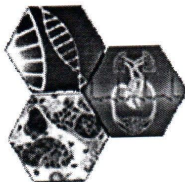


UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**DESNUTRIÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE DE ÁREAS CENTRAIS EM
RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO INTERMITENTE DO BARORREFLEXO**

MÍRIAM CARMO RODRIGUES BARBOSA

**Ouro Preto - MG
2012**



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

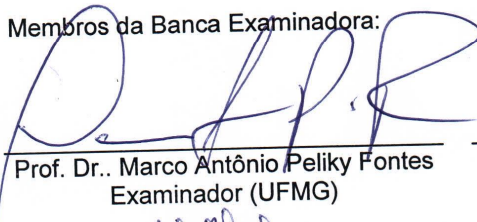


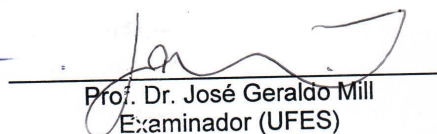
Ata da Banca Examinadora de Defesa da Tese Intitulada:

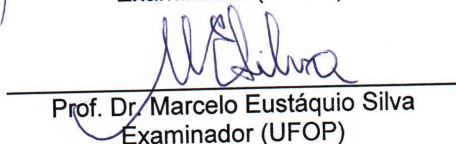
“Desnutrição Protéica e Atividade de Áreas Centrais em Resposta à Estimulação Intermitente do Barorreflexo”

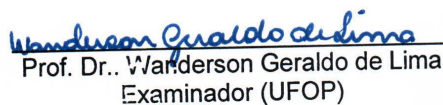
Aos vinte e dois dias do mês de maio de 2012, às 09:30, no Auditório do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese da aluna **Miriam Carmo Rodrigues Barbosa**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por *aprovar* a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

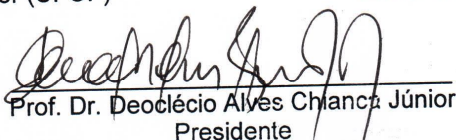
Membros da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Marco Antônio Peliky Fontes
Examinador (UFMG)


Prof. Dr. José Geraldo Mill
Examinador (UFES)


Prof. Dr. Marcelo Eustáquio Silva
Examinador (UFOP)


Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Examinador (UFOP)


Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior
Presidente

DATA DA DEFESA: 22/05/2012

MÍRIAM CARMO RODRIGUES BARBOSA

**DESNUTRIÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE DE ÁREAS CENTRAIS EM
RESPOSTA À ESTIMULAÇÃO INTERMITENTE DO BARORREFLEXO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

Orientador: Deoclécio Alves Chianca Júnior

Co-orientadora: Cláudia Martins Carneiro

**Ouro Preto - MG
2012**

R696d Rodrigues-Barbosa, Miriam Carmo.
Desnutrição proteica e atividade de áreas centrais em resposta à estimulação
intermitente do barorreflexo [manuscrito] / Miriam Carmo Rodrigues Barbosa
– 2012.
85f.: il., color; grafs.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Deoclécio Alves Chiana Junior.
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Cláudia Martins Carneiro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de
Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Bioquímica Estrutural e Fisiológica.

1. Desnutrição - Teses. 2. Proteínas - c-Fos - Teses. 3. Hipertensão -
Barorreflexo - Teses. 4. Sistema nervoso simpático - Teses. 5. Sistema nervoso
parassimpático - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.39:616.12-008.331.1

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, Laboratório de Imunopatologia e Laboratório Multiusuários da Universidade Federal de Ouro Preto com auxílio financeiro da CAPES, CNPQ, PROPP-UFOP, FAPEMIG e FINEP – CT – INFRA 2004.

Dedico este trabalho à minha família e aos meus alunos, por me mostrarem diariamente a aventura e o desafio de aprender e ensinar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Prof. Dr. Deoclécio Alves Chianca Júnior pela oportunidade, orientação e pela confiança em meu trabalho como pesquisadora.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro, pelo suporte indispensável para a realização deste trabalho e pelo exemplo de dedicação à educação e à pesquisa.

Aos Professores Leonardo Máximo Cardoso, Lisandra Brandino de Oliveira, Luciano Gonçalves Fernandes e Rodrigo Cunha Alvim de Menezes pelo valioso auxílio nas orientações metodológicas.

Ao Carlos Henrique Xavier, trabalhador de última hora e ajuda indispensável na conclusão deste trabalho.

Aos financiadores: FAPEMIG, UFOP, CNPQ, CAPES, FINEP – CT – INFRA 2004.

À Universidade Federal de Ouro Preto, ao Ensino Público e à Moradia Estudantil Pública, determinantes na minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço também, de modo especial, à Universidade Federal do Espírito Santo, principalmente à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação na figura de seus Pró-Reitores: Prof. Francisco Guilherme Emmerich e Prof. Neyval Costa Reis Junior, ao Centro de Ciências da Saúde na figura de seu diretor: Prof. Carlos Alberto Redins, ao Departamento de Educação Integrada em Saúde na figura do Prof. Antônio Marcos Birocale e ao Curso de Nutrição na figura da Profa. Luciane Bresciani Salaroli.

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular pelo carinho e pelo convívio cordial durante estes anos de trabalho, em especial à Vanessa, Fernanda, Natália, Aline e Luís. Gostaria de agradecer também ao Sr. Milton Alexandre de Paula pelo cuidado com os animais experimentais.

A todos do Laboratório de Imunopatologia, principalmente à Maria Chaves dos Santos, agradeço a dedicação e paciência.

Agradeço profundamente à minha família. Aos meus queridos pais e irmãos, por sempre me lembrarem quem eu realmente sou.

Ao meu querido marido Ulisses por nunca desistir de mim e por não permitir que eu desista também.

Gostaria de agradecer, enfim, a todas as pessoas infinitamente bondosas e especiais que Deus cuidadosamente colocou no meu caminho até aqui e que seria impossível colocar o nome de todas elas. Vocês estarão para sempre no meu coração, na minha lembrança e nas minhas orações.

Finalmente, agradeço aos animais experimentais que com inocência sacrificam suas vidas pela ciência.

RESUMO

Estudos anteriores do nosso laboratório sugerem que a desnutrição protéica pós-desmame promove alterações na neurotransmissão dos reflexos cardiovasculares em ratos. O presente estudo avaliou se a desnutrição proteica altera a expressão da proteína c-fos (immediate-early gene expression) em importantes áreas envolvidas no controle dos reflexos cardiovasculares, após a estimulação intermitente do barorreflexo. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA – UFOP; protocolo 2009/09). As principais áreas estudadas foram: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH); núcleo do trato solitário (NTS); região rostral ventromedial do bulbo (RVMM); região ventrolateral do bulbo - rostral (RVLM) e caudal (CVLM). Utilizamos ratos Fisher com 28 dias de idade divididos em dois grupos: Controle (C) (dieta padrão com 15% de proteína) e Desnutrido (D) (dieta hipoproteica com 6% de proteína). Após 35 dias de dieta, realizamos a canulação da artéria e veia femorais para os registros cardiovasculares e infusão de drogas, respectivamente. Dois dias depois, realizamos a ativação do barorreflexo através de infusões intermitentes de salina 0,9% (sal) ou fenilefrina (Phe - 0,25 mM; cada 3 min, por 30 min). Noventa minutos após estes procedimentos, os animais foram perfundidos com PBS 0,1M e PFA 0,1M a 4%. Os cérebros foram seccionados em fatias de 35µm e submetidos ao protocolo de imunohistoquímica para c-fos. Os cortes foram fixados em lâminas histológicas, e suas imagens adquiridas em microscópio Leica DM5000 e analisadas com o auxílio do software Leica Q Win. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os dados obtidos foram submetidos ao teste “t” de Student ou ANOVA “one-way” para medidas repetidas com pós-teste de Neuman-Keuls. Apesar de não alterar a PAM basal (D:105 $\pm$ 5 vs. C:115 $\pm$ 3 mmHg) e o ganho barorreflexo (D:-1.5 $\pm$ 0.2 vs. C:-2.2 $\pm$ 0.5 bpm / mmHg), a desnutrição aumenta a FC basal (D:484 $\pm$ 28 vs. C:381 $\pm$ 17 bpm; $P < 0.05$), e a expressão de c-fos na RVMM, mais precisamente no núcleo da raphe obscurus (Rob) após a infusão com Phe (D:81 $\pm$ 18 vs. C:29 $\pm$ 5; $P < 0.05$). Foi observado aumento na expressão de c-fos após a estimulação intermitente do barorreflexo no PVH, NTS medial e CVLM, independentemente do protocolo dietético utilizado. Os dados revelaram um recrutamento neuronal diferenciado em resposta à estimulação do barorreflexo no NTS caudal comissural (Sal: 55 $\pm$ 5 vs. Phe:162 $\pm$ 20; $P < 0.05$) e rostral (Sal: 79 $\pm$ 12 vs. Phe:205 $\pm$ 30; $P < 0.05$), RVLM (Phe: 73 $\pm$ 14 vs. Sal:35 $\pm$ 3; $P < 0.05$) e RVMM em animais desnutridos. Concluímos que a desnutrição protéica modifica o controle cardiovascular e o padrão de resposta central à estimulação do barorreflexo.

ABSTRACT

Previous studies from our laboratory suggest that protein malnutrition after weaning promotes changes in neurotransmission of cardiovascular reflexes in rats. The present study evaluates whether the protein malnutrition alters the expression of c-fos (immediate-early gene expression) in important areas involved in control of cardiovascular reflexes, after intermittent stimulation of the baroreflex. This study was approved by the Ethics Committee on Use of Animals (CEUA - UFOP; Protocol 2009/09). The main areas studied were: the paraventricular hypothalamus (PVH) nucleus solitary tract (NTS), rostral ventromedial medulla (RVMM), rostral (RVLM) and caudal ventrolateral medulla (CVLM). Male Fisher rats at 28 days old were divided into two groups: control (C) (standard diet containing 15% protein) and malnourished (MN) (low protein diet with 6% protein). After 35 days of diet, perform cannulation of the femoral artery and vein to record cardiovascular and drug infusion, respectively. Two days later, we performed a baroreflex activation by intermittent infusions of 0.9% saline (salt) or phenylephrine (Phe - 0.25 mM; every 3 min for 30 min). Ninety minutes after these procedures, the animals were perfused with PBS 0.1 M and 0.1 M PFA 4%. The brains were sectioned in slices of 35 μ m and submitted to the protocol of immunohistochemistry for c-fos. The sections were fixed on slides, and images acquired on Leica DM5000 microscope and analyzed using the software Leica Q Win. Results were expressed as mean $\pm$ standard error of mean. The data were subjected to the student t test or ANOVA "one way" for repeated measures with post-Neuman-Keuls test. Although not change the baseline MAP (MN: 105 $\pm$ 5 vs. C: 115 $\pm$ 3 mmHg) and baroreflex gain (MN: -1.5 $\pm$ 0.2 vs. C: -2.2 $\pm$ 0.5 bpm / mmHg), malnutrition increases the baseline FC (MN: 484 $\pm$ 28 vs. C: 381 $\pm$ 17 bpm, P <0.05), and expression of c-fos in RVMM, more precisely in the raphe obscurus (Rob) after infusion with Phe (MN: 81 $\pm$ 18 vs.. C: 29 $\pm$ 5, P <0.05). It was also observed increased expression of c-fos after intermittent baroreflex stimulation in PVH medial NTS and CVLM regardless of dietary protocol used. The data also revealed a differentiated neuronal recruitment in response to stimulation of the baroreflex in the caudal commissural (Sal: 55 $\pm$ 5 vs. Phe: 162 $\pm$ 20, P <0.05) and rostral NTS (Sal: 79 $\pm$ 12 vs. Phe: 205 $\pm$ 30, P <0.05), RVLM (Phe: 73 $\pm$ 14 vs. Salt: 35 $\pm$ 3, P <0.05) and RVMM in malnourished animals. We conclude that protein malnutrition modifies the cardiovascular control and the pattern of central response to baroreflex stimulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cronograma da metodologia de desnutrição protéica.....	27
Figura 2 - Localização das regiões centrais estudadas e captura de imagens.	35
Figura 3 - Contagem de neurônios marcados com c-fos realizada com o auxílio do software Leica Q Win ®.....	37
Figura 4 – Morfometria para estudo das áreas centrais analisadas, realizada com o auxílio do software Leica Q Win ®.....	38
Figura 5 – Estabelecimento morfométrico e localização das áreas de contagem de neurônios (frames) nas regiões estudadas.	40
Figura 6 – Peso corporal.	42
Figura 7 – FC basal.	43
Figura 8 – PAM basal.	43
Figura 9 – Avaliação do barorreflexo.	44
Figura 10 – Volume infundido.	45
Figura 11 – Registros típicos de PAP, FC e PAM basais.	46
Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos de tronco cerebral que sofreram processamento imunohistoquímico para c-fos utilizando-se técnica de gostejamento e <i>free-floating</i>	48
Figura 13 – Número de neurônios marcados com c-fos no PVH medial.	51
Figura 14 – Expressão neuronal de c-fos no PVH medial.	52
Figura 15 – Número de neurônios marcados com c-fos no NTS.	54
Figura 16 – Número de neurônios marcados com c-fos em diferentes regiões do NTS.	55
Figura 17 – Expressão neuronal de c-fos no NTS medial.	56
Figura 18 – Número de neurônios marcados com c-fos no RVMM.	58
Figura 19 – Número de neurônios marcados com c-fos no RPa e Rob.	59
Figura 20 – Expressão neuronal de c-fos no Rob.	60
Figura 21 – Número de neurônios marcados com c-fos no CVLM.	61

Figura 22 – Expressão neuronal de c-fos no CVLM.	62
Figura 23 – Número de neurônios marcados com c-fos no RVLM.	64
Figura 24 – Expressão neuronal de c-fos no RVLM.	65
Figura 25 – Padrão de ativação neuronal em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo em ratos Controle Phe e Desnutrido Phe.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	microlitro
µm	micrômetro
3V	terceiro ventrículo
4V	quarto ventrículo
Amb	núcleo ambíguo
ANOVA	análise de variância
AP	área postrema
bpm	batimentos por minuto
C	grupo Controle
CC	canal central
CVLM	bulbo ventrolateral caudal
D	grupo Desnutrido
EPM	erro padrão da média
FC	frequência cardíaca
fos-ir	neurônios imunorreativos para c-fos
mmHg	milímetros de mercúrio
NTScc	núcleo do trato solitário caudal comissural
NTSm	núcleo do trato solitário medial ou intermediário
NTSr	núcleo do trato solitário rostral
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulsátil
Phe	fenilefrina
PVH	núcleo paraventricular do hipotálamo
Py	trato piramidal
Rob	núcleo da rafe obscurus
RPa	núcleo da rafe pallidum
RVLM	bulbo ventrolateral rostral
RVMM	região rostral ventromedial do bulbo
Sal	Salina
SNA	sistema nervoso autônomo
SNS	sistema nervoso simpático
UI	unidades internacionais
VLM	bulbo ventrolateral

ÍNDICE

RESUMO	09
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
1 - INTRODUÇÃO	15
2 – REVISÃO DA LITERATURA	18
3 – OBJETIVOS	24
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 – Animais	27
4.2– Desnutrição	27
4.3 – Drogas e soluções utilizadas	28
4.4 - Canulação de artéria e veia femoral	30
4.5 - Registros cardiovasculares	30
4.6 - Avaliação da função barorreceptora	31
4.7 - Obtenção de fatias do SNC para imunohistoquímica	31
4.8 - Imunohistoquímica para c-fos	32
4.9 - Montagem de lâminas	33
4.10 - Captura de imagens	34
4.11 - Análise dos resultados	36
5-RESULTADOS.....	41
5.1 – Efeito da desnutrição sobre o peso corporal dos ratos	42
5.2 – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)	43
5.3 – Avaliação do barorreflexo	44
5.4 – Controle de volume infundido	45
5.5 – Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do barorreflexo	46
5.6 - Elaboração de projeto-piloto para padronização do protocolo de imunohistoquímica para c-fos	47
5.7 - Análise morfométrica das regiões centrais estudadas	49
5.8 - Expressão neuronal de c-fos no PVH medial em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo	50
5.9 - Expressão neuronal de c-fos no NTS em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo	53
5.10 - Expressão neuronal de c-fos no RVMM em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo	57
5.11 - Expressão neuronal de c-fos no CVLM em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo	61
5.12 - Expressão neuronal de c-fos no RVLM em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo	63
5.13 - Padrão de ativação neuronal em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo	66
6 - DISCUSSÃO	69
7 - CONCLUSÕES	74
8 - REFERÊNCIAS	76
9 - ANEXOS	83

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

A desnutrição é caracterizada por um déficit no balanço energético-proteico, que pode prejudicar o funcionamento de vários processos fisiológicos (Bertini, 2006). Atualmente, 14% da população mundial continua a ser afetada pela desnutrição (ONU, 2008). Desnutrição perinatal e o baixo peso ao nascer são considerados fatores de risco que predisõem a doenças cardiovasculares e metabólicas em alguns estágios posteriores da vida (Barker et al, 1993;. Barker e Clark, 1997). Estes dois indicadores são frequentemente usados em modelos experimentais que avaliam as consequências da desnutrição nas adaptações metabólicas e cardiovasculares (Meaney et al, 1996;.. Tropic et al, 2001).

Durante os períodos críticos de desenvolvimento, as alterações nos níveis sistêmicos de hormônios e neurotransmissores podem determinar disfunções neuronais permanentes (Barker e Clark, 1997;. Plagemann et al, 2000), desequilibrando assim o sistema nervoso central (Meaney et al, 1996;. Plagemann et al., 2000). Estas adaptações estruturais podem modificar o fluxo autonômico. A este respeito, é possível que os efeitos cardiovasculares e metabólicos observados nos animais desnutridos durante os períodos peri e pós-natal possam estar relacionados com alterações no sistema nervoso central. Estudos já demonstraram que a desnutrição protéica pós-desmame afeta o controle autonômico do sistema cardiovascular. Nesses estudos, observou-se: i) aumento do tônus vasomotor simpático; ii) alterações na frequência cardíaca basal (FC) e pressão arterial média (PAM); iii) alterações na variabilidade desses parâmetros cardiovasculares (Oliveira et al., 2004). Trabalhos anteriores de nosso laboratório também revelaram que o ganho do barorreflexo antes e após o bloqueio autonômico cardíaco é prejudicado em condições semelhantes de desnutrição. Esses dados sugerem importantes alterações autonômicas neste modelo de desnutrição (Loss et al., 2007). Mais recentemente também observamos disfunção autonômica cardíaca nesses animais (Martins et al., 2011).

Dados não publicados do nosso laboratório demonstram que a neurotransmissão glutamatérgica do barorreflexo é alterada em níveis medulares em animais desnutridos, proporcionando assim a primeira pista sobre a origem central da disfunção autonômica neste modelo. Além disso, mostrou-se que a desnutrição protéica altera a reatividade simpática, mas não as faixas de respostas de PAM e FC à estimulação do reflexo cardiopulmonar. Este fluxo simpático alterado ainda apóia a idéia de que os mecanismos centralmente mediados são determinantes nesta disfunção autonômica (Bezerra et al, 2011a;. Bezerra et al, 2011b).

Em conjunto, esses dados sugerem que a desnutrição protéica pós-desmame, assim como outros fatores extrínsecos como o exercício físico (Rodrigues et al, in press), alteraria a regulação dos reflexos cardiovasculares, possivelmente alterando a plasticidade central em tal magnitude de modo a interferir na homeostasia cardiovascular. Portanto, as áreas centrais que subjazem essas mudanças ainda precisam ser desvendadas. À luz desta ideia, hipotetizamos que a responsividade de regiões cerebrais específicas pela estimulação intermitente do barorreflexo pode ser alterada em animais submetidos à desnutrição proteica. Para testar esta hipótese, avaliou-se se a desnutrição protéica é capaz de alterar a expressão do marcador de atividade neuronal (Berquin et al, 2000;. Chan et al, 2000;.. Weston et al, 2003) proteína c-fos (immediate-early gene expression) no: núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH); núcleo do trato solitário (NTS); região rostral ventromedial do bulbo (RVMM) - rafe pallidum (RPa) e rafe obscurus (Rob); região ventrolateral do bulbo - rostral (RVLM) e caudal (CVLM) em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo.

REVISÃO DA LITERATURA

2 – REVISÃO DA LITERATURA

A desnutrição energética e/ou proteica é caracterizada pela existência de um desequilíbrio entre o fornecimento de nutrientes e a demanda corporal, responsáveis por assegurar o bom funcionamento do organismo (Antiwi, 2008). De acordo com a OMS, a desnutrição é uma condição que afeta populações de todas as nações, sejam elas subdesenvolvidas ou tecnologicamente avançadas (OMS, 2003). Segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), em um estudo de escala global, foi relatada uma queda no número de pessoas desnutridas no mundo nos últimos anos, passando de 1.023 bilhão para 925 milhões (FAO, 2010). Mas embora tenha havido uma redução de 98 milhões de pessoas, ou 9,6%, no total de desnutridos, esse número continua ainda assim alto.

No Brasil, o número de desnutridos diminuiu do ano de 1990 até o ano de 2002 (FAO, 2004). Ainda de acordo com a FAO, em uma pesquisa mais recente, em 2010 existiam 14,8 milhões de pessoas desnutridas no Brasil, uma redução de 4% quando comparada ao período de 90-92 (FAO, 2010).

Apesar do direito inalienável de todo ser humano de não padecer de fome e desnutrição, esta é a segunda causa de morte mais frequente em menores de 5 anos nos países em desenvolvimento (Sawaya, 2006) e, de acordo com a OMS, a alimentação inadequada de recém nascidos e de crianças até 5 anos é responsável por um terço dos casos de desnutrição (OMS, 2007). Constatou-se ainda que 6,6 milhões das 12,2 milhões de mortes anuais entre crianças menores de 5 anos, ou seja, 54% das mortes infantis em países em desenvolvimento estão associadas à desnutrição.

No Brasil a prevalência da desnutrição em crianças menores de 5 anos, aferida pela proporção de crianças com déficit de crescimento, foi de 7% em 2006 (PNDS, 2006). O número ainda substancial de crianças afetadas pela desnutrição em diferentes partes do mundo tem originado expressivo número de estudos na tentativa de elucidar os efeitos da desnutrição no adulto (Barker et al., 1993; Nunes et al., 2002; Sawaya, 2006).

O tipo mais prevalente de desnutrição é o que compromete o crescimento somático do indivíduo, sendo caracterizada pelo baixo peso e baixa estatura. Tanto epidemiológica quanto experimentalmente, a desnutrição pode surgir da desnutrição materna ou da desnutrição intra-uterina, nestes dois primeiros casos quando não existe uma recuperação do estado nutricional após o nascimento. Pode surgir também do aleitamento materno inadequado, da introdução tardia de alimentos complementares ou ainda da introdução de alimentos complementares em quantidade inadequada. Desnutrição peri-natal e retardo de ganho de peso ao nascimento são considerados fatores de risco predisponentes às doenças metabólicas e cardiovasculares em uma fase mais tardia

da vida (Barker et al., 1993). Desnutrição peri e pós-natal são modelos experimentais frequentemente usados para a avaliação das consequências da desnutrição para as regulações metabólicas e cardiovasculares (Tropia et al., 2001; Petry et al., 1997). Animais adultos que foram submetidos à desnutrição durante a fase de desenvolvimento, podem apresentar hipertensão, intolerância à glicose e redução na secreção de insulina (Rasschaert et al., 1995). Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis por estas alterações cardiovasculares e metabólicas ainda são desconhecidos.

A função primordial do sistema cardiovascular é promover a perfusão sangüínea adequada a todos os territórios vasculares do organismo. Para exercer esta função, o sistema cardiovascular deve ser capaz de se adaptar a uma variedade de circunstâncias que variam do repouso, ao exercício intenso ou a qualquer outra situação comportamental. Para tanto, o sistema cardiovascular possui mecanismos de controle, que podem ser humorais ou neurais que consistem na modulação central das atividades eferentes simpática e parassimpática, regulando a função do coração e vasos sangüíneos. Dentre os mecanismos neurais mais importantes de controle da pressão arterial, podemos citar o barorreflexo, o reflexo cardio-pulmonar (Bezold-Jarisch) e o quimiorreflexo, os quais têm por finalidade assegurar que todos os territórios do organismo recebam perfusão sangüínea adequada, garantindo o aporte de oxigênio e nutrientes.

O tônus simpático basal e o barorreflexo são modulados primeiramente pelos neurônios do bulbo. O bulbo ventrolateral (VLM) influencia a atividade intrínseca dos neurônios pré-ganglionares simpáticos e tem um papel crítico no controle da PA (Dampney, 1994). As áreas rostral e caudal do VLM, RVLM e CVLM, respectivamente, possuem, papéis importantes no controle central da PAM. A RVLM tem sido caracterizada como uma região pressora e contém neurônios excitatórios que se projetam diretamente à região preganglionar simpática motora na medula espinhal, enquanto a CVLM tem sido caracterizada como uma região depressora (Guyenet, 1990).

As informações periféricas são processadas e integradas no núcleo do trato solitário (NTS) com sinais que chegam de outras regiões regulatórias como a medula, ponte, diencefalo e telencefalo (Feldman e Ellemberger, 1988). Estudos (Agarwal e Calaresu, 1990 e 1991) mostraram a existência de projeção excitatória do NTS para a região CVLM, a qual promove uma inibição sobre a região simpato-excitatória, RVLM, através de uma via neuronal inibitória ascendente.

A ativação dos neurônios da RVMM produz efeitos diversos na PA e na atividade nervosa simpática (Pilowsky et al. 1986a, Coleman e Dampney, 1995). Enquanto alguns autores não observaram alterações, outros, por outro lado, relataram aumento ou mesmo redução nestes parâmetros (Coleman e Dampney, 1995). Populações de neurônios, principalmente aquelas

localizadas no RPa, foram inibidas, enquanto outras foram excitadas pela ativação do barorreflexo (Morrison e Gebber, 1984 e 1985), sugerindo que este grupo de neurônios do núcleo da rafe participam nas vias de transmissão bulbo-espinhais, mediando efeitos simpatoexcitatórios e simpatoinibitórios, respectivamente.

Estudos neuroanatômicos e eletrofisiológicos têm indicado que o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVH) conecta-se reciprocamente com áreas do sistema nervoso central, envolvidas no controle das funções cardiovasculares (Swanson e Sawchenko, 1983; Kannah et al., 1989; Luitten et al., 1985; Martin et al., 1991). Anteriormente, estudos de Ciriello e Caralesu (1980) demonstraram que a lesão bilateral do PVH reduz os níveis basais de pressão arterial média em ratos espontaneamente hipertensos (SHR). Estudos de Silva-Carvalho et al. (1995) e Rocha et al. (2003) sugeriram que o hipotálamo poderia exercer uma ação facilitatória sobre as vias neurais de reflexos cardiovasculares, devido à ativação de receptores de angiotensina nos neurônios do NTS.

Os núcleos hipotalâmicos estão vulneráveis a alterações metabólicas, neuroendócrinas e nutricionais durante as fases iniciais do desenvolvimento do indivíduo. Durante períodos críticos do desenvolvimento, as alterações nos níveis sistêmicos de hormônios e neurotransmissores podem levar a desestruturas persistentes e, conseqüentemente, disfunção de certas áreas do sistema nervoso central, especialmente do hipotálamo (Plagemann et al., 2000; Meaney et al., 1996). Estas alterações estruturais podem gerar alterações na atividade eferente autonômica e seriam responsáveis pelos estados fisiopatológicos cardiovasculares e metabólicos observados em animais desnutridos durante a fase peri- ou pós-natal.

Plagemann et al. (2000), mostraram que a desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento hipotalâmico leva a uma complexa desorganização dos principais mecanismos hipotalâmicos responsáveis pela regulação do peso corporal e da ingestão de alimentos, que por sua vez causam distúrbios cardiovasculares e metabólicos numa fase mais tardia da vida destes animais. Estes efeitos podem ser mediados por um aumento crônico da atividade eferente simpática e/ou alterações crônicas dos níveis centrais e periféricos de neurohormônios hipotalâmicos como vasopressina, ocitocina e angiotensina. De fato, dados epidemiológicos sugerem que indivíduos com baixo peso corporal ao nascimento apresentam um maior risco de desenvolvimento de um grande número de doenças na fase adulta, como hipertensão, diabetes tipo II e insuficiência cardíaca (Barker et al., 1993). Além disso, em ratos, desnutrição pós-natal leva ao bloqueio do eixo renina-angiotensina intrarenal (Woods et al., 2001). Ao desmame, animais amamentados por fêmeas desnutridas, a atividade do eixo renina-angiotensina se mostra elevada, ao passo que as concentrações plasmáticas de angiotensina II estão reduzidas (Langley-Evans et al., 1996) e os

níveis plasmáticos de aldosterona apresentam-se elevados (Vehaskari et al., 2001). Estes animais podem apresentar ainda redução do desenvolvimento do tecido renal e, conseqüentemente da função deste órgão. Animais adultos, filhos de ratas desnutridas, desenvolvem redução na taxa de filtração glomerular, no fluxo plasmático renal e no número de glomérulos (Lucas et al., 1991). Além disso, nestes animais, o diâmetro glomerular está aumentado (Lucas et al., 1997), a porcentagem de glomérulos degenerados está acentuada e foi observada maior taxa de alteração tubero-glomerular. Estas alterações podem contribuir para a redução na filtração de sódio, aumento no volume do fluido extracelular e, conseqüentemente, hipertensão arterial (Brenner et al., 1998, 1995; Mackenzie et al., 1996). Em conjunto, estas observações sugerem que a regulação da homeostase da concentração e osmolaridade do fluido extra-celular pode estar prejudicada em animais adultos que foram expostos à desnutrição durante o período peri-natal.

Sendo o hipotálamo uma importante região do SNC que atua principalmente na homeostase e estando seus efeitos envolvidos na regulação central da ingestão de alimentos, peso corporal, metabolismo e atividade autônoma cardiovascular não é surpreendente que esta região do SNC seja afetada pela desnutrição (Douglas, 2006). Uma vez que o hipotálamo exerce seus efeitos sobre o sistema nervoso autônomo (SNA), trabalhos sugerem que alterações hipotálamicas promovidas pela desnutrição podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão na vida adulta. Sendo que uma dieta hipoprotéica durante a gestação e a lactação foi capaz de promover em filhotes desmamados (20 dias de vida), diminuição do peso corporal, hipoglicemia, hipoinsulinemia, aumento no volume e densidade dos neurônios da região hipotalâmica ventromedialateral. Observou-se também redução na densidade de neurônios imunoreativos para Galanina e Neuropeptídeo Y no núcleo arqueado, contribuindo com possíveis alterações cardiovasculares (Plagemann et al., 2000).

Em 1995, resultados interessantes apresentados por Graham et al., revelaram padrões diferenciados de expressão de c-fos (immediate-early gene expression) em diversas regiões do cérebro em resposta à hipotensão e hipertensão em ratos acordados. Muitos trabalhos têm utilizado a expressão da proteína c-fos como marcador da atividade neuronal (Chan et al. 1998, 2000; Berquim et al. 2000; Wenton et al. 2003) já que esta proteína é sintetizada poucos minutos após a aplicação do estímulo (Hoffman, 2000).

Trabalhos realizados em nosso laboratório têm demonstrado alterações nos mecanismos de controle do sistema cardiovascular, promovidas pela desnutrição protéica pós-desmame. Tropia et al., 2001, observaram aumento do tônus simpático vasomotor em animais submetidos a um modelo de desnutrição protéica pós-desmame. Além disso, Oliveira et al., 2004, observaram alterações nos valores basais de FC e PAM, além do aumento da variabilidade desses parâmetros quando

analisados, em intervalos de noventa minutos, no domínio do tempo. Em outro trabalho, foram demonstradas modificações no ganho do barorreflexo antes e após bloqueios autonômicos além de alteração no período de latência da resposta barorreflexa, sugerindo alterações autonômicas importantes (Loss et al., 2007). Animais submetidos à desnutrição protéica apresentam aumento das respostas cardiovasculares produzidas pela ativação do quimiorreflexo (Penitente et al., 2007), sendo que foi observado um aumento da responsividade deste reflexo. Martins et al. (2011), demonstraram através da análise da variabilidade da FC no domínio da frequência um aumento da atividade eferente simpática e redução da atividade eferente parassimpática nos ratos submetidos à dieta hipoprotéica, sugerindo uma disfunção autonômica cardíaca nesses animais. Rodrigues et al., in press), em dados ainda não publicados, demonstrou que a desnutrição foi capaz de promover disfunções na neurotransmissão glutamatérgica do barorreflexo ao nível do RVLM. Nossos estudos ainda revelaram que a desnutrição protéica altera a reatividade simpática, mas não as faixas de respostas de PAM e FC à estimulação do reflexo cardiopulmonar (Bezerra et al, 2011a;.. Bezerra et al, 2011b).

Estes dados sugerem que a desnutrição protéica pós-desmame pode promover importantes alterações na regulação reflexa cardiovascular, possivelmente alterando processos de plasticidade central, gerando um desbalanço autonômico que acaba por interferir sobre a homeostase cardiovascular. Porém, os mecanismos responsáveis por tais alterações ainda não foram totalmente elucidados.

OBJETIVOS

3 - OBJETIVOS

O presente estudo tem como principal objetivo a avaliação do padrão de ativação neuronal em diversas regiões do sistema nervoso central, envolvidas com a gênese das alterações cardiovasculares observadas em animais submetidos à desnutrição protéica, em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar o efeito da desnutrição protéica pós-desmame em ratos sobre:
 - o O peso corporal.
 - o O ganho de parâmetros cardiovasculares basais.
 - o A resposta barorreflexa à infusão de fenilefrina.
 - o A expressão da proteína c-fos (um marcador de ativação neuronal) no PVH, NTS, RVMM (RPa e Rob), CVLM e RVLM, importantes áreas para o controle cardiovascular, após a ativação intermitente do barorreflexo .

MÉTODOS

4 - MÉTODOS

4.1 - Animais

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e EC Directive 86/609/EEC para animais experimentais. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA – UFOP; protocolo 2009/09).

Foram utilizados ratos Fischer, divididos em dois grupos: controle e desnutrido. Durante o acasalamento, duas fêmeas, com aproximadamente quatro meses de idade e um macho foram colocados em gaiolas de polietileno de 47 x 33 x 15 cm. Os animais foram mantidos durante todo o experimento em um biotério com regime de temperatura controlada ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com luz acesa a partir das 7 horas da manhã. Após o nascimento, as ninhadas foram manipuladas aleatoriamente e distribuídos oito ratos por mãe. As mães continuaram recebendo ração comercial e água *ad libitum* e os filhotes foram amamentados por vinte e oito dias.

4.2 - Desnutrição

Neste trabalho utilizamos modelo já estabelecido de desnutrição protéica pós-desmame (Bezerra et al., 2011a; Bezerra et al., 2011b; Loss et al., 2007; Martins et al., 2011; Oliveira et al., 2004; Tropia et al., 2001). Após o desmame, os machos das ninhadas foram divididos em dois grupos, a saber: 1-controle, os quais receberam dieta contendo 15% de proteína (dieta controle, comercial Labina®) e; 2- desnutrido, os quais passaram a receber dieta contendo 6% de proteína (dieta de desnutrição) durante 35 dias. Após 35 dias e durante os próximos sete dias, os animais foram utilizados no experimento e continuaram a receber ração experimental. Os animais foram pesados antes do início do experimento. O cronograma da metodologia de desnutrição protéica é apresentado na figura 1.

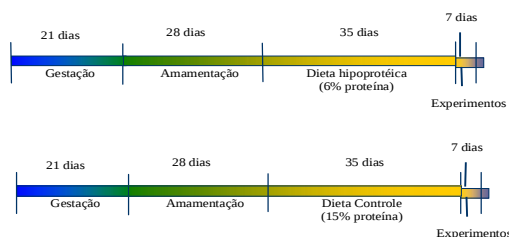


Figura 1 – Cronograma da metodologia de desnutrição protéica. Após o nascimento os animais foram amamentados por um período de 28 dias e em seguida divididos em dois grupos: controle (dieta com 15% de proteína) e desnutrido (dieta com 6% de proteína) por 35 dias. Após esse período os animais eram utilizados para experimentação.

Abaixo, temos os componentes necessários para a elaboração da dieta dos animais desnutridos:

Para 5kg de dieta são necessários:

- **Colina – 12,5g**
- **Mistura de Vitaminas – 50g** (contém em cada g/Kg de mistura: Acetato de retinol – 2.000.000IU / Colecalciferol – 200.000IU / Ácido p-aminobenzoico – 10,00 / I-Inositol – 10,00 / Niacina – 4,00 / Pantotenato de cálcio – 4,00 / Riboflavina – 0,80 / Tiamina HCl – 0,50 / Piridoxina HCl – 0,50 / Ácido fólico – 0,20 / Biotina – 0,04 / Vitamina B12 – 0,003 / Sacarose – q.s.p. 1000. / Colina – 200,0 / α -Tocoferol – 10.000IU).
- **Mistura de sais – 175g** (contém em cada g/Kg de mistura: NaCl – 139,3 / KI – 0,79 / $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 57,3 / CaCO_3 – 381,4 / $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 4,01 / $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 27,0 / $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,548 / $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,477 / $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,023 / KH_2PO_4 – 389,0).
- **Fibra (celulose) – 250g**
- **Caseína – 300g**
- **Óleo vegetal – 200g**
- **Amido de Milho – 4012,5g**

Esta dieta foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pela American Institute of Nutrition (AIN – 93) e é isocalórica com relação à dieta comercial utilizada (Labina®) (422 Kcal/100g de dieta). O teor de sais e vitaminas das dietas também são semelhantes.

Todos os ingredientes citados acima foram misturados, peneirados por três vezes e em seguida peletizados como o auxílio de uma solução de polivinil pirrolidona (PVPK) a 10% em álcool absoluto. Porções de 250g de ração foram misturadas a 115ml da solução de PVPK e em seguida peletizadas no formato desejado. Esta ração passou em seguida por um processo de secagem em temperatura ambiente e após 48h já pôde ser oferecida aos animais.

4.3 – Drogas e soluções utilizadas

Solução Salina 0,9%: A solução veículo foi preparada dissolvendo-se 9,0 g de NaCl em q.s.p. 1000,0 mL de água destilada.

L-fenilefrina: como agente vasoconstritor foi utilizado um agonista α_1 adrenérgico, a L-fenilefrina. A solução estoque foi preparada utilizando-se 0,05g cloridrato de L-fenilefrina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em 1,0 mL salina. Esta solução foi alíquotada em frações de 1,5 tubos de polietileno Eppendorf e armazenadas a -20°C até o momento do uso por período não maior que 45 dias. A solução de uso era preparada minutos antes de iniciar os experimentos, 2,0 μ L da solução estoque eram dissolvidos em 2,0 mL de salina, de modo que a concentração final foi de 0,25 mM.

Antibiótico: Como medida profilática, foi administrado após a cirurgia, 0,2 mL de pentabiótico veterinário [160.000 U.I. /rato, via i.m., (Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil)].

PB 0,2M: Para utilização na preparação de outras soluções utilizadas na imunohistoquímica para c-fos foi preparado um tampão fosfato. Colocou-se 500ml de água destilada para aquecer em um becker. Em seguida acrescentou-se 5,52g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, mantendo sob agitação. Depois de estar totalmente dissolvido o primeiro sal, acrescentou-se 22,72g de Na_2HPO_4 anidro, sempre mantendo a agitação e o aquecimento. Após a dissolução total dos sais, completar o volume final (1000ml). Medir o pH depois do preparo. Manter a solução em geladeira.

PBS 0,1M: Para utilização em várias etapas da imunohistoquímica para c-fos foi preparada uma solução de paraformaldeído. Inicialmente aqueceu-se 500 ml de água destilada num becker. Em seguida acrescentou-se 2,62g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$, mantendo sob agitação. Depois de estar totalmente dissolvido o primeiro sal, acrescentou-se 11,5g de Na_2HPO_4 anidro, sempre mantendo a agitação e o aquecimento. Depois de estar totalmente dissolvido o segundo sal, acrescentou-se 2,92g de NaCl. Após a dissolução total dos sais, completar o volume final (1000ml). Medir o pH depois do preparo, uma vez que este deve ser 7,4. Manter a solução em geladeira.

PFA 0,1M a 4%: Para utilização em várias etapas da imunohistoquímica para c-fos foi preparada uma solução de paraformaldeído. Inicialmente aqueceu-se 450 ml de água destilada num becker até 80°C. Em seguida acrescentou-se 40g de paraformaldeído (pó), mantendo sob agitação e sempre aquecida. Em seguida acrescentou-se 2 ou 3 gotas de NaOH 1M, agitando até que ficasse transparente. Logo depois, esta mistura foi adicionada à 500 ml de PB 0,2M, em uma proveta de 1000ml. O volume restante foi completado com água destilada.

Sacarose 30%: Para preparação dos cérebros para posterior processamento no criostato, foi preparada uma solução de sacarose 30%. Colocou-se 30g de sacarose em uma proveta de 100 ml, o volume foi completado com PBS 0,1M e em seguida manteve-se a agitação da solução até a completa dissolução da sacarose.

4.4 - Canulação de artéria e veia femoral

Dois dias antes dos experimentos, realizou-se a canulação de uma artéria e de uma veia femoral. As cânulas utilizadas foram confeccionadas com tubos de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ, EUA) com comprimento de 4 a 5 cm, soldado com outro tubo de polietileno PE-50, com comprimento médio de 19 cm. Este tamanho de cânula foi utilizado para animais controles, para os desnutridos as cânulas foram confeccionadas com tubos de polietileno PE-10 em torno de 2 cm, soldado a outro tubo de polietileno PE-50 de aproximadamente 10cm. Previamente à canulação, as cânulas de polietileno foram preenchidas com solução fisiológica e em seguida tiveram uma das suas extremidades livres obstruídas com um pino metálico. Após ser realizada a anestesia com uma mistura de cetamina and xilazina (50 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), uma das cânulas foi dirigida para a aorta abdominal, tendo-se como acesso a artéria femoral, ao passo que a extremidade da outra cânula foi acomodada no interior da veia femoral. Uma vez implantadas, as cânulas foram posicionadas no subcutâneo do animal e exteriorizadas na região interescapular e então, fixadas por meio de fios de sutura. A cânula posicionada na artéria foi utilizada para registro da pressão arterial pulsátil e da frequência cardíaca, com derivações eletrônicas para registro da pressão arterial média. A cânula venosa, por sua vez, foi utilizada para a administração sistêmica de drogas.

4.5 - Registros cardiovasculares

Antes do início do registro, injetamos salina heparinizada (1:40), para evitar a formação de coágulos na extremidade das respectivas cânulas. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão MLT0699 (ADInstruments, Austrália) ligado a um amplificador de sinais ETH-400 (CB Sciences, Inc.). Esse amplificador foi conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments, Austrália). A transferência de dados entre o conversor e o computador foi feita por intermédio de uma placa SCISI onde o software Chart for Windows® gerava os registros de pressão arterial pulsátil (PAP) a partir dos dados enviados pelo conversor analógico digital numa frequência de amostragem de 200 Hz. Realizou-se a aquisição dos dados referentes à PAP a partir da qual foram calculadas, “on line” e “off line” a frequência cardíaca (FC) e a pressão arterial média (PAM). Após essa conexão, o animal passou um período de adaptação de 30 a 40 minutos, sendo em seguida iniciado os experimentos.

4.6 - Avaliação da função barorreceptora

Após serem instrumentados, os animais passaram por um período de estabilização de 30 a 40 minutos. Com os parâmetros cardiovasculares estáveis, iniciou-se o registro definitivo sendo que os primeiros 10 a 20 minutos foram tomados como parâmetros basais de PA e FC. A ativação do reflexo barorreceptor foi realizada com infusão, de fenilefrina (0,25 mM) (aumento de pressão de ~ 40 mmHg), utilizando uma bomba de infusão (Bi 2000, Insight) na velocidade de 12 mL/h. Como placebo foi infundido salina a 0,9%. Os ensaios foram iniciados alternadamente com uma droga a fim de se evitar um *vies* nos resultados.

Em cada ensaio foram realizadas dez infusões consecutivas a intervalos de três minutos entre cada uma. A solução de fenilefrina era infundida até promover uma alteração de PAM de 40 mmHg, magnitude esta conhecida por provocar alterações na expressão de c-fos neuronal (Hoffman and Lyo, 2002; Weston et al., 2003).

4.7 - Obtenção de fatias do SNC para imunohistoquímica

A síntese da proteína c-fos depende não apenas da intensidade do estímulo, mas também do tempo entre os estímulos (Hoffman e cols., 2000). A proteína c-fos começa a ser sintetizada de 15 a 30 minutos após o primeiro estímulo e tem a sua expressão máxima cerca de 60 a 90 minutos após o início do estímulo (Hoffman e cols., 2000).

Sendo assim, 90 minutos após o término dos registros cardiovasculares os animais foram profundamente anestesiados com uma mistura de cetamina e xilazina e em seguida foram submetidos à perfusão transcardíaca com soluções de tampão fosfato salina (PBS 0,1M) por 5 minutos e paraformaldeído (PFA a 4%). Para esta perfusão foi utilizada uma bomba peristáltica (BP-600, Milan) e a velocidade da mesma foi de 33 ml por minuto.

O tronco cerebral foi então retirado e mantido em temperatura de 4°C por 24h, em tubo Falcon contendo 20 mL de PFA a 4%. Após esse prazo, realizamos a troca de solução por uma de sacarose 30%, permanecendo os cérebros nesta nova solução por 24h. Este procedimento objetivou a retirada de água contida no tecido, evitando assim a formação de cristais de gelo durante o processo de fatiamento ao criostato.

Em seguida, o tronco cerebral foi fatiado a uma espessura de 35µm, em criostato (Leica CM 1850), em temperatura de -23°C. Era retirada uma fatia de tecido e as duas fatias seguintes eram descartadas para evitar que as áreas selecionadas fossem contadas duas vezes. Posteriormente, os

cortes foram acondicionados em placas para ELISA contendo aproximadamente 2ml de PBS 0,1 M em cada poço.

4.8 - Imunohistoquímica para c-fos

Uma vez realizadas os cortes histológicos, estes foram divididos sequencialmente em três secções: experimental (incubação completa dos anticorpos), controle (omissão do anticorpo primário) e para coloração com vermelho neutro.

Para determinação da proteína c-fos, realizamos inicialmente a lavagem dos cortes com PBS 0,1M utilizando-se um agitador orbital (TS-2000A VDRL SHAKER, Biomixer) durante 5 minutos. Em seguida os cortes foram colocados em uma solução de H₂O₂ 1% por 10 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena do tecido. Os cortes foram então novamente lavados em PBS, sob agitação, durante 5 minutos, por 4 vezes.

Após estes procedimentos foi feita a incubação dos cortes com o anticorpo primário (anti c-fos feito em coelho, Santa Cruz®). Sob agitação, utilizando-se um agitador magnético (78HW-1, Biomixer), foram misturados 10ml de PBS, 20µl Triton (detergente especial) e 0,4 ml de soro bloqueador normal de cabra. A esta mistura foram adicionados 2,5µl de anticorpo primário. Esta solução obtida foi distribuída em placas de ELISA (2 ml por poço) e os cortes histológicos reagiram “free-floating” por 22h. Após este período os cortes foram lavados em PBS, sob agitação, durante 5 minutos, por 3 vezes. Para todos os grupos de animais foi feito um grupo controle, no qual um corte histológico era processado sem a incubação com o anticorpo primário por 24h, para testar a especificidade do protocolo de imunohistoquímica para c-fos.

Em seguida foi feita a incubação com o anticorpo secundário. Sob agitação, foram misturados 10ml de PBS, 20µl Triton e 0,4 ml de soro bloqueador normal de cabra. A esta mistura foram adicionados 25µl de anticorpo secundário (anticorpo anti-coelho feito em cabra biotinilado – Kit Vectastatin®). Esta solução obtida foi distribuída em placas de ELISA (2 ml por poço) e os cortes histológicos reagiram “free-floating” por 1h. Após este período os cortes foram lavados em PBS, sob agitação, durante 5 minutos, por 3 vezes.

Posteriormente, foi feita a incubação dos cortes com o complexo Avidina Biotina-Peroxidase - ABC (Kit Vectastain®). Sob agitação, foram misturados 12,5ml de PBS, 1 gota de solução A (Kit Vectastatin®), 1 gota de solução B (Kit Vectastatin®). Esta solução obtida foi distribuída em placas de ELISA (2 ml por poço) e em seguida os cortes histológicos reagiram “free-floating” por 1h. Após este período os cortes foram lavados em PBS, sob agitação, durante 5 minutos, por 3 vezes.

Após estes procedimentos, os cortes histológicos foram revelados com Diaminobenzidina (DAB). Todos os procedimentos que serão descritos a partir daqui foram realizados em Capela (Nalgon Equipamentos Científicos Ltda), com proteção para nariz, olhos e mãos, dada a toxicidade do DAB. Sob agitação, a uma temperatura de 50°C, foram misturados 10ml de PBS e 5mg de DAB. A mistura foi matida em agitação, porém sem aquecimento, até que a mesma atingisse a temperatura ambiente. Quando a mistura estava totalmente fria, foram adicionados 10 µl H₂O₂ 30%, reagindo por 10 minutos. Em seguida os cortes foram lavados em PBS, sob agitação, durante 5 minutos, por 2 vezes.

Terminados os procedimentos de imunohistoquímica para c-fos, todos os locais nos quais o DAB foi manipulado, bem como as placas de ELISA, beckers e demais utensílios, foram limpos e, quando possível, submersos em água sanitária para inativação do DAB e posterior precipitação do mesmo. Alguns pesquisadores recomendam também deixar o DAB exposto à luz para inativá-lo, ou ainda usar permanganatos. Em qualquer caso é sempre recomendado a leitura da bula do kit de reação do DAB para verificar qual a melhor forma de inativá-lo e descartá-lo sem poluir o meio ambiente nem causar danos aos manipuladores deste material.

4.9 - Montagem de lâminas

Após todo o processamento imunohistoquímico, os cortes foram fixados em lâminas histológicas gelatinizadas. Estas lâminas permaneceram em temperatura ambiente por 48 para secagem. Em seguida as mesmas foram submetidas a um procedimento para desidratação dos cortes histológicos e logo depois foram montadas com Permount.

Para a desidratação dos cortes histológicos estes foram submersos por 3 minutos em água destilada, 2 minutos em álcool a 70°, 2 minutos em álcool a 90°, 2 minutos em álcool a 95°, 2 minutos em álcool a 100°, 2 minutos em uma solução de álcool 100°/xilol 1:1 e finalmente por 2 minutos em xilol.

Todos estes procedimentos foram realizados em capela de fluxo contínuo (Nalgon Equipamentos Científicos Ltda).

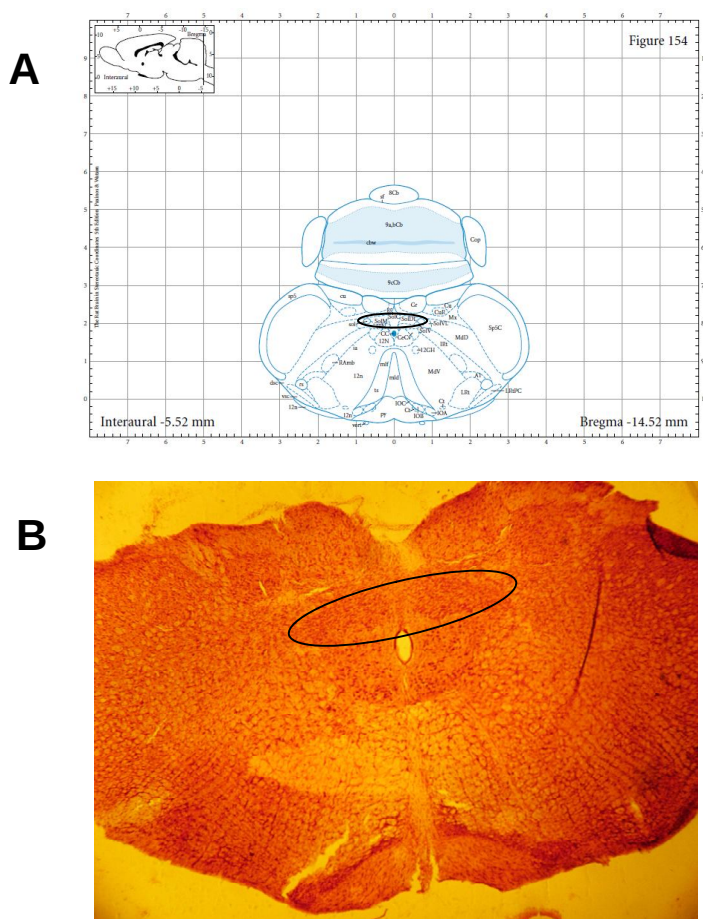
4.10 - Captura de imagens

As imagens obtidas foram adquiridas em microscópio Leica DM5000 e analisadas com o auxílio do software Leica Q Win. Foram avaliados em média 8 cortes por lâmina nas áreas estudadas.

Para a localização do PVH, NTS, RPa, Rob, CVLM e RVLM e suas respectivas subdivisões foram utilizadas as coordenadas de Paxinos e Watson (2007).

Foram considerados como PVH anterior os cortes localizados entre -1.72 mm e -1.80 mm em relação ao bregma. Foram considerados como PVH medial os cortes localizados a -1.92 mm em relação ao bregma. E finalmente, foram considerados como PVH posterior os cortes localizados entre -2.04 mm a -2.16 mm em relação ao bregma.

Foram considerados como NTS caudal comissural os cortes localizados entre -14.60 mm e -14.30mm em relação ao bregma. A figura 2 abaixo dá um exemplo de como foi realizada a localização das regiões centrais estudadas e a posterior captura das imagens dos cortes histológicos obtidos.



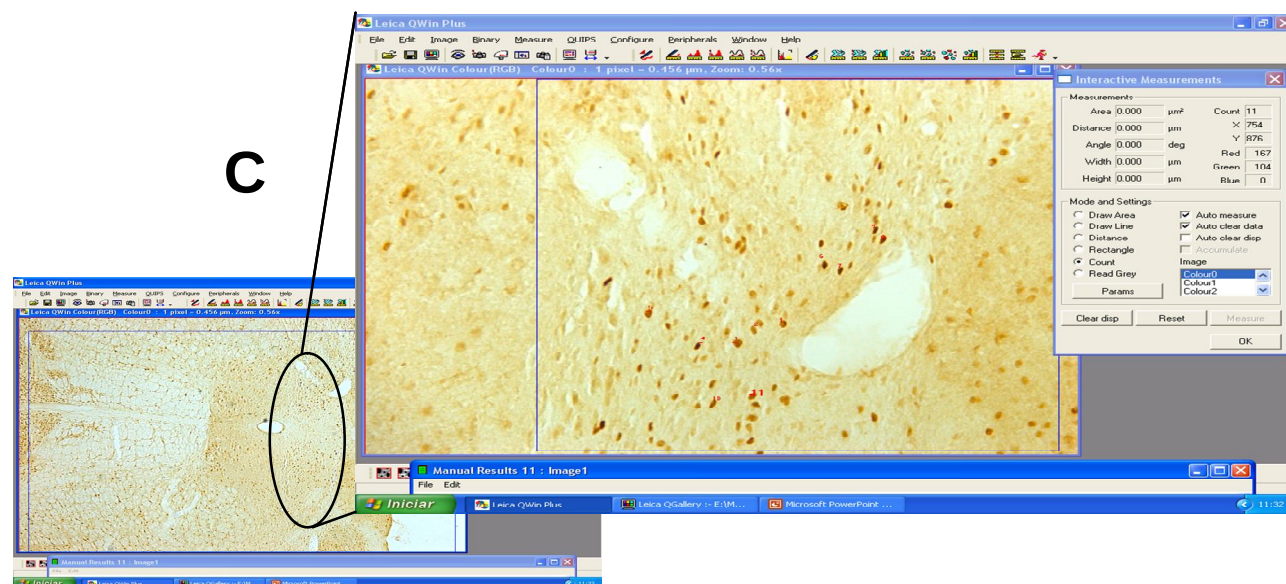


Figura 2 – Localização das regiões centrais estudadas e captura de imagens. (A) Localização do NTScc segundo coordenadas de Paxinos e Watson (2007). (B) Confirmação da região escolhida através de cortes sequenciais corados com vermelho neutro. (C) Imagens capturadas dos cortes histológicos exibidas em fotomicrografia representativa de NTScc de rato desnutrido Phe. Imunohistoquímica PAP, 5x (foto menor) e Imunohistoquímica PAP 20x (foto maior). Frame área 0.22 mm².

Foram considerados como NTS medial ou intermediário os cortes localizados entre -14.08mm e -13.680 mm em relação ao bregma. E finalmente, foram considerados como NTS rostral os cortes localizados entre -13.30mm a -12.72mm em relação ao bregma.

Foram considerados como RPa os cortes localizados entre -14.08 mm e -9.80 mm em relação ao bregma.

Foram considerados como Rob os cortes localizados entre -14.30 mm e -11.60 mm em relação ao bregma.

Foram considerados como CVLM os cortes localizados entre -14.60 mm e -13.68 mm em relação ao bregma.

Foram considerados como RVLM os cortes localizados entre -13.30 mm e -11.80 mm em relação ao bregma.

4.11 - Análise dos resultados

Análise dos registros cardiovasculares: A análise dos dados foi realizada com auxílio dos softwares Chart for Windows® e GraphPad Prism5.00 (Graphpad Inc.) para as análises estatísticas. A PAM e FC foram recalculadas “off line” pico-a-pico sistólico sob smoothing com janela de 201 pontos, para uma filtragem dos dados. Os níveis basais de PAM e FC foram obtidos a partir dos registros de cada animal, através da média dos 10 minutos anteriores a quaisquer injeções endovenosas.

Análise do barorreflexo: Para análise do barorreflexo, valores de FC foram plotados em função de valores correspondentes de PAM a intervalos de 5 mmHg durante a infusão de fenilefrina. Com base nestes dados, uma reta de regressão linear foi determinada com base na equação abaixo:

$$FC = FC_i - G \times PAM$$

onde,

FC = frequência cardíaca;

FC_i = valor de FC quando PAM = 0 (intercepto da reta de regressão com a ordenada);

G = ganho ou sensibilidade;

PAM = pressão arterial média.

Uma vez determinados os parâmetros da equação, o valor de G foi tomado como uma estimativa da sensibilidade do barorreflexo.

Expressão neuronal de c-fos em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo: O atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 2007), como descrito no item 4.10 e ilustrado na figura 2, foi utilizado como uma referência para a localização das áreas escolhidas.

A análise da expressão de c-fos nas áreas centrais estudadas foi realizada com o auxílio do software Leica Q Win ®. Para assegurar a confiabilidade da contagem neuronal realizada pelo software, uma vez que algumas marcações tinham intensidade muito parecida com a marcação de fundo (background) a contagem dos neurônios foi realizada manualmente, conforme ilustra a figura 3 a seguir.

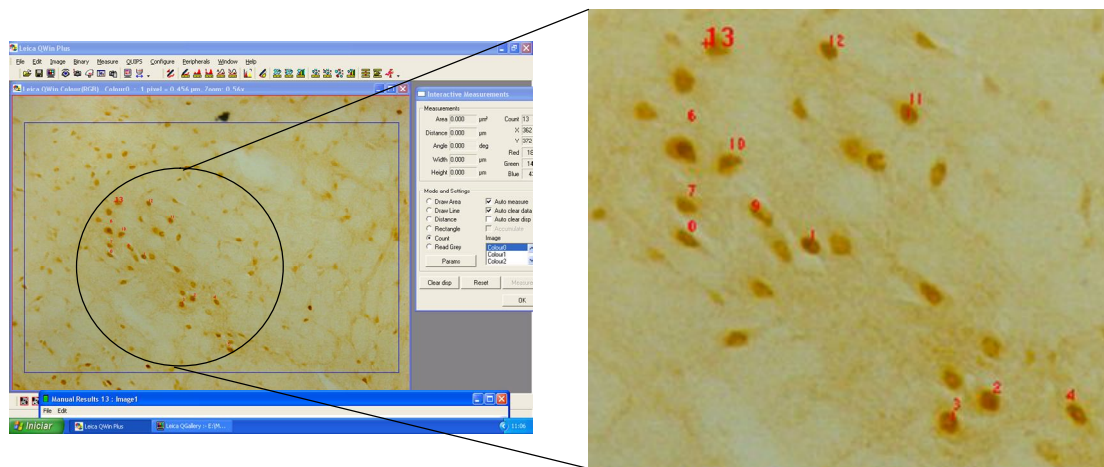
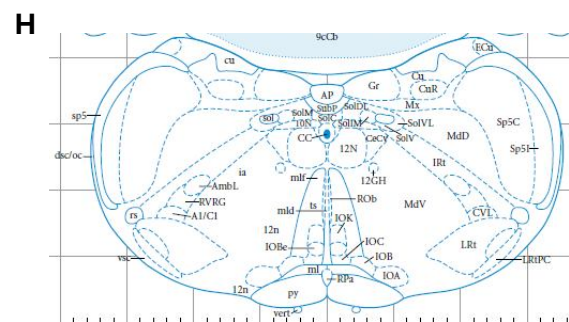
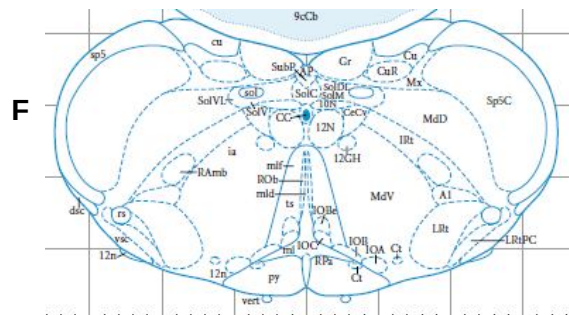
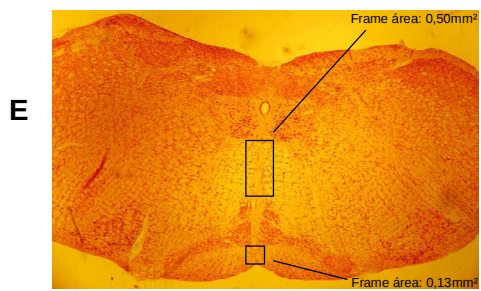
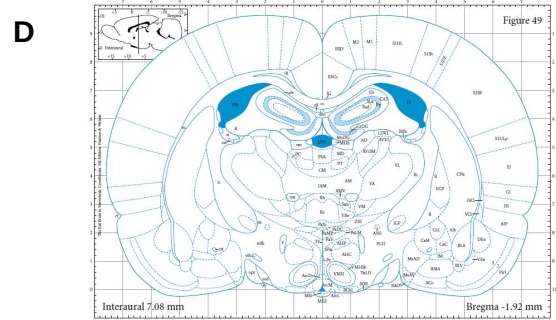
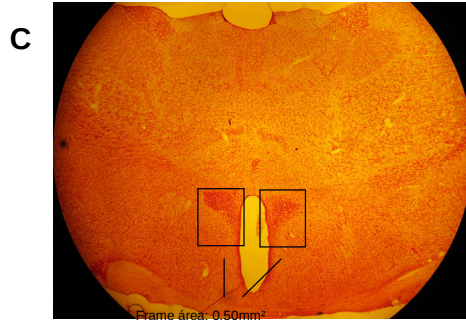


Figura 3 – Contagem de neurônios marcados com c-fos realizada com o auxílio do software Leica Q Win ®. RVLM de animal desnutrido Phe. Imunohistoquímica PAP, 20x.

Como não foram observadas diferenças significativas entre os grupos no que se refere ao tamanho (em mm²) das áreas analisadas (por favor, ver seção de resultados), estabelecemos uma área de 0,23 mm² para o CVLM, 0,48 mm² para o RVLM, 0,44 mm² para NTScc, NTSm e NTSr e 0,50 mm² para Rob e PVH medial e 0,13 mm² para RPa. A figura 4 mostra como foi realizada a morfometria para estudo das áreas analisadas, utilizando-se o software Leica Q Win ®.



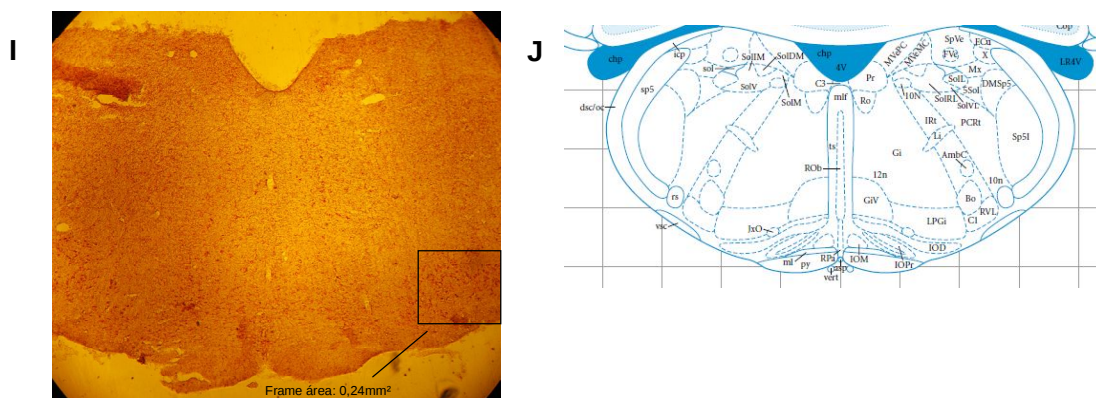


Figura 5 – Estabelecimento morfométrico e localização das áreas de contagem de neurônios (frames) nas regiões estudadas. A) Localização do NTSCc através de cortes sequenciais corados com vermelho neutro (B) Localização do NTSCc segundo coordenadas de Paxinos e Watson (2007). C) Localização do PVH medial através de cortes sequenciais corados com vermelho neutro (D) Localização do PVH medial segundo coordenadas de Paxinos e Watson (2007). (E) Localização do Rob e RPa através de cortes sequenciais corados com vermelho neutro (F) Localização do Rob e RPa segundo coordenadas de Paxinos e Watson (2007). (G) Localização do CVLM através de cortes sequenciais corados com vermelho neutro (H) Localização do CVLM segundo coordenadas de Paxinos e Watson (2007). (I) Localização do RVLM através de cortes sequenciais corados com vermelho neutro (J) Localização do RVLM segundo coordenadas de Paxinos e Watson (2007).

Em nossos estudos, observamos diferentes padrões de expressão neuronal de proteínas c-fos na regiões do sistema nervoso central estudadas. Para verificar se existia um padrão diferenciado de ativação nessas regiões, uma vez que estas áreas tinham tamanhos muito diferentes, dividimos o número de neurônios marcados, imunorreativos para c-fos (fos-ir), pela área de cada região estudada, com o objetivo de verificar a densidade da marcação. Assim, foi proposto classificar, de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelas direções estatísticas encontradas (ver tabela 2 na seção de resultados), a intensidade da marcação neuronal em leve, moderada e intensa sendo que os valores obtidos em cada área delimitada variaram entre 150 e 259, 260-367 e 368-530 fos-ir/mm², respectivamente. No entanto, estes valores foram considerados apenas quando foi observado um aumento significativo na expressão de c-fos no grupo infundido com Phe.

Estatística: Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA Two-way [(C vs. D) x (Sal vs. Phe)] ou teste “t” de Student quando apropriado. A significância foi estabelecida em $P < 0,05$.

RESULTADOS

5 - RESULTADOS

5.1 – Efeito da desnutrição sobre o peso corporal dos ratos

Ao final do período de 35 dias de restrição protéica, os animais desnutridos (n=15) que receberam dieta isocalórica com 60% de redução protéica apresentaram peso significativamente menor quando comparado ao grupo (n=16) da mesma ninhada que recebeu a dieta controle ($75 \pm 3\text{g}$ vs. $279 \pm 15\text{g}$). Estes resultados são mostrados na figura 6.

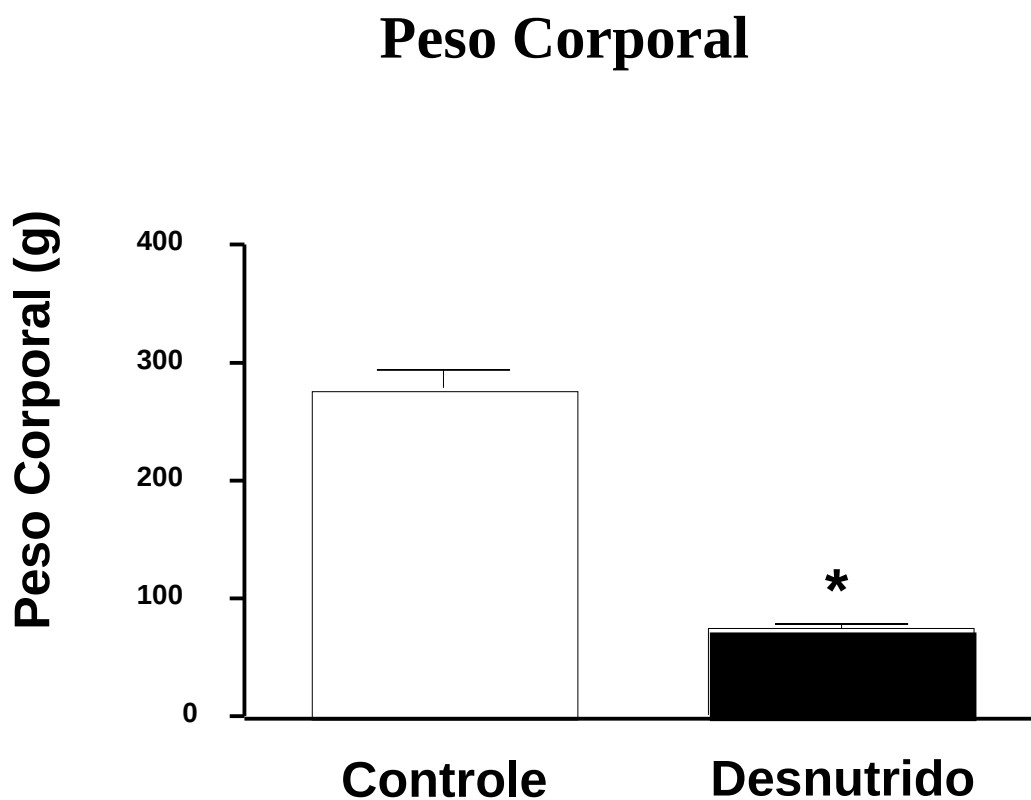


Figura 6 – Peso corporal (g) em ratos do grupo controle (n=16) e desnutrido (n=15). *p < 0.05 em comparação ao grupo controle. Teste “t” de Student.

5.2 – Valores basais de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)

Os níveis basais de PAM e FC foram avaliados por um período de 10 minutos, antes do início do experimento, em animais do grupo controle e desnutrido.

Foi observada uma maior FC basal em animais desnutridos (484 ± 28 vs 381 ± 17 bpm; $P < 0,05$) em relação aos controles (figura 7). Não foram observadas diferenças nos valores de PAM basal nos grupos estudados (D: 105 ± 5 vs C: 115 ± 3 mmHg) (figura 8).

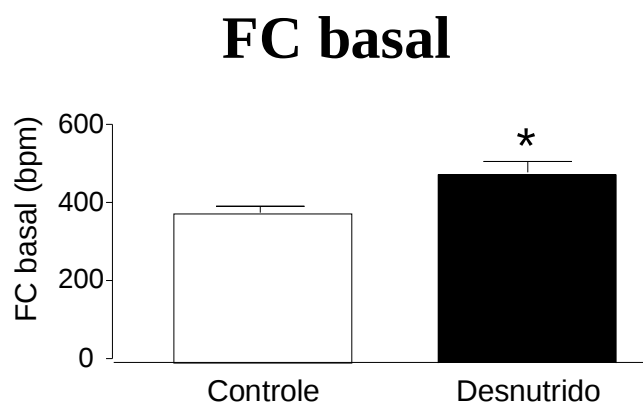


Figura 7 – Frequência cardíaca basal (FC, bpm/min) em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7). *p < 0.05 em comparação ao grupo controle. Teste “t” de Student.

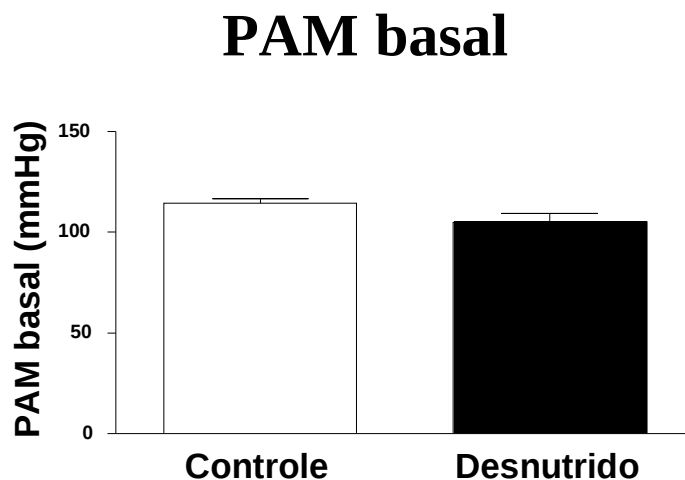


Figura 8 – Pressão arterial média basal (PAM, mmHg) em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7). Teste “t” de Student.

5.3 – Avaliação do barorreflexo

A figura 9 representa alterações na pressão arterial e na frequência cardíaca em resposta à infusão de fenilefrina (0,25 mM). Não foram observadas diferenças significativas no ganho barorreflexo (C: $-1,5 \pm 0,2$ vs D: $-2,2 \pm 0,6$ bpm / mmHg, $n=7-8$) entre os grupos estudados, após infusões de fenilefrina.

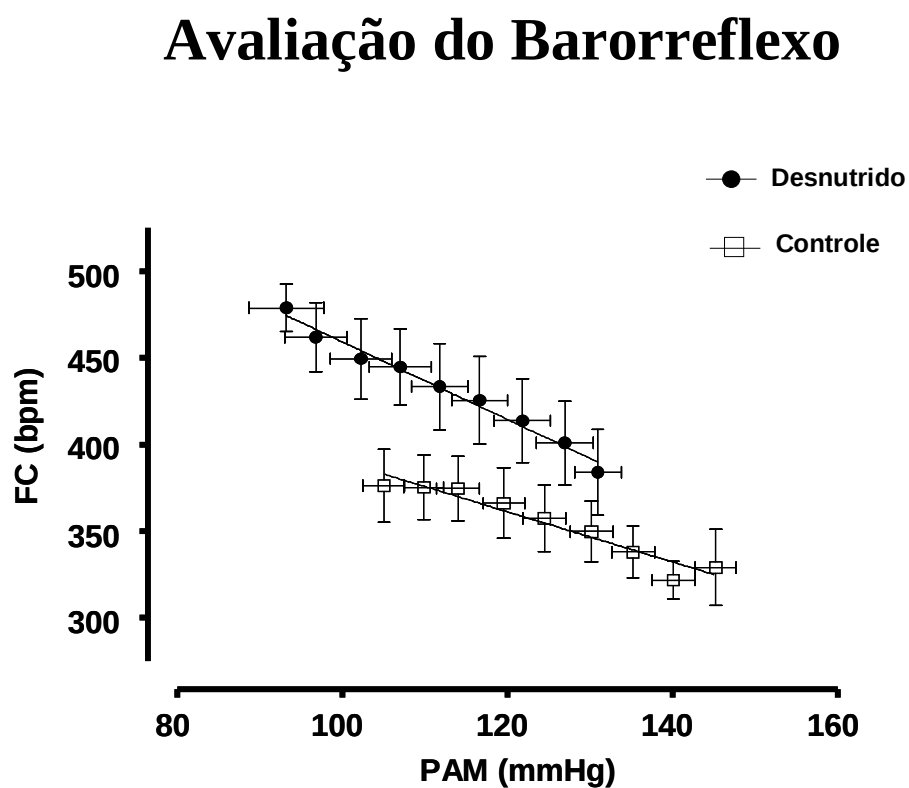


Figura 9 – Alterações reflexas da FC (bpm) em resposta ao aumento da PAM (mmHg) induzidas pela infusão de fenilefrina (0,25 mM) em ratos controles ($r^2=0,1309$) e desnutridos ($r^2=0,2020$).

5.4 – Controle de volume infundido

Durante a estimulação intermitente do barorreflexo com fenilefrina, foi necessário realizar um controle do volume infundido, uma vez que os grupos de animais estudados possuíam médias de peso corporais muito distintas. Desta forma, foi necessário certificar que as alterações na expressão neuronal de c-fos nas áreas estudadas, não estariam sendo provocadas ou mesmo modificadas, por alterações de volume e não apenas pelo aumento da PA, provocado pela fenilefrina.

Para tanto, foi verificada a relação entre o volume infundido (ml) e o peso corporal do animal (g). Não foram observadas diferenças significativas entre os volumes infundidos de fenilefrina (C: $0,006 \pm 0,0007$ vs. D: $0,005 \pm 0,0004$ ml/g, n=6) e salina (C: $0,006 \pm 0,0007$ vs. D: $0,005 \pm 0,0002$ ml/g, n=6) nos grupos estudados (figura 10).

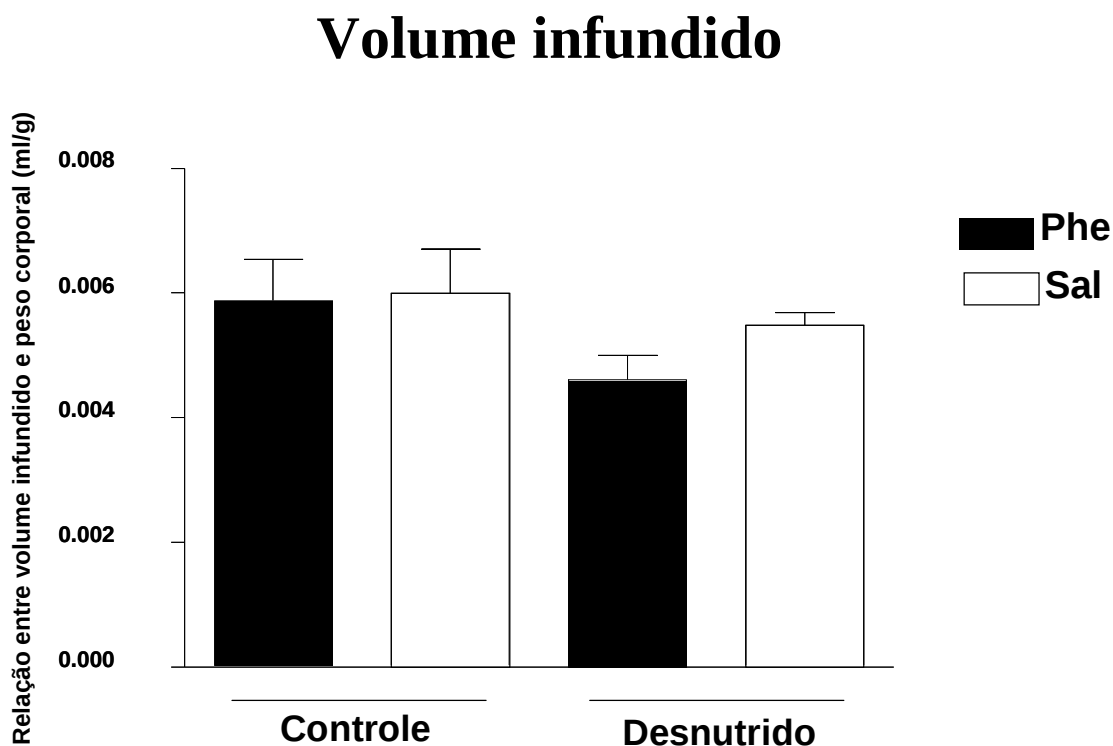


Figura 10 – Relação entre volume infundido e peso corporal (ml/g) em ratos Controle (n=6) e Desnutridos (n=6). Teste “t” de Student.

5.5 – Respostas cardiovasculares promovidas pela ativação do barorreflexo

Alterações da PAP, FC, PAM em função do tempo, produzidas pela ativação do reflexo barorreceptor com infusão, de fenilefrina (0,25 mM) (aumento de pressão de ~ 40 mmHg), utilizando uma bomba de infusão (Bi 2000, Insight) na velocidade de 12 ml/h, em animais controle e desnutridos.

Registros típicos de PAP, FC e PAM basais

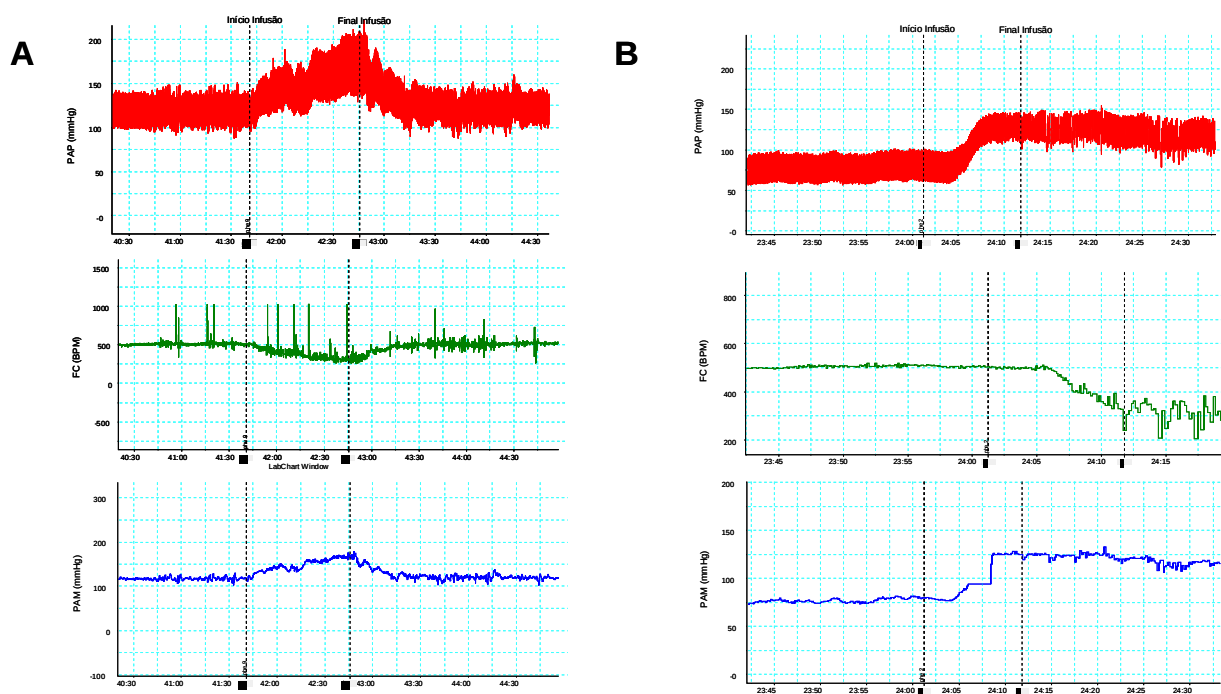


Figura 11 – Registros representativos do grupo controle (A) e do grupo desnutrido (B) mostrando os efeitos das infusões de fenilefrina sobre a PAP, FC, PAM em função do tempo.

5.6 - Elaboração de projeto-piloto para padronização do protocolo de imunohistoquímica para c-fos:

Ao iniciarmos nossos estudos e quando optamos em utilizar a técnica de imunohistoquímica para c-fos, utilizando o protocolo anteriormente descrito, nos deparamos com uma questão metodológica. Nossa dúvida era com relação à disposição dos cortes em placas para ELISA (para processamento *free-floating*) ou se, logo após a secção do tronco cerebral em criostato, os cortes já seriam dispostos em lâminas gelatinizadas e os reagentes gotejados sobre os mesmos.

A técnica que utiliza gotejamento dos reagentes sobre os cortes parecia mais vantajosa, primeiro pela economia, uma vez que seriam necessários apenas 60µl de solução sobre cada corte, diferente da técnica *free-floating*, que usa 2ml de solução em cada poço da placa de ELISA.

Outra vantagem da técnica de gotejamento era que os cortes seriam dispostos na ordem em que fossem seccionados, o que facilitaria a localização das regiões a serem estudadas posteriormente.

A figura abaixo mostra fotomicrografias de cortes histológicos que sofreram processamento imunohistoquímico para c-fos, utilizando-se as duas técnicas acima discutidas. Através das fotomicrografias podemos perceber que a técnica *free-floating* foi a mais eficiente em produzir uma marcação para c-fos de qualidade, uma vez que na fotomicrografia do painel A não foram observadas proteínas c-fos marcadas.

A



B

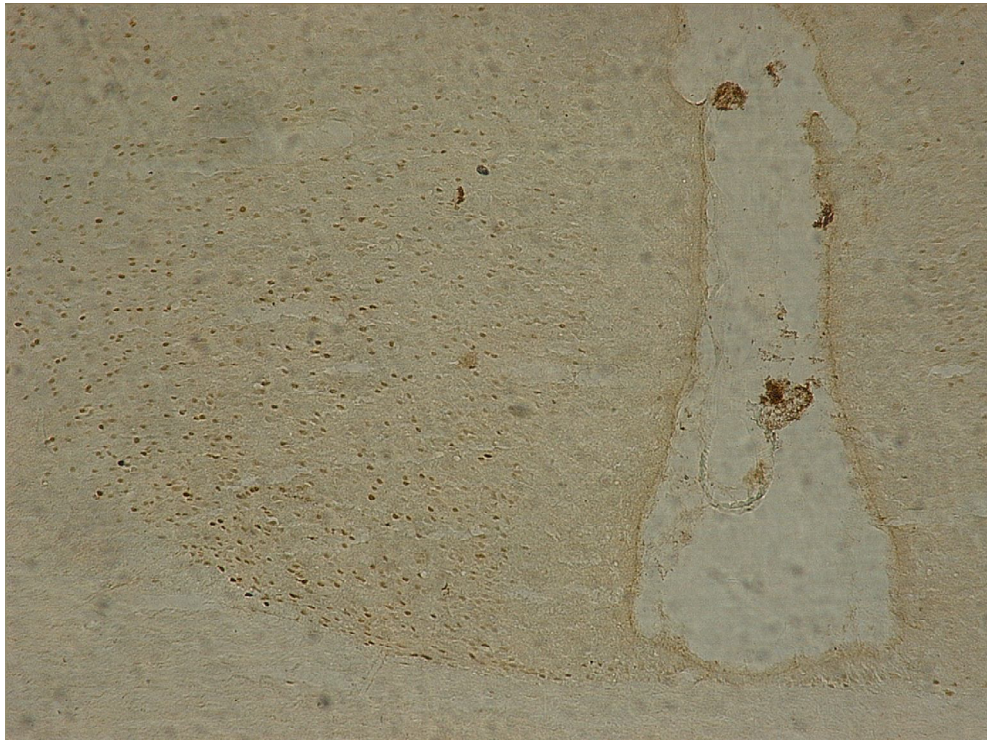


Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos de tronco cerebral que sofreram processamento imunohistoquímico para c-fos utilizando-se técnica de gostejamento (A) e *free-floating* (B). Imunohistoquímica PAP, 10x.

5.7 – Análise morfométrica das regiões centrais estudadas

Trabalhos anteriores de nosso laboratório já haviam revelado a semelhança entre o peso dos cérebros de animais controle e desnutridos. Porém um estudo morfométrico ainda não havia sido realizado. Diante dessa necessidade, realizamos a análise morfométrica das regiões centrais escolhidas para este estudo, a saber: CVLM, RVLM, NTScc, NTSm e NTSr, Rob, RPa, PVH anterior, PVH medial e PVH posterior. A tabela 1 apresenta os resultados da análise morfométrica realizada utilizando-se o software Leica Q Win ® e mostra que não foram observadas diferenças significativas nas áreas estudadas nos grupos avaliados.

Tabela 1 – Análise morfométrica das regiões centrais estudadas em animais controle (n=16) e desnutridos (n=15).

REGIÕES	ÁREA (mm ²)		ÁREA MÉDIA (mm ²)
	CONTROLE	DESNUTRIDO	
CVLM	0.2338 ± 0.01580	0.2288 ± 0.03430	0,23
RVLM	0.4775 ± 0.03544	0.4825 ± 0.09296	0,48
NTScc	0.4325 ± 0.03559	0.4413 ± 0.03538	0,44
NTSm	0.4350 ± 0.04062	0.4425 ± 0.04655	0,44
NTS r	0.4450 ± 0.03708	0.4438 ± 0.05028	0,44
Rob	0.5088 ± 0.04994	0.4950 ± 0.03822	0,5
Rpa	0.1350 ± 0.01918	0.1188 ± 0.02881	0,13
PVH anterior	0.5038 ± 0.03251	0.4975 ± 0.05790	0,5
PVH medial	0.5075 ± 0.02743	0.4988 ± 0.03119	0,5
PVH posterior	0.4950 ± 0.02268	0.5038 ± 0.04395	0,5

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. *p < 0.05 em comparação ao grupo controle. Teste “t” de Student.

5.8 - Expressão neuronal de c-fos no PVH medial em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo

A Figura 13 apresenta a contagem de neurônios marcados com c-fos no PVH. A estimulação intermitente de barorreflexo com fenilefrina produziu aumentos semelhantes no número neurônios marcados com c-fos no PVH de ratos do grupo controle e desnutrido (C Phe: 241 ± 33 vs D Phe: 224 ± 25) quando comparado com animais que receberam infusões de salina (C: 116 ± 1 vs D: 124 ± 14) ($P < 0,05$, Phe vs Sal). Curiosamente, a região medial do PVH mostrou maior número neurônios c-fos marcados nos grupos controle e desnutrido Phe (132 ± 24 vs 139 ± 21) que receberam infusões de fenilefrina em comparação com os grupos que só receberam salina (54 ± 9 vs 62 ± 11) ($P < 0,05$, Phe vs Sal). As fotomicrografias da figura 14 mostram a área do PVH onde a expressão neuronal de c-fos foi analisada.

Número de neurônios marcados com c-fos no PVH medial

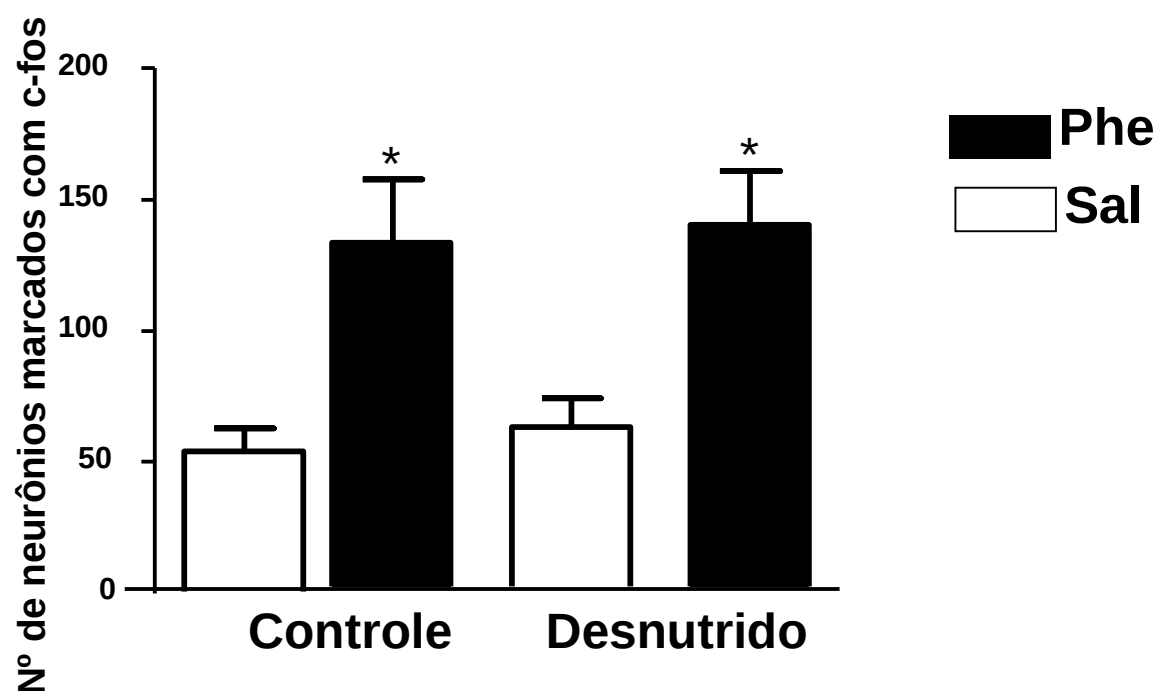


Figura 13 – Expressão neuronal de c-fos no PVH medial em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7-8). *p<0.0001 comparado ao grupo Salina. ANOVA Two way.

Expressão neuronal de c-fos no PVH medial

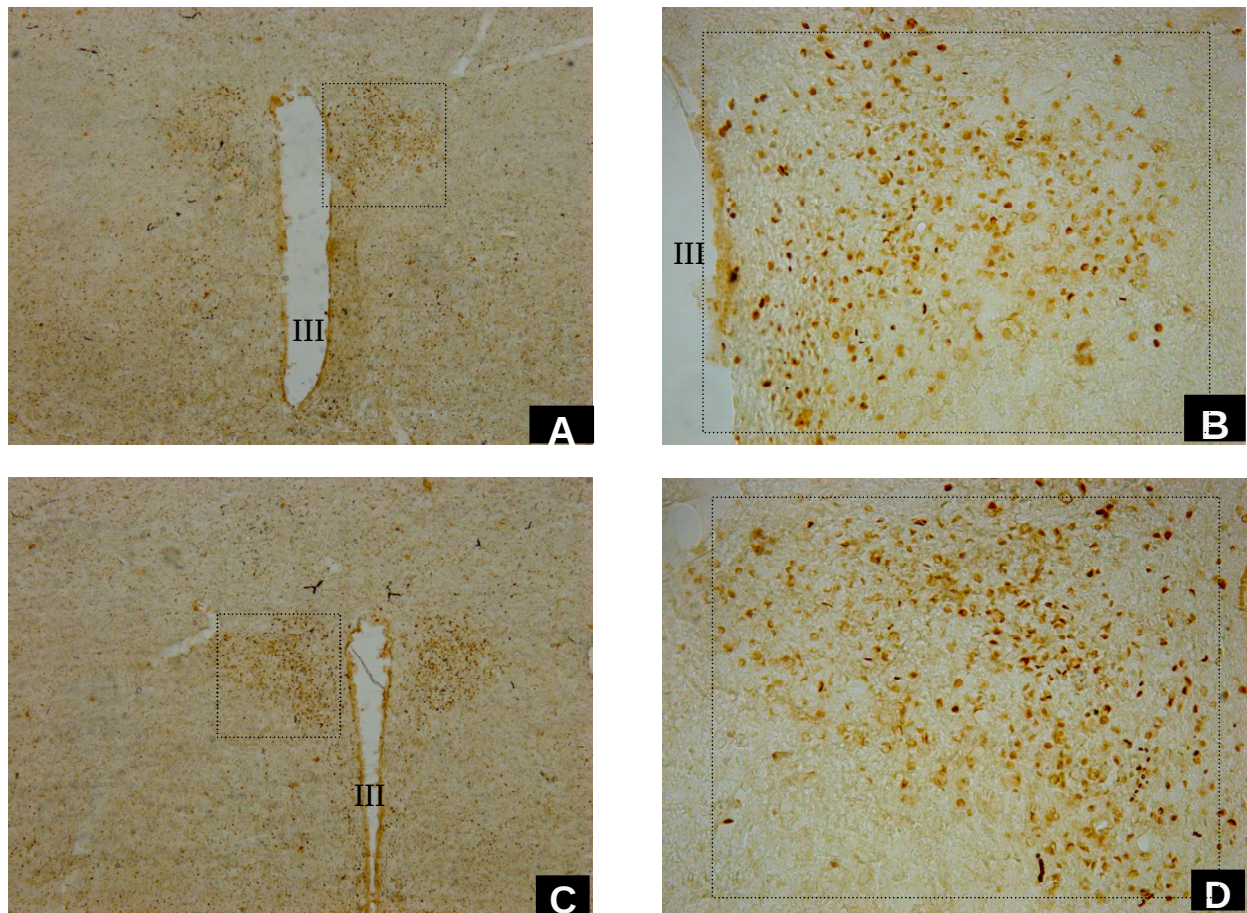


Figura 14 – Fotomicrografias representativas da expressão neuronal de c-fos no PVH medial (aumento 5x e 20x) em ratos desnutridos (A e B) e Controles (C e D) infundidos com fenilefrina. Os quadrados pontilhados indicam a área em que foi realizada a análise da marcação neuronal. Imunohistoquímica PAP.

5.9 - Expressão neuronal de c-fos no NTS em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo

A Figura 15 resume os resultados da expressão de c-fos no NTS de animais controle e desnutrido que receberam infusões de Phe e Sal. Foram observados aumentos significativos no número de neurônios marcados no grupo controle, após infusão de Phe ($383,8 \pm 58,19$ vs 166 ± 32 ; $P < 0,05$), quando comparado ao Sal. Padrão semelhante foi encontrado no grupo desnutrido (600 ± 47 vs 245 ± 18). No entanto, o número de neurônios marcados com c-fos foi significativamente maior no NTS de animais desnutridos que receberam infusões de Phe (Phe: CT vs MN; $P < 0,05$).

Durante as análises, o NTS foi dividido em 3 regiões: i) NTSCc, ii) NTSM e iii) NTSr, conforme já descrito anteriormente. É importante salientar que, nos animais do grupo controle infundidos com Phe, o NTSM foi a região que apresentou a maior expressão de c-fos. Comparado com os infundidos com salina, os desnutridos infundidos com Phe apresentaram um aumento significativo na expressão neuronal de c-fos em todas as subdivisões do NTS [(NTSCc: 55 ± 5 vs 162 ± 20 ; $P < 0,05$); (NTSM: 87 ± 9 vs 233 ± 27 ; $P < 0,05$); (NTSr: 79 ± 12 vs 205 ± 30 ; $P < 0,05$)] (figura 16). As fotomicrografias da figura 17 ilustram o NTSM dos grupos estudados, onde os neurônios c-fos marcados foram contados.

Número de neurônios marcados com c-fos no NTS

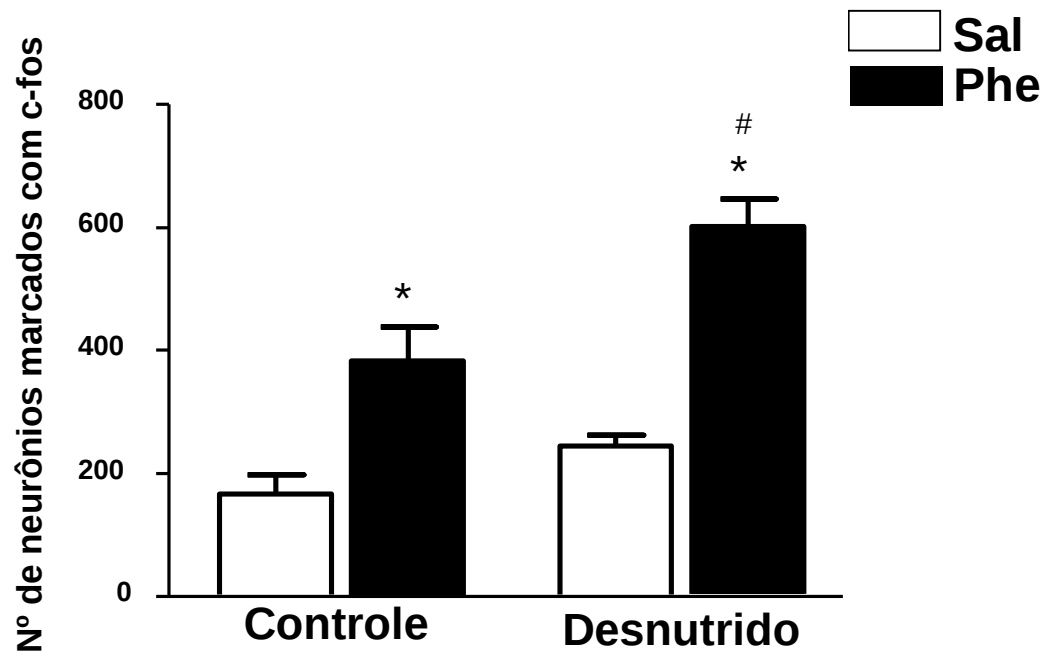


Figura 15 – Expressão neuronal de c-fos no NTS em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7-8) rats. * $p < 0.0001$ comparado ao grupo Salina. # $p < 0.0019$ comparado ao grupo Controle Phe. ANOVA Two way.

Número de neurônios marcados com c-fos em diferentes regiões do NTS

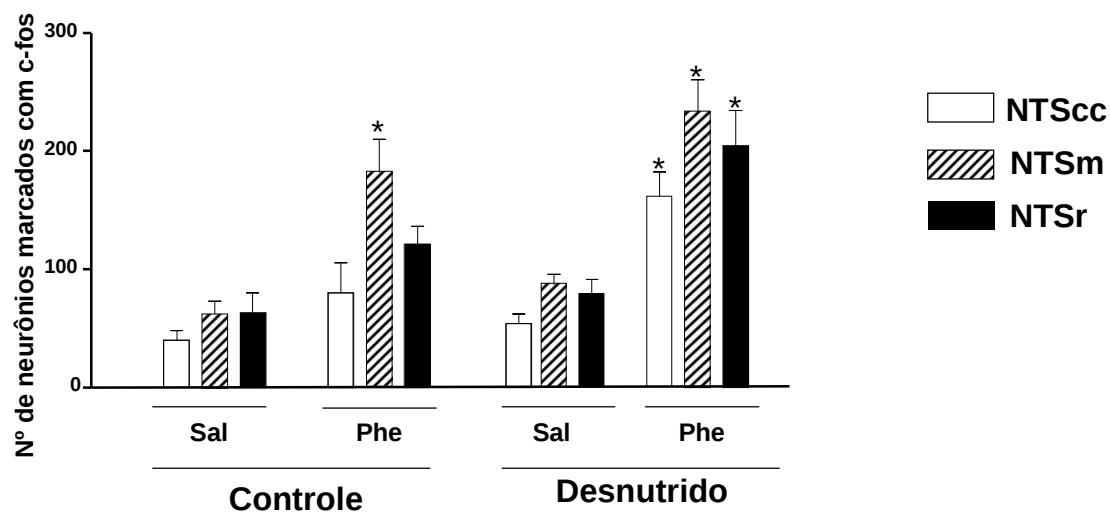


Figura 16 – Expressão neuronal de c-fos em diferentes regiões do NTS em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7-8) rats. * p < 0.05 comparado ao grupo Salina. ANOVA Two way.

Expressão neuronal de c-fos no NTS medial

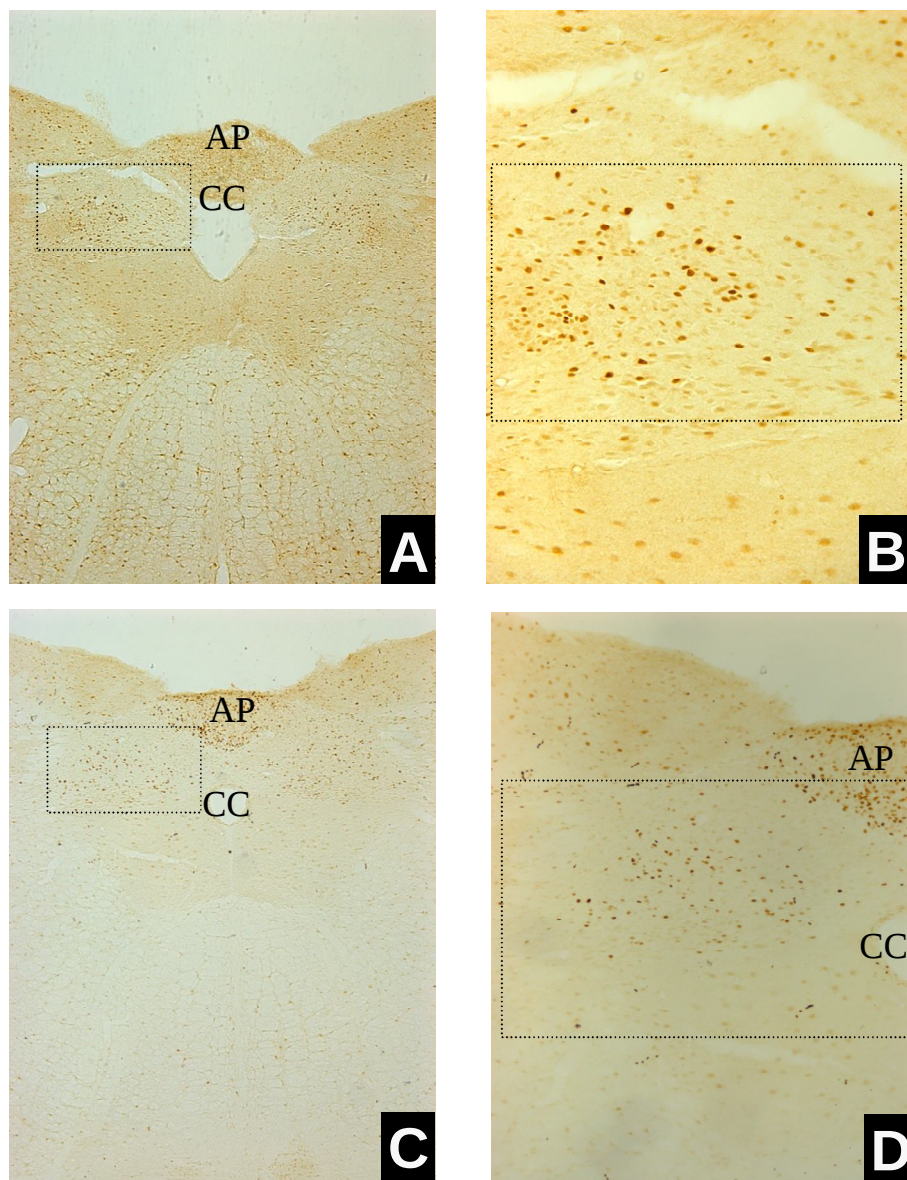


Figura 17 – Fotomicrografias representativas da expressão neuronal de c-fos no NTS medial (aumento 5x e 20x) em ratos desnutridos (A e B) e Controles (C e D) infundidos com fenilefrina. Os quadrados pontilhados indicam a área em que foi realizada a análise da marcação neuronal. Imunohistoquímica PAP.

5.10 - Expressão neuronal de c-fos no RVMM em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo

Os dados agrupados de RVMM mostraram uma maior expressão de c-fos em animais desnutridos infundidos com Phe (Figura 18). Durante nossas análises, também optamos por estudar duas regiões específicas do RVMM, a saber: RPa e Rob. Não foram encontradas diferenças na expressão de c-fos em RPA de animais controles e desnutridos infundidos com Phe (figura 19). No entanto, um aumento substancial no número de neurônios marcados com c-fos foi observado em ROB de desnutridos infundidos com Phe (81 ± 18 x 29 ± 5 ; $P < 0,05$). As fotomicrografias da figura 20 ilustram o Rob dos grupos estudados, onde os neurônios c-fos marcados foram contados.

Número de neurônios marcados com c-fos no RVMM

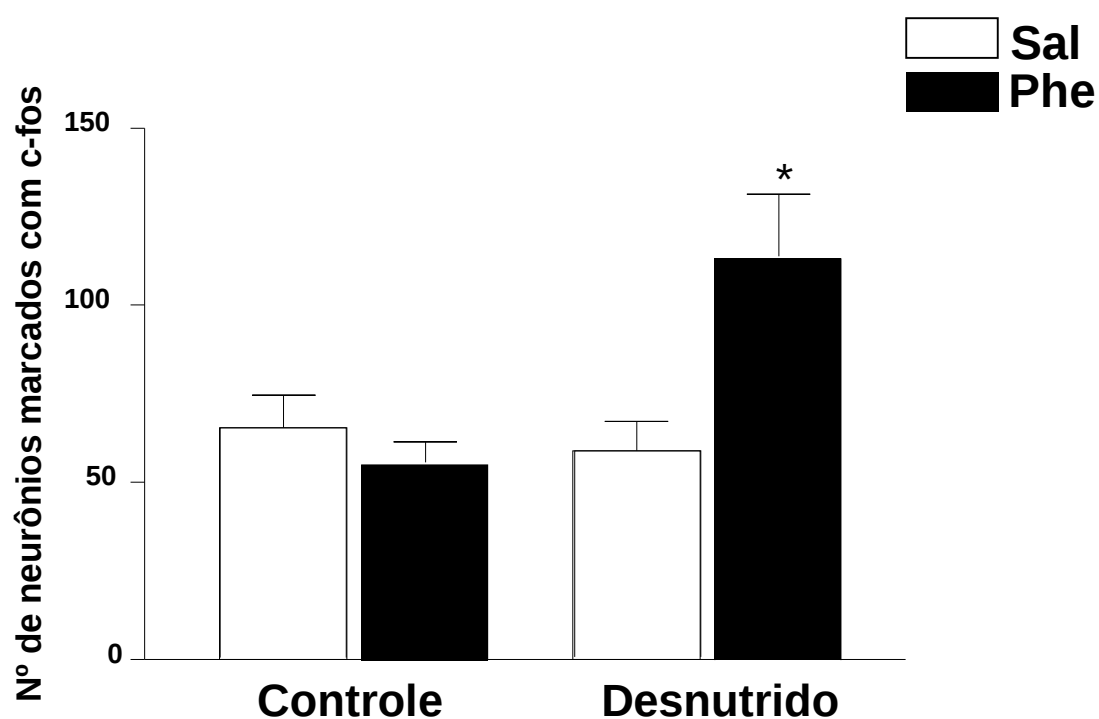


Figura 18 – Expressão neuronal de c-fos no RVMM em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7-8) rats. * $p < 0.0306$ comparado ao grupo Salina. ANOVA Two way.

Número de neurônios marcados com c-fos no RPa e Rob

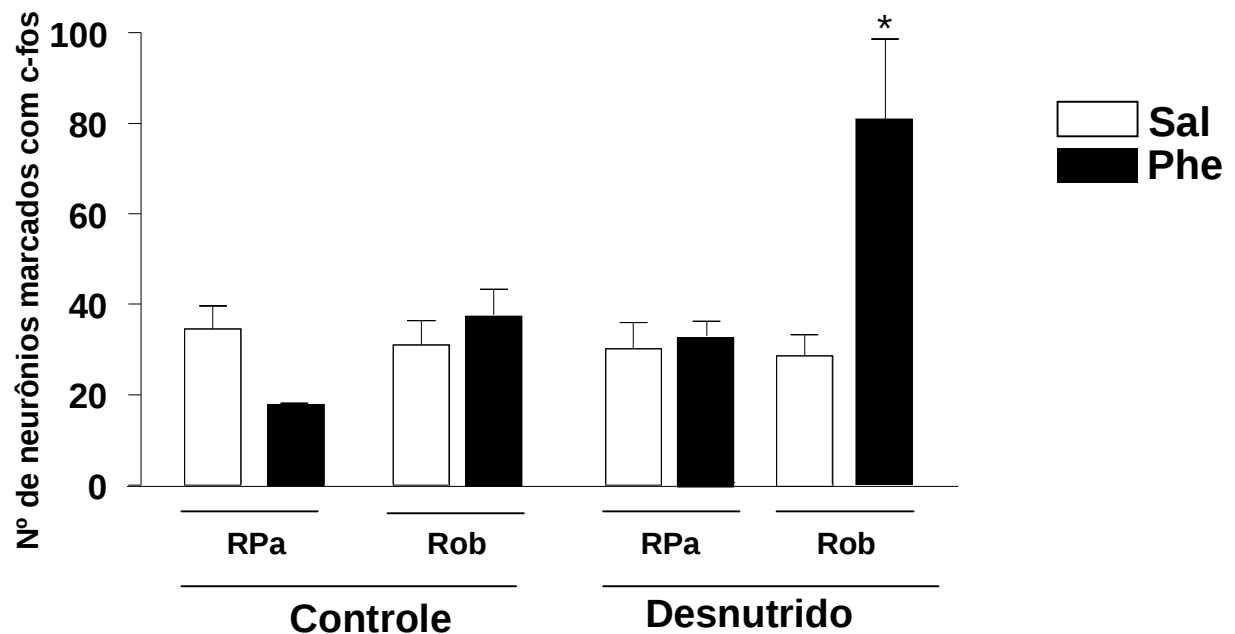


Figura 19 – Expressão neuronal de c-fos no RPa e Rob em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7-8) rats. * p < 0.05 comparado ao grupo Salina. ANOVA Two way.

Expressão neuronal de c-fos no Rob

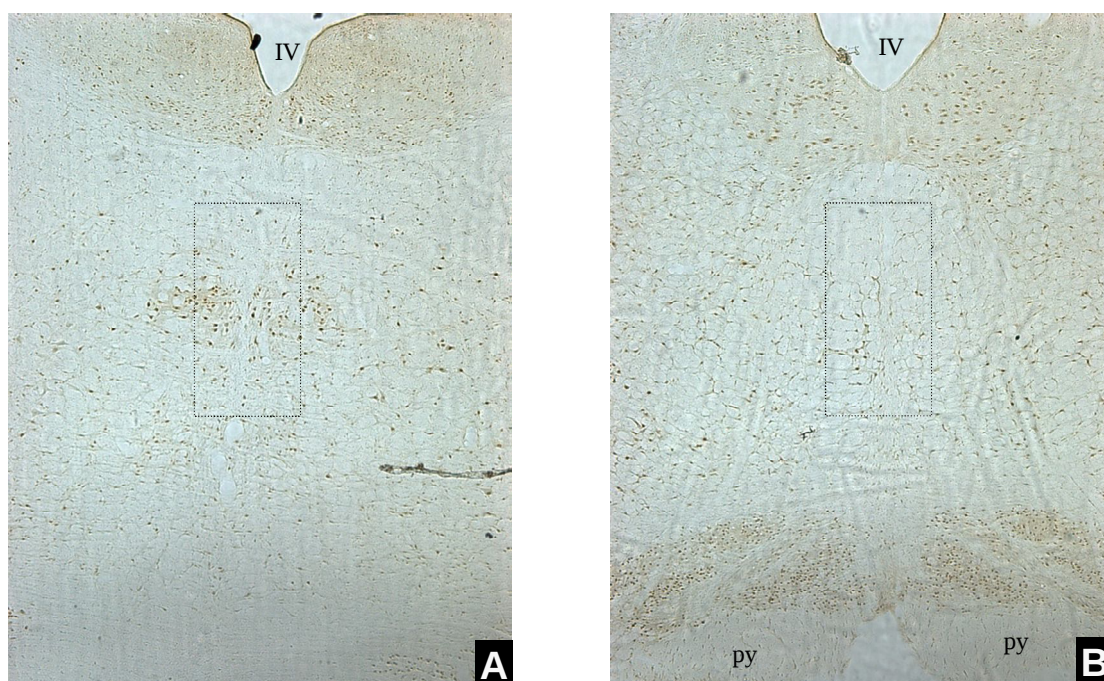


Figura 20 – Fotomicrografias representativas da expressão neuronal de c-fos no Rob (aumento 10x) em ratos desnutridos (A) e Controles (B) infundidos com fenilefrina. Os quadrados pontilhados indicam a área em que foi realizada a análise da marcação neuronal. Imunohistoquímica PAP.

5.11 - Expressão neuronal de c-fos no CVLM em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo

Foi observada uma maior expressão de c-fos nos neurônios da CVLM de animais controles e desnutridos infundidos com fenilefrina quando comparados aos infundidos com solução fisiológica [(C: 64 ± 10 vs 30 ± 5 , $P < 0,05$); (D: 73 ± 5 vs 26 ± 2 , $P < 0,05$)], sendo que este aumento foi semelhante entre os grupos que receberam Phe (figura 21). As fotomicrografias da figura 22 ilustram a CVLM dos grupos estudados, onde os neurônios c-fos marcados foram contados.

Número de neurônios marcados com c-fos no CVLM

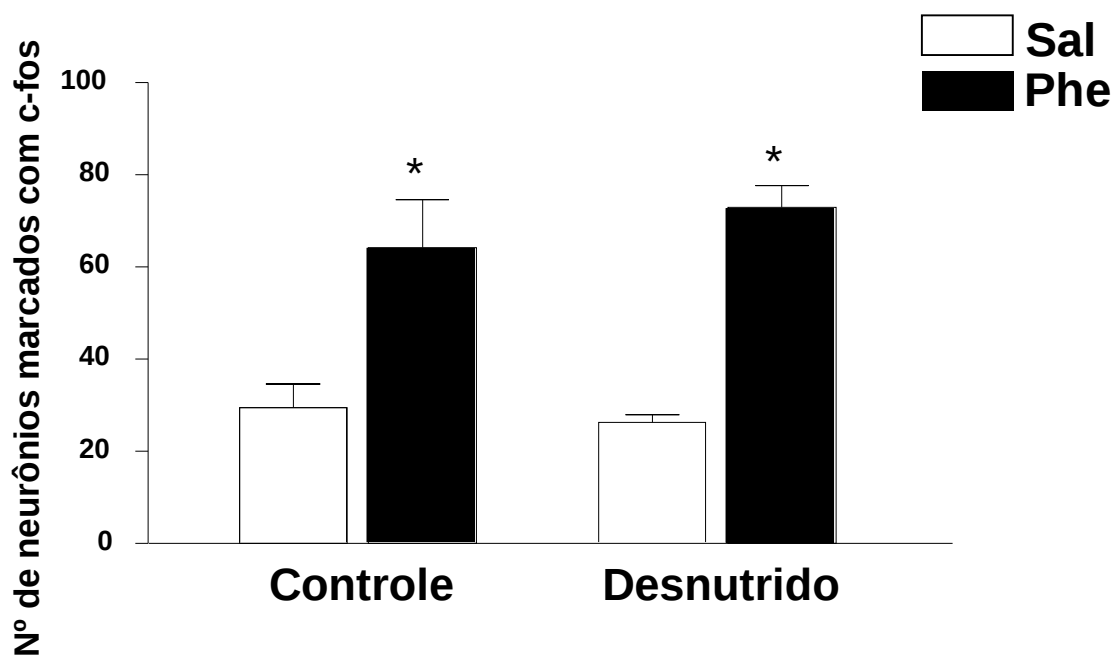


Figura 21 – Expressão neuronal de c-fos no CVLM em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7-8) rats. * $p < 0.0001$ comparado ao grupo Salina. ANOVA Two way.

Expressão neuronal de c-fos no CVLM

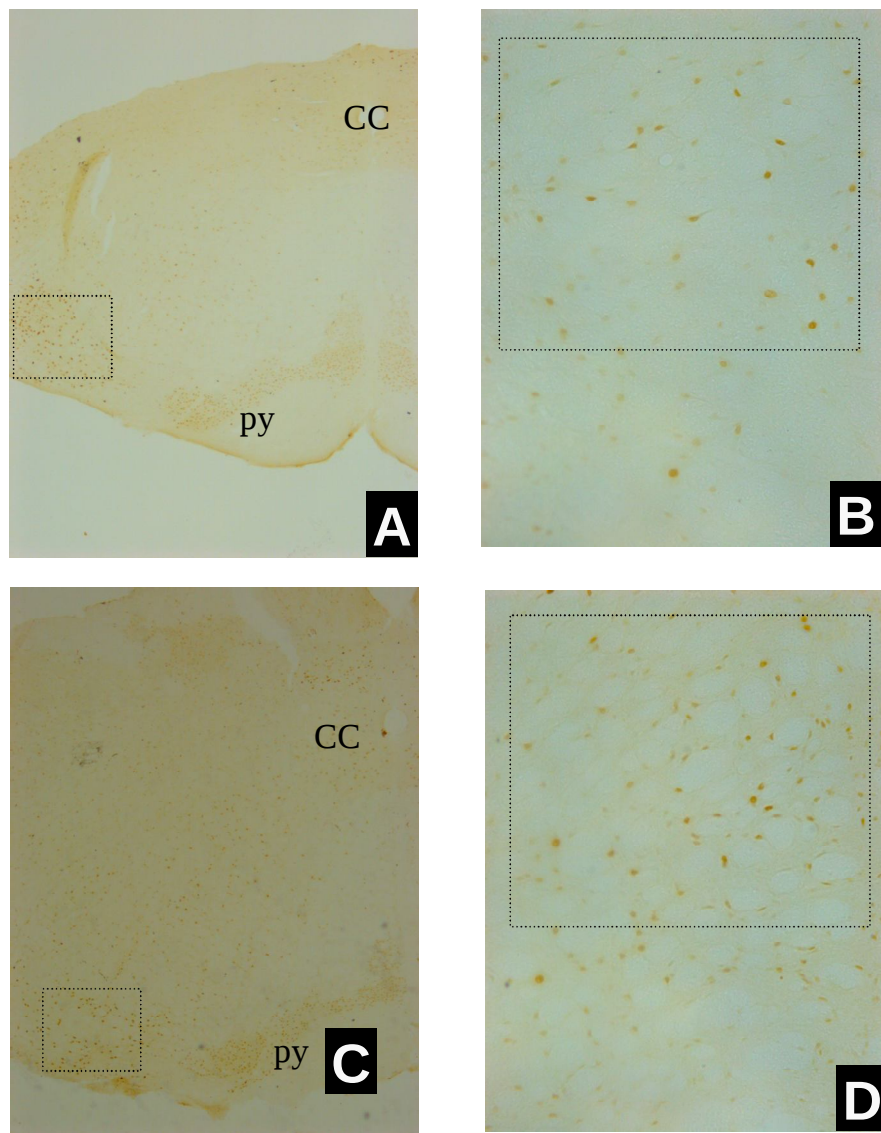


Figura 22 – Fotomicrografias representativas da expressão neuronal de c-fos no CVLM (aumento 5x e 20x) em ratos desnutridos (A e B) e Controles (C e D) infundidos com fenilefrina. Os quadrados pontilhados indicam a área em que foi realizada a análise da marcação neuronal. Imunohistoquímica PAP.

5.12 - Expressão neuronal de c-fos no RVLM em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo

O RVLM de animais controles e desnutridos, infundidos intermitentemente com fenilefrina apresentou uma maior expressão neuronal de c-fos quando comparado ao do grupo salina [(C: 125 ± 5 vs 38 ± 14 ; $P < 0,05$); (D: 73 ± 14 vs 35 ± 3 ; $P < 0,05$)], de forma semelhante ao encontrado no CVLM (figura 23).

No entanto, o RVLM de animais desnutridos parece reagir diferentemente a infusões intermitentes de Phe, uma vez que apresentou um menor número de neurônios marcados com c-fos, quando comparado com o grupo controle nas mesmas condições experimentais (Phe: C vs D; $P < 0,05$) (figura 23). As fotomicrografias da figura 24 ilustram o RVLM dos grupos estudados, onde os neurônios c-fos marcados foram contados.

Número de neurônios marcados com c-fos no RVLM

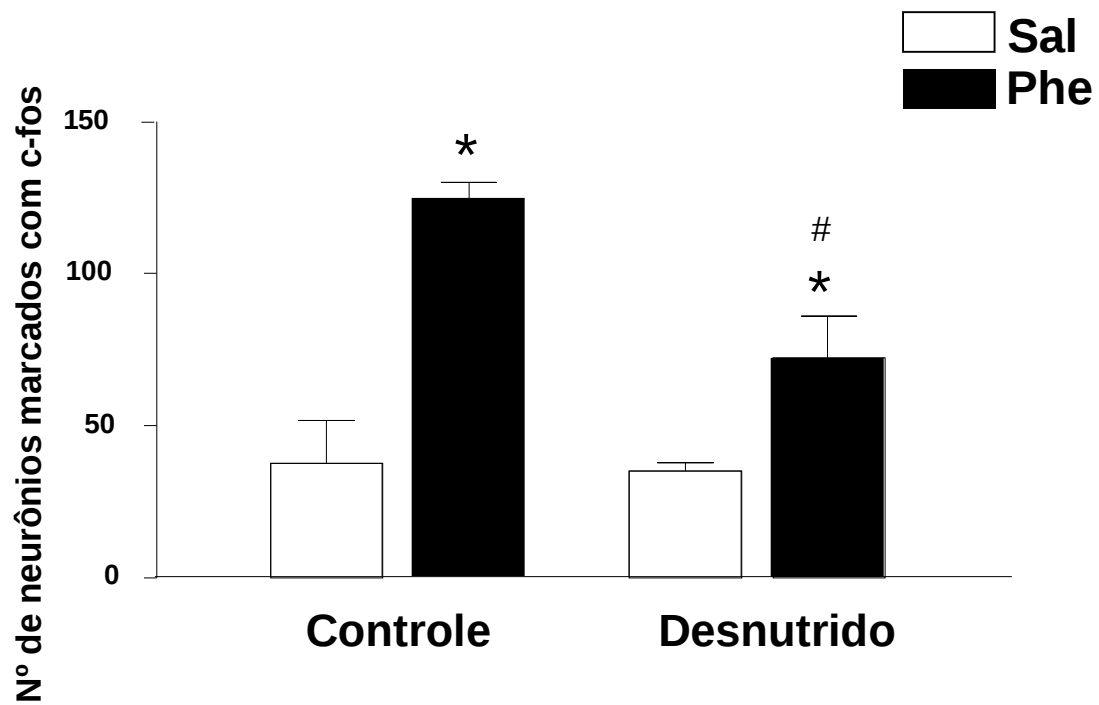


Figura 23 – Expressão neuronal de c-fos no RVLM em ratos Controle (n=8) e Desnutridos (n=7-8) rats. * $p < 0.0001$ comparado ao grupo Salina. # $p < 0.0147$ comparado ao grupo Controle Phe. ANOVA Two way.

Expressão neuronal de c-fos no RVLM

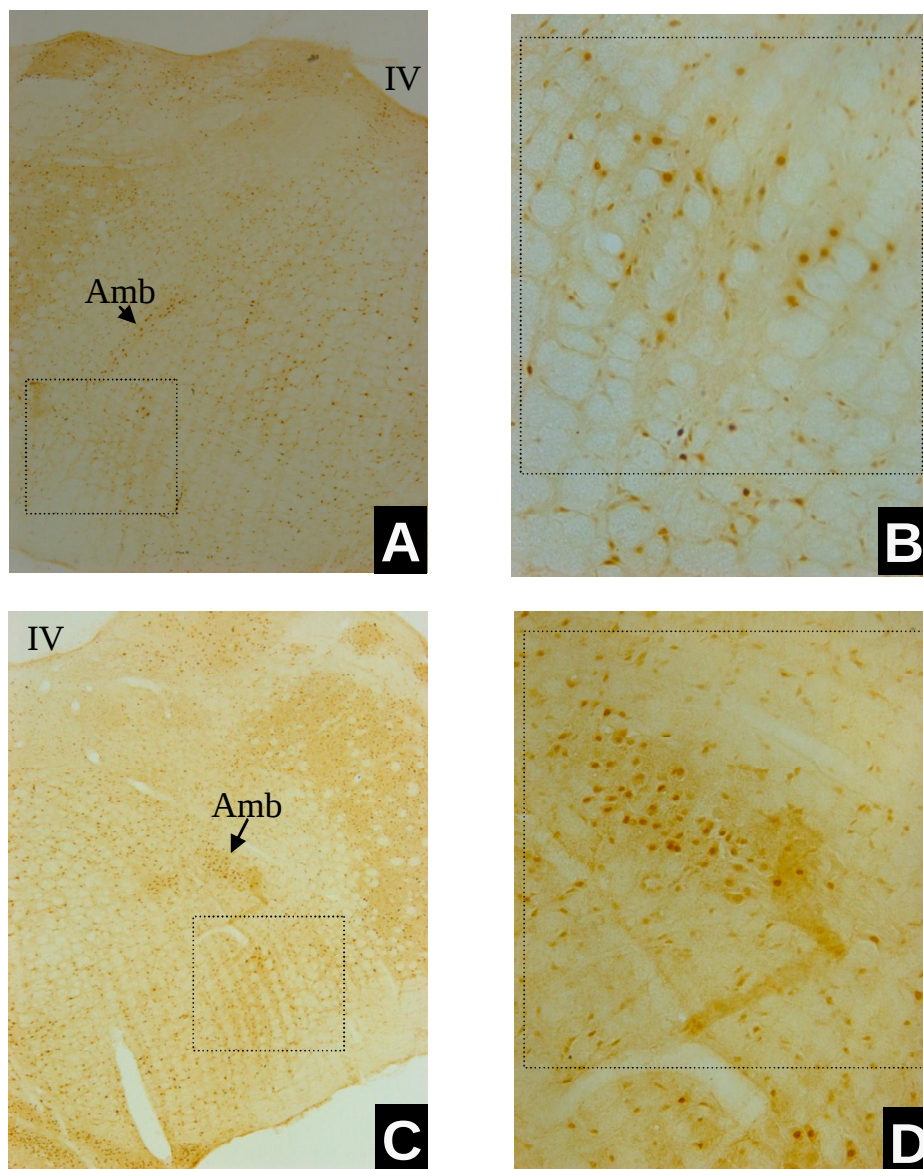


Figura 24 – Fotomicrografias representativas da expressão neuronal de c-fos no RVLM (aumento 5x e 20x) em ratos desnutridos (A e B) e Controles (C e D) infundidos com fenilefrina. Os quadrados pontilhados indicam a área em que foi realizada a análise da marcação neuronal. Imunohistoquímica PAP.

5.13 - Padrão de ativação neuronal em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo

A fim de proporcionar uma comparação entre a intensidade da marcação de c-fos nas áreas específicas estudadas, foi realizada uma análise relativa em que a densidade da marcação foi classificada como leve, moderada e intensa (por favor, ver seção de métodos). Verificou-se uma diferença notável na expressão de c-fos em algumas áreas do sistema nervoso central, relacionadas com o controle das funções cardiovasculares. Assim, no grupo controle infundido com Phe encontramos marcações de densidade moderada no CVLM, RVLM e PVH medial. No mesmo grupo, observou-se marcação intensa no NTSm. Já no grupo desnutrido, surpreendentemente, encontramos marcações leves em RVLM e Rob, moderadas no CVLM e PVH medial e intensas em todas as regiões do NTS (figura 25 e tabela 2).

Padrão de ativação neuronal em resposta à infusão de fenilefrina

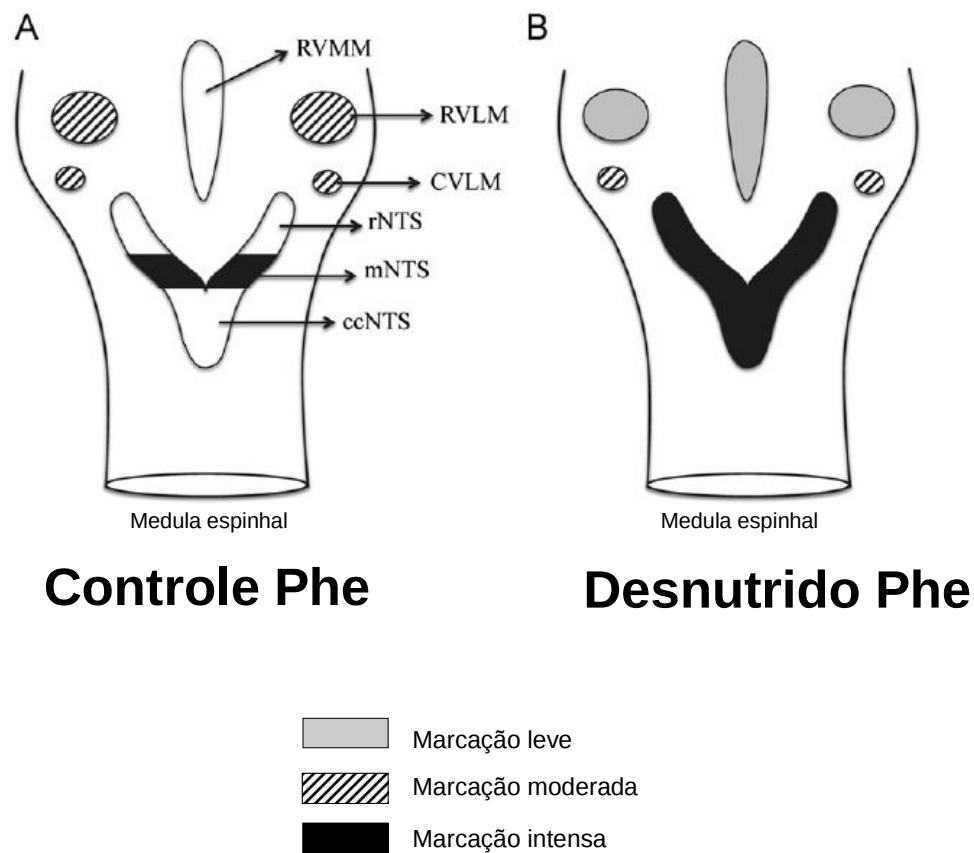


Figura 25 – Desenho esquemático que resume a densidade da marcação neuronal com c-fos em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo em animais Controle Phe (n=8) e Desnutrido Phe (n=7). Campos em cinza e preto indicam baixa e intensa marcação neuronal, respectivamente. Os campos com traços diagonais indicam marcação neuronal moderada para c-fos. CVLM - região ventrolateral caudal do bulbo; RVLM - região ventrolateral rostral do bulbo; RVMM - região rostral ventromedial do bulbo; NTS - núcleo do trato solitário.

Tabela 2 – Ativação neuronal em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo, em animais controle (n=8) e desnutridos (n=7).

Regiões SNC	Área (mm ²)	<i>Controle phe</i>		<i>Desnutrido phe</i>	
		Relação entre número de neurônios marcados/ área (mm ²)		Relação entre número de neurônios marcados/ área (mm ²)	
CVLM	0.23	278.7 ± 45.78		0.23	317.0 ± 20.32
RVLM	0.48	260.0 ± 10.70		0.48	150.7 ± 28.51 *
NTScc	0.44	182.8 ± 56.58 #		0.44	368.3 ± 45.94
NTSm	0.44	413.8 ± 64.11		0.44	530.5 ± 61.69
NTSr	0.44	275.6 ± 34.81 #		0.44	464.9 ± 67.49
Rob	0.5	75.22 ± 11.38 #		0.5	161.7 ± 35.57 *
PVH medial	0.5	263.4 ± 49.08		0.5	277.3 ± 41.00

não significativo quando comparado ao grupo infundido com salina. *p < 0.05 em comparação ao grupo controle infundido com fenilefrina. Teste “t” de Student.

DISCUSSÃO

6 - DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo, em síntese, mostra que ativação intermitente do barorreflexo altera a expressão da proteína c-fos no PVH, NTSm e CVLM independente do protocolo dietético oferecido aos animais. Entretanto, nossos dados apontam para um padrão de ativação neuronal diferenciado no NTS, RVLM e Rob em resposta ao estímulo intermitente do barorreflexo em animais desnutridos.

A desnutrição é uma condição patológica associada à restrição do conteúdo protéico ou protéico-calórico da dieta. Apesar dos avanços no combate a esta doença, a desnutrição permanece sendo um importante problema de saúde pública dos países em desenvolvimento (Bertini, 2006; Lucas et al., 1997; Plagemann et al., 2000; United-Nations, 2008). Ela é responsável por promover alterações na homeostase de diversos sistemas fisiológicos do organismo, ficando evidente a importância de estudar tal patologia para entender os processos fisiopatológicos envolvidos nesse estado nutricional.

O modelo de desnutrição proposto neste trabalho foi baseado na redução do conteúdo protéico da dieta oferecida ao grupo desnutrido de 15% para 6%, o que representa uma redução de 60% da proteína dietética (caseína). É importante destacar que as duas dietas oferecidas aos animais apresentam a mesma quantidade de quilocalorias (Kcal), sendo, portanto, isocalóricas. Esta metodologia assemelha-se aos métodos utilizados em outros trabalhos da literatura (Agarwal et al., 1981; Lukoyanov; Andrade, 2000; Ferreira et al., 2003). Em nossos resultados observamos que os animais submetidos à desnutrição protéica apresentaram redução do ganho de peso de aproximadamente 73%, sendo diferente quando comparado aos animais que receberam a dieta normoprotéica. Diversos outros trabalhos que utilizaram ratos como modelo experimental de desnutrição também tem relatado o déficit no peso corporal através da depleção da massa muscular (Benabe et al., 1993; Kim et al., 1994; Martinez-Maldonado et al., 1993; Oliveira et al., 2004). De uma maneira geral, a redução de peso pode ser utilizada como um indicador básico de desnutrição (Lucas, 1998). Outros fatores característicos de um quadro de desnutrição têm sido apresentados por nosso laboratório e incluem baixos níveis de albumina plasmática e proteínas totais (Tropia et al., 2001; Oliveira et al., 2004). Diante do exposto podemos afirmar que a dieta com 6% de proteína, oferecida aos animais, é eficaz em promover a desnutrição experimental.

No presente estudo, os valores de FC basal dos animais desnutridos foram significativamente maiores quando comparado aos animais controle. Já a PAM dos dois grupos de animais, controle e desnutrido, não foram diferentes (figuras 7 e 8, respectivamente). Trabalhos anteriores do nosso

laboratório mostraram que a desnutrição protéica após a amamentação por um período de 35 dias, não altera os níveis basais de PAM e FC de ratos. Neste mesmo trabalho foi observada uma maior queda da PAM decorrente da administração de prazosin, bloqueador α -adrenérgico, no grupo desnutrido quando comparado ao grupo controle, sugerindo um aumento da atividade simpática vasomotora naqueles animais (Tropia et al., 2001). Posteriormente, Oliveira et al. (2004), utilizando o mesmo modelo experimental, mas com uma metodologia de registro e análise de um maior número de pontos, observaram níveis maiores de PAM e FC basais. Nossos dados de FC dos animais desnutridos assemelham-se àqueles reportados por esses últimos autores, apesar da metodologia utilizada na coleta de dados do presente trabalho se aproximar da realizada por Tropia et al., 2001. Mesmo com estas ligeiras diferenças nos valores basais entre os estudos, provavelmente atribuídas aos métodos de aquisição e análise, os dados sugerem um desequilíbrio autonômico em ratos desnutridos. Neste sentido, um estudo foi significativo, detalhando a contribuição do sistema nervoso autônomo para o controle dinâmico dos parâmetros cardiovasculares em ratos desnutridos (Martins et al., 2011).

Com a utilização de manobras farmacológicas, foi demonstrado um aumento no tônus simpático e diminuição da participação parassimpática nos ratos desnutridos quando comparados aos ratos controles. Neste estudo, a análise da variabilidade da FC no domínio da frequência demonstrou um predomínio do tônus simpático sobre o parassimpático, pois a relação LF/HF dos animais desnutridos se mostrou aumentada em relação ao controle. Esse desbalanço autonômico pode ser responsável por essa elevação da frequência cardíaca encontrada no presente estudo (Martins et al., 2011). Portanto, não seria estranho propor que este desequilíbrio autonômico extensivamente relatado (Bezerra et al, 2011a;. Bezerra et al, 2011b;. Leon-Quinto et al, 1998;. Martins et al, 2011; Tropia et al, 2001) é responsável pelo aumento da frequência cardíaca basal encontrada neste estudo.

Os barorreceptores foram estimulados, através de infusões intermitentes de fenilefrina. Não observamos diferenças significativas no ganho barorreflexo entre os animais desnutridos e controles. Recentemente, aliado à disfunção do barorreflexo, registramos valores aumentados de FC basal e simpatoinibição reduzida ao reflexo cardiopulmonar em ratos desnutridos. Estas são evidências substanciais de que o controle central da função autonômica está acentuadamente modificado em animais que foram submetidos à desnutrição protéica (Bezerra et al, 2011a;. Bezerra et al, 2011b). Surge então a questão de onde essas alterações no sistema nervoso central de animais desnutridos estariam localizadas. Uma vez que o reflexo cardiopulmonar e barorreflexo compartilham vias centrais, a análise do recrutamento neuronal em áreas do tronco cerebral pode ser uma estratégia assertiva para compreender os efeitos produzidos por este modelo de desnutrição no sistema nervoso

autônomo. A razão para este foco em áreas bulbares é que o recrutamento de neurônios no PVH foi semelhante em animais controles e desnutridos, infundidos com fenilefrina. Surpreendentemente, observou-se um aumento do número de neurônios marcados com c-fos no RVMM de animais desnutridos. A região ventromedial do bulbo é descrita por possuir neurônios que regem a atividade nervosa simpática para o coração e a termogênese (Cao e Morrison, 2003; Morrison e Nakamura, 2011; Morrison et al, 2012; Salo et al, 2009.). Estudos anatômicos e funcionais evidenciaram marcações no RVMM (Amendt et al, 1979; Chiba e Masuko, 1989; Hofstetter et al, 2005; Loewy, 1981; Morrison, 1993; Pardini et al, 1990). Ao contrário da atividade basal tônica do RVLM (Campos e McAllen, 1997; Campos e McAllen, 1999a; Campos e McAllen, 1999b), a estimulação dos neurônios do RVMM produz taquicardia pronunciada (Cao e Morrison, 2003; Cao e Morrison, 2006; Morrison, 2003). A atividade neuronal no RVMM aqui apresentada, nos permite sugerir que a restrição de proteínas da dieta, no período pós-desmame, pode redefinir a atividade destes neurônios, aumentando assim a frequência cardíaca basal, provavelmente, para manter o débito cardíaco próximo dos níveis fisiológicos. Um número crescente de pesquisas tem indicado uma falta de uniformidade na atividade das vias centrais que controlam as fontes regionais simpáticas (Dampney et al, 2002; Salo et al, 2006). Dessa forma, é levantada a necessidade de uma avaliação para revelar a existência ou não de alterações neste fluxo não-uniforme gerado pelos neurônios bulbares pré-simpáticos em ratos desnutridos.

A desnutrição durante o período crítico de desenvolvimento pode levar ao desbalanço autonômico através de alterações morfológicas em várias áreas do sistema nervoso central (Plagemann e cols., 2000). Recentemente, obtivemos evidências de que os distúrbios cardiovasculares tipicamente vistos em ratos submetidos à desnutrição protéica pós-desmame podem estar relacionados com alterações na neurotransmissão das regiões bulbares que integram os reflexos cardiovasculares. Dados ainda não publicados do nosso laboratório demonstram que o protocolo de desnutrição protéica pós-desmame foi capaz de promover disfunções na neurotransmissão glutamatérgica do barorreflexo ao nível do RVLM (Rodrigues et al., in press). Nossos resultados revelam uma redução no recrutamento neuronal ao nível do RVLM após a estimulação do barorreflexo em animais submetidos à desnutrição protéica, corroborando com estes resultados ainda não publicados. Sabe-se que a ativação do barorreflexo produz simpatoinibição e bradicardia mediada parassimpaticamente. Esta reatividade autonômica é necessária para a regulação da resistência periférica e da função cardíaca, resultando também da inibição da atividade do RVLM a partir projeção gabaérgica do CVLM (Guyenet, 2006; Machado et al, 1997; Machado, 2001). Assim, além de apresentar alterações na neurotransmissão glutamatérgica, o RVLM de animais

desnutridos poderia responder diferencialmente à modulação por outros núcleos, como CVLM (Guyenet, 2006). Isto parece plausível, uma vez que o recrutamento neuronal após a estimulação do barorreflexo não foi influenciada pela diferença no protocolo dietético ao nível de no CVLM.

A ativação intermitente do barorreflexo também provocou um padrão de recrutamento neuronal diferenciado no NTS de animais controles de desnutridos. Em ambos os grupos, as infusões de fenilefrina aumentaram a expressão neuronal de c-fos no NTSm. Estudos anteriores que utilizaram mesmo protocolo para ativar o barorreflexo, obtiveram resultados semelhantes no que tange a expressão de c-fos no NTS (Cruz et al., 2008). No entanto, quando comparado ao grupo controle, animais desnutridos apresentaram maior recrutamento neuronal em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo nas três regiões dos NTS estudadas. Isto sugere que, no grupo desnutrido, haveria uma configuração neuronal diferenciada no NTS, uma área conhecida por receber os primeiros estímulos autonômicos oriundos do sistema cardiovascular (Guyenet, 2006; Machado et al, 1997;. Machado, 2001). Contudo, estudos adicionais são necessários para melhor entender as mudanças na circuitaria neuronal envolvida no barorreflexo durante desnutrição.

Concluimos que a desnutrição protéica pós-desmame modifica o padrão de recrutamento neuronal em resposta à estimulação intermitente do barorreflexo. Desvendar os mecanismos centrais subjacentes às desordens cardiovasculares observadas durante a desnutrição protéica pode fornecer informações importantes para elaboração de estratégias clínicas para o tratamento desta doença e controle das consequências tardias provocadas pela mesma. No entanto, mais estudos ainda são necessários para esclarecer detalhes dessas mudanças provocadas pela desnutrição protéica.

CONCLUSÕES

7 - CONCLUSÕES

Sumarizando os resultados obtidos no presente estudo, observamos que o protocolo dietético utilizado foi eficiente em promover a desnutrição nos animais.

Observamos também que a desnutrição não alterou a PAM basal e o índice de sensibilidade do barorreflexo ou ganho barorreflexo.

Observamos ainda que a desnutrição alterou, significativamente, a FC basal.

Com relação à expressão de proteína c-fos em resposta ao estímulo intermitente do barorreflexo, mostramos que este protocolo aumentou a expressão neuronal de c-fos no PVH, NTS medial e CVLM, independentemente do protocolo dietético utilizado.

Os dados ainda revelaram um recrutamento neuronal diferenciado em resposta à estimulação do barorreflexo no NTScc, NTSr, RVLM e RVMM (Rob) em animais desnutridos.

Concluimos que a desnutrição protéica modifica o controle cardiovascular e o padrão de resposta central à estimulação intermitente do barorreflexo.

REFERÊNCIAS

8 – REFERÊNCIAS

- Agarwal KN, Prasad C, Taneja V. Protein deprivation and the brain: effect on enzymes and free amino acids related to glutamate metabolism in rats. *Ann.Nutr.Metab*, v. 25, n. 4, p. 228-233, 1981.
- Agarwal. SK., Calaresu, F.R. Reciprocal connections between nucleus tractus solitarii and rostral ventrolateral medulla. *Brain Res.*, 1990, 523: 305-308.
- Agarwal. SK., Calaresu, F.R.. Monosynaptic connections from caudal to rostral ventrolateral medulla in the baroreceptor reflex pathway. *Brain Res.*, 1991, 555: 70-74.
- Amendt, K., Czachurski, J., Dembowski, K., Seller, H., 1979. Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. *J Auton Nerv Syst.* 1, 103-7.
- Antiwi, S. Malnutrition: Missed Opportunities for Diagnosis. *Ghana.Med.J.* 42, 101-104, 2008.
- Barker, DJP; Hales, CN; fall CHD; Osmond,C; Phipps, K; Clarck, PMS. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipdemia (syndrome X): Relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* (36): 62-67, 1993.
- Barker, D.J., Clark, P.M., 1997. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod.* 2, 105-12.
- Benabe JE, Wang S, Wilcox JN, Martinez-Maldonado, M. Modulation of ANG II receptor and its mRNA in normal rat by low-protein feeding. *Am J Physiol*, v. 265, n. 5 Pt 2, p. F660-F669, 1993.
- Berquin, P., Bodineau, L., Gros, F., Larnicol, N., 2000. Brainstem and hypothalamic areas involved in respiratory chemoreflexes: a Fos study in adult rats. *Brain Res.* 857, 30-40.
- Berquim, P.; Cayetanot, F.; Gros, F.; Larnicol, N. Postnatal changes in Fos-like immunoreactivity evoked by hypoxia in the in the rat brainstem and hypothalamus. *Brain Research* 877 (2):131-8, 2000: 148- 159, 2000.
- Bertini, C., 2006. Report of the Standing Committee on Nutrition at its 33rd Session. In Hosted by the World Health Organization. Vol., ed.^eds., Geneva, Switzerland.
- Bezerra, V.M., Xavier, C.H., de Menezes, R.C., Fontes, M.A., Cardoso, L.M., Fernandes, L.G., Chianca, D.A., Jr., 2011a. Bezold-Jarisch reflex in sino-aortic denervated malnourished rats. *Auton Neurosci.* 162, 48-53.
- Bezerra, V.M., Xavier, C.H., Fernandes, L.G., Cardoso, L.M., Fontes, M.A., Chianca, D.A., Jr., 2011b. Sympathoinhibition to Bezold-Jarisch reflex is attenuated in protein malnourished rats. *Neurosci Lett.* 488, 129-32.
- Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens.* 1988 Oct;1(4 Pt 1):335-47.

- Campos, R.R., McAllen, R.M., 1997. Cardiac sympathetic premotor neurons. *Am J Physiol.* 272, R615-20.
- Campos, R.R., McAllen, R.M., 1999a. Tonic drive to sympathetic premotor neurons of rostral ventrolateral medulla from caudal pressor area neurons. *Am J Physiol.* 276, R1209-13.
- Campos, R.R., McAllen, R.M., 1999b. Cardiac inotropic, chronotropic, and dromotropic actions of subretrofacial neurons of cat RVLM. *Am J Physiol.* 276, R1102-11.
- Cao, W.H., Morrison, S.F., 2003. Disinhibition of rostral raphe pallidus neurons increases cardiac sympathetic nerve activity and heart rate. *Brain Res.* 980, 1-10.
- Cao, W.H., Morrison, S.F., 2006. Glutamate receptors in the raphe pallidus mediate brown adipose tissue thermogenesis evoked by activation of dorsomedial hypothalamic neurons. *Neuropharmacology.* 51, 426-37.
- Chan, R. K.; Sawchenko, P. E.- Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry. *Journal of Neuroscience* 18 (1):371- 87, 1998
- Chan, R.K., Jarvina, E.V., Sawchenko, P.E., 2000. Effects of selective sinoaortic denervations on phenylephrine-induced activational responses in the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience.* 101, 165-78.
- Chiba, T., Masuko, S., 1989. Coexistence of varying combinations of neuropeptides with 5-hydroxytryptamine in neurons of the raphe pallidus et obscurus projecting to the spinal cord. *Neurosci Res.* 7, 13-23.
- Ciriello, J ; Calaresu, FR. Role of paraventricular and supraoptic nuclei in central cardiovascular regulation in the cat. *Am. J.Physiol.*, 239: R 137 - R 142, 1980.
- Coleman, M.J., Dampney, R.A. Powerful depressor and sympathoinhibitory effects evoked from neurons in the caudal raphe pallidus and obscurus. *Am. J. Physiol.* 268, 1995.
- Cruz JC, Bonagamba LGH, Machado BH, Biancardi VC, Stern JE. Intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces Fos expression in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience* 157 (2008) 463-472.
- Cruz JC, Bonagamba LGH, Machado BH, Stern JE. Fos expression in the NTS in response to peripheral chemoreflex activation in awake rats. *Auton. Neurosci.* (2009).
- Dampney, R.A.L. Funcional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 1994. 74 (2): 323-364.
- Dampney, R.A., Coleman, M.J., Fontes, M.A., Hirooka, Y., Horiuchi, J., Li, Y.W., Polson, J.W., Potts, P.D., Tagawa, T., 2002. Central mechanisms underlying short- and long-term regulation of the cardiovascular system. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 29, 261-8.

Feldman, J.L; Ellenberger, H.H. Central coordination of respiratory and cardiovascular control in mammals. *Annu. Rev. Physiol.* 1988. 50: 593-606

Ferreira F, Filiputti E, Arantes VC, Stoppiglia LF, Araujo EP, Delghingaro-Augusto V. Decreased cholinergic stimulation of insulin secretion by islets from rats fed a low protein diet is associated with reduced protein kinase calpha expression. *J.Nutr.*, v. 133, n. 3, p. 695-699, 2003.

Food And Agriculture Organization of the United Nations. The State of Food Insecurity in the World.<[http:// www.fao.org](http://www.fao.org).> 2004.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2008). The State of Food Insecurity in the World 2008. p.1-59.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of Food Insecurity in the World - Addressing Food Insecurity in Protracted Crises (2010) <[http:// www.fao.org](http://www.fao.org).>

Graham, J.C., Hoffman, G.E., Sved, A.F. c-Fos expression in brain in response to hypotension and hypertension in conscious rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* Volume 55, Issues 1–2, Pages 92–104,1995.

Guyenet, P.G. Role of ventrolateral medulla in blood pressure regulation, in: AD. Loewy, K.M., Spyer (Eds.), *Central regulation of autonomic functions*, Oxford Univ. Press., New York, 1990. 145-167

Guyenet, P.G., 2006. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci.* 7, 335-46.

Hoffman, G.E., Lyo, D., 2002. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'?. *J. Neuroendocrinol.* 14, 259–268.

Hofstetter, C.P., Card, J.P., Olson, L., 2005. A spinal cord pathway connecting primary afferents to the segmental sympathetic outflow system. *Exp Neurol.* 194, 128-38.

Kannah, H; Hayashida, Y ; Yamashita, H. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am. J. Physiol.*, 256: R 1325 - R 1330, 1989.

Kim SW, Yu BP, Sanderford M, Herlihy JT. Dietary restriction modulates the norepinephrine content and uptake of the heart and cardiac synaptosomes. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, v. 207, n. 1, p. 43-47, 1994.

Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond).* 1996 Nov;91(5):607-15.

Leon-Quinto T, Magnan C, Portha B. Altered activity of the autonomous nervous system as a determinant of the impaired beta-cell secretory response after protein-energy restriction in the rat. *Endocrinology*, v. 139, n. 8, p. 3382-3389, 1998.

Loewy, A.D., 1981. Raphe pallidus and raphe obscurus projections to the intermediolateral cell column in the rat. *Brain Res.* 222, 129-33.

Loss, I.O., Fernandes, L.G., Martins, C.D., Cardoso, L.M., Silva, M.E., Dias-da-Silva, V.J., Moraes, M.F., Chianca, D.A., Jr., 2007. Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. *Life Sci.* 81, 944-50.

Lucas SR, Zaladek-Gil F, Costa-Silva VL, Miraglia SM. Function and morphometric evaluation of intrauterine undernutrition on kidney development of the progeny. *Braz J Med Biol Res.* 1991;24(9):967-70.

Lucas SR, Costa Silva VL, Miraglia SM, Zaladek Gil F. Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. *Pediatr Nephrol.* 1997 Dec;11(6):719-23

Luitten, PGM; terHorst, CJ ; Steffens, AB. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. *Brain Res.*, 329: 374-378, 1985.

Lukoyanov NV, Andrade JP. Behavioral effects of protein deprivation and rehabilitation in adult rats: relevance to morphological alterations in the hippocampal formation. *Behavioural Brain Research*, v. 112, n. 1-2, p. 85-97, 2000.

Machado, B.H., Mauad, H., Chianca Junior, D.A., Haibara, A.S., Colombari, E., 1997. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Braz J Med Biol Res.* 30, 533-43.

Machado, B.H., 2001. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann N Y Acad Sci.* 940, 179-96.

Mackenzie HS, Brenner BM. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis.* 1995 Jul;26(1):91-8.

Mackenzie HS, Lawler EV, Brenner BM. Congenital oligonephropathy: The fetal flaw in essential hypertension? *Kidney Int Suppl.* 1996 Jun;55:S30-4.

Martin, DS; Segura, T ; Haywood, JR. Cardiovascular response to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat. *Hypertension.*, 18: 48-55, 1991.

Martinez-Maldonado M, Benabe JE, Wilcox JN, Wang S, Luo C. Renal renin, angiotensinogen, and ANG I-converting-enzyme gene expression: influence of dietary protein. *Am.J.Physiol*, v. 264, n. 6 Pt 2, p. F981-F988, 1993.

Martins, C.D., Chianca, D.A., Jr., Fernandes, L.G., 2011. Cardiac autonomic balance in rats submitted to protein restriction after weaning. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 38, 89-93.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl JR, Plotsky PM. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Dev Neurosci.* 1996;18(1-2):49-72.

Morrison, S.F., Gebber, G.L. Raphe neurons with sympathetic-related activity: baroreceptor responses and spinal connections. *Am. J. Physiol.* 246, 1984.

Morrison, S.F., Gebber, G.L. Axonal braching patterns and funicular trajectories of raphespinal sympathoinhibitory neurons. *J. Neurophysiol.* 53, 759-772, 1985.

Morrison, S.F., 1993. Raphe pallidus excites a unique class of sympathetic preganglionic neurons. *Am J Physiol.* 265, R82-9.

Morrison, S.F., 2003. Glutamate transmission in the rostral ventrolateral medullary sympathetic premotor pathway. *Cell Mol Neurobiol.* 23, 761-72.

Morrison, S.F., Nakamura, K., 2011. Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci.* 16, 74-104.

Morrison, S.F., Madden, C.J., Tupone, D., 2012. Central control of brown adipose tissue thermogenesis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 3.

Nunes, M.L.; Batista, B.B.; Micheli, F.; Batistella, V. Effects of early malnutrition and nutritional rehabilitation in rat. *J Pediatr (Rio J)*; 78 (1): 39-44. Vol. 77, Nº1, 2002.

Oliveira, E.L., Cardoso, L.M., Pedrosa, M.L., Silva, M.E., Dun, N.J., Colombari, E., Moraes, M.F., Chianca, D.A., Jr., 2004. A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. *Nutr Neurosci.* 7, 201-5.

Paxinos, G., Watson, C., 2007. The rat brain in stereotaxic coordinates. Vol., Academic Press/Elsevier, Amsterdam ; Boston ;

Penitente AR, Fernandes LG, Cardoso LM, Silva ME, Pedrosa ML, Silva LA. Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. *Life Sciences*, v. 81, p. 609-614, 2007.

Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde– PNDS. Disponível em <<http://bvsmis.saude.gov.br>>. 2006.

Petry CJ, Ozanne SE, Wang CL, Hales CN. Early protein restriction and obesity independently induce hypertension in 1-year-old rats. *Clin Sci (Lond)*. 1997 Aug;93(2):147-52.

Pilowsky, P.M., Kapoor, V., Minson, J.B., West, M.J., Chalmers, J.P. Spinal-cord serotonin release and raised blood-pressure after brain-stem kainic acid injection. *Brain Res.* 366, 354-357, 1986a.

Plagemann, A., Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rohde, W., Dorner, G., 2000. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutr.* 130, 2582-9.

Rasschaert J, Reusens B, Dahri S, Sener A, Remacle C, Hoet JJ, Malaisse WJ. Impaired activity of rat pancreatic islet mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase in protein malnutrition. *Endocrinology.* 1995 Jun;136(6):2631-4.

Rocha I, Bras-Rosario L, Amparo-Brarros M, Silva-Carvalho L. Angiotensin AT₁ receptor antagonist losartan and the defence reaction in the anaesthetised rat. *Exp. Physiol.* 88(3): 309-314, 2003.

Rodrigues, F.A., Chianca-Jr, D.A., Fernandes, L.G. Malnutrition affects the pressor response to microinjection of glutamate into RVLM of awake rats. *Biological Research* - in press.

Rodrigues, M.C., Campagnole-Santos, M.J, Machado, R.P., Silva, M.E., Rocha, J.L.M., Ferreira, P., Santos, R.A.S., Alzamora, A.C. Evidence for a role of AT₂ receptors at the CVLM in the cardiovascular changes induced by low-intensity physical activity in renovascular hypertensive rats. *Peptides* (New York). , v.28, p.1375 - 1382, 2007.

Salo, L.M., Campos, R.R., McAllen, R.M., 2006. Differential control of cardiac functions by the brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 33, 1255-8.

Salo, L.M., Nalivaiko, E., Anderson, C.R., McAllen, R.M., 2009. Control of cardiac rate, contractility, and atrioventricular conduction by medullary raphe neurons in anesthetized rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296, H318-24.

Sawaya, A.L. Desnutrição: consequências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estudos Avançados*, Brasil, Vol. 20, Nº. 58, 2006.

Silva-Carvalho L, Dawid-Milner MS, Goldsmith GE, Spyer KM. Hypotalamic modulation of the arterial chemoreceptor reflex in the anaesthetized cat: role of the nucleus of tractus solitarii. *J. Physiol*. 487 (3): 751-760, 1995.

Swanson, LW ; Sawchenko, PE. Hypotalamic integration: organization of paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Review Neurosci.*, 6: 269-324, 1983.

Tropia, F.C., Cardoso, L.M., Pedrosa, M.L., Silva, M.E., Haibara, A.S., Moraes, M.F., Chianca, D.A., Jr., 2001. Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex in conscious rats. *Nutr Neurosci*. 4, 99-107.

United-Nations, F.a.A.O.o.t., 2008. In *The State of Food Insecurity in the World*. Vol., ed.^eds., pp. 1-59.

Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int*. 2001 Jan;59(1):238-45.

Weston, M., Wang, H., Stornetta, R.L., Sevigny, C.P., Guyenet, P.G., 2003. Fos expression by glutamatergic neurons of the solitary tract nucleus after phenylephrine-induced hypertension in rats. *J Comp Neurol*. 460, 525-41.

World Health Organization (2003). *Global Database on Child Growth and Malnutrition*. Disponível em: <<http://www.who.int/nutgrowthdb>>. Acessado em 01 de março de 2011, às 19:45h. 44

World Health Organization (2007). *Nutrition*. Disponível em <<http://www.who.int/nutrition/en/>>. 2007. Acessado em 26 de março de 2011, às 17:00h.

Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction uppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res*. 2001 Apr;49(4):460-7.

ANEXOS

9 – ANEXOS

9.1 – PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A ESTA TESE

9.1.1 – ARTIGO PUBLICADO

Míriam Carmo Rodrigues-Barbosa, Cláudia Martins Carneiro, Lisandra Brandino de Oliveira, Fernanda Cacilda Santos Silva, Carlos Henrique Xavier, Luciano Gonçalves Fernandes, Deoclécio Alves Chianca-Jr. **Protein malnutrition modifies medullary neuronal recruitment in response to intermittent stimulation of the baroreflex.** Brain Research, Volume 1483, 5 November 2012, Pages 20–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.08.019>

9.1.2- TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS DA ÁREA

RODRIGUES, M.C., CARNEIRO, C. M., OLIVEIRA, L. B., CHIANCA, D. A., FERNANDES, L.G.

Imunorreatividade à proteína c-fos no Núcleo Paraventricular (PVN) de ratos submetidos à desnutrição protéica. In: XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2009, Águas de Lindóia - SP.

XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental. , 2009.

¹RODRIGUES, M.C.; ²CARNEIRO, C.M.; ³OLIVEIRA, L.B.; ¹CHIANCA, D.A.; ¹FERNANDES, L.G. ¹Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. ²Laboratório de Imunopatologia. ³Laboratório de Hipertensão – UFOP, Ouro Preto/ MG . EXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-FOS NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DO BARORREFLEXO EM RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA. **XIV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**, 03 a 06 de fevereiro de 2010 – Araraquara/SP.

^{1,5}RODRIGUES, M.C.; ¹ZEBRAL, S.A.; ²CARNEIRO, C.M.; ³OLIVEIRA, L.B.; ⁴FERNANDES, L.G.; ¹CHIANCA, D.A. ¹Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. ²Laboratório de Imunopatologia. ³Laboratório de Hipertensão – UFOP, Ouro Preto/ MG . ⁴ Laboratório de Fisiologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica/ RJ. ⁵Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória/ ES. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-FOS EM ÁREAS CENTRAIS INDUZIDA PELA ATIVAÇÃO DO BARORREFLEXO EM RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA. **XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FESBE**, 25 a 28 de agosto de 2010 – Águas de Lindóia/SP.

⁵RODRIGUES, M.C.; ¹ZEBRAL, S.A.; ²CARNEIRO, C.M.; ³OLIVEIRA, L.B.; ⁴FERNANDES, L.G.; ¹CHIANCA, D.A. ¹Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. ²Laboratório de Imunopatologia. ³Laboratório de Hipertensão – UFOP, Ouro Preto/ MG . ⁴ Laboratório de Fisiologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica/ RJ. ⁵Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Vitória/ ES. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-FOS EM ÁREAS CENTRAIS E ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES EM RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA. **XV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular** – USP – São Paulo/SP, 02 a 05 de fevereiro de 2011.

A Ouro Preto

É manhã...
O sino toca...
Lá longe, alguém recolhe a lenha
para acender o fogo...
A fumaça se mistura à bruma de Vila Rica
anunciando o dia novo.
Ôpa, já é tarde,
já é hora.
Menino pulando
querendo crescer.
Ôpa, já é hora.
Hora de ver mais um dia viver.
Ôpa, já é hora,
e lá na escola
é que ele vai aprender:
que o mundo é pequeno,
que os desafios são tantos,
que é preciso engenho
para entender seus encantos.
Ôpa, já é hora.
Não pára menino,
não olha para trás.
Leva em teu peito
estes tempos de paz.
Não pára menino,
a noite já vem.
Na tarde rosada
o apito do trem.
Ôpa menino,
já é hora.
Homem de verdade
é aquele que chora.
Ôpa menino!
Teu último adeus.
Saudade de todos
que fiquem com Deus!
Mas Vila Rica sempre ficará
te esperando menino,
quando quiseres voltar.
Ôpa já é tarde...
Ôpa menino, já é hora...

(Míriam Carmo Rodrigues, Ouro Preto, 2004)