújo Guedes  
Departamento de Nutrição-UFPE

---

Professora Carol Virgínia Góis Leandro  
Departamento de Nutrição-UFPE

---

Viviane de Oliveira Nogueira Souza  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição-UFPE

## RESUMO

Estudos evidenciam que ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal (DPP) apresentam alterações em parâmetros respiratórios e neuroquímicos no início da vida. Avaliamos os efeitos da DPP sobre padrão neuroquímico de neurônios envolvidos no controle ventilatório do núcleo do trato solitário de ratos (NTS) e sobre o controle reflexo na hipóxia (10 % de O<sub>2</sub>). Ratos Wistar receberam dieta normoproteica (17% de proteína, NP) ou hipoproteica (8% de proteína, HP) no período perinatal. Após o desmame, receberam dieta comercial originando 4 grupos: NP.sham e HP.sham (não submetidos a hipóxia), e HP.hipóxia e NP.hipóxia (submetidos a hipóxia). No 1º, 7º, 14º, 21º dias de vida, por pletismografia de corpo inteiro, avaliamos frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação pulmonar (VE). Aos 30 dias foram avaliados os mesmos parâmetros antes e após exposição à hipóxia e realizada perfusão transcardíaca. Observamos o nível de atividade neuronal (expressão de proteína Fos) e do número de neurônios GABAérgicos ativos (enzima GAD65) no NTS a partir de imunofluorescência. Os dados estão expressos em média ± EPM. Nas idades anteriormente citadas foram feitas medidas de peso corporal. A comparação entre os grupos antes e após exposição à hipóxia foi pela análise de variância two-way ANOVA para medidas repetidas. A expressão da proteína c-Fos e enzima GAD65 foi avaliada pelo teste One-Way ANOVA. Utilizamos pós-teste de Bonferroni. O nível de significância foi  $p < 0,05$ . Os protocolos foram aceitos pelo CEUA/UFPE (23076.041292/2017-17). HP exibe valores basais de FR semelhantes no 1º dia de vida comparado a NP. Já no 7º, 14º e 21º dias, HP apresentou redução de FR. Aos 30 dias, HP apresentou aumento de FR basal. Constatamos valores maiores de VT e VE no 21º e 30º dias nos HP. No 7º e 14º dias HP apresenta menores valores basais de VE. Não houve diferença entre os grupos em FR, VT e VE após o 1º e 2º momento de exposição à hipóxia. No 3º momento houve aumento de FR de HP.hipóxia. VT e VE foram semelhantes.  $\Delta$  no 1º e 2º momentos de exposição foram semelhantes entre os grupos para os três parâmetros. No 3º momento, HP apresentou maiores valores de  $\Delta$ FR. Quanto à VT e VE, não houve diferença. A expressão de Fos e GAD65 no NTS rostral, NP\_sham apresentaram maiores valores comparado a NP\_hipóxia. HP\_sham exibiu maiores valores comparado a HP\_hipóxia. HP\_hipóxia demonstrou valores

menores comparado a NP\_hipóxia. No NTS intermediário, NP\_hipóxia apresentou valores maiores de expressão de Fos e GAD65 comparado aos demais. HP\_sham apresentou valores menores comparado aos demais. No NTS caudal, HP\_sham apresentou valores maiores de expressão de Fos e GAD65 comparado aos demais grupos. NP\_sham apresentou menores valores de expressão de Fos e GAD65 comparado aos demais. NP\_hipóxia exibiu maior expressão de Fos e GAD65 comparado a HP\_hipóxia. Os animais HP demonstraram menor peso corporal comparados a NP. A DPP causa alterações na maturação do sistema respiratório e HP têm aumento da quimiossensibilidade ao O<sub>2</sub> não decorrente de redução na neurotransmissão GABAérgica.

**Palavras-chave:** Desnutrição proteica. Hipóxia. Sistema respiratório.

## ABSTRACT

Studies have shown that rats submitted to perinatal protein malnutrition (DPP) present changes in respiratory and neurochemical parameters in early life. To evaluate the effects of DPP on the neurochemical pattern of neurons involved in the control of the ventilation of the nucleus of the rat solitary tract (NTS) and on the reflex control in hypoxia (10% O<sub>2</sub>). Progenies of Wistar rats were subjected to the normoprotein diet (17% protein, NP) or hypoproteic (8% protein, HP) in the perinatal period. After weaning, they received commercial diet originating 4 groups: NP.sham and HP.sham (hypoxia free), and HP.hypoxia and NP.hypoxia (submitted to hypoxia). At the 1st, 7th, 14th, and 21st days of life, by whole body plethysmography, we evaluated respiratory rate (RF), tidal volume (VT) and pulmonary ventilation (LV). At 30 days, the same parameters were evaluated before and after exposure to hypoxia and transcardiac perfusion was performed for observation of the level of neuronal activity (Fos protein expression) and the number of active GABAergic neurons (GAD65 enzyme) in the NTS from immunofluorescence. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. At the ages mentioned above, body weight measurements were taken. The comparison between groups before and after exposure to hypoxia was by two-way ANOVA variance analysis for repeated measures. Expression of c-Fos protein and GAD65 enzyme was evaluated by One-Way ANOVA. We used the Bonferroni post-test. The level of significance was  $p < 0.05$ . The protocols were accepted by CEUA / UFPE (23076.041292 / 2017-17). HP exhibits similar baseline RF values on the 1st day of life in relation to NP. On the 7th, 14th and 21st days, HP presented reduction of RF. At 30 days, HP had a baseline RR increase. We found higher values of VT and VE in the 21st and 30th days in HP. On the 7th and 14th days HP presented lower baseline LV values. There was no difference between the groups regarding FR, VT and LV after the 1st and 2nd moment of exposure to hypoxia. At the 3rd moment there was an increase in HP.hypoxia. VT and VE were similar. The  $\Delta$  values at the 1st and 2nd exposure moments were similar between the groups for the three parameters. At the 3rd moment, HP presented higher  $\Delta$ FR values. Regarding VT and VE, there was no difference. The expression of Fos and GAD65 in rostral NTS, NP\_sham presented higher values compared to NP\_hypoxia. HP\_sham exhibited

higher values compared to HP\_hypoxia. HP\_hypoxia showed lower values compared to NP\_hypoxia. In the intermediate NTS, NP\_hypoxia presented higher values of Fos and GAD65 expression compared to the other groups. HP\_sham presented lower values compared to the other groups. In the NTS caudal, HP\_sham presented higher values of Fos and GAD65 expression compared to the other groups. NP\_sham presented lower values of Fos and GAD65 expression compared to the other groups. NP\_hypoxia exhibited higher expression of Fos and GAD65 compared to HP\_hypoxia. HP animals showed lower body weight compared to NP. DPP causes changes in respiratory system maturation and HP has increased O<sub>2</sub> chemosensitivity not due to reduction in GABAergic neurotransmission.

**Key words:** Protein malnutrition. Hypoxia. Respiratory system.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas experimentais Normoproteica (17% de proteína) e Hipoproteica (8% de proteína), segundo o Instituto Americano de Nutrição-AIN 93.....	32
Tabela 2 - Composição nutricional da dieta padrão para animais de biotério Labina Presence.....	33
Tabela 3 - Anticorpos utilizados para a realização da técnica de imunofluorescência.....	38

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Desenho Experimental.....	35
Figura 2-	Esquema representativo do protocolo de ventilação basal.....	36
Figura 3-	Esquema representativo do protocolo de ventilação durante e após à hipóxia.....	37
Figura 4-	Avaliação da frequência respiratória (FR) da prole.....	40
Figura 5-	Avaliação do volume corrente (VT) da prole.....	41
Figura 6-	Avaliação da ventilação pulmonar (VE) da prole.....	42
Figura 7-	Avaliação da frequência respiratória (FR) antes e após à hipóxia da prole no 30º dia de vida.....	43
Figura 8-	Avaliação do volume corrente (VT) antes e após à hipóxia da prole no 30º dia de vida.....	43
Figura 9-	Avaliação da ventilação pulmonar (VE) antes e após à hipóxia da prole no 30º dia de vida.....	44
Figura 10-	Valores de $\Delta$ correspondentes a frequência respiratória (FR)..	45
Figura 11-	Valores de $\Delta$ correspondentes a volume corrente (VT).....	45
Figura 12-	Valores de $\Delta$ correspondentes a ventilação pulmonar (VE).....	46
Figura 13-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo NP_sham.....	47
Figura 14-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo HP_sham.....	47
Figura 15-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo NP_hipóxia.....	48
Figura 16-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo HP_hipóxia.....	49
Figura 17-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos e enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral.....	50
Figura 18-	Número de células ativas no NTS rostral.....	51

Figura 19-	Fotomicrografias representativas da expressão de protei Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS intermediário e caudal do grupo NP_sham.....	52
Figura 20-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS intermediário e caudal do grupo HP_sham.....	53
Figura 21-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS intermediário e caudal do grupo NP_hipóxia.....	54
Figura 22-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS intermediário e caudal do grupo HP_hipóxia.....	55
Figura 23-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS intermediário.....	56
Figura 24-	Número de células ativas no NTS intermediário .....	57
Figura 25-	Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD 65 e merge (Fos+GAD65) no NTS caudal.....	58
Figura 26-	Número de células ativas no NTS caudal.....	59
Figura 27-	Peso corporal no °, 5°, 7°, 14°, 21° e 30° dias de vida.....	60

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA	ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
FR	Frequência Respiratória
g	gramas
GABA	Ácido γ-aminobutírico
GABA <sub>B</sub>	Receptor de GABA subunidade b
GAD-67	Enzima glutamato descarboxilase subunidade 67
Glu	Glutamato- Neurotransmissor excitatório – glutamato
GluR2	Receptor de glutamato metabotrópico subunidade 2
H <sup>+</sup>	íon hidrogênio
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HP	hipoproteico
KD	quilo Daltóns
LTF	Potenciação a longo prazo
mL/Kg <sup>-1</sup>	mililitros por quilo de peso corporal
mL.Kg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup>	mililitros por quilo de peso corporal por minuto
NMDA	N- metil D- Aspartato
NP	normoproteico
NTS	Núcleo do Trato Solitário
O <sub>2</sub>	Oxigênio
PH	Potencial Hidrogeniônico
resp.min <sup>-1</sup>	respiração por minuto
VE	Ventilação Pulmonar
VT	Volume Corrente
RAR	Receptor de estiramento
SAR	Receptor de estiramento pulmonar de adaptação lenta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL E PLASTIDADE FENOTÍPICA.....	17
2.2	DESNUTRIÇÃO PROTÉICA PERINATAL E ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS.....	20
2.3	NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO.....	21
2.4	MATURAÇÃO DO SISTEMA RESPIRATÓRIO.....	22
2.5	GLUTAMATO.....	25
2.6	GABA.....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1	ANIMAIS.....	32
4.2	DIETAS.....	32
4.3	INDUÇÃO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA DURANTE O PERÍODO PERINATAL.....	34
4.4	MEDIDA DE VENTILAÇÃO PULMONAR.....	36
4.5	AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS VENTILATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIPÓXIA.....	36
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL DURANTE A HIPÓXIA (POR IMUNO-REATIVIDADE A C-FOS) E CARACTERIZAÇÃO DE NEURÔNIOS GABAÉRGICOS (GAD67) E GLUTAMATÉRGICOS (NMDA-NR1 E AMPA - GLUR2/3) DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO.....	37
4.7	MEDIDAS DE PESO CORPORAL.....	38
4.8	ANÁLISE DOS DADOS.....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

APÊNDICE A - REPERCUSSIONS OF PERINATAL PROTEIN MALNUTRITION ON THE RESPIRATORY PATTERN AND NEUROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE NUCLEUS OF THE SOLITARY TRACT OF OFFSPRING OF RATS SUBMITTED TO MODERATE ACUTE HYPOXIA.....	80
ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	108
ANEXO B - DECLARAÇÃO DE QUALIFICAÇÃO DE DISSERTAÇÃO.....	109

## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos instituições como a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) registraram um aumento do número de pessoas que passam fome no mundo, sobretudo a América Latina e Caribe. Ademais, o Panorama da Segurança Alimentar e Nutricional da América Latina e do Caribe, apresentou alguns indicadores de insegurança alimentar nas populações mencionadas anteriormente, tais como uma em cada dez crianças com menos de cinco anos de idade apresenta retardo no crescimento. O Brasil ainda apresenta significativamente 6% da população infantil acometida por desnutrição crônica (FAO, 2018).

Tem sido amplamente descrito na literatura, que a desnutrição proteica materna durante períodos críticos do desenvolvimento (Gestação e lactação) causa retardo no desenvolvimento fetal e pode predispor esses indivíduos ao aparecimento de doenças cardio-metabólicas, dentre elas a Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) (OJEDA et al., 2008; BRITO-ALVES et al., 2015; COSTA-SILVA et al., 2015; 2016; BRITO-ALVES e COSTA-SILVA, 2018).

Adicionalmente, tem sido observado que a prole de ratos provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal apresentam redução da frequência respiratória (FR) durante todo o período neonatal (0 ao 21º dia de vida), com alterações no controle reflexo da ventilação após a lactação (a partir de 21 dias) (da SILVA, 2016, dados não publicados). Estes resultados sugerem que as alterações no padrão respiratório neonatal podem estar relacionadas aos efeitos neurais da desnutrição proteica materna e, conseqüentemente, retardo na maturação e desenvolvimento da rede neuronal respiratória na prole.

WONG-RILEY e LIU (2005) sugerem que a maturação dos neurônios respiratórios do tronco cerebral de ratos ocorre entre os dias 7 e 21 de vida pós-natal. Este período é caracterizado por uma predominância de neurotransmissão excitatória mediada pelo neurotransmissor glutamato. Durante esse estágio da vida a frequência respiratória é elevada. No entanto, após o 12º dia de vida, há um aumento na densidade de neurônios inibitórios, principalmente dos que liberam glicina ou GABA (LIU e WONG-RILEY, 2013). Este aumento na neurotransmissão inibitória na rede neuronal respiratória é essencial para a maturação do sistema, bem como para um melhor controle reflexo da ventilação (WONG-RILEY, 2013).

Sendo assim, alterações no processo de maturação induzidas pela desnutrição proteica materna, podem retardar e/ou prejudicar o controle cardiorrespiratório, acarretando em problemas no controle reflexo da ventilação e contribuir para o aparecimento de doenças cardiometabólicas no início da vida adulta (COSTA-SILVA et al., 2015). Assim, uma de nossas hipóteses é que será testada no presente projeto é que animais provenientes de mães que sofreram desnutrição proteica tem uma modificação na maturação e desenvolvimento da rede neural respiratória, com desbalanço entre os neurônios inibitórios (gabaérgicos).

Estudos de nosso laboratório têm demonstrado que os animais provenientes de mães que sofreram desnutrição proteica a partir da ingestão de uma dieta contendo 7% de proteína têm uma maior quimiossensibilidade ao O<sub>2</sub> (BRITO-ALVES et al., 2014; BRITO-ALVES et al., 2015), ou seja, em situações de hipóxia (7-10% O<sub>2</sub>) promovem uma maior ativação da rede neural respiratória que leva a maiores respostas cardiovasculares (aumento de pressão arterial) e respiratórias (aumento de ventilação pulmonar).

Estudos têm sugerido que está maior sensibilidade pode ser um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças cardiometabólicas, como a hipertensão arterial, induzidas pela desnutrição proteica materna (COSTA-SILVA et al., 2015; 2016). O modelo experimental recentemente publicado por NOGUEIRA et al. (2018) demonstrou que os animais jovens provenientes de mães que sofreram restrição proteica no período da gestação e lactação, apresentam maior ativação neuronal em regiões chaves do controle respiratório, como o núcleo retrotrapezóide. No entanto, ainda não estão elucidados quais neurotransmissores estão envolvidos nestas respostas.

Outros estudos também desenvolvidos no laboratório de Nutrição, Educação Física e Plasticidade Fenotípica-UFPE, têm constatado que animais provenientes de mães submetidas à desnutrição durante o período perinatal (gestação e lactação), antes de desenvolverem hipertensão arterial, apresentam alterações no padrão ventilatório basal e no controle reflexo da ventilação no início da vida (30 dias) (BRITO-ALVES et al., 2014). Tais alterações podem estar relacionadas com a hiperativação do sistema nervoso simpático e subsequente estabelecimento de hipertensão arterial nestes animais (BRITO-ALVES et al., 2015; BARROS et al., 2015; LUZARDO et al., 2011; GOYAL et al., 2010).



Logo, o presente estudo surgiu da necessidade de investigar se a manutenção de um estado de desnutrição do tipo protéica no período perinatal até o período pós-desmame seria capaz de causar um processo de adaptação e minimizar possíveis consequências deletérias, como problemas metabólicos e cardiorrespiratórios, a longo prazo. Tendo em vista a situação atual de bilhões de indivíduos que sofrem de carências nutricionais já na vida intrauterina, pode-se afirmar que este é um problema de saúde pública. Portanto, é de suma importância estudar mais profundamente como seria a vida pós-natal e como reverter os efeitos da privação de nutrientes, a fim de assegurar um correto crescimento e desenvolvimento com atenuação de doenças na vida adulta.

Diante de tais evidências, nossa hipótese de trabalho é de que os animais que foram submetidos à desnutrição perinatal apresentariam uma alteração no desenvolvimento neuroquímico de neurônios (GABAérgicos) localizados no NTS, que são responsáveis por integrar as respostas cardiorrespiratórias. Além disso, esta alteração levaria a mudanças no padrão respiratório, bem como na quimiossensibilidade ao O<sub>2</sub>, contribuindo para um maior ritmo respiratório e, conseqüentemente, maior risco de desenvolvimento de hipertensão arterial neste modelo experimental.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL E PLASTICIDADE FENOTÍPICA

A nutrição materna tem sido objeto de diversas investigações experimentais dada sua enorme influência no desenvolvimento embrionário e suas repercussões na vida pós natal da prole. Em modelos experimentais como roedores, diversos estágios do desenvolvimento já foram alvo de pesquisas científicas. A maioria dos estudos que avaliam o período periconcepcional utiliza dietas pobres em proteína (aproximadamente 9% de proteína) somadas a uma tentativa de recuperação do estado nutricional a partir da ingestão de dietas normoproteicas na vida extrauterina.

Dentre as consequências mais significativas da desnutrição protéica perinatal, estão: hipertensão durante toda a vida acompanhada de capacidade atenuada de dilatação arterial; aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina; aumento de adiposidade incluindo a aquisição de um metabolismo adaptado ao acúmulo de tecido adiposo; tendência de aumento do crescimento e peso ao longo da vida; além de um padrão de comportamento hiperativo anormal (WATKINS et al. 2008, 2010, 2011; FLEMING; ECKERT; DENISENKO, 2017).

Indícios dos efeitos da desnutrição em seres humanos também foram averiguados. As pessoas concebidas durante os 5 meses da fome holandesa no inverno durante a Segunda Guerra Mundial aumentaram o risco de doença cardíaca coronariana, hipertensão, alto IMC, intolerância à glicose, esquizofrenia, depressão e pior cognição na idade adulta em comparação com aqueles que vivenciam a fome mais tarde na gravidez (PAINTER et al., 2006; ROSEBOOM et al., 2011; DE ROOIJ e ROSEBOOM, 2013).

A hipótese de origem fetal da doença no adulto tem se fundamentado no conceito de “fenótipo econômico” ou “thrifty phenotype”, segundo o qual o feto é capaz de se adaptar e sobreviver em um ambiente de pobre nutrição, mesmo que para isso seja preciso reduzir seu crescimento somático (HALES e BARKER, 2001). Essa flexibilidade de ajustar a trajetória de crescimento em resposta a diferentes condições ambientais é denominada plasticidade do desenvolvimento,

situação na qual o genótipo pode produzir diferentes fenótipos (HANSON, GODFREY et al., 2011; WEST-EBERHARD, 2005).

Estas adaptações imediatas podem alterar os fenótipos da prole de uma forma prejudicial, repercutindo na vida adulta com aumento do risco de doenças crônicas, como diabetes tipo 2, hipertensão e doença coronariana (GLUCKMAN, HANSON et al., 2009). Para Gluckman, o feto se adapta e prediz o ambiente pós-natal no qual ele irá se desenvolver, através de um processo denominado de resposta adaptativa preditiva (HANSON e GLUCKMAN, 2008). Essa relação entre ambiente pré-natal e a previsão do ambiente futuro pós-natal tem como característica principal ajustar os fenótipos da prole para satisfazer otimamente os desafios impostos pelo ambiente (HANSON e GLUCKMAN, 2008).

Extrapolando então para a desnutrição durante a gestação, os fenótipos da prole são ajustados para prever um ambiente pós-natal de insuficiência nutricional. Quando o ambiente pré-natal é semelhante ao ambiente pós-natal – “Match”, menor é o risco de aparecimento de doenças na vida adulta. No entanto, quando o ambiente pré-natal não coincide com o pós-natal (a exemplo da desnutrição na gestação e fartura nutricional na vida pós-natal) – “Mismatch”, maior o risco de desenvolver doenças crônicas. Vale ressaltar que as adaptações ao ambiente tendem a ocorrer de formas distintas entre as linhagens de células (GLUCKMAN, CUTFIELD et al., 2005; SUN et al., 2015; DENISENKO et al., 2016).

A incompatibilidade entre ambiente pré e pós-natal induz obesidade, resistência à insulina e leptina, disfunção endotelial vascular e hipertensão tanto em modelos experimentais com humanos quanto em modelos experimentais com roedores. Em roedores, tem sido demonstrado que processos epigenéticos, como mudanças na metilação de DNA em específicos dinucleotídeos (cistina e guanina) e também em estruturas de histonas, desempenham uma importante função na compreensão desses efeitos acima citados. No mesmo estudo foi evidenciado que uma hipometilação do DNA na prole de ratos submetidos à insuficiente aporte nutricional durante a gestação é correlacionado com um aumento de doenças cardiovasculares (GICQUEL, EL-OSTA et al., 2008; HIRST e MARRA, 2009).

Wells (2007) destaca que o baixo peso ao nascer e a trajetória de crescimento são os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças metabólicas, ou seja, crianças com baixo peso ao nascer e uma rápida trajetória ou catch-up de crescimento, em outras palavras, um acelerado ganho de peso e

gordura, resulta em uma alta carga metabólica para os processos fisiológicos dessas crianças, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas (WELLS, 2007).

Para corroborar com essa hipótese, Wells tem recentemente proposto um modelo conceitual entre desnutrição materna e o risco de doenças dos filhos, baseado em características fenotípicas. Para Wells, os fenótipos apresentam uma capacidade metabólica (variedade de aspectos estruturais e funcionais de órgãos e sistemas que emergem da vida fetal e infância) e uma carga metabólica (carga imposta pelos tecidos e sua condição fisiológica sobre a capacidade metabólica homeostática) (WELLS, 2011).

A hipótese é que a desnutrição durante a gestação e/ou lactação pode reduzir a capacidade metabólica fenotípica dos filhos e uma vez que estes são impostos a um ambiente de alta carga metabólica (dietas hiperlipídicas, hiperglicêmicas e sedentarismo), gera-se um desequilíbrio entre a relação capacidade x carga, predispondo o aparecimento de doenças na progênie. No entanto, não se sabe o momento em que a balanço capacidade x carga desequilibra, visto que cada indivíduo detém uma particularidade fisiológica, podendo esse desequilíbrio se expressar a curto ou em longo prazo (WELLS, 2011).

Recentemente o paradigma de como a regulação da expressão gênica estaria envolvido nas desordens fisiológicas observadas em modelos experimentais de desnutrição protéica começou a ser aos poucos desvendado. Estudos como o de Navarro et al. (2017) discutiram a hipótese de que os mecanismos subjacentes à programação pré-natal de risco para adultos são epigenéticos e sensíveis a fatores ambientais, como a nutrição.

Kumamoto e Oshio (2018) constataram que a exposição à deficiência de folato ou ao bisfenol A durante o período fetal altera as expressões de Xist (transcrito específico inativo-X), Tsix (o repressor antisense de Xist), e muitos genes ligados ao cromossomo X amplamente em camundongos recém-nascidos. Esse achado sugere que esse efeito mediado pelo cromossomo X é considerado um dos mecanismos de vários problemas encontrados no ambiente fetal. O processo XCI tem algumas semelhanças com a hipótese do fenótipo poupador e pode se tornar uma das abordagens para revelar os mecanismos do DOHaD.

Atualmente esta temática continua em expansão, no entanto pouco se sabe sobre quais genes específicos atuam em cada alteração fisiológica observada e como evitá-los através da exposição a fatores ambientais protetores.

## 2.2 DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL E ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS

As fases de crescimento e desenvolvimento do indivíduo, tal como gestação e lactação, são conhecidas como períodos de rápida proliferação e diferenciação celular (MORGANE et al., 1993). Tem sido amplamente descrito na literatura através de diversos estudos epidemiológicos e experimentais, que a desnutrição no ambiente perinatal causa baixo peso ao nascer e pode predispor esses indivíduos ao desenvolvimento de doenças de cunho metabólico, dentre elas a hipertensão arterial sistêmica (OJEDA et al, 2008; LAPILLONNE, 2011; BRITO-ALVES, 2015; BRITO-ALVES e COSTA-SILVA, 2018).

Além destes estudos epidemiológicos, estudos experimentais têm demonstrado que a diminuição no conteúdo proteico da dieta (6-9 %/g) da mãe durante a gestação (MESQUITA et al., 2010), lactação (LUZARDO et al., 2011) ou após o desmame (COSTA-SILVA et al., 2009) pode aumentar os níveis basais de pressão arterial na prole. Neste sentido, alguns autores têm se detido a investigar animais provenientes de mães que sofreram desnutrição proteica (8% de proteína) no período perinatal e tem observado que a partir do 3º mês de vida, os animais exibem níveis pressóricos aumentados, o qual perdura até a fase adulta (ALVES et al., 2012a; ALVES et al., 2012b; BRITO-ALVES et al., 2014; BARROS 2015; BRITO-ALVES et al., 2015).

Nesta perspectiva, estudos de nosso laboratório têm demonstrado que estes animais, além de apresentarem aumento nos níveis pressóricos, exibem um aumento no ritmo respiratório basal e na quimiossensibilidade ao CO<sub>2</sub> aos 30 dias de vida, porém ocorre uma normalização destes parâmetros após os 90 dias de vida. Tais resultados sugerem que estas respostas duram um curto período de tempo (NOGUEIRA et al., 2012; BRITO-ALVES et al., 2014). Segundo Harkema (1984) em estudos com ratos e também com cobaias (LECHNER; WINSTON, 1986) que sofreram desnutrição a longo prazo apontam que se desencadeia um processo de redução das áreas de troca gasosa nos alvéolos pulmonares que

possivelmente está associado à destruição das paredes alveolares (KERR et al., 1985; SAHEBJAMI; VASSALLO, 1979). Tais alterações na estrutura do parênquima pulmonar assim como nos músculos responsáveis pela respiração desencadeiam prejuízo na complacência pulmonar, o que proporcionalmente altera a sua mecânica respiratória (DIAS et al., 2004).

### 2.3 NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO

O núcleo do trato solitário (NTS) é o primeiro sítio sináptico que recebe informações provenientes dos aferentes cardiorrespiratórios, incluindo os quimiorreceptores periféricos, os barorreceptores, receptores de estiramento pulmonar e do sistema digestório (CIRIELLO et al., 1994; COTTLE, 1964). Em relação a sua localização anatômica, estende-se desde o nível caudal da porção do núcleo facial à porção caudal da decussação das pirâmides (LOEWY, 1990; DAMPNEY, 1994). Estudos recentes têm sugerido que os neurônios do NTS desempenham importante papel para o processamento e coordenação respiratórias e simpáticas à hipóxia. O perfil sináptico dos neurônios NTS que recebem aferentes excitatórios é complexo e envolve neurotransmissores distintos, incluindo glutamato, ATP e acetilcolina (ANDERSEN e KUNZE, 1994; MENDONÇA-ACCORSI et al., 2011; GUYENET et al., 2014).

Quanto a sua divisão anatômico-funcional é subdividido em três subnúcleos: rostral, caudal e intermediário. Existem evidências de que os neurônios NTS intermediário e NTS caudal de 2ª ordem são organizados em grupos de acordo com as informações sensoriais aferentes que recebem. O NTS intermediário e caudal estão diretamente envolvidos no controle cardiovascular e respiratório, pois todas as projeções aferentes vagais e glossofaríngeas (que conduzem informações cardiorrespiratórias) fazem sua primeira sinapse nessas duas porções do NTS. Sabe-se que a porção intermediária do NTS constitui o principal sítio de entrada das aferências dos barorreceptores e de receptores de estiramento pulmonar de adaptação lenta (SARs), utilizando o aminoácido excitatório L-glutamato como principal neurotransmissor (TALMAN et al., 1980; WESTON et al., 2003). Receptores de estiramento (RARs) convergem para os neurônios do NTS caudal (MIFFLIN et al., 1988, MIFFLIN, 1992; KUBIN et al., 2006).

Já a porção caudal do NTS constitui o principal sítio no SNC para o qual se projetam as aferências dos quimiorreceptores carotídeos (CHITRAVANSI et al., 1994; CIRIELLO et al., 1994; FINLEY; KATZ, 1992). A partir do NTS, as informações provenientes dos receptores periféricos podem ser distribuídas para diversas áreas do sistema nervoso, dentre as quais se destacam as áreas localizadas na região ventrolateral do bulbo que controlam o tônus simpático sobre o sistema cardiorrespiratório. Os terminais centrais dos neurônios aferentes vagais transmitem informações sensoriais viscerais para o tronco cerebral através de uma sinapse glutamatérgica no nível do NTS rostral (ANDRESEN e KUNZE, 1994; ANDRESEN e YANG, 1990; HORNBY, 2001; TRAVAGLI et al., 2006; JEAN, 2001). Portanto, dependendo da informação sensorial, grupos NTS de neurônios de 2ª ordem são ativados para recrutar vias eferentes específicas (AICHER et al., 1996, BAILEY et al., 2006; ALHEID et al., 2011; SONG et al., 2011).

## 2.4 MATURAÇÃO DOS SISTEMAS NERVOSO E RESPIRATÓRIO

Nos mamíferos, a respiração se inicia antes do nascimento, contudo, sofre mudanças durante o início da vida pós-natal. A diferenciação dos progenitores neurais que originam as principais entradas sensoriais neuromoduladoras para o grupo de neurônios gerador do padrão respiratório localizados no tronco encefálico começa antes do início do ritmo respiratório. No entanto, não está claro se as entradas sensoriais são funcionais então. Durante a vida fetal, o feto é mantido em um ambiente mais ácido do que após o nascimento (KUBLI et al. 1969). Este ambiente um pouco mais ácido pode ser crucial para induzir o aparecimento do ritmo respiratório (BELTRÁN-CASTILLO; MORGADO-VALLE; EUGENÍN, 2017).

O período crítico de desenvolvimento dos quimiorreceptores respiratórios periféricos também chamados de corpo carotídeo está intimamente relacionado com a maturação do sistema respiratório. Sabe-se que o corpo carotídeo recebe aferências provenientes do nervo glossofaríngeo e as envia para diversos núcleos cerebrais responsáveis pelo controle cardiorrespiratório localizados na medula oblonga (WONG-RILEY et al. 2013). No rato, o período crítico de desenvolvimento do sistema nervoso inicia-se na 3ª semana de gestação e se estende até o 35º dia de vida (MORGANE et al., 1993).

A desnutrição protéica nos períodos críticos de desenvolvimento do sistema nervoso central, desencadeia efeitos neuroquímicos (FEOLI et al., 2006; MOKLER et al., 2007) e neuroanatômicos (GALLER et al., 1995). Dentre os efeitos neuroquímicos e na neuroanatomia, podemos citar respectivamente, o aumento da concentração de radicais livres no hipocampo, cerebelo e córtex (FEOLI et al., 2006) e o retardo na astrocitogênese e na gliogênese (GRESSENS et al., 1997) têm sido documentados. As alterações neuroanatômicas verificadas em indivíduos submetidos à desnutrição protéica englobam desde uma diminuição da ramificação e das espinhas dendríticas e conexões sinápticas, até um prejuízo no crescimento de células granulares (GALLER et al., 1995). Portanto, a ocorrência de alterações na sincronia da maturação de diversos componentes cerebrais acarretará em prejuízos na ordem da circuitaria das células nervosas. Perturbações periódicas no desenvolvimento morfológico, fisiológico e bioquímico no sistema nervoso central são capazes de provocar danos funcionais irreversíveis (MORGANE et al., 2002).

Alguns parâmetros são utilizados para compreender como funciona o sistema respiratório, dentre eles a frequência respiratória (FR), a taxa de consumo de  $O_2$ , a resposta ventilatória e os níveis de produção de  $CO_2$ . A FR corresponde ao número de ciclos respiratórios (inspiração e expiração) que o organismo realiza involuntariamente por minuto. Já o volume minuto (VT), é o volume de ar inspirado ou expirado em cada respiração normal. A taxa de consumo de  $O_2$  ( $VO_2$ ) é definida como a quantidade de  $O_2$  resultante da diferença entre o  $O_2$  inspirado, constante na atmosfera e a quantidade de  $O_2$  expirado por minuto. O consumo de  $O_2$  é uma medida objetiva da capacidade funcional, ou seja, da capacidade do organismo em ofertar e utilizar o oxigênio para a produção de energia. A taxa de consumo de  $CO_2$  ( $VCO_2$ ) semelhante a definição de  $VO_2$ , é a quantidade de  $CO_2$  resultante da diferença entre o  $CO_2$  inspirado, constante na atmosfera e a quantidade de  $CO_2$  expirado (YAZBEK Jr. et al. 1985; GUYTON e HALL, 2003).

Durante o primeiro dia de vida, os neonatos mesmo em condições de normóxia (níveis normais de oxigênio- 21% de  $O_2$ ) apresentam a FR moderadamente alta. Sugere-se que isso ocorra para compensar a deficiência na troca gasosa em decorrência da limitada superfície alveolar (BURRI, 1974; WONG-RILEY et al. 2013). Desse modo, no 1º dia de vida em ratos, os níveis da resposta ventilatória/taxa de consumo de  $O_2$  bem como a relação resposta



ventilatória/produção de CO<sub>2</sub> encontram-se bem elevados (LIU et al., 2009; WONG-RILEY et al. 2013).

Por conseguinte, do 2º ao 7º dia de vida durante a normóxia, a taxa metabólica basal (quantidade mínima de energia em calorias necessária para manter as funções vitais do organismo em repouso) encontra-se aumentada para satisfazer os requisitos do crescimento tecidual (MCARDLE et al., 1992). A FR está reduzida, bem como a relação entre os níveis da resposta ventilatória/taxa de consumo de O<sub>2</sub> e a relação resposta ventilatória/produção de CO<sub>2</sub> também encontram-se diminuídos, embora estáveis, o que indica uma otimização na convecção de gás (LIU et al., 2009; BENNETT e HICKS, 2001). Isso implica em afirmar que a rede de controle respiratório é, neste momento, mais eficiente no processo de modulação da ventilação para se adequar às necessidades de desenvolvimento dos pulmões, além das necessidades metabólicas do corpo.

A segunda e terceira semana pós-natal, nos ratos, são caracterizadas por uma relativa maturação do corpo carotídeo e ainda, uma maturação das vias respiratórias do tronco encefálico. É importante destacar que durante a normóxia, a FR tende a aumentar por volta do 13º dia de vida, seguida de um declínio gradual deste parâmetro respiratório. O volume corrente (VT) e a ventilação pulmonar (VE) aumentam de modo considerável na segunda semana, posterior a um aumento progressivo de VT e um relativo platô em VE (WONG-RILEY et al. 2013; LIU et al., 2006). Desse modo, é possível afirmar que a ventilação pulmonar está em processo de amadurecimento no período que corresponde a segunda e terceira semanas pós-natais.

Em relação ao desenvolvimento neuroquímico, a segunda e terceira semana pós-natais compreendem um período de aumento de neurotransmissões excitatórias ocasionadas devido ao aumento da expressão do glutamato (WONG-RILEY et al., 2013). A subunidade de receptor de NMDA requer um equilíbrio ou uma elevação de acordo com a fase da vida. No entanto, os receptores de GABA do tipo GABAB, diminuem com o tempo.

O sistema GABAérgico exerce influência na excitabilidade dos neurônios que é submetida a mudanças consideráveis durante o período de gestação e lactação. No início do processo de desenvolvimento o GABA atua como neurotransmissor excitatório em diversas estruturas cerebrais, dentre elas o tronco

encefálico e medula espinhal (RITTER e ZHANG, 2000; WU et al., 1992). Mesmo antes das sinapses serem formadas, ocorre o acúmulo e liberação de GABA mediada por transportadores de GABA (GAT's) (TAYLOR et al., 1990; TAYLOR e GORDON-WEEKS, 1991). Os mecanismos de acumulação e liberação de GABA, existência de receptores e fibras neuronais precocemente ao início da sinaptogênese inibitória, comprovam sua atuação como fator neurotrófico (VARJU, et al., 2001).

Primeiro, ao serem ativados os receptores do ionotrópicos GABA-A, despolarizam os neurônios, mas, à medida que os gradientes de íons cloreto são consolidados, o GABA paulatinamente transforma-se no principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central. O processo de maturação é susceptível a ação de diversos agentes estressores, tendo sido constatado que a suspensão da neurotransmissão GABAérgica foi observada na presença de várias alterações respiratórias em recém-nascidos (ABU-SHAWEESH e MARTIN, 2008; DARNALL et al., 2006; LUO et al., 2004; ZHAO et al., 2011). Contudo, o aparecimento de receptores glicinérgicos frequentemente aumentam com a idade, e a expressão de receptor de glutamato GluR2 não aumentam, estabilizam ou reduzem com a idade (LIU e WONG-RILEY, 2002;2005). Estes eventos interligam-se bem com um aumento geral na atividade da citocromo oxidase observada ao passar do tempo nos núcleos do tronco cerebral (WONG-RILEY et al., 2013; LIU e WONG-RILEY, 2002; 2003). A citocromo oxidase é considerada a ligação final do metabolismo do O<sub>2</sub> cerebral, sendo, portanto, um indicador de isquemia tecidual (PRESTI, et al., 2008). O desenvolvimento neuroquímico está intimamente ligado a maturação do sistema respiratório, observando-se a forte influência que o primeiro exerce sobre o segundo.

## 2.5 GLUTAMATO

O l-glutamato é um aminoácido não-essencial, sendo considerado o principal neurotransmissor excitatório de sistema nervoso central de mamíferos. Desempenha tanto funções normais (desenvolvimento neural, plasticidade sináptica) como também patológicas (dor neuropática, ansiedade, depressão)

(NELSON e COX, 2002; ATTWELL, 2000; PETROFF, 2002; HACKETT e UEDA, 2015).

A síntese de glutamato pode ocorrer de duas formas: a partir da glutamina ou por transaminação do  $\alpha$ -cetoglutarato (SCHOUSBOE e WAAGEPETERSEN, 2005). A nível neuronal é sintetizado principalmente pela enzima glutaminase, que converte glutamina em glutamato no interior das mitocôndrias. É armazenado em vesículas sinápticas e após sua liberação é então recaptado por neurônios e astrócitos. Sua liberação na fenda sináptica é feita por exocitose  $\text{Ca}^{2+}$ -dependente (AMARA e FONTANA, 2002; DANBOLT, 2001; DAINKHI; YUDKOFF, 2000; MELDRUM, 2000).

Estudos imunohistoquímicos e de hibridação in situ sugeriram que muitos neurônios piramidais e alguns não-piramidais são glutamatérgicos (CONTI et al., 1987, 1988, 1989; KANEKO e MIZUNO, 1988; DORI et al., 1989; NAJLERAHIM et al., 1990; CONTI, 1991; KANAI e HEDIGER, 1992) e que numerosas sinapses assimétricas são glutamato-positivas (DEFELIPE et al., 1988; CONTI et al., 1989; DORI et al., 1989). Existem dois tipos de receptores de glutamato: ionotrópicos e metabotrópicos. Os ionotrópicos são canais iônicos e são identificados com base em seus primeiros agonistas ativados seletivamente. São denominados de N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina (Kainato). Já os metabotrópicos, são acoplados à proteína G, atuando através de segundos mensageiros (HOLLMANN e HEINEMANN, 1994; MAYER e ARMSTRONG, 2004).

Os receptores NMDA constituem-se de quatro domínios transmembranares semelhantes a outros canais iônicos que sofrem regulação por ligante, um domínio extracelular N-terminal e um intracelular C-terminal (NAKANISHI, 1992). Estão interligados compondo um canal iônico permeável a íons cálcio, sódio e potássio (MACDERMOTT et al., 1986; MAYER et al., 1987). Os mesmos estão susceptíveis a uma inibição voltagem-dependente realizada por íons magnésio. Após remoção deste bloqueio exercido pelo magnésio, são capazes de mediar potenciais pós-sinápticos excitatórios (NOVAK et al., 1984). Portanto, para que este canal seja aberto, é preciso que haja a despolarização da membrana. Tais potenciais pós-sinápticos possuem a característica de serem lentos e ao serem ativados, esses receptores promovem a síntese de óxido nítrico (NO) através da enzima óxido nítrico sintase (MORRIS, 1994).

O receptor do tipo NMDA possui além do sítio do ligante, diversos outros sítios de ligação, com a capacidade de regular a atividade do canal: sítio da fenciclidina, dentro do canal, o sítio para ligação da glicina, sítios para ligação de poliaminas (SUCHER, 1996), um sítio de ligação do zinco e um sítio sensível à oxidação ou redução (LEHMANN et al., 1990). Algumas de suas subunidades foram clonadas. Entre elas, a subunidade NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, NR3A e NR3D. A subunidade NR1 possui oito processamentos diferentes, sendo primordial para seu funcionamento (MORIYOSHI et al., 1991). Para um receptor funcional, é necessário a associação das três subunidades em um arranjo heteromérico, bem como a ligação paralela dos coagonistas, glutamato e glicina (DIGLEDINE et al., 1999; NISHI et al., 2001; SASAKI et al., 2002; PAOLETTI e NEYTON, 2007).

Todavia, os receptores AMPA/kainato (também denominados não-NMDA) são ligados a canais iônicos permissivos a sódio e potássio e, em algumas configurações, ao cálcio, e medeiam potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos (TRUSSEL et al., 1988). Várias subunidades de receptores AMPA/kainato foram clonadas e classificadas de acordo com seletividade ao agonista. As subunidades GluR1 a GluR4 têm maior afinidade por AMPA, enquanto as subunidades GluR5 a GluR7 são seletivas para kainato (GASIC et al., 1992). Entretanto, não são todos os neurônios que expressam as quatro subunidades. Uma análise semiquantitativa demonstrou que 44,2% de todos os neurônios corticais não estão marcados em seções processadas por uma sonda retrógrada GluRI, 19,8% com o GluR2, 36,2% com o GluR3 e 56% com o GluR4 (CONTI, et al., 1994).

A participação do glutamato em diversos processos que envolvem plasticidade (aprendizado, memória) que são influenciados pela desnutrição tem sido amplamente descritos. Estudos de Tonkiss et al. (1998) demonstraram que ratos que sofreram desnutrição protéica durante o período pré-natal apresentam alterações em aminoácidos excitatórios. Concentrações aumentadas de glutamato em resposta a um processo de desnutrição protéica também têm sido descritas (COLOMBO et al, 1992; NAYAK e CHATTERJEE, 2003). Segundo Rotta et al. (2003), há uma redução da ligação  $NA^+$ -independente de glutamato ao seu receptor em membranas sinápticas em animais que foram submetidos à desnutrição protéica pré e pós natal.

## 2.6 GABA

O ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), atua como principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. O GABA reduz a excitabilidade neuronal através de seus receptores expressos em neurônios e astrócitos a partir de diversos mecanismos, influenciando muitos circuitos e funções neurais (IVERSEN, 1972; ENNA e SOLOMON, 1975; BRAVO, et al., 2011).

A partir do  $\alpha$ -cetoglutarato, o GABA pode ser sintetizado (do Ciclo de Krebs) pela transaminase conhecida como GABA-T que o converte em ácido L-glutâmico (glutamato); o mesmo é descarboxilado pela descarboxilase do ácido glutâmico (GAD, expressa somente em células que usam o GABA como neurotransmissor) para constituir o GABA (OLSEN; BETZ, 2006).

Seus efeitos são mediados por duas principais classes de receptores: GABA-A e GABA-C (ionotrópicos e permeáveis a íons  $\text{Cl}^-$ ), que existem como vários subtipos constituídos pela junção de diferentes subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  as subunidades), além dos receptores GABA-B (metabotrópicos, produtores de correntes inibitórias lentas e reguladores da atividade de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ), que são acoplados a proteína G arranjados em um heterodímero formado por duas subunidades (GABA-B1 e GABA-B2). Ambos possuem localizações tanto pré quanto pós-sinápticas, agindo separadamente na propagação pela fenda sináptica (CHEBIB; JOHNSTON, 1999; RUDOLPH e MÖHLER, 2004; CRYAN e KAUPMANN, 2005).

O receptor GABA-A é uma proteína macromolecular grande contendo um canal de cloreto transmembranar integral, um local de reconhecimento de GABA e sítios alostéricos para benzodiazepínicos e barbitúricos através dos quais eles podem modular a função do receptor GABA (ENNA, 1983).

A sinalização deste neurotransmissor envolve a enzima limitante de conversão de GABA, a GAD, que desempenha um papel central neste processo. Em estudos de clonagem molecular observou-se que, a GAD encontra-se no cérebro adulto em duas isoformas, chamadas de GAD65 e GAD67, ambas provenientes de dois genes regulados independentemente nos cromossomos 2 e 10, respectivamente, em seres humanos (KAUFMAN et al., 1986; KATAROVA et al., 1990; SOGHOMONIAN e MARTIN, 1998; ESCLAPEZ, et al., 1994, FELDBLUM, et al., 1993). A liberação de GABA é dependente de cálcio e se dá por

despolarização e também por influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , a partir de receptores ionotrópicos glutamatérgicos do tipo AMPA (CHÁVEZ et al., 2006). O GABA é recaptado tanto pelo terminal nervoso, quanto por células da glia (HANG et al., 2004).

A GAD65 (peso molecular 65 400 Da) aparentemente é direcionada para membranas e terminações nervosas, ao passo que a GAD67 (peso molecular 66 600 Da) apresenta-se difundida amplamente entre as células. Ambas as isoformas são capazes de sintetizar o neurotransmissor GABA, mas GAD67 no citoplasma e GAD65, para liberação vesicular. Alguns achados sugerem que as duas isoformas da enzima exercem funções distintas na sistematização da comunicação por neurônios gabaérgicos (SOGHOMONIAN e MARTIN, 1998; OLSEN, 2006).

Sua síntese pode sofrer regulação a curto prazo da atividade GAD e também regulação à longo prazo, nos níveis de GAD. O seu cofator é o piridoxal-fosfato (MARTIN et al., 1993;1991). Alguns estudos utilizando GAD recombinante exibiram que a isoforma GAD65 é mais sensível a seu cofator que a isoforma GAD67 (ERLANDER et al., 1991).

Quanto à regulação a longo prazo, sabe-se que é um processo de grande complexidade. Algumas evidências sugerem que concentrações da enzima e a expressão do gene podem ser regulados por mecanismos transcricionais e pós-transcricionais (SZABO et al., 1996; PINAL et al., 1997; YANAGAWA et al., 1997).

Os níveis de GABA também regulam a quantidade da isoforma GAD67 pós-transcrição, visto que o nível de proteína GAD67 no córtex cerebral é extremamente sensível a mudanças nos níveis intracelulares de GABA (RIMVALL et al., 1993;1994). Tais diferenças na forma de atuação das duas isoformas de GAD sugerem que elas participam distintamente da neurotransmissão mediada por GABA.

A deficiência de vitamina B-6 durante o desenvolvimento do cérebro produz mudanças globais nos parâmetros da neurotransmissão GABAérgica. A atividade da enzima dependente de vitamina B-6, a decarboxilase de ácido glutâmico (GAD) é significativamente menor nos cérebros de filhotes de ratos deficientes em B-6 em relação aos controles (BAYOUMI e SMITH, 1972;1973). Os baixos níveis de atividade de GAD medida em animais com deficiência de vitamina B-6 são atribuíveis à depleção de co-fatores, uma vez que os níveis medidos de apoenzima de GAD são maiores no tecido cerebral de filhotes deficientes (BAYOUMI AND

SMITH, 1972;1973). Os decréscimos induzidos por deficiência de vitamina B-6 na atividade GAD resultam em uma diminuição global nos níveis de GABA cerebral.

A desnutrição pré-natal é capaz de afetar diretamente o complexo funcional de receptores GABA-A, a partir da evidência de que é observada uma menor captação de  $\text{Cl}^-$  em ratos desnutridos quando comparados a animais controle (BORGHESE et al., 1998). Como observado também por Steiger et al. (2003), os níveis de mRNA das subunidades GABA-A estão alterados em indivíduos que sofreram desnutrição pré-natal, o que em última análise, certifica a tentativa do organismo de encontrar um novo ponto de equilíbrio. Modificações nos níveis de mRNA de subunidades  $\beta 2$  e  $\beta 3$  de receptores GABA-A tem sido relacionadas a mudanças nas propriedades dos canais e da aparência dos receptores na superfície da célula (BUREAU e OLSEN, 1990; CONNOLLY, 1996). Del Angel-Meza et al. (2002), constataram em estudos experimentais realizados com um modelo de desnutrição protéica em ratos, uma atividade reduzida da GAD no início da segunda e terceira semanas pós-natais no córtex cerebral, e uma reversão deste parâmetro aos 30 dias de vida, revelando um atraso de cerca de sete dias no desenvolvimento. Tais dados sugerem que estas respostas neuroquímicas envolvem um processo de plasticidade de caráter compensatório que afetam diretamente a síntese de GABA.

Outro modelo de desnutrição precoce também foi desenvolvido por Telang et al. (1984), no qual os estudos se concentraram em análises de saturação dos sítios de alta e baixa afinidade dos receptores de GABA. Foi constatado um maior número de sítios de baixa afinidade em animais desnutridos quando comparados ao grupo controle, o que aparenta ser em decorrência de uma redução na quantidade de inibidores endógenos dos sítios de alta afinidade em animais que sofreram desnutrição. A síntese de GABA também é afetada pela desnutrição do tipo protéica, sendo observado um aumento nas concentrações do neurotransmissor em ratos desnutridos (WAPIR e LIFSHITZ, 1977).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre o padrão neuroquímico de neurônios que estão envolvidos no controle da ventilação do núcleo do trato solitário de ratos, bem como sobre o controle reflexo na hipóxia (10 % de O<sub>2</sub>).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Em ratos machos provenientes de mães submetidas à dieta hipoproteica durante gestação e lactação (perinatal):

- 1- Realizar o registro de frequência respiratória, volume minuto e ventilação pulmonar durante o período de normóxia (21% de O<sub>2</sub>) no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida;
- 2- Avaliar o padrão respiratório durante e após a exposição a hipóxia (10 % de O<sub>2</sub>) no 30º dia de vida;
- 3- Caracterizar a partir de imunofluorescência os neurônios gabaérgicos do núcleo do trato solitário ativados pela hipóxia (10 % de O<sub>2</sub>) no 30º dia de vida.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais eram mantidos em gaiolas coletivas, com água e ração *ad libitum*, e com temperatura e umidade controladas. Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (23076.041292/2017-17).

### 4.2 DIETAS

A dieta controle foi uma dieta normoprotéica contendo 17% de caseína, a qual foi produzida no Laboratório de Técnica Dietética do Centro Acadêmico de Vitória da UFPE. A dieta experimental foi uma dieta hipoprotéica contendo 8% de caseína, a qual também foi produzida no mesmo local. As dietas confeccionadas foram isocalóricas com alteração apenas no conteúdo de proteína (REEVES et al., 1993).

Tabela 1 - Composição Nutricional das dietas experimentais

Ingredientes	Quantidade*	
	8 %	17%
Caseína	94,12 g	200,0 g
Mix Vitamínico	10,0 g	10,0 g
Mix Mineral	35,0 g	35,0 g
Celulose	50,0 g	50,0 g
Bitartarato de Colina	2,5 g	2,5 g
DL-Metionina	3,0 g	3,0 g
Óleo de Soja	76,0 ml	76,0 ml

Amido de Milho	503,4 g	397,486 g
Amido Dextrinizado	132,0 g	132,0 g
Sacarose	100,0 g	100,0 g
THBT (antioxidante de gordura)	0,014 g	0,014 g

---

\*Quantidade para 1 kg de dieta. Descrito por Reeves (REEVES et al., 1993)

FONTE: AIN-Instituto Americano de Nutrição (1993)

\* A caseína utilizada para preparação das dietas tinha 85% de pureza.

\* Butihidroxitolueno

Tabela 2 - Composição nutricional das dieta padrão para  
animais de biotério

Umidade (máx)	130,00 g/Kg
Proteína bruta (min)	230,0 g/Kg
Extrato etéreo (min)	40,0 g/Kg
Matéria mineral	100,0 g/Kg
Cálcio (máx)	12,0 mg/Kg
Cálcio (min)	13,0 mg/Kg
Fósforo (min)	8.500,00 mg/Kg
Sódio (min)	2.700,00 mg/Kg
Magnésio (min)	500,00 mg/Kg
Ferro (min)	180,0 mg/Kg
Cobre (min)	30,00 mg/Kg
Manganês (min)	110,00 mg/Kg
Zinco (min)	110,00 mg/Kg
Iodo (min)	1,00 mg/Kg

Cobalto (min)	2,00 mg/Kg
Selênio (min)	0,20 mg/Kg
Vitamina A (min)	25.500,00 UI/Kg
Vitamina D3 (min)	4.000,00 UI/Kg
Vitamina E (min)	82,00 UI/Kg
Vitamina K3 (min)	6,40 mg/Kg
Vitamina B1 (min)	11,00 mg/Kg
Vitamina B2 (min)	12mg/Kg
Niacina (min)	219 mg/Kg
Ácido pantotênico (min)	90 mg/Kg
Vitamina B6 (min)	11,00 mg/Kg
Ácido fólico (min)	13,00 mg/Kg
Biotina (min)	0,10 mg/Kg
Vitamina B12 (min)	40,00 mcg/Kg
Olina (min)	1.800,00mg/Kg
Lisina (min)	12,50g/Kg
Metionina (min)	3.500,00 mg/Kg

---

FONTE: Site oficial Labina Presence. Pode estar sujeita a pequenas variações de acordo com o lote.

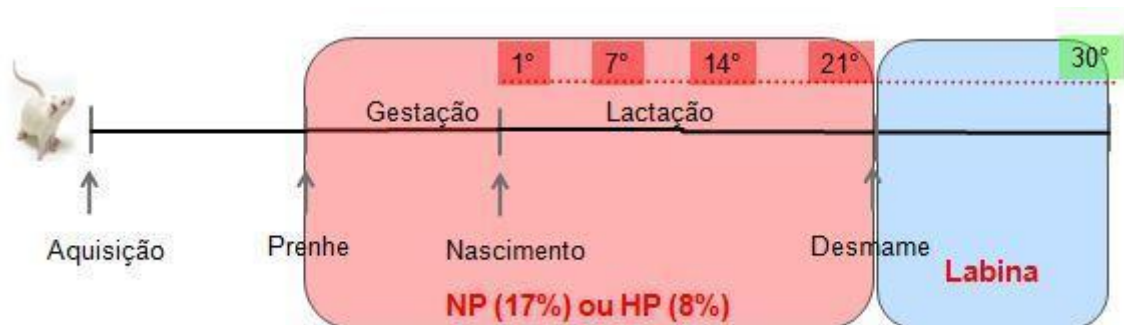
#### 4.3 INDUÇÃO DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA DURANTE O PERÍODO PERINATAL (GESTAÇÃO E LACTAÇÃO)

Dez ratas virgens foram acasaladas com ratos machos férteis na proporção de 1:2. A observação da presença de espermatozóides no esfregaço vaginal foi usada para definir o 1º dia de prenhez. A partir da determinação da prenhez, as

ratas prenhas foram colocadas em gaiolas individuais e alocadas randomicamente em quatro grupos (n= 6 animais/grupo):

- grupo NP.sham: recebeu dieta normoprotéica (NP, 17% de caseína) durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e de lactação (21 dias) e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias que não passaram pelo protocolo de hipóxia;
- grupo HP.sham: recebeu ração hipoprotéica (HP, 8% de caseína) durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e de lactação (21 dias) e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias que não passaram pelo protocolo de hipóxia;
- grupo NP.hipóxia: recebeu dieta normoprotéica (NP, 17% de caseína) durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e de lactação (21 dias) e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias que passaram pelo protocolo de hipóxia;
- grupo HP.hipóxia: recebeu ração hipoprotéica (HP, 8% de caseína) durante todo o período de gestação (aproximadamente 21 dias) e de lactação (21 dias) e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e passaram pelo protocolo de hipóxia.

Figura 1 - Desenho Experimental



FONTE: Silva, 2017.

\*a linha horizontal pontilhada em vermelho corresponde aos dias em que foram realizados os experimentos

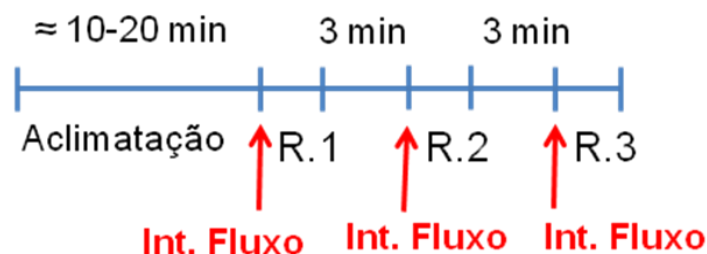
\*\*os quadrados vermelhos correspondem aos dias em que foram realizados os registros ventilatórios basais

\*\*\*o quadrado verde corresponde ao dia em que foi realizado o registros ventilatório durante e após a hipóxia

#### 4.4 MEDIDAS DA VENTILAÇÃO PULMONAR

No 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dias de vida, os animais foram submetidos a avaliações da ventilação, que será obtida por pletismografia de corpo inteiro, em um sistema fechado. O animal era posto dentro de uma caixa pletismográfica com um volume de 5 litros e passa por um período de aclimação de aproximadamente 30 minutos. Durante a realização de cada medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (~2 min) de acordo com a idade do animal. As oscilações causadas pela ventilação foram captadas pelo espirômetro e pelo amplificador de sinais (ML141 spirometer, PowerLab, ADInstruments). (MALAN, 1973). Três variáveis respiratórias foram determinadas, a frequência respiratória (FR), o volume corrente (VT) e a ventilação pulmonar (VE), os dois últimos calculados através da fórmula previamente descrita (BRITO-ALVES et al., 2014).

Figura 2 - Esquema representativo do protocolo de ventilação basal



FONTE: Silva, 2017.

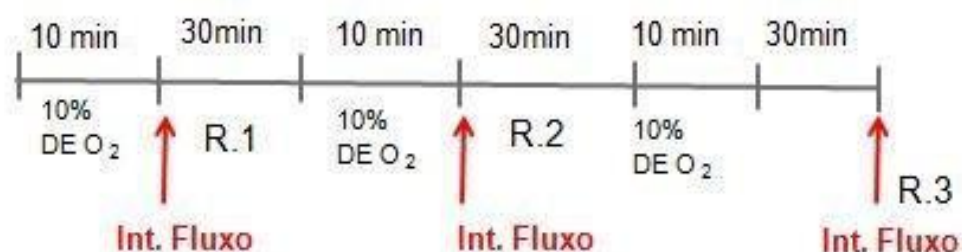
\* Int.Fluxo: interrupção do fluxo

\*R.1, R.2, R.3: registros ventilatórios basais 1, 2 e 3.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS VENTILATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIPÓXIA (10 % DE O<sub>2</sub>)

No 30º dia de vida, após o período de aclimação, os animais foram submetidos à hipóxia (10% de O<sub>2</sub>), por 10 minutos. Para isso, a câmara foi ventilada com uma mistura gasosa padrão umedecida contendo 10% de O<sub>2</sub> e as respostas ventilatórias foram continuamente registradas.

Figura 3 - Esquema representativo do protocolo de ventilação durante e após exposição a hipóxia



FONTE: Silva, 2017.

\* Int.Fluxo: interrupção do fluxo

\* R.1, R.2, R.3: registros ventilatórios basais 1, 2 e 3.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE NEURONAL DURANTE A HIPÓXIA (POR IMUNO-REATIVIDADE A C-FOS) E CARACTERIZAÇÃO DE NEURÔNIOS GABAÉRGICOS (GAD65) DO NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO

Após os 10 minutos de exposição à mistura gasosa hipóxica (descrito anteriormente, item 4.5), os animais passaram por um período de 30 minutos em normóxia e, em seguida, por um novo período de 10 minutos em hipóxia. Este protocolo é suficiente para induzir a ativação da rede neural respiratória sensível à hipóxia, bem como, sua identificação (KING et al., 2012).

Após o procedimento de hipóxia descritos acima, os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg, ip) para realização da perfusão transcardíaca. Durante a perfusão foram utilizadas uma solução de PBS (salina tamponada) e em seguida uma solução fixadora de PFA (paraformaldeído) a 4%. Em seguida, os encéfalos foram retirados do crânio e pós-fixados em uma solução fixadora de PFA a 4% durante 4-6 horas. Em seguida, trocou-se a solução anterior por outra, à base de sacarose (30%) na qual os encéfalos permaneceram por 48 horas. Posteriormente, os encéfalos congelados foram crio-seccionados em cortes coronais de 25 µm de espessura utilizando-se criostato (Leica CM1850).

Os cortes coronais de uma série foram removidos da solução anti-congelante e incubados em solução com anticorpos primários anti-Fos (feito em

coelho) por 48 h. Posteriormente, foi realizada, por 5 minutos, a reação de imunofluorescência como descrito por Nogueira et al.(2018). Logo em seguida foram adicionados a 2,375 mL de PBS, triton a 0,2%, BSA a 1% bem como os anticorpos primários para c-FOS (1:2000) e GAD65 (1:400) durante 16 horas. No dia seguinte, foram lavados com PBS por 5 minutos, 5 vezes. Após tal processo, foram acrescidos a 2,492 mL de PBS, os anticorpos secundários para c-FOS (1:2000) e GAD65 (1:400) por 2 horas (TAKAKURA et al., 2007). Por fim, os cortes foram novamente lavados com PBS por 5 minutos por 5 vezes e foram montadas as lâminas utilizando-se uma solução de montagem ( 1,4-diazabícclo[2.2.2]octano, DABCO).

A identificação dos núcleos estudados foi realizada com auxílio de microscopia de fluorescência (microscópio Zeiss modelo HBO 100.AX10.) e do atlas Paxinos e Watson (2007).

Tabela 3 - Anticorpos utilizados

<b>Anticorpos Primários</b>		
c-FOS	rabbit anti-Fos as primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)	1: 2000
GAD65	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz USA), RRID: AB_2619725,mouse monoclonal, sc 377145	1: 400
<b>Anticorpos Secundários</b>		
c-FOS	donkey anti-rabbit Alexa Fluor 488 secondary antibody (Life Technologies, USA)	1: 2000
GAD65	CyTM3-conjugated AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) 594	1: 400

FONTE: Silva, 2018.

#### 4.7 MEDIDAS DE PESO CORPORAL

As medidas de peso corporal dos filhotes foram obtidas a partir da utilização de uma balança digital analítica com precisão de 0,1 g (AS 5000c). Os pesos foram obtidos no 1º, 5º, 7º, 14º, 21º e 30º dias de vida.

#### 4.8 ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  epm (erro padrão da média). Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk. A comparação entre os dados do grupo NP e do grupo HP foi realizada pelo teste “t”

de Student não pareado. Já a comparação entre os grupos antes e após a exposição à hipóxia nos três momentos de exposição [valores absolutos e delta ( $\Delta$ =valor após a exposição-valor basal)] foi avaliada pela análise de variância two-way para medidas repetidas (ANOVA). A expressão da proteína c-Fos e da enzima GAD65 foi avaliada pela análise de variância one-way ANOVA. Quando necessário, utilizamos o pós-teste de Bonferroni. O nível de significância considerado quando  $p < 0,05$ .

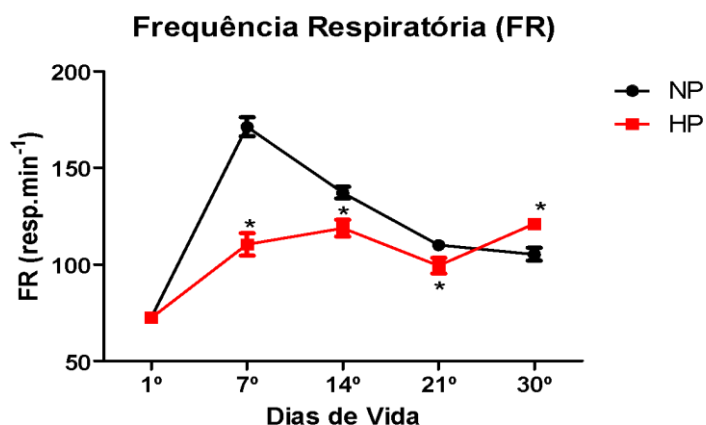


## 5 RESULTADOS

A prole de ratos provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal exibem valores basais de FR semelhantes no 1º dia de vida (NP:  $72.72 \pm 2.381$  n=18 vs. HP:  $72.61 \pm 0.8752$  n=11 resp.min<sup>-1</sup>) em relação ao grupo normoproteico. Já no 7º (NP:  $171.2 \pm 4.879$  n=18 vs. HP:  $110.4 \pm 5.733$  n=14 resp.min<sup>-1</sup>), 14º (NP:  $137.2 \pm 3.072$  n=18 vs. HP:  $119.0 \pm 4.392$  n=14 resp.min<sup>-1</sup>) e 21º (NP:  $110.1 \pm 2.019$  n=18 vs. HP:  $99.43 \pm 4.113$  n=14 resp.min<sup>-1</sup>) dias de vida, os animais desnutridos apresentam uma redução dos valores de FR quando comparados com os animais do grupo NP (**Figura 4**).

No entanto, no 30º dia de vida (**Figura 4**), observa-se que houve um aumento na FR basal nos animais desnutridos (HP.sham), não observado nas idades anteriores (NP.sham:  $105.4 \pm 3.270$  n=8 vs. HP.sham:  $121.0 \pm 2.394$  n=6 resp.min<sup>-1</sup>).

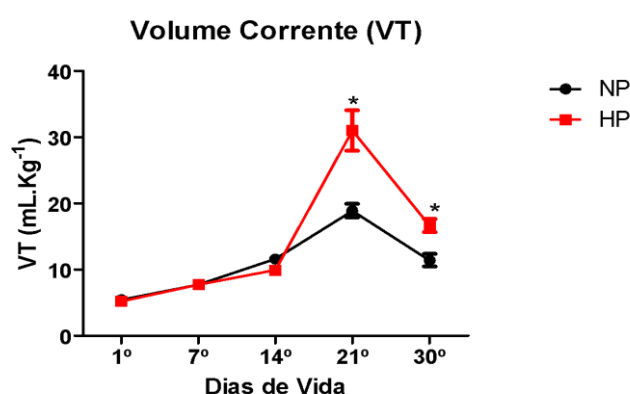
Figura 4 - Avaliação da frequência respiratória (fr) da prole de ratos no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida



**Figura 4:** Avaliação da frequência respiratória (FR) da prole de ratos no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP-8% de proteína) durante a gestação e lactação e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida.\*Valores são diferentes estatisticamente entre os grupos HP e NP no 7º, 14º, 21º e 30º dias de vida ( $p < 0.05$ , Teste T de Student não-pareado).

Quanto às demais variáveis ventilatórias, ao analisar VT constatamos valores maiores no grupo HP no 21º dia (NP:  $18.92 \pm 1.032$  n=18 vs. HP:  $31.04 \pm 3.081$  n=14 mL.Kg<sup>-1</sup>) e 30º dia de vida (NP:  $11.44 \pm 0.9634$  n=8 vs. HP:  $16.69 \pm 0.9928$  n=6 mL.Kg<sup>-1</sup>) nos HP comparados aos NP não havendo diferença significativa nas demais idades estudadas (**Figura 5**).

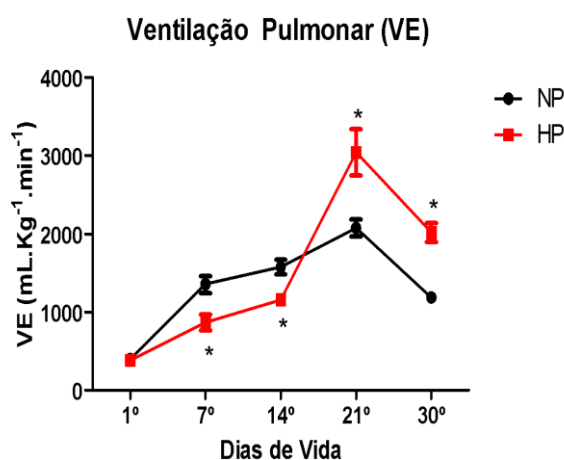
Figura 5 – Avaliação do volume corrente (VT) da prole de ratos no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida



**Figura 5:** Avaliação do volume corrente (VT) da prole de ratos no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP- 17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. .\*Valores são diferentes estatisticamente entre os grupos HP e NP no 7º, 14º, 21º e 30º dias de vida ( $p < 0.05$ , Teste T de Student não-pareado).

Interessantemente, em relação à VE, também notamos que no 7º (NP:  $1354 \pm 107.9$  n=18 vs. HP:  $866.1 \pm 97.55$  n=14 mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), 14º (NP:  $1579 \pm 92.82$  n=18 vs. HP:  $1158 \pm 72.88$  N=14 mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dias de vida os animais desnutridos apresentaram menores valores basais que o grupo NP. No entanto, no 21º (NP:  $2076 \pm 112.3$  n=18 vs. HP:  $3044 \pm 299.0$  n=14) e 30º (NP:  $1188 \pm 74.61$  n=8 vs. HP:  $2018 \pm 121.5$  n=6 mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dias de vida os animais desnutridos apresentaram maiores valores basais que o grupo NP (**Figura 6**).

Figura 6 – Avaliação da ventilação pulmonar (VE) da prole de ratos no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida



**Figura 6:** Avaliação da ventilação pulmonar (VE) da prole de ratos no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. \*Valores são diferentes estatisticamente entre os grupos HP e NP no 7º, 14º, 21º e 30º dias de vida ( $p < 0.05$ , Teste T de Student não-pareado).

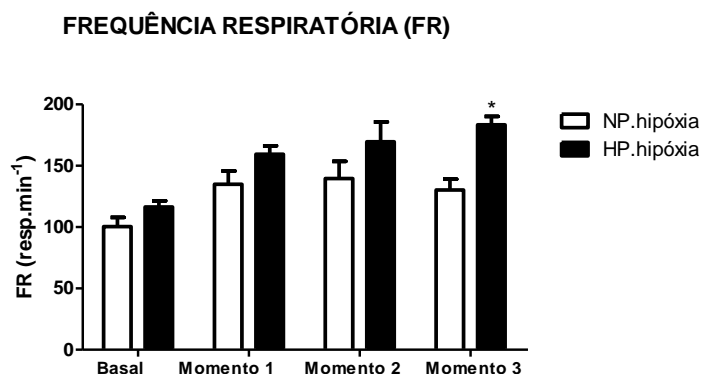
A prole de ratos provenientes de mães submetidas à desnutrição protéica perinatal demonstraram valores semelhantes de FR após o primeiro momento de exposição à hipóxia (NP.hipóxia: 134,9 vs. HP.hipóxia: 159,4  $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>) (**Figura 7**). No que diz respeito ao VT, o grupo HP.hipóxia novamente apresentou valores similares se comparado ao grupo controle (NP.hipóxia: 20,54 vs. HP.hipóxia: 21,02  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>)(**Figura 8**). O mesmo ocorreu com VE, não foram observadas diferenças entre os grupos (NP.hipóxia: 2763 vs. HP.hipóxia: 3306 mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)(**Figura 9**).

No 2º momento de exposição, também não foram observadas diferenças entre os grupos nas três variáveis analisadas, como demonstrado nas **Figuras 7, 8 e 9** (FR: NP.hipóxia: 139,6 vs. HP.hipóxia: 169,5  $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>; VT:NP.hipóxia: 18,79 vs. HP.hipóxia: 20,04  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>; VE: NP.hipóxia: 2519 vs. HP.hipóxia: 3015  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>).

No 3º momento de exposição foi constatado um aumento de FR no grupo HP.hipóxia em comparação aos animais controle (NP.hipóxia: 130,2 vs. HP.hipóxia: 183,4  $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>) (**Figura 7**). O volume corrente e a ventilação pulmonar, entretanto foram semelhantes entre os grupos (VT:NP.hipóxia: 18,44 vs.

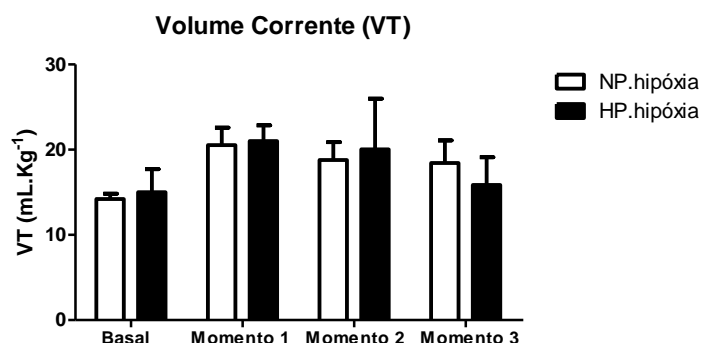
HP.hipóxia:15,86n=5 mL.Kg<sup>-1</sup>; VE: NP.hipóxia: 2317 vs. HP.hipóxia:2831 n=5 mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)(**Figura 8 e 9**).

Figura 7 - Avaliação da frequência respiratória (FR) antes e após a exposição à hipóxia (10% de O<sub>2</sub>) da prole de ratos 30º dia de vida



**Figura 7:** Avaliação da frequência respiratória (FR) antes e após a exposição à hipóxia (10% de O<sub>2</sub>) da prole de ratos 30º dia de vida provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP-8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. \*Os resultados estão expressos em EPM (p<0,01, Teste two-way ANOVA).

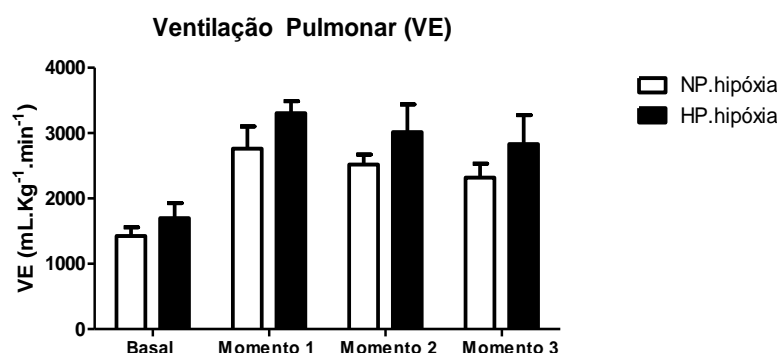
Figura 8 -. Avaliação do volume corrente (VT) antes e após a exposição à hipóxia (10% de O<sub>2</sub>) da prole de ratos no 30º dia de vida



**Figura 8:** Avaliação do volume corrente (VT) antes e após a exposição à hipóxia (10% de O<sub>2</sub>) da prole de ratos no 30º dia de vida provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de

proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. \*Os resultados estão expressos em EPM ( $p>0,05$ , Teste two-way ANOVA).

Figura 9 - Avaliação da ventilação pulmonar (VE) antes e após exposição à hipóxia (10% de  $O_2$ ) da prole de ratos no 30º dia de vida



**Figura 9:** Avaliação da ventilação pulmonar (VE) antes e após exposição à hipóxia (10% de  $O_2$ ) da prole de ratos no 30º dia de vida provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP- 17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. \*Os resultados estão expressos em EPM ( $p>0,05$ , Teste two-way ANOVA).

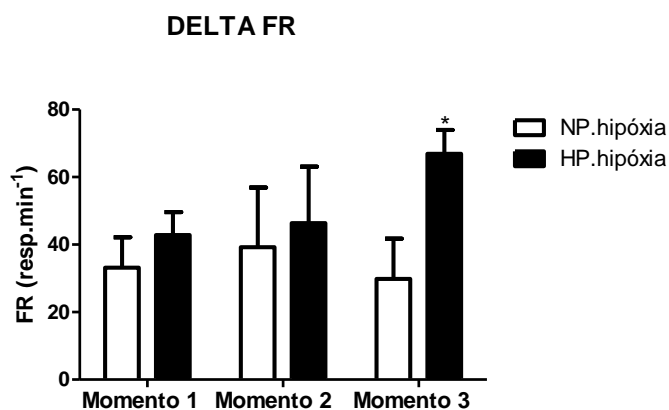
Ao verificarmos os valores de  $\Delta$ , os valores correspondentes ao 1º momento de exposição foram semelhantes entre os grupos tanto para FR, quanto para VT e VE ( $\Delta$ FR: NP.hipóxia: 33,17 vs. HP.hipóxia:42,81  $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VT:NP.hipóxia:4,198vs. HP.hipóxia: 6,008  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VE: NP.hipóxia: 3328vs. HP.hipóxia:1607  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) (**Figuras 10, 11 e 12**).

Já em relação ao 2º momento de exposição, novamente não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos nas três variáveis ventilatórias ( $\Delta$ FR:NP.hipóxia: 39,22vs. HP.hipóxia:46,35  $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VT:NP.hipóxia:3,785vs. HP.hipóxia:5,031 $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VE: NP.hipóxia: 790,7vs. HP.hipóxia: 1211 $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) (**Figuras 10, 11 e 12**).

Quanto aos valores de  $\Delta$ FR no 3º momento de exposição, os animais apresentaram maiores valores quando comparados ao grupo controle (NP.hipóxia: 29,82vs. HP.hipóxia:66,92 $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>) (**Figuras 10**). Tanto em relação ao volume corrente quanto a ventilação pulmonar, não houve diferenças entre os

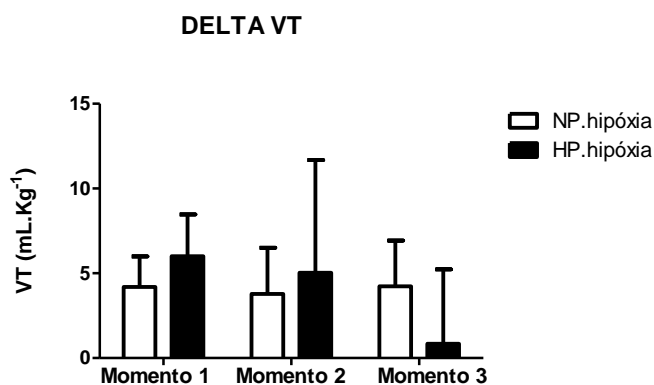
grupos ( $\Delta VT$ : NP.hipóxia:4,231 vs. HP.hipóxia:0,8455 n=5 mL.Kg<sup>-1</sup>;  $\Delta VE$ : NP.hipóxia: 4853 vs. HP.hipóxia:1131 n=5 mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)(**Figuras 11 e 12**).

Figura 10 - Valores de  $\Delta$  correspondentes a frequência respiratória (FR)



**Figura 10:** Valores de  $\Delta$  correspondentes a frequência respiratória (FR) da prole de ratos provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. . \*Os resultados estão expressos em EPM (p<0,0316, Teste two-way ANOVA).

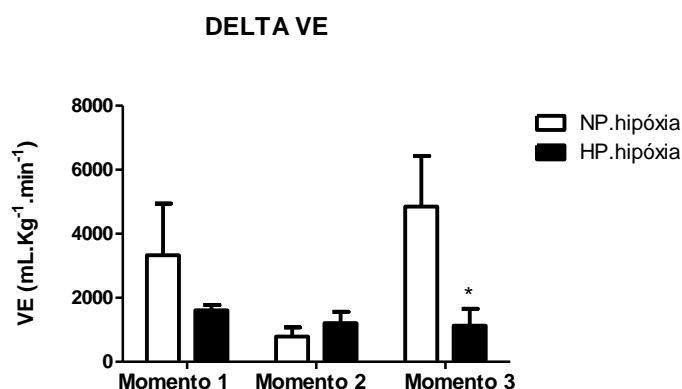
Figura 11 - Valores de  $\Delta$  correspondentes a volume corrente (VT)



**Figura 11:** Valores de  $\Delta$  correspondentes a volume corrente (VT) da prole de ratos provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína)

ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. . \*Os resultados estão expressos em EPM ( $p < 0,05$  Teste two-way ANOVA).

Figura 12 - Valores de  $\Delta$  correspondentes a ventilação pulmonar (VE)



**Figura 12:** Valores de  $\Delta$  correspondentes a ventilação pulmonar (VE) da prole de ratos provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. . \*Os resultados estão expressos em EPM ( $p < 0,0411$ , Teste two-way ANOVA).

Em relação à atividade neuronal no NTS rostral, quantificada através da expressão da proteína Fos, os animais NP\_sham apresentam maiores valores se comparados ao grupo NP\_hipóxia. O grupo HP\_sham exibiu maiores valores em relação ao grupo HP\_hipóxia. O mesmo foi observado em relação ao número de células marcadas pela enzima GAD65 (preditora da atividade de GABA). O grupo HP\_hipóxia demonstrou valores significativamente menores em comparação ao grupo NP\_hipóxia. O número de células ativas que expressaram a enzima GAD65 e que expressaram proteína Fos, foi correspondente a 75% no grupo NP\_sham; de 97,2% no grupo HP\_sham; 84,6% no grupo NP\_hipóxia e 86,74% no grupo HP\_hipóxia (**Figuras, 13, 14, 15, 16, 17, 18**).

Figura 13 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo NP\_sham

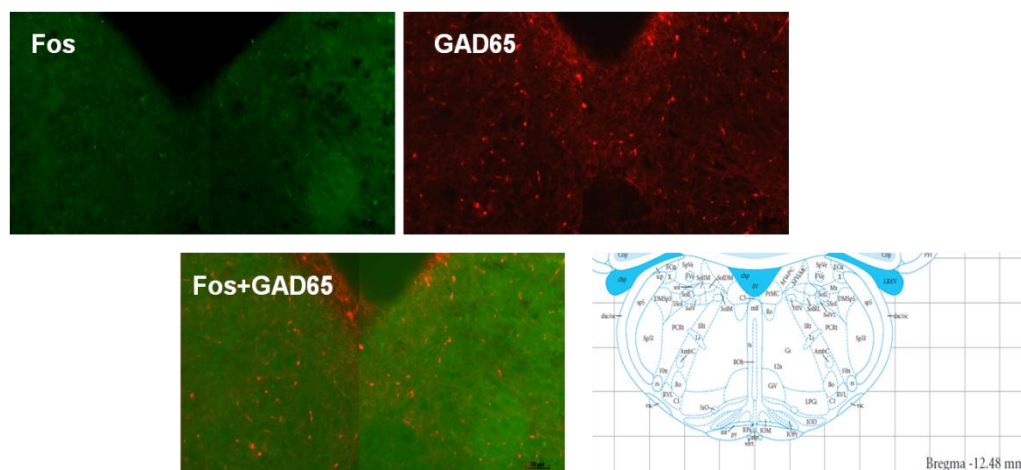


Figura 13: Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde), enzima GAD65 (comprimento de onda 546, coloração vermelha) e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo NP\_sham, que recebeu dieta NP durante gestação e lactação e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e foram submetidos apenas a cirurgia de perfusão transcárdica. À direita, foto representativa do Atlas Paxinos e Watson (2007) correspondente as coordenadas estereotáticas das fotomicrografias. As áreas próximas ao núcleo magnocellular (PrMC), foram consideradas NTS rostral (SolDM, SolGL, SolIL, SolL e SolV).

Figura 14 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo HP\_sham

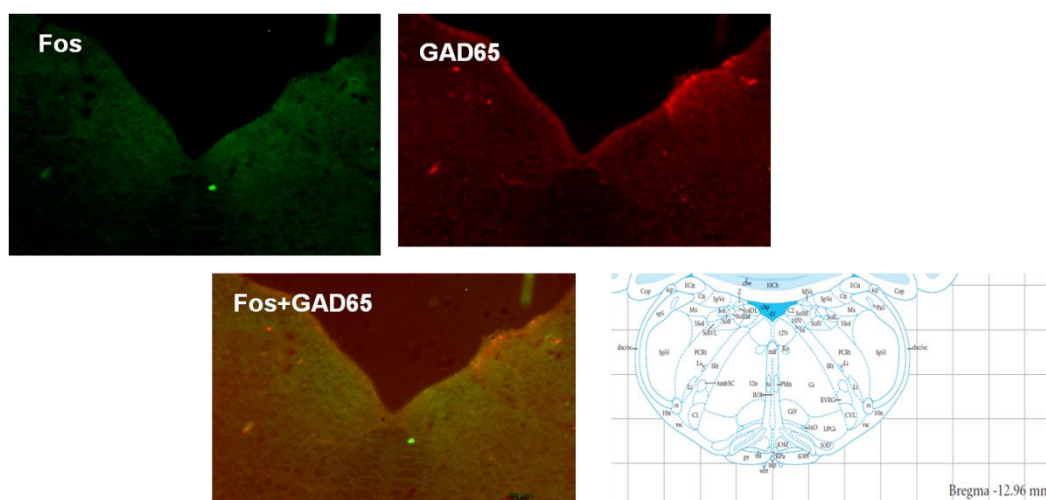




Figura 14: Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde), enzima GAD65 (comprimento de onda 546, coloração vermelha) e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo HP\_sham, que recebeu dieta HP durante gestação e lactação e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e foram submetidos apenas a cirurgia de perfusão transcárdica. À direita, foto representativa do Atlas Paxinos e Watson (2007) correspondente as coordenadas estereotáticas das fotomicrografias. As áreas próximas ao núcleo Z (Z) e ao núcleo vestibular medial (MVe), foram consideradas NTS rostral (SolDM, SolGL, SolIL, SolL e SolV).

Figura 15 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo NP\_hipóxia

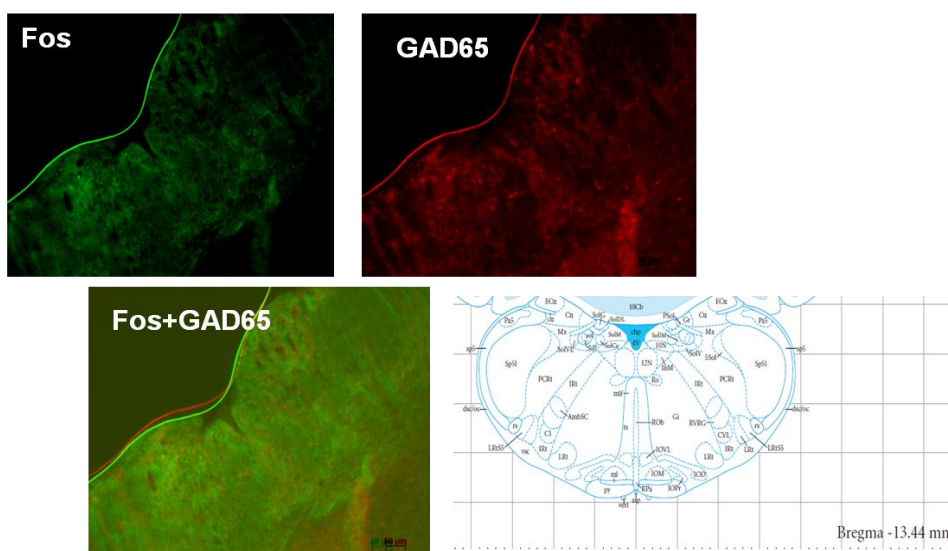


Figura 15: Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde), enzima GAD65 comprimento de onda 546, coloração vermelha) e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo NP\_hipóxia, que recebeu dieta NP durante gestação e lactação e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e foram expostos a hipóxia intermitente aguda moderada (10% de O<sub>2</sub>). À direita, foto representativa do Atlas Paxinos e Watson (2007) correspondente as coordenadas estereotáticas das fotomicrografias. As áreas próximas a abertura do quarto ventrículo (4V), foram consideradas NTS rostral (SolCe, SolDL, SolG, SolI, SolIM, SolV e SolVL).

Figura 16 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo HP\_hipóxia

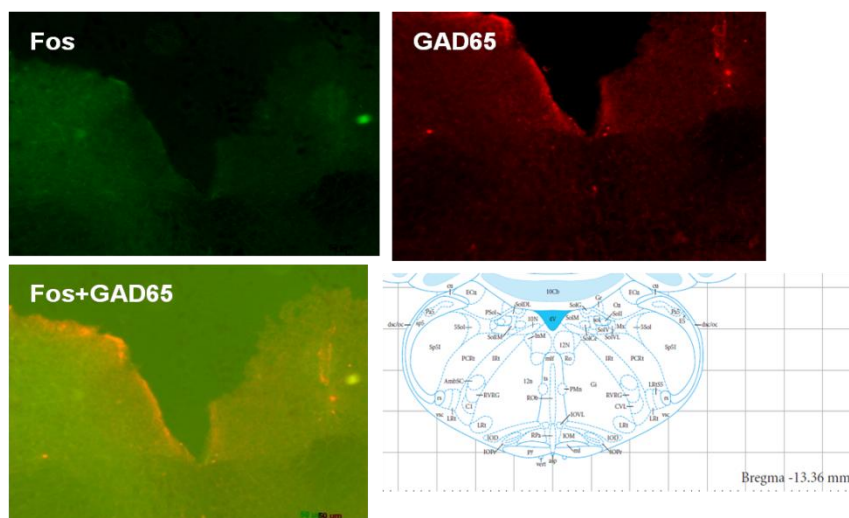


Figura 16: Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde), enzima GAD65 comprimento de onda 546, coloração vermelha) e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral do grupo HP\_hipóxia que recebeu dieta HP durante gestação e lactação e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e foram expostos a hipóxia intermitente aguda moderada (10% de O<sub>2</sub>). À direita, foto representativa do Atlas Paxinos e Watson (2007) correspondente as coordenadas estereotáticas das fotomicrografias. As áreas próximas ao núcleo dorsal motor do vago (10N) e a abertura do quarto ventrículo (4V) foram consideradas NTS rostral (SolCe, SolDL, SolG, SolI, SolIM, SolVL e SolV).

Figura 17 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) no NTS rostral

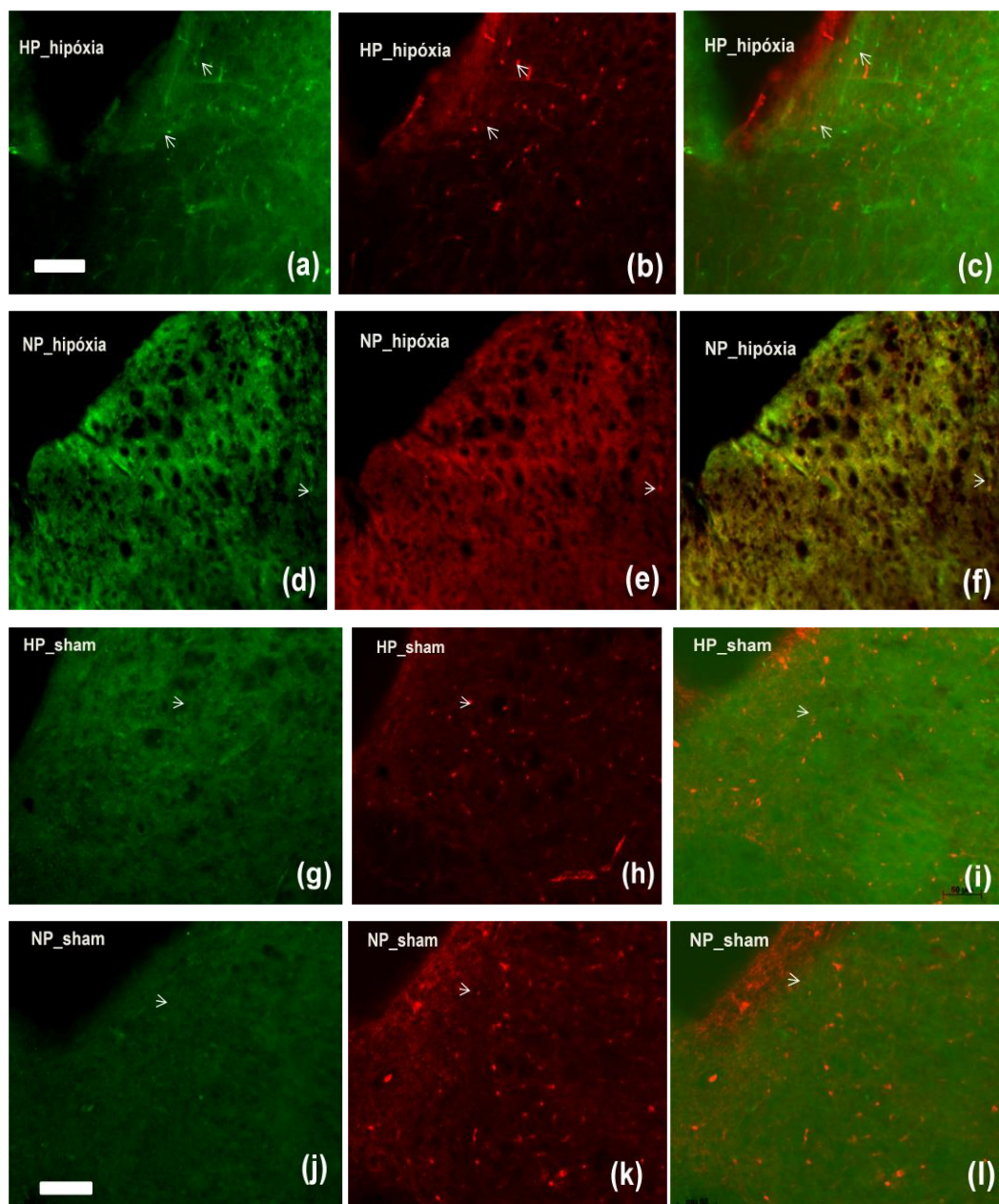


Figura 17: (a, d, g, j): fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde) no NTS rostral dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida; (b, e, h, k): fotomicrografias representativas da expressão da enzima GAD65 (comprimento de onda 546, coloração vermelha) no NTS rostral dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida; (c, f, i e l): fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos + expressão da enzima GAD65

(merge) no NTS rostral dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida. A barra de escala de A= B,C,D,E,F,G,H,I,J, K e L representando 50  $\mu$ m.

Figura 18 - Número de células ativas no NTS rostral

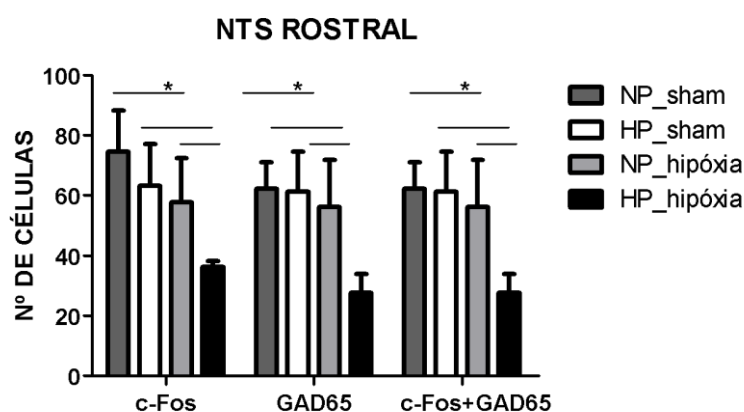


Figura 18: Número de células ativas no NTS rostral após exposição a hipóxia 10% de O<sub>2</sub> (grupos NP\_hipóxia e HP\_hipóxia) ou que foram submetidos a cirurgia de perfusão transcardíaca (grupos NP\_sham e Hp\_sham) da prole de ratos provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida.\*Valores são diferentes estatisticamente entre os grupos ( $p < 0.0001$ , Teste One-Way ANOVA).

No que diz respeito ao NTS intermediário, verificamos que os animais do grupo NP\_hipóxia apresentaram valores maiores de expressão tanto de proteína Fos, quanto da enzima GAD65 quando comparados aos demais grupos experimentais. Interessantemente, o grupo HP\_sham apresentou valores substancialmente menores de expressão tanto de proteína Fos, quanto da enzima GAD65 se comparado aos demais grupos experimentais. O número de células ativas que expressaram a enzima GAD65 e que expressaram proteína Fos, foi correspondente a 61,4% no grupo NP\_sham; de 62,16% no grupo HP\_sham; 100% no grupo NP\_hipóxia, e 95% no grupo HP\_hipóxia (Figuras, 19, 20, 21, 22, 23, 24).

Figura 19 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) do NTS intermediário e caudal do grupo NP\_sham

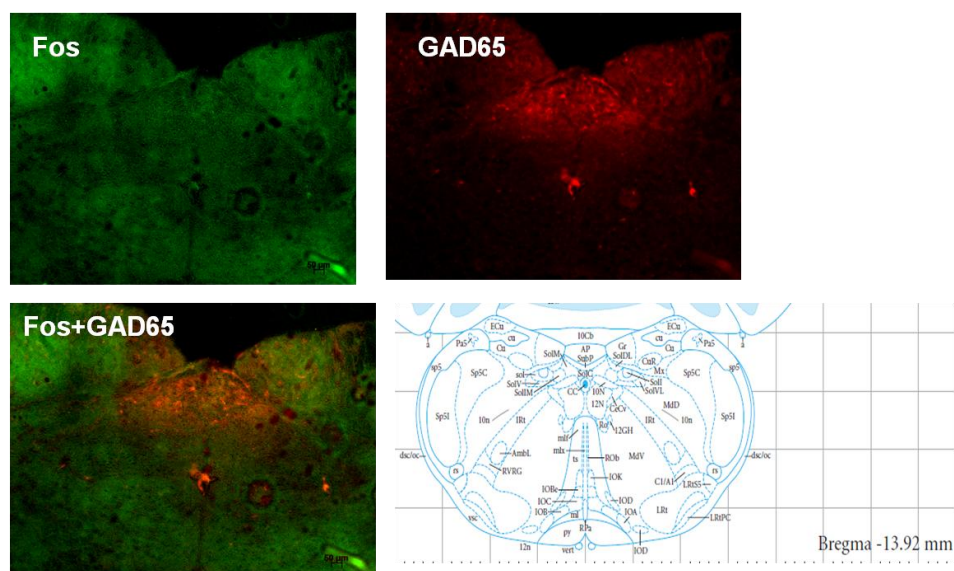


Figura 19: Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde), enzima GAD65 (comprimento de onda 546, coloração vermelha) e merge (Fos+GAD65) do NTS intermediário e NTS caudal do grupo NP\_sham, que recebeu dieta NP durante gestação e lactação e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e foram submetidos apenas a cirurgia de perfusão transcardíaca. À direita, foto representativa do Atlas Paxinos e Watson (2007) correspondente as coordenadas estereotóxicas das fotomicrografias. As áreas próximas a área postrema (AP) foram consideradas NTS intermediário (SolM) e as áreas próximas ao aqueduto central (CC) foram consideradas NTS caudal (SolC).



Figura 20 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) do NTS intermediário e caudal do grupo HP\_sham

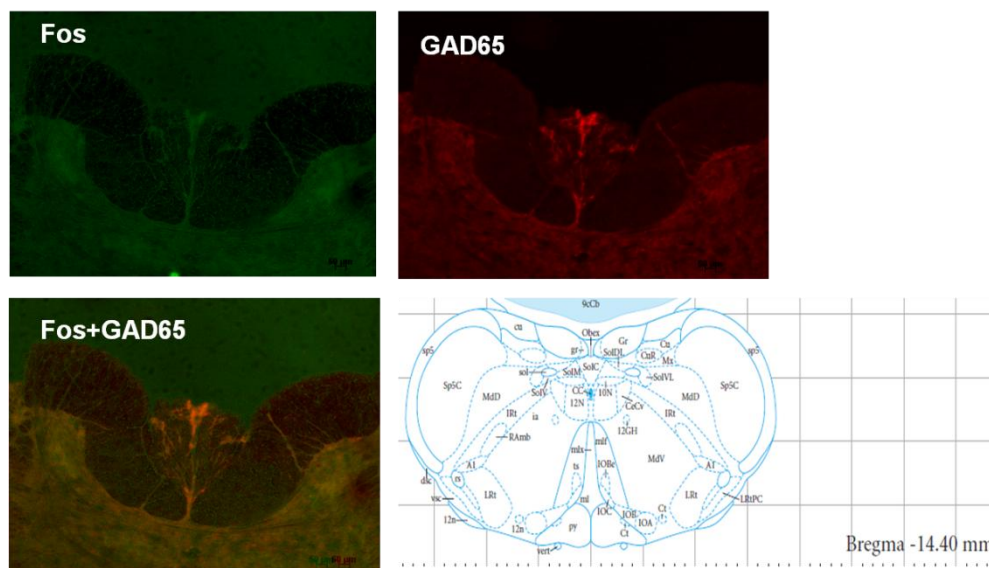


Figura 20: Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde), enzima GAD65 (comprimento de onda 546, coloração vermelha) e merge (Fos+GAD65) do NTS intermediário e NTS caudal do grupo HP\_sham, que recebeu dieta HP durante gestação e lactação e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e foram submetidos apenas a cirurgia de perfusão transcardíaca. À direita, foto representativa do Atlas Paxinos e Watson (2007) correspondente as coordenadas estereotóxicas das fotomicrografias. As áreas próximas a abertura do óbex foram consideradas NTS caudal (SolC) e as áreas próximas ao NTS caudal (SolC) foram consideradas NTS intermediário (SolM).

Figura 21 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) do NTS intermediário e caudal do grupo NP\_hipóxia

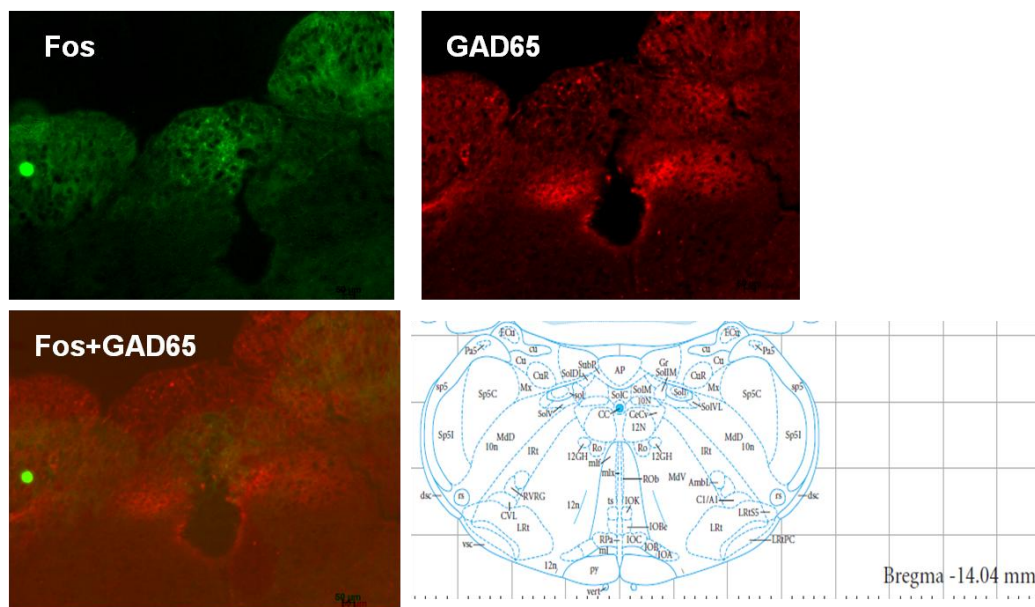


Figura 21: Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde), enzima GAD65 (comprimento de onda 546, coloração vermelha) e merge (Fos+GAD65) do NTS intermediário e NTS caudal do grupo NP\_hipóxia, que recebeu dieta NP durante gestação e lactação e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e foram submetidos a exposição à hipóxia intermitente aguda moderada (10% de O<sub>2</sub>). À direita, foto representativa do Atlas Paxinos e Watson (2007) correspondente as coordenadas estereotaxicas das fotomicrografias. As áreas próximas a área postrema (AP) foram consideradas NTS intermediário (SolIM) e as áreas próximas ao aqueduto central (CC) foram consideradas NTS caudal (SolC).

Figura 22 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) do NTS intermediário e caudal do grupo HP\_hipóxia

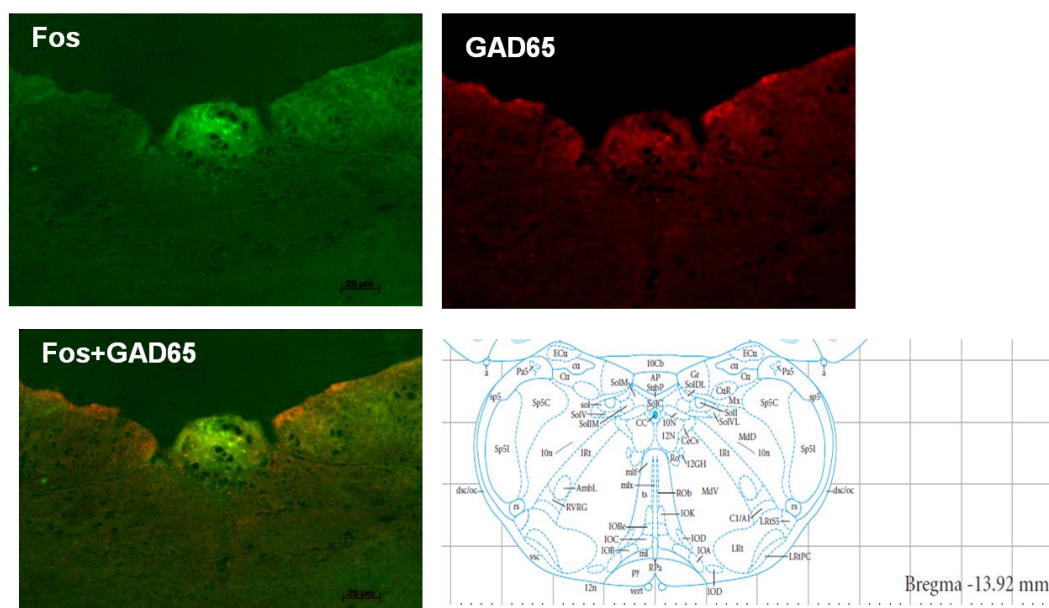


Figura 22: Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde), enzima GAD65 (comprimento de onda 546, coloração vermelha) e merge (Fos+GAD65) do NTS intermediário e NTS caudal do grupo HP\_hipóxia, que recebeu dieta HP durante gestação e lactação e dieta padrão para animais de biotério após o desmame até os 30 dias e foram submetidos a exposição à hipóxia intermitente aguda moderada (10% de O<sub>2</sub>). À direita, foto representativa do Atlas Paxinos e Watson (2007) correspondente as coordenadas esteriotáticas das fotomicrografias. As áreas próximas a área postrema (AP) foram consideradas NTS intermediário (SolIM) e as áreas próximas ao aqueduto central (CC) foram consideradas NTS caudal (SolIC).



Figura 23 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) no NTS intermediário

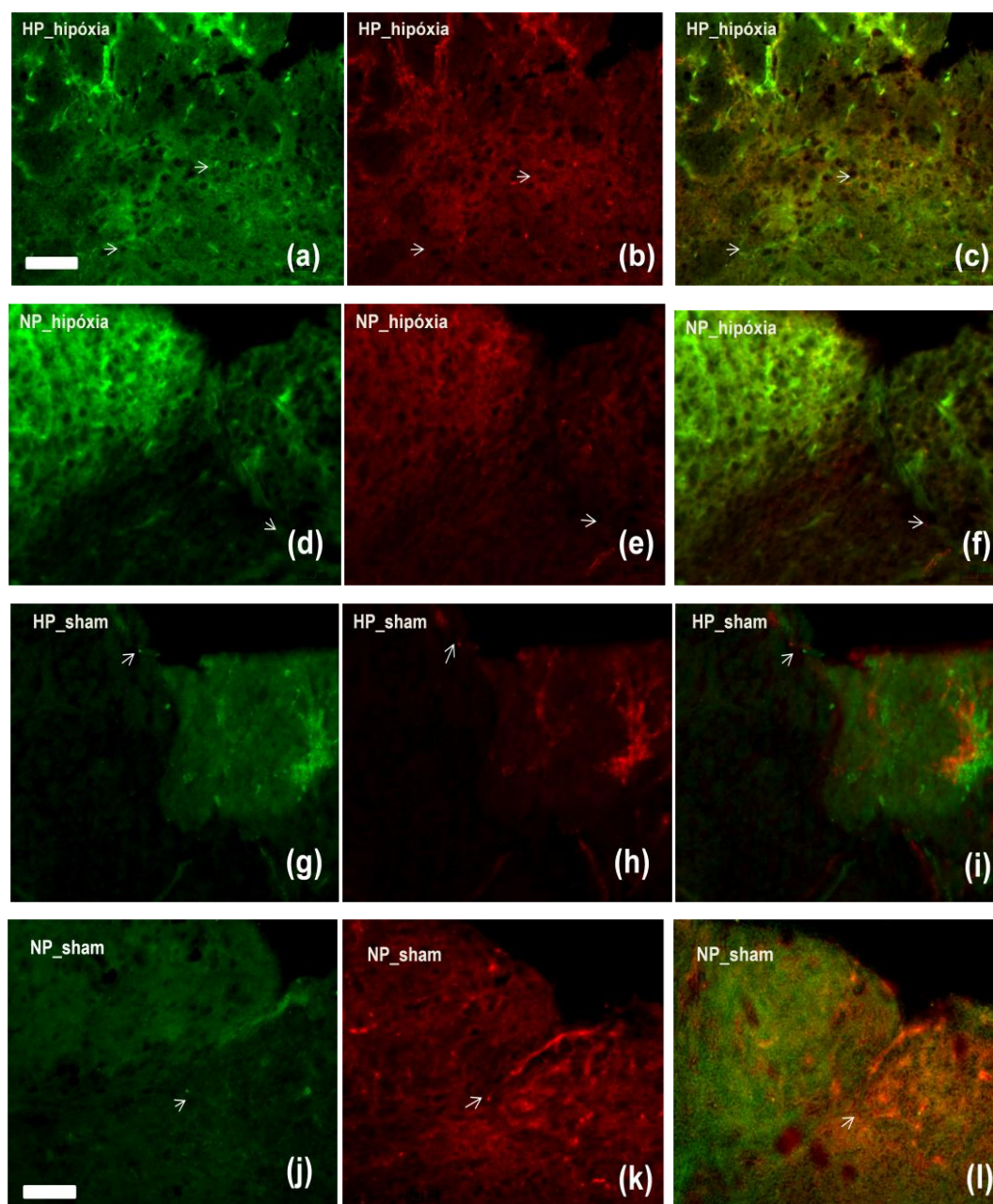


Figura 23: (a, d, g, j): fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde) no NTS intermediário dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida; (b, e, h, k): fotomicrografias representativas da expressão da enzima GAD65 (comprimento de onda 546, coloração vermelha) no NTS intermediário dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida; (c, f, i e l): fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos + expressão da

enzima GAD65 (merge) no NTS intermediário dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida. A barra de escala de A=B,C,D,E,F,G,H,I,J, K e L representando 50  $\mu$ m.

Figura 24 - Número de células ativas no NTS intermediário

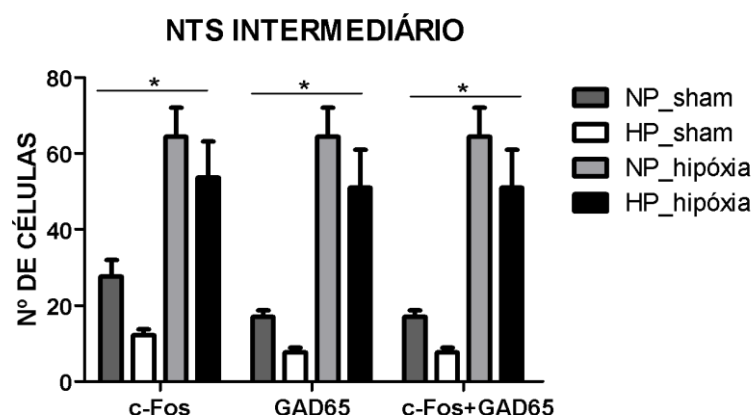


Figura 24: Número de células ativas no NTS intermediário após exposição a hipóxia 10% de O<sub>2</sub> (grupos NP\_hipóxia e HP\_hipóxia) ou que foram submetidos a cirurgia de perfusão transcardíaca (grupos NP\_sham e HP\_sham) da prole de ratos provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida.\*Valores são diferentes estatisticamente entre os grupos ( $p < 0.0001$ , Teste One-Way ANOVA).

Interessantemente no NTS caudal, observamos que o grupo NP\_sham apresentou valores menores de expressão tanto de proteína Fos quanto da enzima GAD65 quando comparado aos demais grupos experimentais, exceto quando comparado a HP\_hipóxia. Em contrapartida, quando comparado a todos os grupos experimentais, o grupo HP\_sham apresentou valores maiores de expressão tanto de proteína Fos quanto da enzima GAD65. Neste subnúcleo foi verificado também que o grupo NP\_hipóxia exibiu maior expressão de proteína Fos e da enzima GAD65 em relação ao grupo HP\_hipóxia. O número de células ativas que expressaram a enzima GAD65 e que expressaram proteína Fos, foi correspondente a 75% no grupo NP\_sham; de 97,2% no grupo HP\_sham; 84,6%

no grupo NP\_hipóxia, e 86,7% no grupo HP\_hipóxia (Figuras, 19, 20, 21, 22, 25 e 26 ).

Figura 25 - Fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos, enzima GAD65 e merge (Fos+GAD65) no NTS caudal

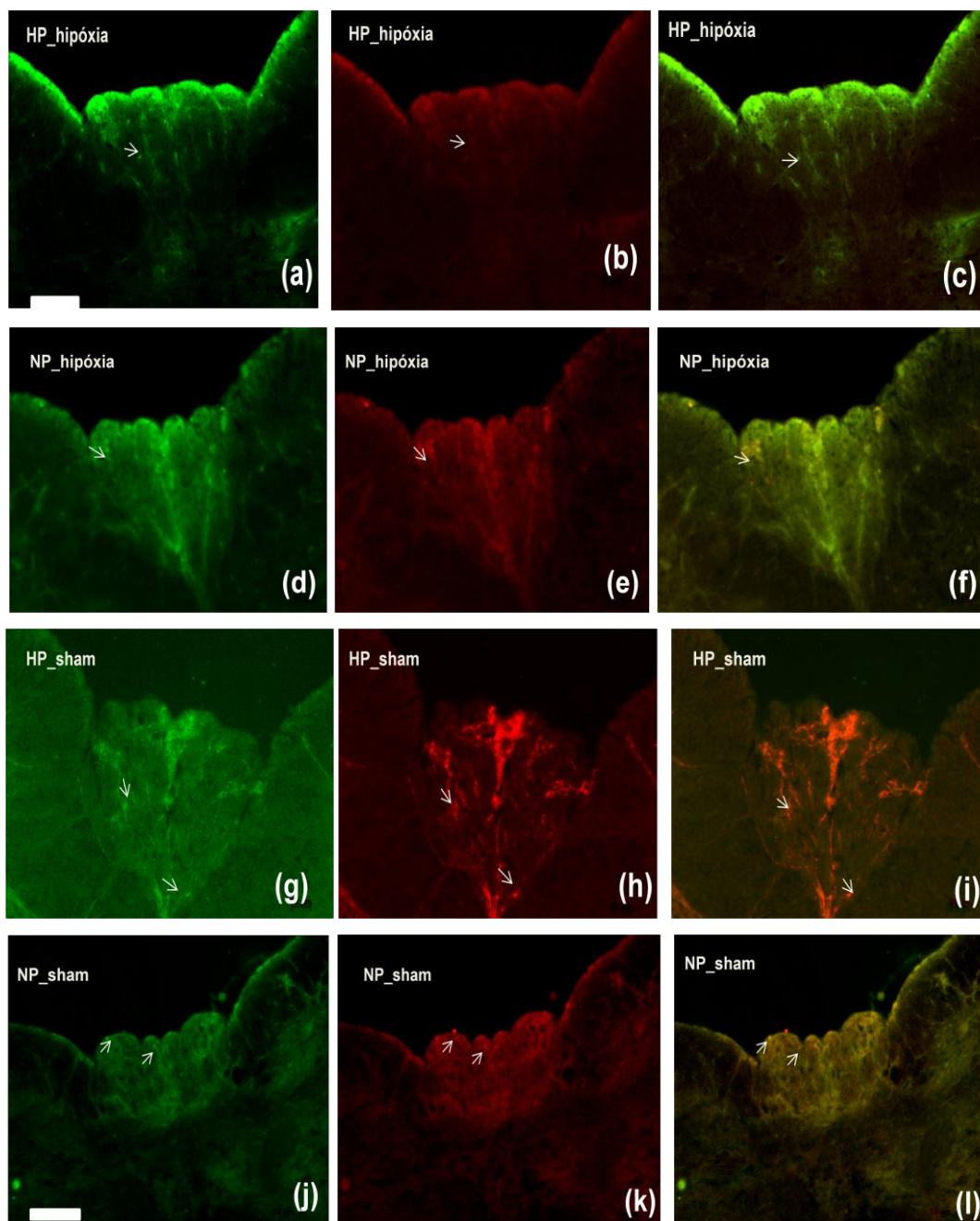


Figura 25:(a, d, g, j): fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos (comprimento de onda 488, coloração verde) no NTS caudal dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida; (b, e, h, k): fotomicrografias representativas da expressão da enzima GAD65 (comprimento de

onda 546, coloração vermelha) no NTS caudal dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida; (c, f, i e l): fotomicrografias representativas da expressão de proteína Fos + expressão da enzima GAD65 (merge) no NTS caudal dos grupos NP\_sham, HP\_sham, NP\_hipóxia e HP\_hipóxia aos 30 dias de vida. A barra de escala de A=B,C,D,E,F,G,H,I,J, K e L representando 50  $\mu$ m.

Figura 26 - Número de células ativas no NTS caudal

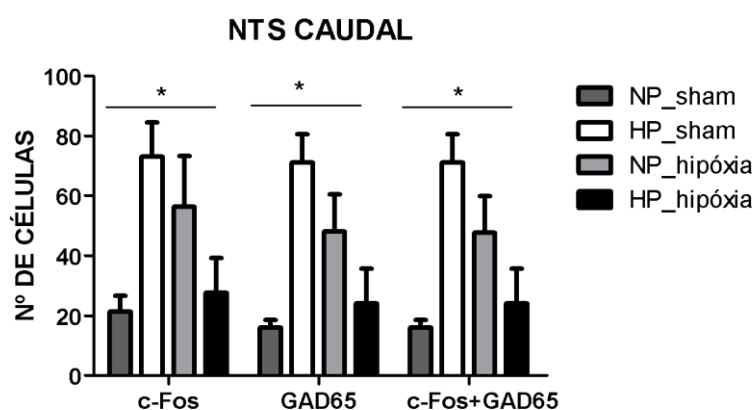


Figura 26: Número de células ativas no NTS caudal após exposição a hipóxia 10% de O<sub>2</sub> (grupos NP\_hipóxia e HP\_hipóxia) ou que foram submetidos a cirurgia de perfusão transcardíaca (grupos NP\_sham e HP\_sham) da prole de ratos provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação) e dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida.\*Valores são diferentes estatisticamente entre os grupos ( $p < 0.0001$ , Teste One-Way ANOVA).

Em relação ao peso corporal, no 1º dia de vida (NP:  $6.507 \pm 0.2638$  n=11 vs. HP:  $5.893 \pm 0.1131$  n=11 g) houve variação significativa entre os grupos, no qual o grupo HP apresentou um menor peso corporal comparado a NP. No 5º dia de vida não houve diferenças significativas entre os grupos (NP:  $12.50 \pm 0.4195$  n=11 vs. HP:  $9.768 \pm 0.2870$  n=8 g). No entanto, a partir do 7º dia (NP:  $15.09 \pm 0.8047$  n=11 vs. HP:  $12.88 \pm 0.2942$  n=8 g) é possível observar novamente uma redução no peso dos animais HP em relação ao grupo controle que se estende até os 30 dias de vida (14º: NP:  $35.08 \pm 0.6576$  n=18 vs. HP:  $19.35 \pm 0.6193$  n=14; 21º: NP:  $42.06$

$\pm 3.091$   $n=18$  vs. HP:  $28.02 \pm 1.105$   $n=14$  30º: NP:  $94.15 \pm 1.868$   $n=18$  vs. HP:  $62.65 \pm 1.599$   $n=11$  g) (Figura 27).

Figura 27 - Peso corporal no 1º, 5º, 7º, 14º, 21º e 30º dias de vida

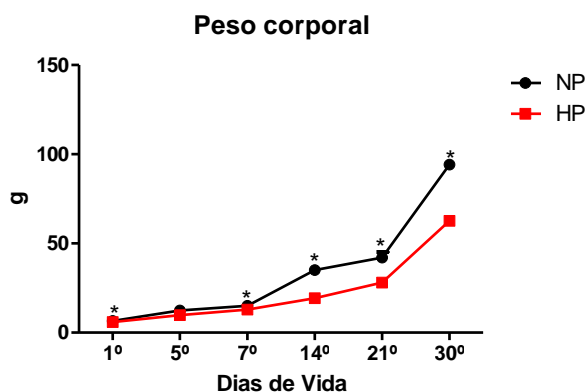


Figura 27: Avaliação do peso corporal da prole de ratos no 1º, 5º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida provenientes de mães que receberam dieta normoproteica (NP-17% de 28 proteína) ou hipoproteica (HP- 8% de proteína) durante a gestação e lactação ) ou dieta comercial para animais de biotério (labina) após o desmame (21 dias) até os 30 dias de vida. \*Valores são diferentes entre os grupos no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de vida. ( $p < 0,05$ , Teste T de Student não-pareado).

O artigo original elaborado a partir de tais resultados encontra-se escrito na língua inglesa na seção apêndice.



## 6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores do nosso laboratório têm evidenciado que animais provenientes de mães desnutridas apresentam uma redução de FR do 5º ao 14º dia de vida e no 30º dia de vida (momento em que os animais deixam de consumir uma dieta hipoproteica e passam a consumir uma dieta padrão para animais de biotério) apresentam um aumento súbito de FR. A partir desses resultados o presente estudo buscou avaliar os efeitos de uma dieta padrão pós desmame sobre o padrão respiratório basal e após a exposição à hipóxia (10% de O<sub>2</sub>) de ratos Wistar provenientes de ratas submetidas à desnutrição proteica durante a gestação e lactação.

Nossos dados referentes aos valores de frequência respiratória sugerem que as alterações ventilatórias exibidas pelos animais desnutridos iniciam-se já na primeira semana após o nascimento, como pudemos observar diante da redução dos valores no 7º, 14º e 21º dia de vida, período que corresponde à maturação do sistema respiratório. Esses dados sugerem que a desnutrição proteica perinatal é capaz de alterar a maturação do sistema respiratório, promovendo uma redução da frequência respiratória. Entretanto, no 30º dia de vida a prole de ratos pertencentes ao grupo HP.sham apresentam um aumento súbito de FR em relação ao grupo NP.sham. Ao que parece, existe algum componente da dieta padrão de biotério que é capaz de promover aumento de FR nos animais desnutridos, tais como a fonte de proteína da dieta padrão que é de baixo valor biológico (incapaz de recuperar o estado nutricional dos animais) e a quantidade excessiva do micronutriente sódio (que possibilita um aumento pressórico e por conseguinte, alterações no sistema nervoso simpático).

Com relação aos animais que foram submetidos à hipóxia intermitente aguda (10% de O<sub>2</sub>), constatamos que não houve diferenças significativas em relação a VT e VE nos três momentos de exposição, porém houve um aumento de FR no terceiro momento de exposição. No entanto, é possível observar que houve uma tendência a redução dos valores de VT e VE ao longo dos testes hipóxicos. Lee et al. (2017), verificaram um comportamento semelhante ao apresentado pelo grupo HP.hipóxia, no qual é evidenciado um aumento progressivo de FR em relação ao grupo NP.hipóxia. Assim como Powell et al.(1998) que demonstraram que há uma potenciação de curto prazo induzida pela hipóxia expressa por um

aumento paulatino da ventilação seguida de uma lenta recuperação dos valores, observamos que ambos os grupos exibiram tal comportamento em relação as variáveis VT e VE. Cummings e Wilson (2005) sugeriram que a modulação dos inputs aferentes do corpo carotídeo também estão envolvidos na modulação da resposta ventilatória durante e após hipóxia. Eles observaram que o pico de resposta a atividade do nervo sinusal carotídeo foi diminuída durante ataques hipóxicos. Essa ocorrência indicou que a atenuação da resposta ventilatória hipóxica representada em relação a VT e VE tanto no grupo controle quanto no grupo HP neste estudo, pode ser o resultado de menor pico de resposta quimiorreceptores periféricos durante o segundo e terceiro momentos de exposição (hipóxia sucessiva).

Assim como Gressens et al. (1997), também analisamos a resposta precoce à hipóxia comparando os dois períodos antes e após o início do estímulo (fator pré e pós) o que no nosso estudo corresponde ao valor de  $\Delta$ . Corroborando com esse estudo, no terceiro momento de exposição, os animais desnutridos durante o período perinatal (grupo HP.hipóxia) apresentaram um aumento de FR em comparação com o grupo controle (NP.hipóxia). Além disso, observamos que a resposta tardia à hipóxia (aqui entendida como a resposta no terceiro momento de exposição), é caracterizada por uma redução de VE no grupo desnutrido, bem como uma tendência de redução em VT no mesmo grupo. Tais resultados sugerem a existência de alguma anormalidade na neurotransmissão sináptica de caráter inibitório.

Outro fenômeno denominado de potenciação à longo prazo (LTF) também é induzido pela hipóxia intermitente aguda. Lui et al. (2018) sugerem que o NTS está envolvido na mediação da LTF induzida por uma sequência de apneias provocadas por microinjeção de lidocaína a 5%, e que um mecanismo de circuito NTS medeia o processo de plasticidade motora respiratória. Lemes et al. (2016) em estudos com ratos verificaram que a partir de 15 minutos após a exposição à hipóxia intermitente aguda houve uma redução no tempo de inspiração em preparações *in situ*, o que pode afetar diretamente a atividade do nervo frênico (principal nervo responsável pela inspiração) e que em última análise também reflete-se nos valores de VT, visto que o VT corresponde ao volume de ar inspirado e expirado. Tal como os valores de VT apresentados pelo grupo HP em relação ao NP, sugerimos que sobretudo na

fase inspiratória, os animais desnutridos apresentem alterações decorrentes de plasticidade do sistema respiratório.

Estudos recentes indicaram que a LTF é maior em ratos de 1 mês de vida em comparação com ratos com 2 meses de idade, indicando que animais mais jovens pode ter uma capacidade aumentada para indução de IH plasticidade ventilatória (MCGUIRE e LING, 2004). Diante do disposto acima, sugere-se que o fator idade é de suma importância para compreensão dos efeitos da LTF induzidas pela hipóxia intermitente. Semelhante ao constatado em nosso estudo, além dos animais que foram submetidos à hipóxia intermitente aguda serem jovens (1 mês de vida) acreditamos que a dieta pobre em proteína também tenha contribuído de forma significativa para a plasticidade ventilatória apresentada pelos animais do grupo HP, seja tanto decorrente de alterações na quimiossensibilidade ao O<sub>2</sub> quanto de alterações neuroquímicas.

Estudos realizados por Rideau et al. (2016), apontaram um impacto substancial da desnutrição protéica perinatal sobre o desenvolvimento da estrutura e função cerebral, notadamente um déficit de mielinização e uma perturbação da maturação oligodendroglial. No intuito de verificar se as alterações no ritmo respiratório exibidas pelos animais HP estão realmente associadas a alterações neuroquímicas, sobretudo de caráter inibitório, realizamos a dupla marcação de células neuronais nos três subnúcleos do NTS (NTS rostral, NTS intermediário e NTS caudal) em relação à expressão de atividade neural (proteína Fos) e a expressão da enzima GAD65 (enzima limitante da síntese do neurotransmissor inibitório GABA).

Observamos que os animais submetidos à hipóxia intermitente aguda moderada (10% de O<sub>2</sub>) exibiram menores níveis de expressão de proteína Fos e da enzima GAD65 nos subnúcleos rostral e caudal do NTS em comparação aos grupos que não foram submetidos à hipóxia. Porém, no que se refere ao subnúcleo intermediário do NTS, os animais submetidos à hipóxia demonstraram maior expressão de proteína Fos e da enzima GAD65. A dieta hipoproteica foi capaz de elucidar alterações significativas na neurotransmissão de caráter inibitório, tendo em vista o comportamento observado entre os grupos experimentais nos três subnúcleos do NTS estudados promovendo em última análise, os resultados observados no sistema respiratório desses animais.



Após exposição a hipóxia crônica a 30% de O<sub>2</sub> durante 9 dias, Chung, Ivy e Reid (2006), atestaram que ratos da linhagem Springe-Dawley exibiram alterações na neurotransmissão mediada por GABA, na região caudal do NTS (NTS caudal). Estes animais demonstraram uma redução de VT e FR mediada pela ação da bicuculina (antagonista GABAérgica de receptores GABA<sub>A</sub>). Tal fato fundamenta a afirmativa de que o neurotransmissor inibitório GABA liberado no NTS caudal, está envolvido na resposta ventilatória à hipóxia, conduzindo a resposta reflexa a hipóxia (aumento de VT). Como demonstrado principalmente pelos animais do grupo HP\_hipóxia, sugerimos que a redução da neurotransmissão inibitória induzida por GABA no NTS caudal (observado a partir da análise da expressão de Fos e GAD65), seria a causa para o comportamento destes animais em relação às variáveis VT e VE após exposição a hipóxia.

A Síndrome de Rett, desordem neurológica causada por mutações de perda de função no gene ligado ao X que codifica o regulador epigenético Mecp2 (proteína 2 de ligação metil-CpG) e que entre outros sintomas causa distúrbios respiratórios tais como a hiperventilação, tem sido alvo de estudos experimentais ao longo do tempo. Tendo em vista a relação do NTS com a modulação respiratória, além do papel da redução da neurotransmissão GABAérgica no desequilíbrio respiratório na Síndrome de Rett, Chen et al. (2017) ao realizarem estudos com camundongos *knockout* para Mecp2, sugerem que a disfunção respiratória que acomete os pacientes seria mediada por um desequilíbrio na neurotransmissão de GABA no NTS. Como observado anteriormente, os animais desnutridos apresentaram um aumento de FR (em decorrência de um quadro de hiperventilação) aos 30 dias de vida antes e após exposição à hipóxia. Tais achados suportam mais uma vez, a hipótese de que uma instabilidade na neurotransmissão inibitória no NTS, predominantemente GABAérgica, estaria ligada ao comportamento respiratório observado em nosso modelo experimental.

Além da hipóxia (crônica e aguda), outro estímulo também é capaz de ocasionar mudanças na atividade neuronal de núcleos cerebrais responsáveis pelo controle cardiorrespiratório. A exposição à hipercapnia (aumento na concentração de CO<sub>2</sub>) tem sido estudada em diversos modelos experimentais (ZHANG et al. 2003; NOGUEIRA et al., 2018). Diferentemente do observado por Nogueira et al. (2018), que constataram um aumento de atividade neuronal no núcleo retrotrapezóide de ratos submetidos à desnutrição protéica perinatal após

exposição a hipercapnia, observamos que os animais desnutridos submetidos a hipóxia (HP\_hipóxia) apresentaram menor nível de atividade neuronal e da neurotransmissão de caráter inibitório mediada por GABA no NTS caudal.

O peso corporal é um indicativo direto do estado nutricional, sendo reflexo da alimentação do indivíduo. Através das amostras de peso corporal obtidas dos filhotes de ambos os grupos NP e HP, verificamos que os animais HP tiveram um baixo peso no 1º dia de vida (24h após o nascimento), corroborando com MENENDEZ-CASTRO e cols., 2012. Esses resultados sugerem que o modelo de desnutrição utilizado foi capaz de alterar o peso nos primeiros dias de vida. A partir do 7º dia de vida, é possível observar que os animais HP apresentam uma redução gradual de peso corpóreo. Tem sido retratado em modelos de desnutrição que a diferença no peso corporal dos HP em relação ao grupo controle torna-se mais acentuada a partir da 1ª semana após o nascimento (ALVES e cols., 2008; NASCIMENTO e cols., 2013) tal como visto em nosso modelo experimental.

## 7 CONCLUSÃO

Diante do observado através da análise dos nossos resultados, é possível concluir que a desnutrição protéica perinatal é capaz de causar alterações na maturação do sistema respiratório, evidenciada por redução de FR nas primeiras semanas de vida pós-natal e um aumento de FR aos 30 dias de vida. Além disso, sugerimos que os animais desnutridos têm um aumento da quimiossensibilidade ao  $O_2$  decorrente de alterações na neurotransmissão, porém não em decorrência da redução na neurotransmissão GABAérgica. Para elucidar qual o neurotransmissor envolvido na redução da atividade neuronal nestes animais, serão necessários estudos futuros.

## REFERÊNCIAS

- ABU-SHAWEESH, J.M., MARTIN, R.J. Neonatal apnea: what's new? **Pediatr. Pulmonol.**, v.43, p. 937–944, 2008.
- AICHER, S. A. et al. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. **J. Comp. Neurol.**, v.373, p.62–75, 1996.
- ALHEID, G. F., JIAO, W., and MCCRIMMON, D. R. Caudal nuclei of the rat nucleus of the solitary tract differentially innervate respiratory compartments within the ventrolateral medulla. **Neuroscience** , v.190, p.207–227, 2011.
- ALVES A.P., DÂMASO, A.R., DAL PAI, V. Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular estriado esquelético em ratos. *Jornal de Pediatria*. 2008; Vol. 84, Nº 3.
- ALVES, J.L.B. et al. Avaliação Bioquímica e dos níveis basais da pressão arterial em ratos submetidos à desnutrição protéica durante a gestação e lactação. In: XVI Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, 2012, Goiania. Livro de Resumos, 2012a.
- ALVES, J.L.B. et al. Baroreflex-evoked responses in rats submitted to protein undernutrition during perinatal period. In: XLVII Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia e III Encontro Científico do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Gramado-RS. Anais de Resumos (meio digital), 2012b.
- AMARA, S.G., FONTANA, A.C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochem Int.**, v. 41, p.313-8, 2002.
- ANDRESEN, M. C., and KUNZE, D. L. Nucleus tractus solitarius— gateway to neural circulatory control. **Annu. Rev. Physiol.**, v.56, p.93–116, 1994.
- ANDRESEN, M.C. and YANG, M. Non-NMDA receptors mediate sensory afferent synaptic transmission in medial nucleus tractus solitarius. **Am. J. Physiol. Heart Ore. Physiol.**, v.259, p.1307-1311, 1990.
- ATTWELL, D. Brain uptake of glutamate: food for thought. **J Nutr**, v.130, n. 4 Suppl., p. 1023S-5S, Apr. 2000.
- BAILEY, T.W. et al. Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus: Targets specific synaptic reliability and convergence patterns. **Journal of Neuroscience**, v.26, p.11893– 11902, 2006.
- BARKER, D.J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v.261, p. 412-7, 2007.

BARKER, D.J. et al. Maternal and social origins of hypertension. **Hypertension**, v. 50, p. 565-71, 2007.

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

BAYOUMI, R. A., AND SMITH, W. R. D.. Regional distribution of Glutamic Acid Decarboxylase in the developing brain of the pyridoxine-deficient rat. **J. Neurochem.**, v.21, p. 603-613, 1973.

BAYOUMI, R. A., AND SMITH, W. R. D. Some effects of dietary vitamin B-6 deficiency on gamma-aminobutyric acid metabolism in developing rat brain. **J. Neurochem.**, v.19, p.1883-1897, 1972.

BELTRÁN-CASTILLO, S.; MORGADO-VALLE, C.; EUGENÍN, J. The Onset of the Fetal Respiratory Rhythm: An Emergent Property Triggered by Chemosensory Drive? **Adv Exp Med Biol**, v. 1015, p.163-192, 2017.

BENNETT, A.F.; HICKS, J.W. Postprandial exercise: prioritization or additivity of the metabolic responses? **J. Exp Biol.**, v. 204, p. 2127–2132, 2001.

BORGUESE, C.M. et al. Lack of tolerance to the anxiolytic effect of diazepam and pentobarbital following chronic administration in perinatally undernourished rats. **Brain. Res. Bull.**, v.46, p.237-244, 1998.

BRAVO, A.J. et al. Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. **PNAS**, v. 108, n. 38, p. 16050–16055 September 20, 2011.

BRITO ALVES, J.L. et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **Br J Nutr**, v. 111, n. 4, p. 606-15, 2014.

BRITO ALVES, J.L. et al. Maternal Protein Restriction Increases Respiratory and Sympathetic Activities and Sensitizes Peripheral Chemoreflex in Male Rat Offspring. **The Journal of Nutrition**, 2015.

BUREAU, M.; OLSEN, R.W. Multiple distinct subunits of the γ-aminobutyric-A receptor protein show different ligand-binding affinities. **Mol. Pharmacol.**, v. 37, p. 497-502, 1990.

BURRI, P.H. The postnatal growth of the rat lung. 3. **Morphology. Anat Rec.**, v. 180, p. 77–98, 1974.

CHÁVEZ, A.E.; SINGER, J.H.; DIAMOND, J.S. Fast neurotransmitter release triggered by Ca influx through AMPA-type glutamate receptors. **Nature Letters**.443:12. 2006.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. R. The 'abc' of GABA receptors: a brief review'. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 26, p. 937-940, 1999.

CHEN et al. Defective GABAergic neurotransmission in the nucleus tractus solitarius in *Mecp2*-null mice, a model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis.*, v.109, p. 25–32, 2018.

CHITRAVANSHI, V. C., A. KACHROO, and H. N. SAPRU. A midline area in the nucleus commissuralis of NTS mediates the phrenic nerve responses to carotid chemoreceptor stimulation. **Brain Res.**, v.662, p.127–133, 1994.

CHUNG, S. IVY, G.O. and REID, S.G. GABA-mediated neurotransmission in the nucleus of the solitary tract alters resting ventilation following exposure to chronic hypoxia in conscious rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** , v.291, p. 1449–1456, 2006.

CIRIELLO, J., et al. Central projections of baroreceptor afferent fibres in the rat. In: Robin, I.; Barraco, A., editors. Nucleus of the solitary tract. **CRC Press London**, p. 35-50, 1994.

COLOMBO, J.P.; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFISTER, U.; PERRITAZ, R. Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in rats. **Annal. Nutr. Metab.**, v. 36; p. 23-33, 1992.

CONNOLLY, C.N. et al. Subcellular localization of the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors is determined by receptor  $\beta$  subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 9899-9904, 1996.

-CONTI, F., A. RUSTIONI, P. PETRUSZ, and A.C. TOWLE. Glutamate-positive neurons in the somatic sensory cortex of rats and monkeys. **J. Neurosci.**, v. 7, p. 1887-1901, 1987.

CONTI, F., M. FABRI, and T. MANZONI. Glutamate-positive corticocortical neurons in the somatic sensory areas I and I1 of cats. **J. Neurosci.** 8:2948-2960, 1988.

CONTI, F., J. DEFELIPE, I. FARINAS, and T. MANZONI. Glutamate-positive neurons and axon terminals in cat sensory cortex: A correlative light and electron microscopic study. **J. Comp. Neurol.**, 290:141-153, 1989.

CONTI, F., MINELLI, A., and BRECHA, N.C. Cellular Localization and Laminar Distribution of AMPA Glutamate Receptor Subunits mRNAs and Proteins in the Rat Cerebral Cortex. **The Journal of Comparative Neurology** v.350, p.241-259, 1994.

COSTA-SILVA, J.H. et al. New Insights on the Maternal Diet Induced-Hypertension: Potential Role of the Phenotypic Plasticity and Sympathetic-Respiratory Overactivity. **Front Physiol.** , v. 24 p. 345, 2015.

COSTA-SILVA JH, SIMÕES-ALVES AC, FERNANDES MP. Developmental Origins of Cardiometabolic Diseases: Role of the Maternal Diet. **Front Physiol.**, v.16, p. 504, 2016.

COTTLE, M.K. Degeneration studies of primary afferents of ixth and xth cranial nerves in the cat. **J Comp Neurol.**, v.122, p.329–345, 1964.

CRYAN, J.F., KAUPMANN, K. Don't worry 'B' happy!: A role for GABA(B) receptors in anxiety and depression. **Trends Pharmacol Sci**, v. 26, p.36–43, 2005.

CUMMINGS, K.J.; WILSON, R.J. Time-dependent modulation of carotid body afferent activity during and after intermittent hypoxia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v. 288, p.1571-1580, 2005.

DAIKHIN, Y. YUDKOFF, M. Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1026-31, 2000.

DANBOLT, N.C. Glutamate uptake. **Prog Neurobiol.**, v. 65, p.1-105, 2001.

DAMPNEY, R. A. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.**, v. 74, p. 323–364, 1994.

DARNALL, R.A., ARIAGNO, R.L., KINNEY, H.C. The late preterm infant and the control of breathing, sleep, and brainstem development: a review. **Clin. Perinatol.**, v. 33, p.883–914, 2006.

DE BRITO ALVES, J. L.; COSTA-SILVA, J. H. Maternal protein malnutrition induced-hypertension: New evidence about the autonomic and respiratory dysfunctions and epigenetic mechanisms. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 45, n. 5, p. 422-429, 2018.

DEFELIPE, J. et al. Demonstration of glutamate-positive axon terminals forming asymmetric synapses in the cat neocortex. **Brain Res**, v.455, p.162-165, 1988.

DEL ANGEL-MESA, A.R. et al. Cerebral GABA release and GAD activity in protein- and tryptofan-restricted rats during development. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v. 20, p.47-54, 2002.

DENISENKO, O. et al. Regulation of ribosomal RNA expression across the lifespan is fine-tuned by maternal diet before implantation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1859, p.906–913, 2016.

DE ROOIJ, S.R.; ROSEBOOM, T.J. The developmental origins of ageing: study protocol for the Dutch famine birth cohort study on ageing. **BMJ Open**, v.3, 2013.

DIAS, C. M. et al. Effects of undernutrition on respiratory mechanics and lung parenchyma remodeling. **J. Appl. Physiol.**, v. 97, p. 1888-1896, 2004.

DINGLE DINE, R. et al. The glutamate receptor ion channels. **Pharmacol Rev**, v. 51, n.1, p. 7-61, Mar 1999, 2007.

DORI, I., M. PETROU, and J.G. PARNAVELAS. Excitatory transmitter amino acid-containing neurons in the rat visual cortex: A light and electron microscopic immunocytochemical study. **J. Comp. Neurol.**, 290: 169-184, 1989.

ENNA, S.J.. The GABA receptors. **Humana Press Inc.**, Clifton, New Jersey, 1983.

ENNA, S.J. AND SOLOMON, H. S. Properties of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptor binding in rat brain synaptic membrane fractions. **Brain Research**, v. 100, p. 81-97, 1975.

ERLANDER, M. G. et al. **Neuron**, v.7, p. 91–100, 1991.

ESCLAPEZ, M. et al. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 1834–1855, 1994.

FAO, FOOD AND DRUG ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional en América Latina y el Caribe.**

Disponível em: <<http://www.fao.org/americas/publicaciones-audio-video/panorama/2018/es/>> Acesso em: 29 de abril de 2019.

FELDBLUM, S., ERLANDER, M. G. and TOBIN, A. J. **J. Neurosci. Res.**, v. 34, p. 689–706, 1993.

FEOLI, A.M. et al. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. **Nutrition**, v.22, p.160-165, 2006.

FINLEY JC, KATZ DM. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. **Brain Res**, v. 572, p. 108–116, 1992.

FLEMING, T.P.; ECKERT, J.J.; DENISENKO, O. The Role of Maternal Nutrition During the Periconceptional Period and Its Effect on Offspring Phenotype. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p.87-105, 2017.

GALLER, J. R., SHUMSKY, J. S., & MORGANE, P. J. Malnutrition and brain development. In W. A. Walker, & J. Watkins (Eds.), **Nutrition in pediatrics** (p. 3-58). New York: Plenum Press, 1995.

GUICQUEL, C.; EL-OSTA, A.; LE-BOUC Y. Epigenetic Regulation and fetal programming. **Best Pract Res Clin End Met**, v.22, p.1-16, 2008.

GLUCKMAN, D.P. et al. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v.5, p. 401–408, 2009.

GODFREY, M.K. et al. Epigenetic Gene Promoter Methylation at Birth Is Associated With Child's Later Adiposity. **Diabetes**, v. 60, 2011.

GOYAL, R. et al. Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. **Reprod Sci.**, v.17, p.227-38, 2010.

GOZAL, D.; XUE, Y.; SIMAKAJORNBOON, N. Hypoxia induces c-Fos protein expression in NMDA but not AMPA glutamate receptor labeled neurons within the



nucleus tractus solitarii of the conscious rat. **Neuroscience Letters**, v. 262, p. 93-96, 1999.

GRESSENS, P. et al. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. **Developmental Brain Research**, v. 103, p. 21–35, 1997.

GUYENET, P.G. Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. **Compr Physiol.**, v. 4, p.1511-62, 2014.

GUYTON, C.A.; HALL, E.J. Tratado de Fisiologia Médica, Rio de Janeiro, Elsevier, 2006-4ª tiragem, 1128p.

HACKETT, J.T.; UEDA, T. Glutamate release. **Neurochem Res.**, v. 40, p.2443-60, 2015.

HANSON, M.A.; GLUCKMAN, P.D. Developmental Origins of Health and Disease: New Insights. **Journal compilation, Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.102, p.90–93, 2008.

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

HANG, H. P. et al. Aminoácidos transmissores. In: \_\_\_\_\_ **Farmacologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 32, p. 527-540.

HARKEMA, J. R. et al. A comparison of starvation and elastase models of emphysema in the rat. **Am.Rev. Respir. Dis.**, v. 129, p. 584-591, 1984.

HIRST, M.; MARRA, M.A. Epigenetics and human disease. **The International Journal of Biochemistry and Biology**, v.41, p.136-146, 2009.

HORNBY, P.J. Central neurocircuitry associated with emesis. *Am J Med.*, v. 111, p.106-112, 2001.

IVERSEN, L. L., The uptake, storage, release and metabolism of GABA in inhibitory nerves. In S. H. SNYDER (Ed.), **Perspectives in Neuropharmacology**, Oxford University Press, New York, p. 75-111, 1972.

JEAN, A. Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev.*, v. 81, p.929-69, 2001.

KANAI, Y., and M.A.HEDIGER . Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. **Nature**, v. 360, p.467-471, 1992.

KANEKO, T., and N. MIZUNO. Immunohistochemical study of glutaminase-containing neurons in the cerebral cortex and thalamus of the rat. **J.Comp. Neurol.**, v. 267, p. 302-309, 1988.

KAUFMAN, D. L. et al. **Science**, v.232, p. 1138–1140, 1986.

KATAROVA, Z. et al. **Eur. J. Neurosci.**, v. 2, p. 190–202, 1990.

KERR, J. S. et al Nutritional emphysema in the rat: influence of protein depletion and impaired lung growth. **Am. Rev. Respir. Dis.**, 131, 644-650, 1985.

KING, T.L. et al. Hypoxia activates nucleus tractus solitarii neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 302: R1219-32, 2012.

KUBIN, L., et al. Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. **J Appl Physiol.**, v.101, p.618–627, 2006.

KUBLI, F.W. et al. Observations on heart rate and pH in the human fetus during labor. **Am J Obstet Gynecol**, v.104, p.1190–1206, 1969.

KUMAMOTO, T.; OSHIO, S. New Approach to the Investigation of DOHaD Using X-inactivation Gene Expression System. **Nihon Eiseigaku Zasshi**, v. 73, p.101-104, 2018.

LANGLEY-EVANS, S. Early life origin of hypertension: a rat model. **Ashwell M. Tomorrow's Nutrition**. London , British Nutrition Foundation, p. 33-42, 1994.

LAPILLONNE, A., et al. Intervenants au séminaire Nutrition du prématuré du GEN-IdF. **Arch Pediatr.**, v. 18, p. 313-23, 2011.

LECHNER, A. J.; WINSTON, D. C.; BAUMAN, J. E. Lung mechanics, cellularity, and surfactant after prenatal starvation in guinea pigs. **J. Appl. Physiol.**, v. 60, p.1610-1614, 1986.

LEE, K.; CHIANG, S.; LI, Y. Mild Acute Intermittent Hypoxia Improves Respiratory Function in Unanesthetized Rats With Midcervical Contusion. **Neurorehabilitation and Neural Repair**, v. 31, p. 364–375, 2017.

LEMES, E.V. et al. Long-term facilitation of expiratory and sympathetic activities following acute intermittent hypoxia in rats. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 217, p.254–266, 2016.

LIU, Q.; WONG-RILEY, M.T. Postnatal development of glycine receptor subunits  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , and  $\beta$  immunoreactivity in multiple brain stem respiratory-related nuclear groups of the rat. **Brain Res**, v.1538, p.1-16. 2013.

LOEWY, A. D. "Central autonomic pathways," in Central Regulation of Autonomic Functions, eds A. D. Loewy and K. M. Spyer , **New York, NY: Oxford University Press**, p.88–103, 1990.

LUI et al. Brainstem Nuclei Associated with Mediating Apnea-Induced Respiratory Motor Plasticity. **Sci Rep.**, v. 8, 2018.

LUO, Z., COSTY-BENNETT, S., FREGOSI, R.F. Prenatal nicotine exposure increases the strength of GABA(A) receptor-mediated inhibition of respiratory rhythm in neonatal rats. **J. Physiol.**, v. 561, p.387–393, 2004.

LUZARDO, R. et al. Metabolic programming during lactation stimulates renal Na<sup>+</sup> transport in the adult offspring due to an early impact on local angiotensin II pathways. **PLoS One**, v.6, p.212-32, 2011.

MALAN A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respir Physiol**, v.17, p. 32-44, 1973.

MCGUIRE, M.; LING, L. Ventilatory long-term facilitation is greater in 1-month-versus 2-month-old awake rats. **J. Appl. Physiol.**,v. 98, p. 1195–1201, 2004.

MARTIN, D.L. et al. Regulatory Properties of Brain Glutamate Decarboxylase (GAD): The Apoenzyme of GAD Is Present Principally as the Smaller of Two Molecular Forms of GAD in Brain. **J. Neurosci**, v. 11, p. 2725–2731,1991.

MARTIN, D.L. et al. Cofactor interactions and the regulation of glutamate decarboxylase activity.**Neurochem. Res.**,v.16, p. 243–249, 1991.

MAYER, M.L.; ARMSTRONG, N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 66, p. 161-181, 2004.

MAYER, M.L.; ARMSTRONG, N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 66, p. 161-181, 2004.

McARDLE, W. D.; KATCH, F. I.; KATCH, V. L. Fisiologia do exercício: energia, nutrição e desempenho humano.3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 387, 392-399.

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, p.1007S-1015S, 2000.

MENDONÇA-ACCORSI, D. et al. Synaptic profile of nucleus tractus solitarius neurons involved with the peripheral chemoreflex pathways. **Neuroscience**, v.197, p.107-20, 2011.

MEÑENDEZ-CASTRO, C.; CORDASIC, N.; SCHMID, M. e cols. Intrauterine growth restriction promotes vascular remodelling following carotidartery ligation in rats. **Clinical Science**, v.123, p.437-444, 2012.

MESQUITA, F.F.; GONTIJO J.A.; BOER, P.A. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. **Braz J Med Biol Res** 43, 1010-1018, 2010.

MIFFLIN, S. W., SPYER, K. M. and WITHINGTON-WRAY, D. J. Baroreceptor inputs to the nucleus tractus solitarius in the cat: Postsynaptic actions and the influence of respiration. **Journal of Physiology**,v.399, p.349–367, 1988.

MIFFLIN, S. W. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitarius. **American Journal of Physiology**, v. 263, p. 368–375, 1992.

MOKLER, D.J. et al. Stress-induced changes in extracellular dopamine and serotonin in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus of prenatally malnourished rats. **Brain Research**, v.1148, p.226-233, 2007.

MORGANE, J.P. et al. Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, p. 91-128, 1993.

MORGANE, J.P.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effect of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 26, p. 471-483, 2002.

NAJLERAHIM, A. et al. Distribution of messenger RNAs encoding the enzymes glutaminase, aspartate aminotransferase and glutamic acid decarboxylase in rat brain. **Mol. Brain Res.**, v.7, p.317-333, 1990.

NASCIMENTO E, GUZMAN-QUEVEDO O, DELACOURT N, et al. Long-lasting effect of perinatal exposure to L-tryptophan on circadian clock of primary cell lines established from male offspring born from mothers fed on dietary protein restriction. **PLoS One**, v. 8, 2013.

NAVARRO et al. Prenatal Nutrition and the Risk of Adult Obesity: Long-Term Effects of Nutrition on Epigenetic Mechanisms Regulating Gene Expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 2017.

NAYAK, P.; CHATTERJEE, A.K. Dietary protein restriction causes modification in aluminium-induced alteration in glutamate and GABA system of rat brain. **BMC Neuroscience**, v. 4, p. 4, 2003.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger – **Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NISHI, M. et al. Motoneuron specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. **J. Neurosci.**, v. 21, p. RC185, 2001.

NOGUEIRA, V. et al. Carotid body removal normalizes respiratory frequency and prevents sympathetic overactivity and hypertension in offspring from protein restricted. **Hypertension**, 2018.

OLSEN, R. W.; BETZ, H. GABA and glycine. In: SIEGEL, G. Basic Neurochemistry. Molecular, Cellular and Medical Aspects. **American Society for Neurochemistry**, 2006.

OJEDA, N.B.; GRIGORE, D.; ALEXANDER, B.T. Developmental programming of hypertension: insight from animal models of nutritional manipulation. **Hypertension**, v. 52, p. 44-50, 2008.

PAINTER, R.C. et al. Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. **Am J Clin Nutr**, v. 84, p. 322–327, 2016.

PAOLLETI, P.; NEYTON, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. **Curr Opin Pharmacol**, v.7, n.1, p. 39-47, Feb. 2007.

PAXINOS G, WATSON C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. San Diego, CA: **Academic**, 2007.

PINAL, C. S., CORTESSIS, V. and TOBIN, A. J. **Dev. Neurosci.**, v.19, p. 465–475, 1997.

PETROFF, O.A. GABA and glutamate in the human brain. **Neuroscientist**, v.8, n.6, p. 562-73, 2002.

POWELL, F.L.; MILSOM, W.K.; MITCHELL, G.S. Time domains of the hypoxic ventilatory response. **Respir Physiol**, v. 112, p.123-134, 1998.

PRESTI, C.; SILVA, E.S.; CASTELLI, V. Atualização em cirurgia vascular e endovascular. Rio de Janeiro, **Elsevier**, 2008.

REEVES, PG. et al. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr.**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.

RIDEAU et al. Transcriptomic regulations in oligodendroglial and microglial cells related to brain damage following fetal growth restriction. **Glia**, v.64, p. 2306-2320. 2016.

RIMVALL, K., SHEIKH, S. N. and MARTIN, D. L. . Effects of increased gamma-aminobutyric acid levels on GAD67 protein and mRNA levels in rat cerebral cortex. **J. Neurochem.**, v. 60, p. 714–720, 1993.

RIMVALL, K. and MARTIN, D. L. The level of GAD67 protein is highly sensitive to small increases in intraneuronal gamma-aminobutyric acid levels. **J. Neurochem.**, v. 62, p. 1375–1381, 1994.

RITTER, B.; ZHANG, W. Early postnatal maturation of GABA-mediated inhibition in the brainstem respiratory rhythm-generation network of the mouse. **Eur. J. Neurosci.**, v.12, p.2975-2984, 2000.

ROSEBOOM, T.J. et al. Hungry in the womb: what are the consequences? Lessons from the Dutch famine. **Maturitas**, v. 70, p.141–145, 2011.

ROTTA, L.N. et al. Effects of undernutrition on glutamatergic parameters in rat brain. **Neurochem. Res.**, v.28, p. 1181-1186, 2003.

RUDOLPH, U., MÖHLER, H. Analysis of GABAA receptor function and dissection of the pharmacology of benzodiazepines and general anesthetics through mouse genetics. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 475–498, 2004.

SASAKI, Y.F. et al. Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. **J. Neurophysiol.**, v. 87, p. 2052-2063, 2002.

SCHOUSBOE, A., WAAGEPETERSEN, H.S. Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. **Neurotox Res.** v. 8, p. 221-5, 2005.

SAHEBJAMI, H.; VASSALLO, C. L. Effects of starvation and refeeding on lung mechanics and morphometry. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 119, p. 443-451, 1979.

SILVA, IF. Desnutrição Perinatal e Manipulação Nutricional: Repercussões sobre o sistema respiratório e bioquímico, 53 f., 2016. TCC - (Desnutrição e Fisiologia do Sistema Respiratório), Universidade Federal de Pernambuco-Centro Acadêmico de Vitória.

SONG, G. et al. Hypoxia-excited neurons in NTS send axonal projections to KollikerFuse/parabrachial complex in dorsolateral pons. **Neuroscience**, v. 175, p. 145–153, 2011.

SOGHOMONIAN, J.J. and MARTIN, D. L. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? **TIPS**, v. 19, p. 500-505, Dec, 1998.

STEIGER, J.L. et al. Effects of prenatal malnutrition on GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$  and  $\beta 2$  mRNA levels. **Neuroreport**, v. 13, p. 1731-1735, 2003.

SUN, C. et al. Epigenetic regulation of histone modifications and Gata6 gene expression induced by maternal diet in mouse embryoid bodies in a model of developmental programming. **BMC Dev Biol**, v. 153, 2015.

SZABO, G., et al. **DNA Cell Biol.**, v. 15, p. 1081–109, 1996.

TALMAN, W.T.; PERRONE, M.H. and REIS, D.J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science**, v. 209, p. 813– 815, 1980.

TAYLOR, J.; DOCHERTY, M.; GORDON-WEEKS, P.R. GABAergic growth cones: release of endogenous  $\gamma$ -aminobutyric acid precedes the expression of synaptic vesicles antigens. **J. Neurochem.**, v. 54, p. 1689-1699, 1990.

TAYLOR, J.; GORDON-WEEKS, P.R. Calcium-independent  $\gamma$ -aminobutyric acid release from growth cones: role of  $\gamma$ -aminobutyric acid transport. **J. Neurochem.**, v. 56, p. 273-280, 1991.

TAKAKURA, A.C. et al. GABAergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. **J Neurophysiol.**, v. 98, p. 374-81, 2007.

TELANG, S. et al. Early undernutrition and [<sup>3</sup>H] $\gamma$ -aminobutyric acid binding in rat brain. **J. Neurochem.**, v. 43, p. 640-645, 1984.

TETSUJI, T. et al. Intrathecal P/Q- and R-type calcium channel blockades on spinal substance P release and c-Fos expression. **Neuropharmacology**, 2013.

TONKISS, J., ALMEIDA, S.S., GALLER, J.R. Prenatally malnourished female but no male rats show increased sensitivity to MK-801 in a DRL-task. **Behav. Pharmacol.**, v.9, p. 49-54, 1998.

TRAVAGLI, R.A. et al. Brainstem circuits regulating gastric function. **Annu Rev Physiol.**, v. 68, p.279–305, 2006.

VARJU, P.; KATAROVA, Z.; MANDÁSZ, E.; SZABÓ, G. GABA signaling during development: new data and old questions. **Cell tissue Res.**, v. 305, p. 239-246, 2001.

WELLS, J.C.K. Flaws in the theory of predictive adaptive responses. **Trends in Endocrinology&Metabolism**, v. 18, p. 331-337, 2007.

WESTON, M. et al. Fos expression by glutamatergic neurons of the solitary tract nucleus after phenylephrine-induced hypertension in rats. **J Comp Neurol**, v. 460, p.525–541, 2003.

ZHANG, L. et al. Hypercapnia-induced activation of brainstem GABAergic neurons during early development. **Respir. Physiol. Neurobiol.**, v.136, p. 25-37, 1993.

ZHAO, J., GONZALEZ, F., MU, D. Apnea of prematurity: from cause to treatment. **Eur. J. Pediatr.**, v.170, p.1097–1105, 2011.

YANAGAWA, Y. et al. **Biochem. J.**, v. 326, p.573–578, 1997.

YAZBEK Jr., P. et al. Aspectos propedêuticos no uso da ergoespirometria. **Arq. Bras. Cardiol.**, v.44, n.4, p.291-5. 1985.

WAPNIR, R.A. and LIFSHITZ, F. Fasting-induced hypoglycemia in experimentally malnourished rats. **J. Nutr.**, v.107, p.383-390, 1977.

WATKINS, A.J. et al. Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. **Biol Reprod**, v.78, p.299–306, 2008.

WATKINS, A.J. et al. Maternal low-protein diet during mouse pre-implantation development induces vascular dysfunction and altered renin-angiotensin-system homeostasis in the offspring. **Br J Nutr**, v. 103, p.1762–1770, 2010.

WATKINS, A.J. et al. Maternal periconceptional and gestational low protein diet affects mouse offspring growth, cardiovascular and adipose phenotype at 1 year of age. **PLoS One**, v. 6, 2011.

-WELLS, J.C.K.; STOCK, T.J. Re-examining heritability: genetics, life history and plasticity, **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 22, p.421-426, Out. 2011.

WEST-EBERHARD, M.J. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **J Exp Zool B Mol Dev Evol.**, v. 304, p.610-8, 2005.

WONG-RILEY MT, LIU Q. Neurochemical development of brain stem nuclei involved in the control of respiration. **Respir Physiol Neurobiol**, v.149,p.83-98, 2005.

WONG-RILEY MT, LIU Q. Peripheral–central chemoreceptor interaction and the significance of a critical period in the development of respiratory control. **Respir Physiol Neurobiol**, v.185, p.156-69, 2013.

WU, W.L.; ZISKIND-CONHAIM, L.; SWEET, M.A. Early development of glycine-and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. **J.Neurosci.**, v.12,p.3935-3945, 1992.



## APÊNDICE A - REPERCUSSIONS OF PERINATAL PROTEIN MALNUTRITION ON THE RESPIRATORY PATTERN AND NEUROCHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE NUCLEUS OF THE SOLITARY TRACT OF OFFSPRING OF RATS SUBMITTED TO MODERATE ACUTE HYPOXIA

**Short-title:** Moderate acute hypoxia and neurochemical characterization of the nucleus of the solitary tract

### **Abstract**

The aim of this study was to evaluate ventilatory parameters before and after exposure to moderate acute hypoxia and the level of neuronal activity and neurochemical characterization of neurons of the nucleus of the solitary tract (STN) of offspring from mothers undergoing perinatal protein malnutrition in the perinatal period (gestation and lactation). Wistar rats fed a hypoprotein diet (HP, 8% casein) or a normoprotein diet (NP, 17% casein) during the perinatal period. After weaning, the animals received a commercial diet for the animals of the vivarium (labina), giving rise to 4 experimental groups: NP\_sham (no hypoxia protocol), HP\_sham (hypoxia protocol), HP\_hypoxia (passed through the hypoxia protocol) and NP\_hypoxia (under the hypoxia protocol). On the 1st, 5th, 7th, 14th, 21st and 30th days of life, offspring body weight measurements were performed. At 30 days of life, by plethysmography of the whole body, we assessed the respiratory frequency (RF), tidal volume (VT) and pulmonary ventilation (VE) before and after exposure to moderate acute hypoxia (10% O<sub>2</sub>). After the hypoxia procedure, transcardiac perfusion was performed. Afterwards, the brains were removed and cryosected to observe the level of neuronal activity and the number of active neurons in the STN from the immunofluorescence technique. The results are expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). The comparison between the groups before and after exposure to hypoxia at the three moments of exposure (absolute and delta values) was assessed by repeated two-way analysis of variance (ANOVA). Expression of c-Fos protein and GAD65 enzyme was evaluated by one-way ANOVA. When necessary, we use the Bonferroni post-test. The significance level considered was  $p < 0.05$ . The protocols were accepted by CEUA / UFPE (23076.041292 / 2017-17). When we verified the values of  $\Delta$ , the values corresponding to the 1st moment of exposure were similar between the groups for

both: RF, VT and VE. Regarding the second moment of exposure, again no significant differences were observed between groups in the three ventilatory variables. As for the  $\Delta$ RF values at the 3rd moment of exposure, the animals had higher values when compared to the control group. Both in relation to tidal volume and pulmonary ventilation, there were no differences between groups. Regarding the expression of Fos protein in the rostral STN, NP\_sham animals present higher values when compared to NP-hypoxia and HP-hypoxia groups. The HP\_sham group exhibited higher values in relation to the NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups. The same was observed in relation to the number of cells marked by the enzyme GAD65. Regarding the intermediate STN, we observed that the animals of the NP\_hypoxia group presented higher values of expression of both Fos protein and GAD65 enzyme when compared to the groups that were not submitted to hypoxia. The same finding occurred in relation to the HP hypoxia group, which presented higher expression values of both Fos protein and GAD65 enzyme when compared to groups that were not submitted to hypoxia. At the STN caudal, HP\_sham presented substantially higher values of both Fos protein and GAD65 enzyme expression when compared to the NP\_sham, NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups. In addition, when compared to the NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups, the NP\_sham group also had lower expression values for both Fos protein and GAD65 enzyme. In this subnucleus it was also verified that the NP-hypnoxy group exhibited greater expression of Fos protein and the enzyme GAD65 in relation to the HP-hypoxia group. HP animals presented lower body weight when compared to NP animals. In conclusion, we suggest that perinatal protein malnutrition is capable of causing changes in the maturation of the respiratory system, as evidenced by the reduction of RF in the first weeks of postnatal life and an increase in RF at 30 days of life. In addition, we suggest that malnourished animals have an increase in O<sub>2</sub> chemosensitivity due to changes in neurotransmission, but not due to the reduction in GABAergic neurotransmission.

**Key words:** Protein malnutrition. Hypoxia. Respiratory system.

## 1 Introduction

It has been widely reported in the literature that maternal protein malnutrition during the perinatal period causes delayed fetal development and may predispose these individuals to the appearance of cardio-metabolic diseases, including systemic arterial hypertension (1-4). In this sense, nutritional deficiency during critical periods of development promotes changes in the fetal environment (a process of metabolic programming with the purpose of increasing the chances of survival of the fetus and in postnatal life) that can trigger genetic alterations and maturation and development of fetal organs and systems, leading to functional deficiencies, including ventilatory changes.

Studies by Brito-Alves et al. (2,5) showed that animals from mothers who suffered perinatal protein malnutrition and received a standard diet for animals after weaning had a higher chemosensitivity to O<sub>2</sub> in situations of hypoxia (7-10% O<sub>2</sub>) presenting cardiovascular responses and exacerbated respiratory symptoms (increased blood pressure and pulmonary ventilation) at 30 days. A recent study by NOGUEIRA et al. (2018) shows that young animals from mothers who suffered protein restriction in the gestation and lactation period present greater neuronal activation in key regions of respiratory control, such as the retrotrapezoid nucleus. However, it is not yet clear which neurotransmitters are involved in these responses.

In view of such evidence, our working hypothesis is that animals that were submitted to perinatal malnutrition would present an alteration in the neurochemical development of GABAergic neurons located in the STN, which are responsible for integrating the cardiorespiratory responses. In addition, this change would lead to changes in respiratory pattern as well as chemosensitivity to O<sub>2</sub>, contributing to a higher respiratory rate.

## **2 Materials and Methods**

The protocols and experimental procedures were approved by the Animal Use Ethics Committee of the Biological Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (UFPE) (23076.041292 / 2017-17).

## 2.1 Animals

An amount of 12 virgin Wistar female rats (*Rattus norvegicus*) was obtained from the vivarium of the Academic Center of Vitória of the Federal University of Pernambuco. The animals were kept in collective cages at controlled temperature ( $22 \pm 18^{\circ} \text{C}$ ) with a controlled light-dark cycle (dark from 6:00 p.m. to 6:00 p.m.). A standard diet for laboratory animals and water were given ad libitum (52% carbohydrate, 21% protein and 4% lipids - Labina; Purina Agriband). The mating occurred in the ratio of 1: 2 (two females to one male). The presence of spermatozoa in the vaginal smear was used to define the first day of pregnancy. From the determination of pregnancy, the pregnant rats were placed in individual cages and randomly assigned to two groups ( $n = 5$  animals / group): NP group, which received normoprotein diet (NP, 17% casein) throughout the gestation (approximately 21 days) and lactation (21 days); and HP group, which received hypoproteic ration (HP, 8% casein) throughout the gestation period (approximately 21 days) and lactation (21 days) and normoprotein (17% casein). The diets were carried out at the Laboratory of Experimental Nutrition - CAV of the Federal University of Pernambuco, according to the American Institute of Nutrition - (AIN-93) (6). The casein used to make the diets contained 85% purity (85 g protein per 100 g casein). Diets were isocaloric and only the amount of protein was altered (Table 1). Offspring from these females were reduced to 8 males per litter. After weaning (from the 22nd day of life), the animals were subdivided into 4 experimental groups according to the diet received in the post-weaning period: NP.sham, which received NP diet during the perinatal period and after weaning until the 30 days of life received commercial diet for animals of the vivarium and that did not undergo the protocol of hypoxia; HP.sham, who received HP diet during the perinatal period and after weaning until the 30 days of life received a commercial diet for animals of the vivarium that did not undergo the hypoxia protocol; NP.hypoxia, who received NP diet during the perinatal period and after weaning until the 30 days of life received commercial diet for livestock animals and was submitted to moderate acute hypoxia; and HP.hipoxia, who received HP diet during the perinatal period and after weaning until the 30 days of life received commercial diet for livestock animals and was submitted to moderate acute hypoxia. After weaning, the parents were euthanized by an anesthetic overdose (sodium pentobarbital, 40mg / kg). In

addition, the offspring of females were also euthanized with an anesthetic overdose. If the litter presented less than 8 male rats, females were used to standardize the size of the litter. Functional studies were performed on the 30th day of life.

## **2.2 Measures of pulmonary ventilation**

On the 30th day of life, the animals were submitted to evaluations of the ventilation obtained by plethysmography of whole body, in a closed system. The animal was placed into a plethysmography box with a volume of 5 liters and underwent a 30 minute acclimation period in which humidified air (21% O<sub>2</sub>) circulated and maintained at 25 ° C. During each ventilation measurement, the airflow was interrupted and the chamber of the animal remained fully sealed for short periods (~ 3min). The oscillations caused by ventilation were captured by the spirometer and signal amplifier (ML141 spirometer, PowerLab, ADInstruments) (7). Three respiratory variables were determined: respiratory rate (RR), tidal volume (VT) and pulmonary ventilation (LV), the latter two calculated using the previously described formula (5).

## **2.3 Evaluation of ventilatory responses induced by moderate acute intermittent hypoxia (10% O<sub>2</sub>)**

At the 30 th day of life, after the acclimation period, the animals were submitted to hypoxia (10% O<sub>2</sub>) for 10 minutes. For this, the chamber was vented with a moistened standard gas mixture containing 10% O<sub>2</sub>. Evaluation of neuronal activity during hypoxia (by immunoactivity at c-Fos) and characterization of gabaergic neurons (GAD65) from the nucleus of the solitary tract.

## **2.4 Evaluation of neuronal activity during hypoxia (by immunoactivity at c-Fos) and characterization of gabaergic neurons (GAD65) from the nucleus of the solitary tract**

After 10 minutes of exposure to the hypoxic gaseous mixture (described previously, item 4.5), the animals went through a period of 30 minutes in normoxia and then a new period of 10 minutes in hypoxia. This protocol is sufficient to induce hypoxia-sensitive respiratory neural network activation, as well as its identification (19).

After the hypoxia procedure described above, the animals were anesthetized with pentobarbital (50 mg / kg, ip) for transcardiac perfusion. During the infusion, a solution of PBS (buffered saline) and then a 4% PFA (paraformaldehyde) fixative solution was used. Then, the brains were removed from the skull and postfixed in a 4% PFA fixative solution for 4-6 hours. Then, the previous solution was changed to another, the sucrose base (30%) in which the encephals remained for 48 hours. Subsequently, frozen brains were cryosected in coronal sections of 25  $\mu$ m thickness using a cryostat (Leica CM1850).

Coronal sections of a series were removed from the anti-freeze solution and incubated in solution with primary anti-Fos antibodies (made in rabbit) for 48 h. Subsequently, the immunofluorescence reaction was performed for 5 minutes as described by Nogueira et al. (17). The identification of the nuclei studied was performed with the aid of microscopy and the atlas Paxinos and Watson (20). GABA: For the labeling of GABAergic neurons, glutamate decarboxylase (GAD, subunit 65) was labeled as previously described by Takakura et al. (21).

## **2.5 Body Weight Measurements**

Puppy body weight measurements were obtained using an analytical digital scale accurate to 0.1 g (AS 5000c). Weights were obtained on the 1st, 5th, 7th, 14th, 21st and 30th days of life.

## **2.6 Statistical analysis**

The results are expressed as mean  $\pm$  SEM (standard error of the mean). The comparison between the groups before and after exposure to hypoxia at the three moments of exposure (absolute and delta values) was assessed by repeated two-way analysis of variance (ANOVA). Expression of c-Fos protein and GAD65 enzyme was evaluated by one-way ANOVA. When necessary, we used the Bonferroni post-test. The significance level considered was  $p < 0.05$ .

## **3 Results**

When we verified the values of  $\Delta$ , the values corresponding to the 1st moment of exposure were similar between the groups for both FR, VT and VE ( $\Delta$ FR: NP.hypoxia: 33.17 vs. HP.hypoxia: 42.81  $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VT: NP.hypoxia:

4,198 vs HP.hypoxia: 6,008  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VE: NP.hypoxia: 3328 vs HP.hypoxia: 1607  $n=5$  mL.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) (**Figures 1, 2 and 3**).

Regarding the second time of exposure, there were no significant differences between groups in the three ventilatory variables ( $\Delta$ FR: NP.hypoxia: 39.22 vs HP.hypoxia: 46.35  $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VT: NP.hypoxia: 3.785 vs HP.hypoxia: 5.031  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VE: NP.hypoxia: 790.7 vs HP.hypoxia: 1211  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) (**Figures 1, 2 and 3**).

As for the  $\Delta$ FR values at the 3rd moment of exposure, the animals presented higher values when compared to the control group (NP.hypoxia: 29.82 vs. HP.hypoxia: 66.92  $n=5$  resp.min<sup>-1</sup>) (**Figure 1**). As for tidal volume and pulmonary ventilation, there were no differences between groups ( $\Delta$ VT: NP.hypoxia: 4,231 vs. HP.hypoxia: 0.8455  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>;  $\Delta$ VE: NP.hypoxia: 4853 vs. HP. hypoxia: 1131  $n=5$  mL.Kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) (**Figures 2 and 3**).

In relation to the neuronal activity in the rostral STN, quantified by the expression of the Fos protein, NP\_sham animals present higher values when compared to the groups NP\_hypoxia and HP\_hypoxia. The HP\_sham group exhibited higher values in relation to the NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups. The same was observed for the number of cells labeled by the enzyme GAD65 (predictor of GABA activity). The number of active cells expressing the GAD65 enzyme and expressing Fos protein was 76% in the NP\_sham group; of 98.6% in the HP\_sham group; 97.8% in the NP hypoxia group, and 100% in the HP hypoxia group (**Figures 4.A, 4.B, 4.C, 4.D, 4.E, 4.F and 4.G**).

With respect to the STN intermediate, we observed that the animals of the NP hypothyroid group presented higher values of expression of both Fos protein and GAD65 enzyme when compared to groups that did not undergo hypoxia (NP\_sham and HP\_sham). The same finding occurred in relation to the HP hypoxia group, which presented higher expression values of both Fos protein and GAD65 enzyme when compared to the groups that were not submitted to hypoxia (NP\_sham and HP\_sham). The number of active cells expressing the GAD65 enzyme expressing Fos protein corresponded to 73.7% in the NP\_sham group; of 40% in the HP\_sham group; 100% in the NP hypoxia group, and 97.2% in the HP hypoxia group (**Figures 5.A, 5.B, 5.C, 5.D, 5.E, 5.F and 5.G**).

Interestingly in the caudal STN, we observed that the HP\_sham group had substantially higher values of both Fos protein and GAD65 enzyme expression when compared to the NP\_sham, NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups. In addition, when compared to the NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups, the NP\_sham group also had lower expression values for both Fos protein and GAD65 enzyme. In this subnucleus it was also verified that the NP-hypoxia group exhibited greater expression of Fos protein and the enzyme GAD65 in relation to the HP-hypoxia group. The number of active cells expressing the GAD65 enzyme expressing Fos protein was 100% in the NP\_sham group; of 100% in the HP\_sham group; 100% in the NP hypoxia group, and 90.9% in the HP hypoxia group (**Figures 5.A, 5.B, 5.C, 5.D, 6.A, 6.B and 6.C**).

Regarding body weight, on the first day of life (NP:  $6.507 \pm 0.2638$  n = 11 vs. HP:  $5.893 \pm 0.1131$  n = 11 g) there was significant variation between groups, in which the HP group had a lower body weight compared the NP. On the 5th day of life there were no significant differences between groups (NP:  $12.50 \pm 0.4195$  n = 11 vs. HP:  $9.768 \pm 0.2870$  n = 8 g). However, from day 7 (NP:  $15.09 \pm 0.8047$  n = 11 vs. HP:  $12.88 \pm 0.2942$  n = 8 g) it is possible to observe again a reduction in the weight of HP animals compared to the control group extending to the 30 days of life (14<sup>o</sup>: NP:  $35.08 \pm 0.6576$  n = 18 vs. HP:  $19.35 \pm 0.6193$  n = 14; 21<sup>o</sup>: NP:  $42.06 \pm 3.091$  n = 18 vs. HP:  $28.02 \pm 1.105$  n = 14 30<sup>o</sup>: NP:  $94.15 \pm 1,868$  n = 18 vs. HP:  $62.65 \pm 1,599$  n = 11 g) (**Figure 7**).

#### 4 Discussion

Previous studies from our laboratory have shown that animals from malnourished mothers present a reduction in RF from the 5th to the 14th day of life and at the 30th day of life (when the animals leave a hypoprotein diet to consume a standard diet for livestock animals ) show a sudden increase in RF. From these results, the present study aimed to evaluate the effects of a hypoprotein, normoprotein or post-weaning diet on the respiratory pattern of Wistar rats from rats submitted to protein malnutrition during gestation and lactation.

As well as Gressens et al. (8), we analyzed the early response to hypoxia comparing the two periods before and after the onset of the stimulus (pre and post factor), which in our study corresponds to the value of  $\Delta$ . Corroborating this study,



at the third moment of exposure, the animals malnourished during the perinatal period (HP\_hypoxia group) presented an increase in RF compared to the control group (NP\_hypoxia). In addition, we observed that the late response to hypoxia (here understood as the response at the third time of exposure), is characterized by a reduction of VE in the malnourished group, as well as a trend of reduction in VT in the same group. These results suggest the existence of some abnormality in inhibitory synaptic neurotransmission.

It has been suggested that acute intermittent hypoxia is capable of modifying plasticity in the respiratory system, leading to an increase in compensatory ventilation soon after the end of the hypoxic stimulus (LTF) (9-11). The expression of ventilatory LTF in animals submitted to hypoxia is associated with an increase in inspiratory motor activity and it has been proposed by several studies that such alteration would be related to the increase in VT (11-13).

Lemes et al., (14) in studies with nonanesthetized rats submitted to severe acute intermittent hypoxia (10 episodes of hypoxia of 2 minutes at a concentration of 6% of O<sub>2</sub> interspersed with 5 minutes of normoxia), verified that from 15 minutes after exposure to acute intermittent hypoxia there was a reduction in inspiratory time in in situ preparations, which may directly affect the activity of the phrenic nerve (the main nerve responsible for inspiration) and which is also ultimately reflected in the VT values, since the VT corresponds to the volume of inspired and expired air. Like the VT values presented by the HP group in relation to NP, we suggest that especially in the inspiratory phase, malnourished animals present alterations due to plasticity of the respiratory system.

Recent studies have indicated that LTF is higher in 1-month-old rats compared to 2-month-old rats, indicating that younger animals may have an increased capacity for induction of HI hepatic plasticity (15). In view of the above, it is suggested that the age factor is of paramount importance for understanding the effects of LTF induced by intermittent hypoxia. Similar to that observed in our study, besides the animals that were submitted to acute intermittent hypoxia were young (1 month of life), we believe that the diet low in protein also contributed significantly to the ventilatory plasticity presented by the animals of the HP group, both due to changes in O<sub>2</sub> chemosensitivity and neurochemical changes.

In order to verify if the changes in the respiratory rhythm are actually associated to neurochemical alterations, mainly of inhibitory character, we performed the double marking of neuronal cells in the three subnuclei of the STN (rostral STN, intermediate STN and caudal STN) in relation to the expression of neural activity (Fos protein) and the expression of the enzyme GAD65 (GABA inhibitory neurotransmitter synthesis limiting enzyme).

We observed that animals submitted to moderate acute intermittent hypoxia (10% O<sub>2</sub>) exhibited lower levels of Fos protein expression and GAD65 enzyme in the rostral and caudal STN sub-nuclei compared to groups that did not undergo hypoxia. However, with respect to the intermediate sub-nucleus of the STN, the animals submitted to hypoxia showed higher expression of Fos protein and the enzyme GAD65. The hypoproteic diet was able to elucidate significant alterations in neurotransmission of inhibitory character, considering the behavior observed among the experimental groups in the three NTS subnuclei studied.

After exposure to chronic hypoxia at 30% O<sub>2</sub> for 9 days, Chung, Ivy and Reid (16), demonstrated that Sprague-Dawley rats exhibited changes in GABA-mediated neurotransmission in the caudal STN (caudal STN) region. These animals demonstrated a reduction of VT and RF mediated by the action of bicuculin (GABAergic GABAA receptor antagonist). This fact supports the assertion that the inhibitory neurotransmitter GABA released in the caudal NTS is involved in the ventilatory response to hypoxia, leading to the reflex response to hypoxia (VT increase). As demonstrated primarily by the animals of the HP-hypoxia group, we suggest that the reduction of inhibitory neurotransmission induced by GABA in the caudal NTS (observed from the analysis of the expression of Fos and GAD65), would be the cause for the behavior of these animals in relation to the VT variables and VE after exposure to hypoxia.

Rett syndrome, a neurological disorder caused by mutations of loss of function in the X-linked gene that encodes the epigenetic regulator Mecp2 (methyl-CpG binding protein 2) and among other symptoms causes respiratory disorders such as hyperventilation, has been targeted of experimental studies over time. Considering the relationship of STN with respiratory modulation, in addition to the role of GABAergic neurotransmission reduction in respiratory imbalance in Rett

Syndrome, Chen et al. (2017) when performing studies with *Mecp2* knockout mice suggest that the respiratory dysfunction affecting patients would be mediated by an imbalance in the neurotransmission of GABA in the STN. As previously observed, malnourished animals presented an increase in RF (due to hyperventilation) at 30 days of life before and after exposure to hypoxia. Such findings support once again the hypothesis that an instability in inhibitory neurotransmission in STN, predominantly GABAergic, would be linked to the respiratory behavior observed in our experimental model.

In addition to hypoxia (chronic and acute), another stimulus is also capable of causing changes in the neuronal activity of brain nuclei responsible for cardiorespiratory control. Exposure to hypercapnia (increase in CO<sub>2</sub> concentration) has been studied in several experimental models (17-18). Differently from that observed by Nogueira et al. (17), who observed an increase in neuronal activity in the retrotrapezoid nucleus of rats submitted to perinatal protein malnutrition after exposure to hypercapnia, we observed that malnourished animals submitted to hypoxia (HP\_hypoxia) had lower levels of neuronal activity and neurotransmission of inhibitory mediated by GABA in the NTS caudal.

Body weight is a direct indicator of nutritional status, reflecting the individual's diet. Through the body weight samples obtained from the puppies of both NP and HP groups, we found that the HP animals had a low weight on the first day of life (24h after birth), corroborating with MENENDEZ-CASTRO et al., 2012. These our results suggest that the malnutrition model used was able to change weight in the first days of life. From the 7th day of life, it is possible to observe that HP animals show a gradual reduction in body weight. It has been portrayed in models of malnutrition that the difference in body weight of PH in relation to the control group becomes more pronounced from the first week after birth (23;24) as seen in our experimental model.

## **5 Conclusion**

In view of the analysis of our results, it is possible to conclude that perinatal protein malnutrition is capable of causing changes in the maturation of the respiratory system, as evidenced by the reduction of RF in the first weeks of postnatal life and an increase in RF at 30 days life. In addition, we suggest that malnourished animals have an increase in O<sub>2</sub> chemosensitivity due to changes in

neurotransmission, but not due to the reduction in GABAergic neurotransmission. To elucidate which neurotransmitter involved in reducing neuronal activity in these animals, further studies are needed.

## References

1. Ojeda NB, Grigore D, Alexander BT. Developmental programming of hypertension: insight from animal models of nutritional manipulation. *Hypertension*. 2008;52(1):44-50. Epub 2008/05/14.
2. de Brito Alves JL, Nogueira VO, Cavalcanti Neto MP, Leopoldino AM, Curti C, Colombari DS, et al. Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. *J Nutr*. 2015;145(5):907-14. Epub 2015/05/03.
3. Costa-Silva JH, de Brito-Alves JL, Barros MA, Nogueira VO, Paulino-Silva KM, de Oliveira-Lira A, et al. New Insights on the Maternal Diet Induced-Hypertension: Potential Role of the Phenotypic Plasticity and Sympathetic-Respiratory Overactivity. *Front Physiol*. 2015;6:345. Epub 2015/12/05.
4. Costa-Silva JH, Simoes-Alves AC, Fernandes MP. Developmental Origins of Cardiometabolic Diseases: Role of the Maternal Diet. *Front Physiol*. 2016;7:504. Epub 2016/12/03.
5. de Brito Alves JL, Nogueira VO, de Oliveira GB, da Silva GS, Wanderley AG, Leandro CG, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br J Nutr*. 2014;111(4):606-15. Epub 2013/09/26.
6. REEVES PGN, F.H. and 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. *The Journal of Nutrition*. 1993;123(11):1939-51.
7. Malan A. Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. *Respiration Physiology*. 1973;17:32-44.
8. Pierre Gressens SvMM, Leslie Besse, Elise Nsegbe, Jorge Gallego,, Bertrand Delpech CG, Philippe Evrard, Jean-Marie Ketelslegers,, Maiter. D. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. *Developmental Brain Research*. 1997;103:21–35.
9. Valic M, Pecotic R, Pavlinac I, Valic Z, Peros K, Dogas Z. Microinjection of methysergide into the raphe nucleus attenuated phrenic long-term facilitation in rats. *Exp Brain Res*. 2010;202(3):583-9. Epub 2010/01/21.
10. Pavlinac I, Pecotic R, Dogas Z, Valic M. Role of 5-HT(1)(A) receptors in induction and preservation of phrenic long-term facilitation in rats. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;175(1):146-52. Epub 2010/11/03.
11. Mitchell GS, Tracy L. Baker, Steven A. Nanda, David D. Fuller, Andrea G. Zabka, Brad A. Hodgeman, Ryan W. Bavis, Kenneth J. Mack, and E. B. Olson, Jr. Invited Review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity. *Journal Applied of Physiology*. 2001;90:2466–75.

12. Mahamed S, Mitchell GS. Is there a link between intermittent hypoxia-induced respiratory plasticity and obstructive sleep apnoea? *Exp Physiol*. 2007;92(1):27-37. Epub 2006/11/14.
13. Baker-Herman TL, Strey KA. Similarities and differences in mechanisms of phrenic and hypoglossal motor facilitation. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;179(1):48-56. Epub 2011/07/13.
14. Lemes EV. CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS INDUZIDAS PELA HIPÓXIA INTERMITENTE AGUDA E PARTICIPAÇÃO DOS MECANISMOS SEROTONINÉRGICOS DA SUPERFÍCIE VENTRAL DO BULBO: Universidade Federal de Santa Catarina; 2014.
15. McGuire, M.; Ling, L. Ventilatory long-term facilitation is greater in 1-month- versus 2-month-old awake rats. *J. Appl. Physiol.*, 2004; 98:1195–1201.
16. Chung, S. Ivy, G.O. and Reid, S.G. GABA-mediated neurotransmission in the nucleus of the solitary tract alters resting ventilation following exposure to chronic hypoxia in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* , 2006; 291:1449–1456.
17. Nogueira ,V. et al. Carotid body removal normalizes respiratory frequency and prevents sympathetic overactivity and hypertension in offspring from protein restricted. *Hypertension*, 2018.
18. Zhang, L. et al. Hypercapnia-induced activation of brainstem GABAergic neurons during early development. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 1993; 136: 25-37.
19. King, T.L. et al. Hypoxia activates nucleus tractus solitarii neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2012; 302: 1219-32.
20. Paxinos, G. and Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, CA: Academic, 2007.
21. Takakura, A.C. et al. gabaergic pump cells of solitary tract nucleus innervate retrotrapezoid nucleus chemoreceptors. *J neurophysiol.*, 2007; 98: 374-81.
22. Nascimento E, Guzman-Quevedo O, Delacourt N, et al. Long-lasting effect of perinatal exposure to L-tryptophan on circadian clock of primary cell lines established from male offspring born from mothers fed on dietary protein restriction.. *PLoS One*. 2013;8(2):e56231.
23. Meñendez-Castro, C.; Cordasic, N.; Schmid, M. e cols. Intrauterine growth restriction promotes vascular remodelling following carotid artery ligation in rats. *Clinical Science*, 123, 437-444, 2012.
24. Alves A.P., Dâmaso, A.R., Dal Pai, V. Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal sobre morfologia, a diferenciação e o metabolismo do tecido muscular esquelético em ratos. *Jornal de Pediatria*. 2008;Vol. 84, Nº 3.

## TABLES

**Table 1.** Nutritional Composition of the experimental diets (g/100g diet)

Nutrient	Normal protein (17% protein) <sup>1</sup>	Low protein (8% protein)
Casein (85%)*	20	9.41
Dextrin cornstarch	13.2	13.2
Cellulose	5	5
Sucrose	10	10
Cornstarch	39.74	50.34
Soybean oil	7	7
Choline	0.25	0.25
Methionine	0.3	0.3
Vitamin mix	1	1
Mineral mix	3.5	3.5
Energy density (kJ/g)	16.26	16.26

\* The casein used in preparation of diet was 85% pure.

<sup>1</sup> Based on AIN-93 standard diet.

## FIGURE LEGENDS

Figure 1. **Delta of RF before and after exposure to hypoxia.** Values of  $\Delta$  corresponding to the respiratory frequency (RF) of the offspring of rats from mothers who received normoprotein (NP-17% protein) or hypoprotein (HP-8% protein) diet during gestation and lactation) and commercial diet for animals (laboratory) after weaning (21 days) until 30 days of age.

Figure 2. **Delta of VT before and after exposure to hypoxia.** Values of  $\Delta$  corresponding to tidal volume (VT) of the offspring of rats from mothers who received normoprotein (NP-17% protein) or hypoprotein (HP-8% protein) diet during gestation and lactation) and commercial diet for animals (laboratory) after weaning (21 days) until 30 days of age.

Figure 3. **Delta of LV before and after exposure to hypoxia.** Values of  $\Delta$  corresponding to the pulmonary ventilation (LV) of the offspring of rats from mothers

who received normoprotein (NP-17% protein) or hypoprotein (HP-8% protein) diet during pregnancy and lactation) and commercial diet for animals (laboratory) after weaning (21 days) until 30 days of age.

Figure 4.A. **Photomicrographs representative of the rostral NTS of the NP\_sham group.** Representative photomicrographs of Fos protein expression (wavelength 488, green coloration), GAD65 enzyme (wavelength 546, red staining) and merge (Fos + GAD65) in the rostral NTS of the NP\_sham group, which received NP diet during gestation and lactation and standard diet for animals from weaning after weaning until 30 days and were submitted to transcardiac perfusion surgery only. To the right, a representative photo of the Atlas Paxinos and Watson (21) corresponding to the stereotactic coordinates of the photomicrographs. The areas close to the magnocellular nucleus (PrMC), were considered rostral NTS (SolDM, SolGL, SolIL, SolL and SolV).

Figure 4.B. **Photomicrographs representative of the Rostral NTS of the HP\_sham group.** Representative photomicrographs of the Fos protein expression (wavelength 488, green color), enzyme GAD65 (wavelength 546, red staining) and merge (Fos + GAD65) in rostral NTS of HPsham group, which received HP diet during gestation and lactation and standard diet for animals from weaning after weaning until 30 days and were submitted to transcardiac perfusion surgery only. To the right, a representative photo of the Atlas Paxinos and Watson (21) corresponding to the stereotactic coordinates of the photomicrographs. The areas close to the Z (Z) nucleus and medial vestibular nucleus (MVe) were considered rostral NTS (SolDM, SolGL, SolIL, SolL and SolV).

Figure 4.C. **Photomicrographs representative of the rostral NTS of the NP\_hypoxia group.** Representative photomicrographs of Fos protein expression (wavelength 488, green color), enzyme GAD65 wavelength 546, red color) and merge (Fos + GAD65) in the rostral NTS of the NP\_hypoxia group, which received NP diet during gestation and lactation and standard diet for weaning animals after weaning up to 30 days and were exposed to moderate acute intermittent hypoxia (10% O<sub>2</sub>). To the right, a representative photo of the Atlas Paxinos and Watson (21) corresponding to the stereotactic coordinates of the photomicrographs. The areas

close to the opening of the fourth ventricle (4V) were considered rostral NTS (SolCe, SolDL, SolG, SolI, SolIM, SolV and SolVL).

**Figure 4.D. Photomicrographs representative of the rostral NTS of the HP\_ hypoxia group.** Representative photomicrographs of the Fos protein expression (wavelength 488, green color), enzyme GAD65 wavelength 546, red color) and merge (Fos + GAD65) in the rostral NTS of the HP hypoxia group receiving HP diet during gestation and lactation and diet standard for experimental animals after weaning until 30 days and were exposed to moderate acute intermittent hypoxia (10% O<sub>2</sub>). To the right, a representative photo of the Atlas Paxinos and Watson (21) corresponding to the stereotactic coordinates of the photomicrographs. The areas close to the dorsal motor nucleus of the vagus (10N) and the opening of the fourth ventricle (4V) were considered rostral NTS (SolCe, SolDL, SolG, SolI, SolIM, SolVL and SolV).

**Figure 4.E. Representative photomicrographs of Fos protein expression in rostral NTS.** Photomicrographs representative of the Fos protein expression (wavelength 488, green color) in the rostral NTS of the NP\_sham, HP\_sham, NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups at 30 days of age.

**Figure 4.F. Representative photomicrographs of GAD65 enzyme expression in rostral NTS.** Photomicrographs representing the expression of the enzyme GAD65 (wavelength 546, red color) in the rostral NTS of the NP\_sham, HP\_sham, NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups at 30 days of age.

**Figure 4.G. Number of active cells in rostral NTS. Number of cells active in rostral NTS** after exposure to 10% O<sub>2</sub> hypoxia (NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups) or who underwent transcatheter perfusion surgery (NP\_sham and Hp\_sham groups) of offspring from mothers receiving normoprotein diet (NP- 17% of protein) or hypoproteic (HP-8% of protein) during gestation and lactation) and commercial diet for animals from weaning (labina) after weaning (21 days) until 30 days of life. \* Values are statistically different between groups (p <0.0001, One-Way ANOVA Test).

**Figure 5.A. Photomicrographs representative of the intermediate and caudal NTS of the NP\_sham group.** Representative photomicrographs of Fos



protein expression (wavelength 488, green coloration), GAD65 enzyme (wavelength 546, red staining), and merge (Fos + GAD65) of the NTS intermediate and NTS caudal of the NP\_sham group, which received NP diet during gestation and lactation and standard diet for animals from weaning after weaning until 30 days and were submitted to transcardiac perfusion surgery only. To the right, a representative picture of the Atlas Paxinos and Watson (21) corresponding to the stereotactic coordinates of the photomicrographs. The areas near the postrema area (PA) were considered NTS intermediate (SolM) and the areas near the central aqueduct (CC) were considered NTS caudal (SolC).

**Figure 5.B. Photomicrographs representative of the intermediate and caudal NTS of the HP\_sham group.** Representative photomicrographs of Fos protein expression (wavelength 488, green color), enzyme GAD65 (wavelength 546, red staining), and merge (Fos + GAD65) of the NTS intermediate and NTS caudal of the HPsham group, which received HP diet during gestation and lactation and standard diet for animals from weaning after weaning until 30 days and were submitted to transcardiac perfusion surgery only. To the right, a representative picture of the Atlas Paxinos and Watson (21) corresponding to the stereotactic coordinates of the photomicrographs. The areas close to the opening of the Óbex were considered NTS caudal (SolC) and the areas close to the NTS caudal (SolC) were considered intermediate NTS (SolM).

**Figure 5.C. Photomicrographs representative of the intermediate and caudal NTS of the NP\_hypoxia group.** Representative photomicrographs of Fos protein expression (wavelength 488, green staining), GAD65 enzyme (wavelength 546, red staining), and merge (Fos + GAD65) of the NTS intermediate and flow NTS of the NP\_hypoxia group, which received NP diet during gestation and lactation and standard diet for weaning animals after weaning until 30 days and were submitted to moderate acute intermittent hypoxia (10% O<sub>2</sub>). To the right, a representative picture of the Atlas Paxinos and Watson (21) corresponding to the stereotactic coordinates of the photomicrographs. The areas near the postrema area (PA) were considered NTS intermediate (SolM) and the areas near the central aqueduct (CC) were considered NTS caudal (SolC).

**Figure 5.D. Photomicrographs representative of the intermediate and caudal NTS of the HP\_hypoxia group.** Photomicrographs representing the expression of Fos protein (wavelength 488, green staining), GAD65 enzyme (wavelength 546, red staining) and merge (Fos + GAD65) of the NTS intermediate and NTS caudal of the HP hypoxia group, which received HP diet during gestation and lactation and standard diet for weaning animals after weaning until 30 days and were submitted to moderate acute intermittent hypoxia (10% O<sub>2</sub>). To the right, a representative photo of the Atlas Paxinos and Watson (2007) corresponding to the stereotactic coordinates of the photomicrographs. The areas near the postrema area (PA) were considered NTS intermediate (SolM) and the areas near the central aqueduct (CC) were considered NTS caudal (SolC).

**Figure 5.E. Representative photomicrographs of Fos protein expression in the NTS intermediate.** Photomicrographs representative of Fos protein expression (wavelength 488, green color) in the NTS intermediate of the NP\_SHAM, HP\_sham, NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups at 30 days of life.

**Figure 5.F. Representative photomicrographs of the expression of GAD65 enzyme in the NTS intermediate.** Photomicrographs representing the expression of the enzyme GAD65 (wavelength 546, red staining) in the NTS intermediate of the NP\_sham, HP\_sham, NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups at 30 days of age.

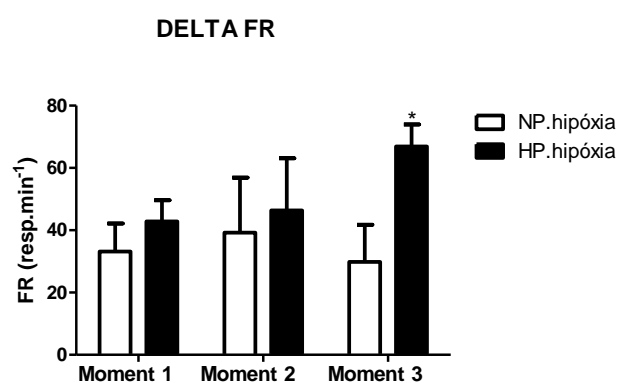
**Figure 5.G. Number of active cells in the NTS intermediate.** Number of cells active in the NTS intermediate after exposure to 10% O<sub>2</sub> hypoxia (NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups) or who underwent transcardiac perfusion surgery (NP\_sham and Hp\_sham groups) of offspring from mothers receiving a normoprotein diet (NP- 17% of protein) or hypoproteic (HP-8% of protein) during gestation and lactation) and commercial diet for animals from weaning (labina) after weaning (21 days) until 30 days of life. \* Values are statistically different between groups (p <0.0001, One-Way ANOVA Test).

**Figure 6.A. Representative photomicrographs of Fos protein expression in caudal NTS.** Representative photomicrographs of Fos protein expression (wavelength 488, green color) in the NTS caudal of the NP\_sham, HP\_sham, NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups at 30 days of life.

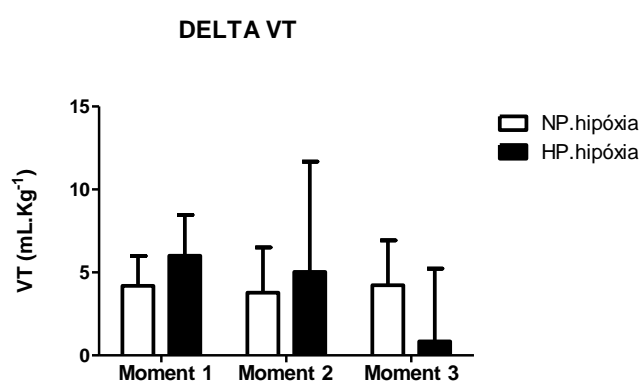
Figure 6.B. **Representative photomicrographs of the expression of GAD65 enzyme in the caudal NTS.** Photomicrographs representative of the expression of the enzyme GAD65 (wavelength 546, red color) in the NTS caudal of the NP\_SHAM, HP\_sham, NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups at 30 days of life.

Figure 6.C. **Number of active cells in the NTS caudal.** Number of active cells in the NTS caudal after exposure to 10% O<sub>2</sub> hypoxia (NP\_hypoxia and HP\_hypoxia groups) or who underwent transcatheter perfusion surgery (NP\_sham and HP\_sham groups) of offspring from mothers receiving normoprotein diet (NP-17% of protein) or hypoproteic (HP-8% of protein) during gestation and lactation and commercial diet for animals from weaning (labina) after weaning (21 days) until 30 days of life. \* Values are statistically different between groups ( $p < 0.0001$ , One-Way ANOVA Test).

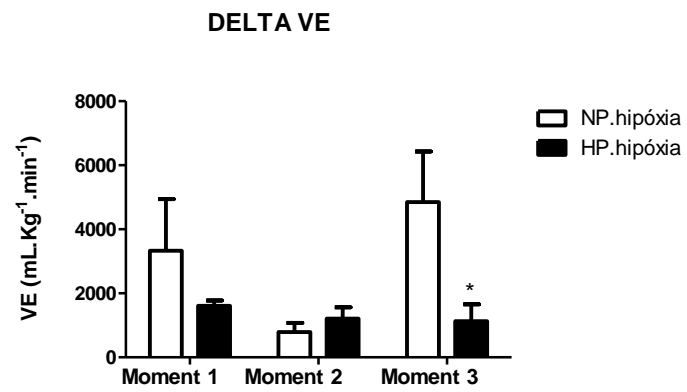
Figure 7. **Body weight on the 1st, 5th, 7th, 14th, 21st and 30th day of life.** Evaluation of body weight of offspring of rats on the 1st, 5th, 7th, 14th, 21st and 30th day of life from mothers who received normoproteic (NP-17% 28 protein) or hypoproteic (HP- 8% protein) during pregnancy and lactation) or commercial diet for laboratory animals (weaning) after weaning (21 days) until 30 days of age. \* Values are different between groups on the 1st, 7th, 14th, 21st and 30th day. of life. ( $p < 0.05$ , unpaired Student's t-test).



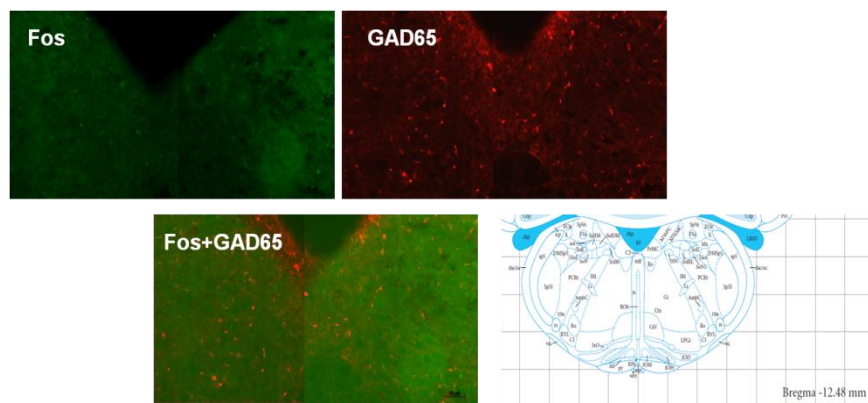
**Figure 1.**



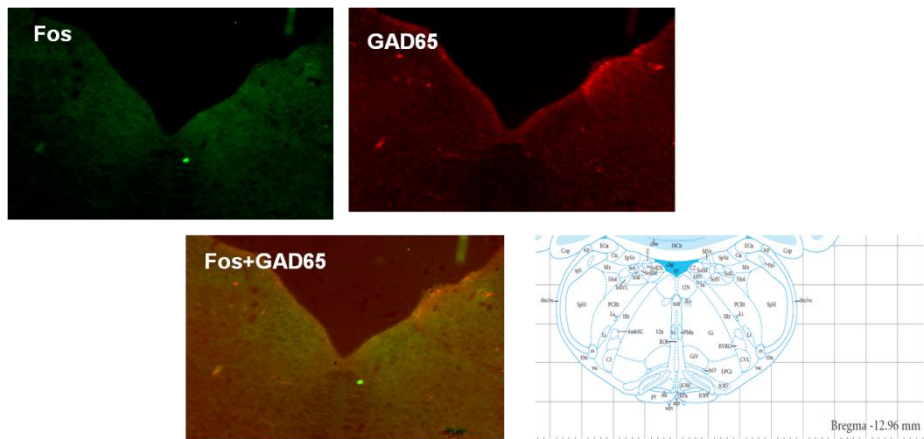
**Figure 2.**



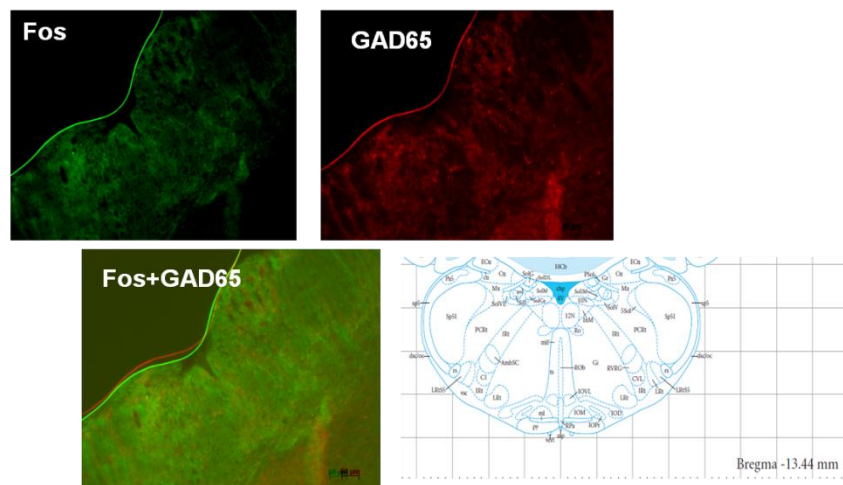
**Figure 3.**



**Figure 4.A.**



**Figure 4.B.**



**Figure 4.C.**

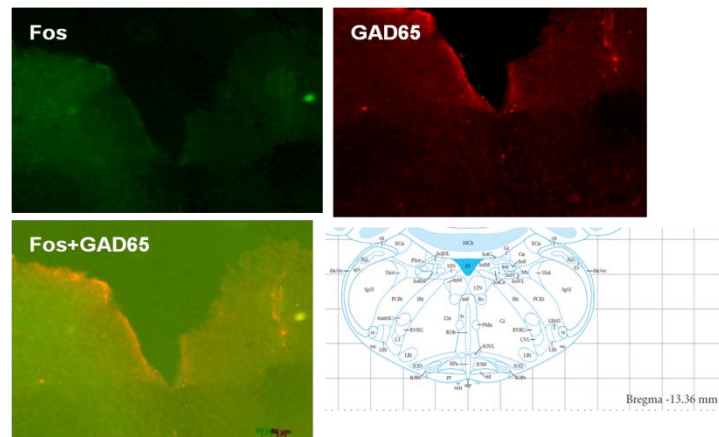


Figure 4.D.

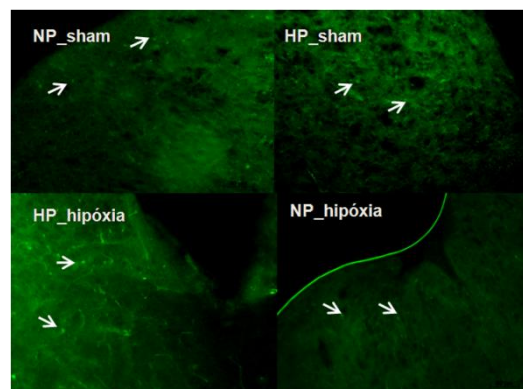
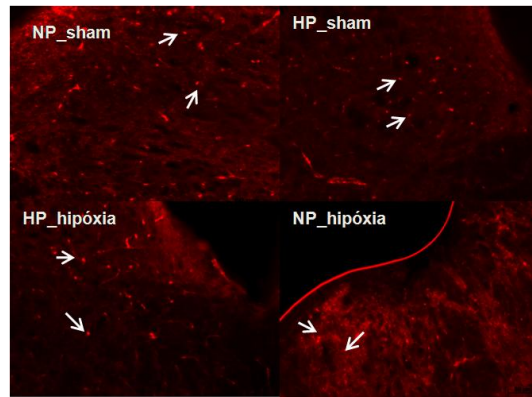
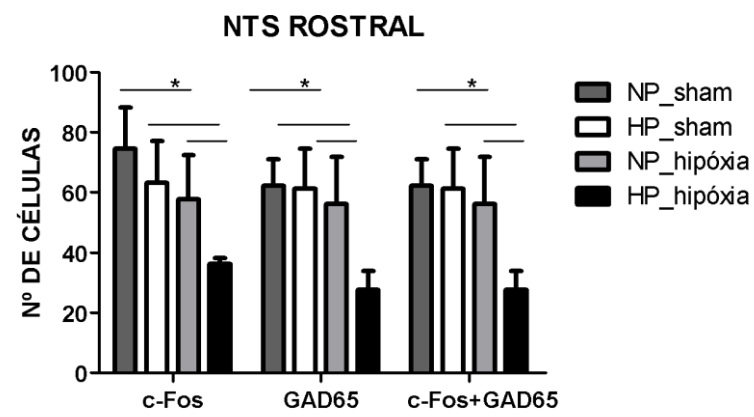


Figure 4.E.



**Figure 4.F**



**Figure 4.G**



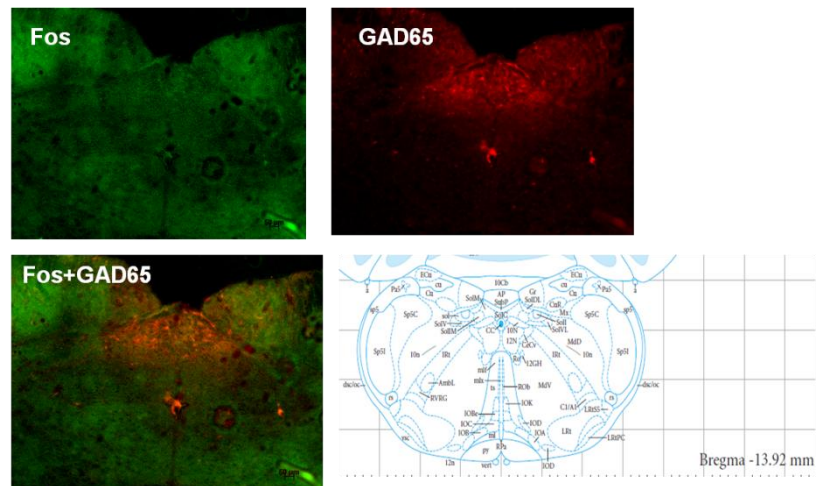


Figure 5.A

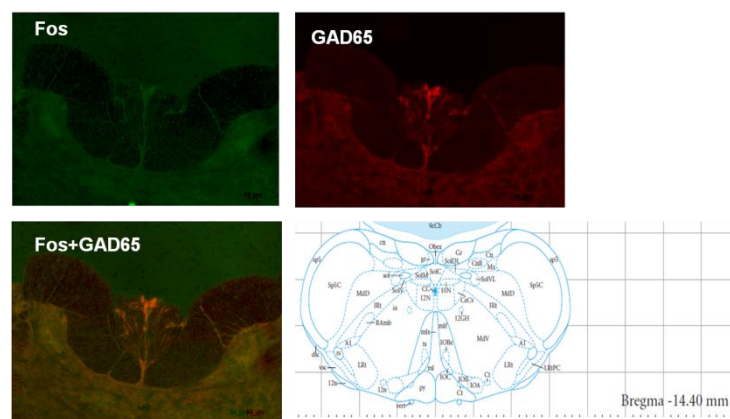


Figure 5.B

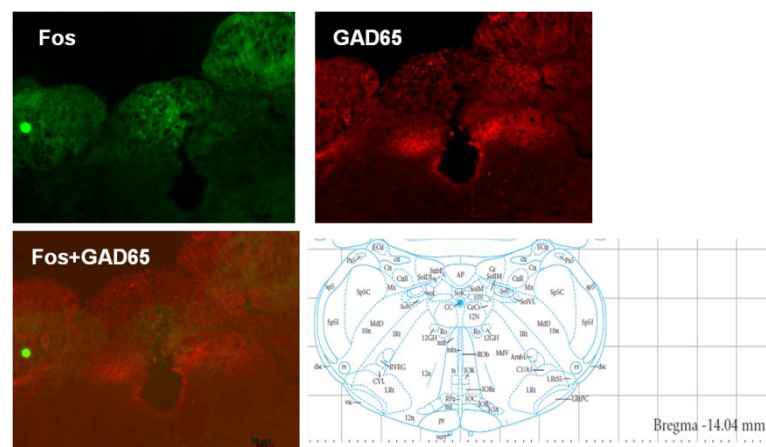


Figure 5.C

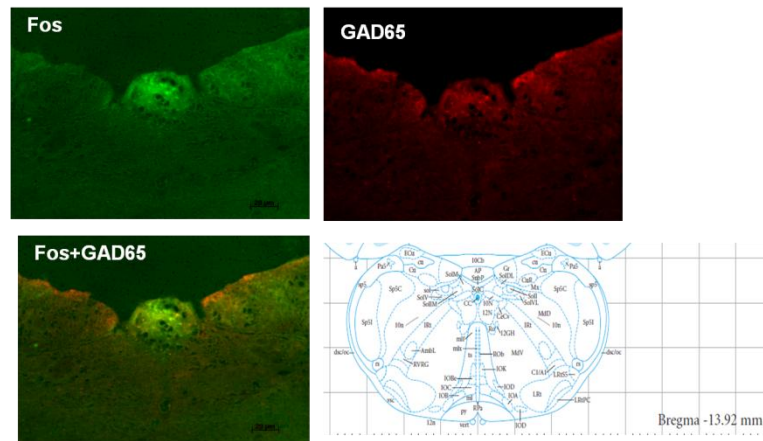


Figure 5.D

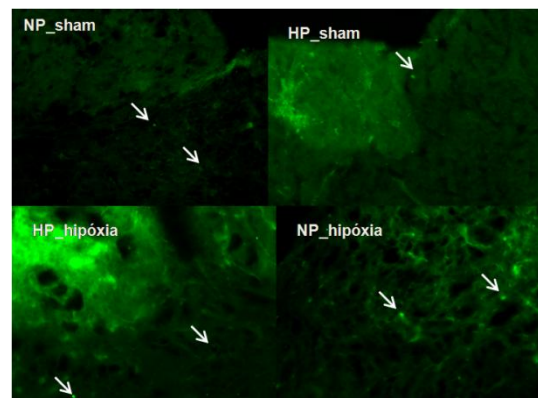
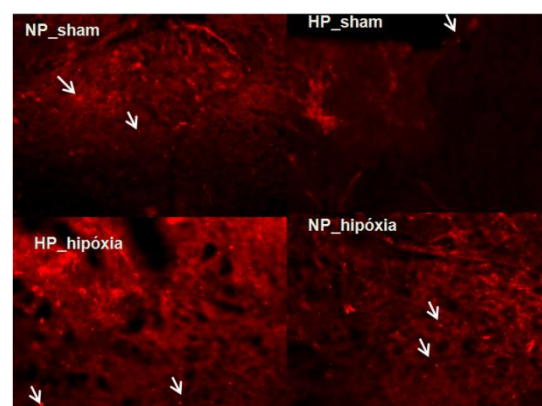


Figure 5.E



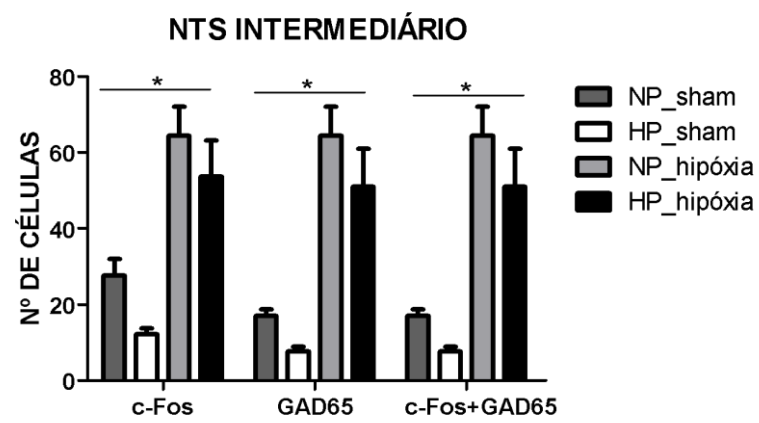


Figure 5.G

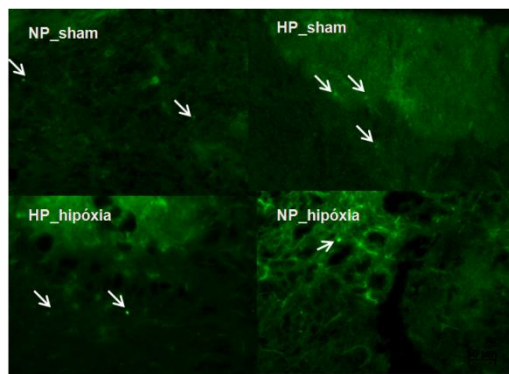


Figure 6.A

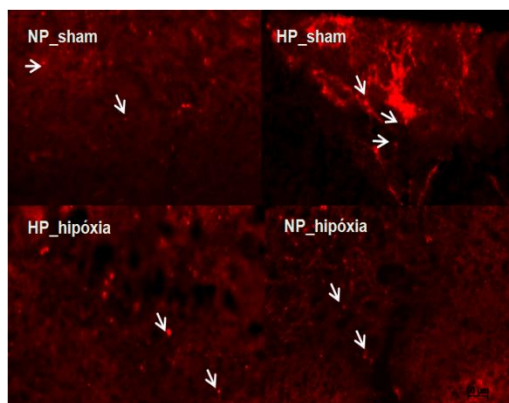


Figure 6.B

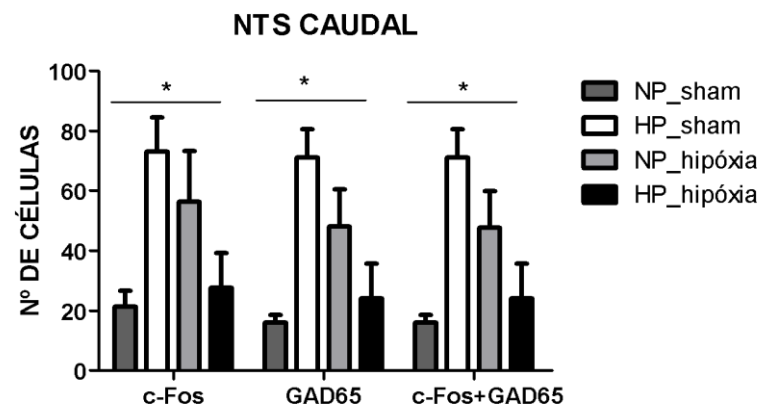


Figure 6.C

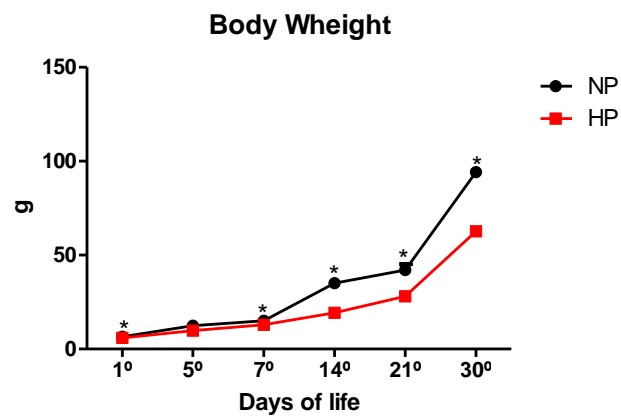


Figure 7.

## ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Biociências**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351

fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br

Recife, 08 de novembro de 2017.

Ofício nº 108/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

**Para: Prof. João Henrique da Costa Silva**

Centro Acadêmico de Vitória

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº **23076.041292/2017-17**

Certificamos que a proposta intitulada **“Avaliação do padrão respiratório e caracterização neuroquímica de neurônios do núcleo do trato solitário de ratos neonatos submetidos á desnutrição protéica perinatal** registrada com o nº**23076.041292/2017-17**sob a responsabilidade de **Prof. João Henrique da Costa Silva**que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 08/11/2017.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	08/11/2017 a 10/02/2019
Espécie/ linhagem/raça	Ratos heterogênicos/Wistar
Nº de animais	25
Peso/Idade	100g / 30 dias
Sexo	10 machos e 15 fêmeas
Origem	Biotério do CAV/UFPE.

Atenciosamente,

*Pedro V. Carilli*  
Prof. Dr. Pedro V. Carilli  
Presidente da CEUA / CCA UFPE  
SIAP 1301/584



**ANEXO B - DECLARAÇÃO DE QUALIFICAÇÃO DE DISSERTAÇÃO****DECLARAÇÃO**

Declaro que a mestranda Ially Fabiane da Silva qualificou, no dia 10 de janeiro de 2019, o projeto de dissertação intitulado "*Avaliação do padrão respiratório e caracterização neuroquímica de neurônios do núcleo do trato solitário de ratos jovens submetidos a desnutrição proteica perinatal*", obtendo menção **APROVADA**.

A Banca Avaliadora foi constituída pelos seguintes professores: Thyago Moreira de Queiroz, Carol Virgínia Gois Leandro e Rubem Carlos Araújo Guedes.

Recife, 22 de janeiro de 2019.

*Thayza C. M. Stamford*  
Prof.<sup>a</sup> Thayza C. M. Stamford  
Vice-Coordenadora  
Programa de Pós-Graduação em Nutrição  
SAPE 2340002