

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição

JULLIET ARAÚJO DE SOUZA

EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL
SOBRE A IMUNORREATIVIDADE DA PERIOD 1 NOS
NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICO E ARQUEADO

RECIFE
2014

JULLIET ARAÚJO DE SOUZA

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL
SOBRE A IMUNORREATIVIDADE DA PERIOD 1 NOS
NÚCLEOS SUPRAQUIASMÁTICO E ARQUEADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Sandra Lopes de Souza

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Matilde Cesiana da Silva

**RECIFE
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S725e	<p>Souza, Juliet Araújo de.</p> <p>Efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a imunorreatividade da period 1 nos núcleos supraquiasmático e arqueado / Juliet Araújo de Souza. – Recife: O autor, 2014.</p> <p>55 f. : il. ; tab. ; 30 cm.</p> <p>Orientadora: Sandra Lopes de Souza.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2014.</p> <p>Inclui referências e anexos.</p> <p>1. Núcleo Supraquiasmático. 2. PERIOD. 3. Ritmos Circadianos. 4. Desnutrição Proteica. I. Souza, Sandra Lopes de (Orientadora). II. Título.</p> <p>612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2014-144)</p>
-------	---

JULLIET ARAÚJO DE SOUZA

**EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO PROTEICA PERINATAL SOBRE A
IMUNORREATIVIDADE DA PERIOD 1 NOS NÚCLEOS
SUPRAQUIASMÁTICO E ARQUEADO**

Dissertação aprovada em _____ de _____ de 2014.

Prof^ª Dra. Elizabeth do Nascimento, UFPE

Prof^ª Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas, UFPE

Prof^ª Dra. Matilde Cesiana da Silva, CAV- UFPE

RECIFE
2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela fé em Jesus, a qual me dá esperança no futuro e a certeza de que essa esperança não será frustrada.

Aos meus pais Paulo e Fátima pelo amor demonstrado na amizade, na renúncia, na dedicação, no suprimento e nos gestos cotidianos que aumentam minha admiração por vocês. Obrigada pela confiança, por me ensinarem a sonhar e me apoiarem em todos os momentos. Em tão poucas palavras seria impossível descrever minha gratidão. Amo vocês.

Aos meus irmãos Paulo e Rennan, meus amigos, pelo carinho e cuidado que têm por mim. A experiência familiar é muito mais divertida com vocês. Sou grata pelo companheirismo e pela certeza que sempre posso contar com os dois.

Aos meus avós, tios e primos, pois o apoio que recebo em casa se soma ao apoio que recebo de vocês formando uma verdadeira rede de auxílio. Agradeço a dedicação desinteressada, a presença constante e o amparo a mim direcionado.

Aos amigos da Igreja Batista Emanuel por fazerem parte da minha história de uma maneira tão linda. No convívio percebo que somos mais que uma organização, somos um organismo.

À prof.^a Sandra Lopes de Souza, uma grande pesquisadora, pela amizade, acessibilidade, compreensão, generosidade., respeito e por investir tempo e energia para que sejamos bem sucedidos. Com você tenho aprendido um modelo de orientação para além da pesquisa, seus conselhos são para a vida.

À prof.^a Matilde Cesiana da Silva, um exemplo de perseverança, pela sinceridade no proceder, pelo comprometimento demonstrado durante todos esses anos e pela confiança depositada em mim. Aprendi muito sobre ciência ao seu lado.

Aos companheiros do laboratório: Tássia, um braço direito na execução deste projeto, Lívia, Amanda, Larissa, Renata, Diogo, Taisy, Mayara e Isa. Agradeço pelo desprendimento em ajudar independentemente das próprias ocupações.

À turma da pós-graduação pelo companheirismo.

À Cecília e Neci pela ética e profissionalismo na execução de suas atividades junto à coordenação.

***“Tudo tem o seu tempo
determinado, e há tempo para
todo o propósito debaixo do
céu.” (Eclesiastes 3:1)***

RESUMO

Os seres vivos apresentam ritmicidade circadiana em vários processos biológicos como a atividade locomotora e o comportamento alimentar. Perturbações da ritmicidade estão associadas ao desenvolvimento de doenças metabólicas. A desnutrição proteica perinatal pode afetar o sistema circadiano durante o seu desenvolvimento com consequências tardias permanentes. Animais submetidos a esse modelo de desnutrição apresentam alterações no padrão circadiano de componentes moleculares necessários à geração dos ritmos. Essas modificações têm sido associadas com fenótipos anormais do comportamento alimentar. O presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre o perfil circadiano da imunorreatividade da proteína relógio PERIOD 1 nos núcleos supraquiasmático (NSQ) e arqueado (ARC). Ratos *Wistar* albinos foram obtidos no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Após acasalamento e detecção da prenhez as mães foram alimentadas com dieta hipoproteica (proteína 8%) ou normoproteica (proteína 17%) durante toda a gestação e lactação. O ajuste das ninhadas foi realizado um dia após o nascimento de maneira que apenas machos participaram neste estudo. Do 21º dia, após o desmame, os animais permaneceram juntos até o 28º dia, quando foram separados em gaiolas individuais para a posterior avaliação da ingestão alimentar circadiana, no 35º dia, e análise da imunorreatividade da PERIOD 1 nos núcleos supraquiasmático e arqueado, no 38º dia. A desnutrição promoveu hiperfagia na fase escura sem alterar o padrão circadiano de ingestão alimentar (8h: Controles $3,8 \pm 0,5$ g/g x100, n=9 vs Desnutridos $4,8 \pm 0,6$ g/g x100, n=9, $p < 0,0001$; 16:00: Controles $2,8 \pm 0,6$ g/g x100, n=9 vs Desnutridos $3,8 \pm 0,4$ g/g x100, n=9, $p < 0,05$). Por outro lado, houve menor imunodetecção da PERIOD 1 no núcleo arqueado às 00h e 20h em animais desnutridos quando comparados aos controles (0h: Controles $616,1 \pm 3,4$, n=6 vs Desnutridos $214,2 \pm 66,4$, n=4, $p < 0,001$; 20h: Controles $525,8 \pm 24,7$, n=6, vs Desnutridos $341,6 \pm 46,4$, n=4, $p < 0,001$). Esses achados sugerem que a PERIOD 1 do relógio central do NSQ é menos vulnerável às manipulações nutricionais no início da vida quando comparado a outras regiões extra-NSQ, como o núcleo arqueado. Palavras-chave: Núcleo Supraquiasmático, PERIOD 1, Ritmos Circadianos, Desnutrição Proteica Perinatal.

Palavras-chave: Núcleo Supraquiasmático. PERIOD 1. Ritmos Circadianos. Desnutrição Proteica Perinatal.

ABSTRACT

Living organisms exhibit circadian rhythmicity in various biological processes such as locomotor activity and eating behavior. Rhythmicity disturbances are associated with the development of metabolic diseases. Perinatal protein malnutrition can affect the circadian system during its development with long-term consequences. Animals subjected to this type of malnutrition exhibit alterations in the circadian pattern of molecular components required to generate rhythms. These changes have been associated with abnormal eating behavior phenotypes. The present study aimed to determine the effects of perinatal protein malnutrition on the circadian profile of PERIOD 1 clock protein immunoreactivity in the suprachiasmatic nucleus (SCN). Wistar albino rats were obtained from the Department of Nutrition at Federal University of Pernambuco. After mating and pregnancy detection mothers were fed low protein diet (8% protein) or normal protein diet (17% protein) throughout pregnancy and lactation. Litters adjustment was performed the day after birth so that only males participated in this study. After weaning, at 21 days, animals remained together until the 28th day, when they were separated into individual cages for further circadian food intake evaluation, on the 35th day, and PERIOD 1 immunoreactivity analysis in the suprachiasmatic and arcuate nuclei on the 38th day. Malnutrition promoted hyperphagia in the dark phase without altering the circadian pattern of food intake (8h: Controls $3,8 \pm 0,5$ g/g x100, n=9 vs Malnourished $4,8 \pm 0,6$ g/g x100, n=9, $p < 0,0001$; 16:00: Controls $2,8 \pm 0,6$ g/g x100, n=9 vs Malnourished $3,8 \pm 0,4$ g/g x100, n=9, $p < 0,05$). There was no difference in the PERIOD 1 immunoreactivity between control and malnourished group in the suprachiasmatic nucleus. On the other hand, there was less PERIOD 1 immunodetection in the arcuate nucleus at 00h and 20h in malnourished animals when compared to controls (0h: Controls $616,1 \pm 3,4$, n=6 vs Malnourished $214,2 \pm 66,4$, n=4, $p < 0,001$; 20h: Controls $525,8 \pm 24,7$, n=6, vs Malnourished $341,6 \pm 46,4$, n=4, $p < 0,001$). These findings suggest that PERIOD 1 of SCN central clock is less vulnerable to nutritional manipulations in early life when compared to other regions outside the SCN, as the arcuate nucleus.

Keywords: Suprachiasmatic Nucleus, PERIOD 1, Circadian Rhythms, Perinatal Protein Malnutrition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Efeito da desnutrição perinatal sobre o peso corporal de ratos. Pág. 31

Figura 2: Efeito da desnutrição perinatal sobre o consumo alimentar circadiano em ratos. Pág. 32

Figura 3: Efeito da desnutrição sobre o número de neurônios imunorreativos ao PER 1 no núcleo supraquiasmático (NSQ). Pág. 33

Figura 4: Efeito da desnutrição sobre o número de neurônios imunorreativos ao PER 1 no NSQ direito (A) e esquerdo (B). Pág. 34

Figura 5: Efeito da desnutrição sobre o número de neurônios imunorreativos a PER 1 no núcleo arqueado do hipotálamo. Pág. 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação e lactação. Pág. 27

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA — Atividade Antecipatória Alimentar

AgRP — Proteína relacionada ao Agouti

AIN — American Institute of Nutrition (Instituto Americano de Nutrição)

α -MSH — Hormônio Alfa Estimulador de Melanócito

ARC — Núcleo Arqueado

AVP — arginina-vasopressina

BMAL 1 — Brain and Muscle Arnt Like 1

CART — Transcrito Relacionado à Cocaína e Anfetamina

CLOCK — Circadian Locomotor Output Cycles Kaput

CRY 1, 2 — Cryptochrome 1, 2

DAB — Diaminobenzidina

DMH — Núcleo Dorsomedial Hipotalâmico

DR — Núcleo Dorsal da Rafe

FEO — Food Entrainable Oscillator (Oscilador Arrastado por Alimento)

HDL — Lipoproteína de Alta Densidade

IFN- α — Interferon alfa

JAK — Janus Kinase

LEO — Light Entrainable Oscillator (Oscilador Arrastado por Luz)

LHA — Área Hipotalâmica Lateral

NAD⁺ — Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

NAMPT — Nicotinamida Fosforibosiltransferase

NAS — Níquel amônio sulfato

NGS — Normal Goat Serum (Soro Normal de Cabra)

NPY — Neuropeptídeo Y

NSQ — Núcleo Supraquiasmático

NTS — Núcleo do Trato Solitário

PB — Núcleo Parabraquial

PBS — Phosphate Buffered Saline (Tampão Fosfato-Salino)

PER 1, 2, 3 — Period 1, 2, 3

POMC — Pró-opiomelanocortina

PVN — Núcleo Paraventricular Hipotalâmico

REV ERB α — Reverse Erythroblastosis Vírus α

REM — Rapid Eye Movement (Movimentos Rápidos dos Olhos)

ROR α — Retinoic acid-related Orphan Receptor α

SWS — Slow-Wave Sleep (Sono de Ondas Lentas)

SIRT 1, 3 — Sirtuína 1, 3

STAT 1— Signal Transducer and Activator of Transcription 1

TRH — Trato Retinohipotalâmico

VIP — polipeptídeo vasoativo intestinal

VMH — Núcleo Ventromedial Hipotalâmico

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. <i>Ritmos Circadianos</i>	15
2.2. <i>O Núcleo Supraquiasmático e os Osciladores Periféricos</i>	15
2.3. <i>Bases moleculares da ritmicidade biológica</i>	17
2.4. <i>Ritmos Circadianos e Comportamento Alimentar</i>	18
2.5. <i>Feo (Food Entrainable Oscillator)</i>	20
2.6. <i>Perturbações dos Ritmos Circadianos</i>	21
3. HIPÓTESE	24
4. OJETIVO GERAL	25
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
6. MATERIAIS E MÉTODOS	27
<i>Grupos Experimentais</i>	27
<i>Peso corporal</i>	28
<i>Consumo Alimentar</i>	28
<i>Perfusão Transcardíaca e obtenção do Encéfalo</i>	28
<i>Análise Imunohistoquímica</i>	29
<i>Análise quantitativa de células PER 1-IR</i>	30
<i>Análise estatística</i>	30
7. RESULTADOS	31
<i>Peso corporal</i>	31
<i>Consumo alimentar circadiano</i>	32
<i>Imunorreatividade da PERIOD 1 no núcleo supraquiasmático (NSQ)</i>	33
<i>Imunorreatividade da PERIOD 1 no NSQ por hemisférios</i>	34
<i>Imunorreatividade da PERIOD 1 no núcleo arqueado</i>	35
8. DISCUSSÃO	36
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	44
10. REFERÊNCIAS	46
11. ANEXOS	55

1. APRESENTAÇÃO

Muitos estudos têm apontado a importância do ambiente nutricional uterino e neonatal para o adequado crescimento e desenvolvimento. As consequências da desnutrição em períodos críticos do desenvolvimento cerebral podem persistir na vida adulta alterando permanentemente a bioquímica, fisiologia e anatomia do sistema nervoso. Em roedores, a adequada nutrição é imprescindível para evitar adaptações fenotípicas irreversíveis dos neonatos sobre os diferentes sistemas, dentre eles o sistema circadiano. Esse sistema é responsável pela geração de oscilações em processos biológicos como a alimentação, a atividade locomotora e a expressão gênica. Assim, no decorrer de cerca de um dia, esses eventos apresentam picos e depressões que lhes conferem a característica oscilatória.

Semelhante a outros sistemas, o circadiano é vulnerável a perturbações na oferta nutricional durante o período de seu intenso desenvolvimento, que abrange a gestação e lactação. Nesses períodos surgem os neurônios que formarão o marca-passo central, localizado no Núcleo Supraquiasmático Hipotalâmico (NSQ) e as sinapses que permitirão a ação sincronizada desses neurônios. A oferta insuficiente de proteínas durante os períodos críticos para o desenvolvimento do sistema circadiano acarretam alterações morfofuncionais em seus componentes promovendo impactos metabólicos e comportamentais.

A presente dissertação intitulada “Efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre a imunorreatividade da PERIOD 1 nos núcleos Supraquiasmático e Arqueado” teve como objetivo determinar, em ratos, os efeitos da desnutrição protéica perinatal sobre o perfil circadiano da proteína relógio PERIOD 1 (PER 1) no núcleo Supraquiasmático (NSQ) comparando a sua expressão com outro núcleo hipotalâmico, o Arqueado (ARC). Foram utilizados ratos *wistar* desnutridos durante a gestação e a lactação, os quais foram avaliados na segunda e terceira semanas pós-desmame. Este trabalho será submetido à revista científica em formato de artigo original.

Os resultados do presente trabalho, indicando os efeitos programadores sobre o relógio circadiano ressaltam a importância dos cuidados com a nutrição das gestantes e lactantes. Nesses períodos, o sistema relógio do feto e neonato é mais vulnerável a agressões e a desnutrição pode influenciar a sua ritmicidade na vida adulta. Poucos estudos têm avaliado os efeitos do ambiente nutricional sobre o desenvolvimento do relógio circadiano. Futuramente será preciso avaliar se os efeitos da perturbação circadiana no desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta são potencializados por experiências adversas no início da vida.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A desnutrição atinge 868 milhões, ou 12,5% da população mundial (FAO, 2012). Destas, quase todas, ou 852 milhões, habitam em países em desenvolvimento. Embora tenha havido uma redução contínua nas estimativas em relação ao período entre 1990-1992 (18,6%), nos últimos anos essa diminuição tem ocorrido em uma taxa mais lenta. Além disso, dados de países africanos contrastam com a tendência geral e o número de desnutridos aumentou no mesmo período (FAO, 2013). A desnutrição foi responsável por 3 milhões de mortes, ou seja, 45% das mortes infantis em 2011 em todo o mundo (BLACK et al., 2013).

A desnutrição em períodos críticos do desenvolvimento cerebral, gestação e a lactação, pode alterar a anatomia (ZHANG; WEI; YANG, 2013), fisiologia (CHAUDHARY et al., 2013) e bioquímica (MOKLER et al., 2007) do sistema nervoso de forma irreversível. As características dessas alterações são diferentes dependendo do tipo (protéica e/ou calórica), intensidade (maior ou menor percentagem de restrição) e período (gestação e/ou lactação) em que ocorre o insulto (ALAMY; BENGELLOUN, 2012). Assim, dieta com 6% de caseína durante a gestação não promoveu modificações sobre as células piramidais hipocampais (DEBASSIO, 1994). No entanto, uma dieta com 8% de caseína na idade adulta induziu perda progressiva de neurônios piramidais na camada CA3 hipocampal (PAULA-BARBOSA et al., 1989). A proteína é um componente nutricional crítico para o desenvolvimento das funções neurológicas. Ao que parece, aminoácidos essenciais para a mãe também o são para o feto. Assim, a omissão de um único aminoácido na dieta materna tem consequências diretas sobre a síntese protéica fetal (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Na experimentação animal, redução na plasticidade axonal é observada em filhotes oriundos de ratas alimentadas com uma dieta pobre em triptofano (PENEDO et al., 2009). Um menor peso encefálico é constatado em fetos de ratas alimentadas com dieta sem adição de treonina (METCOFF; COLE; LUFF, 1981). Entre as funções de precursores de proteínas estruturais essenciais ao crescimento cerebral, enzimas, hormônios e neurotransmissores, os aminoácidos agem, eles mesmos, como neurotransmissores participando, portanto, do funcionamento do sistema nervoso (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002).

Os efeitos da desnutrição proteica em período críticos do desenvolvimento são observados sobre o sistema circadiano (OROZCO-SÓLIS, 2011). Este sistema temporizador gera oscilações rítmicas que controlam diversos processos biológicos. Alterações nesse sistema têm sido implicadas na gênese de distúrbios metabólicos (SALGADO-DELGADO et al., 2013).

2.1.Ritmos Circadianos

Os ritmos circadianos, oscilações em processos biológicos que se repetem com um período aproximado de 24 horas (do latim “circa diem”, que significa “cerca de um dia”) regulam diversos fenômenos no organismo como alimentação, expressão gênica e atividade locomotora. São distribuídos nos reinos biológicos, nas bactérias (OUYANG et al., 1998), fungos (GARDNER; FELDMANZ, 1980), insetos, plantas (KONOPKA; BENZER, 1971) e vertebrados (VITATERNA et al., 1994), conferindo-lhes uma vantagem adaptativa (OUYANG et al., 1998).

A luz é o principal "doador de tempo" (zeitgeber) ou cronador ambiental, permitindo que o relógio interno se ajuste ao ciclo claro-escuro. Os eventos rítmicos, no entanto, não são dirigidos pelos ciclos ambientais, mas são produzidos endogenamente, uma vez que são observadas alternâncias cíclicas mesmo na ausência de sinais externos (LAVOIE; HÉBERT; BEAULIEU, 2013). Em condições constantes de laboratório, como escuro constante, camundongos continuam a expressar ritmos na atividade locomotora, apresentando momentos de maior atividade alternados a períodos de queda na atividade locomotora (LAVOIE; HÉBERT; BEAULIEU, 2013). Diz-se, então, que esses ritmos estão em livre-curso (inglês. *free-running*), isto é, eles não estão sincronizados com os ciclos ambientais e oscilam com um período (τ) ligeiramente diferente de 24 horas (SACK RL, BRANDES RW, 2000)

2.2.O Núcleo Supraquiasmático e os Osciladores Periféricos

Para se produzir um ritmo interno é necessário um dispositivo capaz de gerar as oscilações e transmiti-las para todo o organismo. Estudo realizado por Moore et al em 1972 demonstrou que o núcleo supraquiasmático, localizado bilateralmente no hipotálamo, era o alvo de projeções originadas nas células ganglionares da retina, o trato retinohipotalâmico (TRH), responsáveis por mediar os efeitos da luz sobre a função hipotalâmica-hipofisária (MOORE; LENN, 1972). Em seguida, o mesmo autor demonstrou que os NSQ participam da produção do ritmo circadiano de liberação da corticosterona e que as informações mediadas pelo TRH são necessárias para a sincronização desse ritmo com o ciclo claro/escuro (MOORE; EICHLER, 1972). A ablação do NSQ também aboliu o ritmo circadiano de atividade, consumo de oxigênio e ingestão alimentar em camundongos. (COOMANS et al., 2013). O transplante de tecido do NSQ fetal para o terceiro ventrículo de hamsters, com prévia lesão do NSQ, restaurou a atividade locomotora circadiana nesses animais

demonstrando a função do núcleo como marca-passo central na geração e manutenção do padrão rítmico circadiano (LEHMAN, 1987).

O NSQ, no entanto, não é o único oscilador dos mamíferos. Reppert et al 1981 atribuiu a persistência de ritmicidade circadiana após ablação do NSQ a osciladores localizados fora do NSQ, chamados periféricos em contraposição ao central (REPPERT, 1981). Estudos posteriores confirmaram a presença de osciladores no fígado, pulmões, rins, coração, baço, estômago, tireóide, adrenais, pineal, entre outros (RIPPERGER; ALBRECHT, 2012; YAMAZAKI et al., 2009; YOO et al., 2004). Em animais semitransparentes, como o peixe zebra (*Danio rerio*), os osciladores periféricos são capazes de detectar sinais luminosos ambientais e sincronizar-se diretamente pela luz, via mecanismos não oculares (WHITMORE; FOULKES; SASSONE-CORSI, 2000). Assim, os osciladores periféricos são sincronizados diretamente pelo NSQ, através do qual são ajustados ao ciclo claro/escuro (YAMAZAKI, 2000). Portanto, o NSQ é considerado um sincronizador de todos os relógios (DIBNER; SCHIBLER; ALBRECHT, 2010).

A sincronização dos ritmos circadianos dos osciladores periféricos pelo NSQ se dá diretamente através de sinais humorais e neurais (CHEON et al., 2013). O “hormônio glicocorticóide” exibe um padrão circadiano de oscilação e tem ação na sincronização de vários osciladores periféricos sem afetar, no entanto, o NSQ (OSTER et al., 2006). A dexametasona, um agonista do receptor glicocorticoide, aumenta os níveis da proteína PER 2 em cultura de fibroblastos embrionários (CHEON et al., 2013). Ademais, a dexametasona é capaz de induzir a expressão do gene relógio *Period 1* (Per 1) e alterar a fase de expressão do *Per 1* e do receptor nuclear *Rev erb α* (Reverse Erythroblastosis Vírus α) em tecidos periféricos (BALSALOBRE, 2000). No entanto, sua ação não influencia a expressão no NSQ. Esses achados demonstram a existência de comunicação humoral entre o NSQ e os osciladores periféricos. A sinalização neural, por outro lado, também é necessária para a sincronização dos osciladores espalhados pelo organismo. Em cultura de glândula salivar de ratos transgênicos a inervação simpática é requerida para a sua sincronização ao ciclo claro/escuro (VUJOVIC, 2008). Além disso, o estudo mostrou que os osciladores periféricos podem atuar mais como integradores de várias informações temporais do que simples osciladores submissos ao marca-passo central do NSQ (VUJOVIC, 2008).

Além de sinais humorais e neurais enviados pelo NSQ outras informações podem influenciar a temporização dos tecidos periféricos, a saber, a temperatura corporal e o ritmo de alimentação. A aplicação de pulsos de temperatura (38,5°C) a culturas de pituitária e pulmão demonstrou que esses tecidos são altamente responsivos as mudanças fisiológicas de

temperatura. Ao contrário, o NSQ mostrou-se resistente as mudanças idênticas de temperatura. (BUHR; YOO; TAKAHASHI, 2010). Da mesma forma, a oferta de alimento exclusivamente durante o período do dia a camundongos, animais com maior consumo noturno, é capaz de inverter a fase de expressão gênica em tecidos periféricos sem, contudo, afetar significativamente o marca-passo central. Assim, é provável que esses sinais ajam principalmente nos tecidos periféricos sem grandes, ou nenhum, efeitos sobre o NSQ (DAMIOLA, 2000).

2.3.Bases moleculares da ritmicidade biológica

O mecanismo molecular responsável pela geração das oscilações circadianas está baseado em feedback transcricional-translacional (HASTINGS; REDDY; MAYWOOD, 2003). Este feedback consiste em produtos de genes ditos relógio (proteínas) funcionem como fatores ativadores ou repressores de suas próprias expressões. Proteínas ativadoras se unem e iniciam a produção de proteínas repressoras que, depois de um tempo, também se unem e inibem as ativadoras, diminuindo a própria produção e atividade. As proteínas ativadoras são denominadas CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput) e BMAL 1 (Brain and Muscle Arnt Like – 1), as repressoras são PER 1, PER 2, PER 3 (Period 1, 2, 3) e CRY 1 e CRY 2 (Cryptochrome 1, 2) (KOJIMA; SHINGLE; GREEN, 2011; TAKAHASHI et al., 2008). Para ativar a transcrição dos genes que codificam as proteínas repressoras PER e CRY, o heterodímero (CLOCK-BMAL1) precisa se ligar à região promotora desses genes, denominada E-box, a qual apresenta a seqüência de bases CACGTG (HAO et al., 1997).

Embora haja algum entendimento de como é regulada a expressão de PER e CRY, o mecanismo responsável pela regulação da expressão dos elementos positivos, CLOCK e BMAL 1, é menos conhecido (AKASHI, M; TAKUMI, 2005). O gene *Clock*, que codifica a proteína de mesmo nome, possui expressão constitutiva, ou seja, não apresenta variações diárias significativas na sua expressão (BALMFORTH et al., 2007; TAKATA et al., 2002). Quanto ao *Bmal 1*, sua expressão é regulada negativamente pelo fator de transcrição REV-ERB α (Reverse Erythroblastosis Vírus α) e positivamente pelo ROR α (Retinoic acid-related Orphan Receptor α), os quais competem pela região promotora (RORE) do gene *Bmal 1* (AKASHI, M; TAKUMI, 2005; GUILLAUMOND et al., 2005). Tanto o REV-ERB α , quanto o ROR α têm sua expressão regulada positivamente pelo heterodímero CLOCK-BMAL 1 (DUEZ; STAELS, 2008).

2.4. Ritmos Circadianos e Comportamento Alimentar

O comportamento alimentar abrange processos complexos regulados por necessidades biológicas, hábitos, fatores sociais, propriedades hedônicas do alimento e preferências alimentares, ou seja, fatores homeostáticos e não-homeostáticos (RIEDIGER, 2012). É regulado pela interação entre mecanismos periféricos e centrais que controlam a fome e a saciedade. O hipotálamo, importante por seu envolvimento na integração desses sinais, possui duas populações distintas de neuropeptídeos, os orexigênicos Neuropeptídeo Y (NPY) e a Proteína relacionada ao Agouti (AgRP) e os anorexigênicos Pró-opiomelanocortina (POMC) e Transcrito Relacionado à Cocaína e Anfetamina (CART). Suas produções respondem a flutuações nos níveis de nutrientes e hormônios, como a insulina e a leptina, sinais periféricos que refletem o estado energético corporal (SCHWARTZ et al., 2000).

Quando há aumento de tecido adiposo, os níveis circulantes de insulina e leptina diminuem. Isso leva à ativação do grupo de neurônios NPY/AgRP e a concomitante inibição do grupo POMC/CART. O aumento na expressão e liberação de AgRP e NPY e a diminuição na expressão e liberação de α -MSH (Hormônio Alfa Estimulador de Melanócito), um derivado do POMC, levam ao aumento da ingestão alimentar visando o ganho de peso e a restauração dos níveis anteriores. Quando há diminuição de tecido adiposo, no entanto, o oposto acontece (SCHWARTZ et al., 2000). Todos esses neuropeptídeos hipotalâmicos apresentam oscilações circadianas. As expressões diárias de quase todos se relacionam com o comportamento alimentar. Assim, os neuropeptídeos orexigênicos NPY e AgRP (KALRA et al., 1999; LU, 2002) apresentam níveis elevados durante a fase escura em ratos, a fase de maior ingestão alimentar. O oposto acontece com o POMC (KALRA et al., 1999) um neuropeptídeo anorexigênico que apresenta níveis elevados na fase clara, a fase de menor ingestão. Embora a relação entre a expressão do CART e a ingestão alimentar não seja tão evidente quanto o é para os outros neuropeptídeos, há evidências de sua expressão circadiana em várias regiões encefálicas envolvidas na regulação do comportamento alimentar como o núcleo accumbens, hipotálamo e amígdala (VICENTIC et al., 2005).

Várias áreas envolvidas na regulação do comportamento alimentar recebem projeções do NSQ. Essas áreas incluem os núcleos hipotalâmicos Paraventricular (PVN), Dorsomedial (DMH) e Ventromedial (VMH), Área Hipotalâmica Lateral (LHA) dentre outras (HILLEBRAND; DE WIED; ADAN, 2002). Tal comunicação neural provê o núcleo com a capacidade de influenciar diretamente o ritmo alimentar. Em ratos, o padrão temporal típico

de alimentação, com maior consumo na fase escura, é abolido após lesões do núcleo NSQ (NAGAI et al., 1978).

A execução normal do padrão diário de ingestão alimentar envolve a expressão de genes relógio. A inativação dos genes *Clock* ou *Per 2* aumenta o consumo alimentar diurno em animais de hábito noturno (TUREK et al., 2005; YANG et al., 2009). A ausência do *Clock* diminui os níveis de CART, gera hiperfagia e aumento do peso corporal em resposta à dieta padrão de maneira semelhante à ingestão de dieta rica em gordura (TUREK et al., 2005). Em adição, sugere-se que o *Per 2* suprime a alimentação durante o período inativo através da regulação do ritmo do α -MSH no hipotálamo (YANG et al., 2009).

Os genes relógio também estão envolvidos na regulação da utilização das fontes energéticas. Glicose e ácidos graxos são as principais fontes de energia do organismo e animais mutantes para os genes relógio exibem fenótipos anormais quanto à utilização desses macronutrientes. O silenciamento da expressão do *Bmal 1* aumenta o quociente respiratório, indicando que esse gene está envolvido na utilização de gordura como fonte energética (SHIMBA et al., 2011). A falta do *Bmal 1* diminui o armazenamento de gordura no tecido adiposo e aumenta os níveis de ácidos graxos circulantes, levando ao armazenamento de gordura ectópica no fígado e músculo esquelético (SHIMBA et al., 2011). Além disso, o silenciamento da expressão do *Bmal 1* em camundongos aumentou a produção de glicose a partir do piruvato, avaliado pelo teste de tolerância ao piruvato (KENNAWAY et al., 2013). Nesse teste a injeção intraperitoneal de 2mg/g de piruvato resultou em maiores níveis de glicose sanguínea refletindo um aumento da gliconeogênese hepática (KENNAWAY et al., 2013).

O controle circadiano do metabolismo energético em nível celular é evidenciado pela biodisponibilidade do NAD⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo). Essa coenzima representa o estado energético celular, modula a função oxidativa mitocondrial e, consequentemente, o metabolismo orgânico (PEEK, 2013). A sirtuína 1 (SIRT 1), uma desacetilase dependente do NAD⁺, pode desacetilar a BMAL 1 e prejudicar sua atividade (NAKAHATA et al., 2008). Por outro lado, a Nampt (Nicotinamida Fosforibosiltransferase), uma enzima necessária à produção do NAD⁺, é alvo do heterodímero CLOCK-BMAL 1 possibilitando à maquinaria circadiana regular a produção de NAD⁺ (RAMSEY et al., 2009). Uma vez que o NAD⁺ é necessário à função de enzimas reguladoras da oxidação mitocondrial, como a SIRT 3 (HIRSCHEY et al., 2011), a maquinaria circadiana gera oscilações na capacidade oxidativa mitocondrial através da regulação do ritmo do NAD⁺ (PEEK et al., 2013).

Sinais indicadores da disponibilidade de energia oscilam no decorrer do dia, apresentando aumento e diminuição de sua produção (PASLEY JN, BARNES CL, 1987). A presença de macronutrientes (fontes energéticas) durante a digestão incentiva a liberação de hormônios, a exemplo da colecistoquinina, em resposta a presença de lipídeos. Esse hormônio apresenta seus maiores níveis durante a fase escura em roedores (PASLEY JN, BARNES CL, 1987), a fase de maior gasto energético e, conseqüentemente, de maior consumo energético (SALGADO-DELGADO et al., 2013). Os processos que ocorrem durante a digestão, como a liberação de hormônios, no entanto, não acontecem apenas em resposta à ingestão alimentar. O organismo também é capaz de antecipar o período de disponibilidade do alimento permitindo-lhe se ajustar para aproveitar melhor os nutrientes, otimizando os processos de digestão e absorção.

2.5.FEO – Food Entrainable Oscillator (Oscilador Arrastado por Alimento)

Oscilações endógenas circadianas capacitam os organismos a antecipar a disponibilidade de alimentos. Isso é evidente quando roedores são submetidos à restrição alimentar. Nesse protocolo, animais têm seu período de disponibilidade de alimentos restrito a apenas algumas horas durante o dia. Os animais apresentam expressão comportamental cerca de 2-4 horas antes da disponibilidade do alimento, caracterizado por aumento da atividade locomotora denominada Atividade Antecipatória Alimentar (AAA) (CHABOT; CONNOLLY; WARING, 2012). Além disso, há aumento da temperatura corporal, dos níveis de corticosterona, adaptações celulares e metabólicas hepáticas, dentre outras, resultando em maior eficiência na utilização dos nutrientes (DÍAZ-MUÑOZ et al., 2010; SHEWARD et al., 2007; SZENTIRMAI et al., 2010).

Como citado anteriormente, o sinal fótico é considerado o mais potente sincronizador dos relógios biológicos. No entanto, as alterações observadas nos experimentos com restrição alimentar indicam a possível existência de um oscilador sincronizado pelo alimento, o qual tem sido denominado FEO (Oscilador Arrastado por Alimento). Este se localizaria extra-NSQ, o oscilador arrastado por Luz (LEO), uma vez que ratos com lesão do núcleo ainda apresentaram a Atividade Antecipatória Alimentar (PEZUK et al., 2010). Além disso, o FEO deveria ser capaz de desacoplar os sinais supressores do NSQ sobre outros osciladores para permitir que as alterações fisiológicas e comportamentais típicas da AAA aconteçam fora do período característico sem interferir com o funcionamento do LEO (Oscilador Arrastado por Luz) (BLUM; LAMONT; ABIZAID, 2012). Ainda não é claro se o FEO é formado por uma

rede neuronal ou possui um local específico. Baseando-se na capacidade que os relógios têm de permanecer oscilando mesmo após a remoção do sincronizador, um estudo foi conduzido na tentativa de isolar as possíveis áreas componentes do FEO. Os autores sugeriram que uma região que permanecesse ativa após um período de restrição alimentar seguido do retorno para uma alimentação *ad libitum*, representaria um provável local do oscilador sincronizado pelo alimento. As áreas encontradas foram o hipotálamo dorsomedial (DMH), o núcleo arqueado (ARQ), o núcleo dorsal da rafe (DR), o núcleo parabraquial (PB) e o núcleo do trato solitário (NTS) (BLUM; LAMONT; ABIZAID, 2012). Esses achados reforçam a ideia de que o FEO não está localizado numa única estrutura, mas distribuído numa rede neuronal.

É difícil identificar quais componentes moleculares do LEO também participam do FEO, uma vez que os achados são inconsistentes. O Bmal 1 e o Per 2 parecem fazer parte do FEO, dado que estudos mostram que na ausência de ambos não ocorre a AAA (FEILLET et al., 2006; FULLER; LU; SAPER, 2012). Por outro lado, há resultados mostrando o oposto, e mais estudos são necessários no sentido de esclarecer quais são essenciais para o FEO (PENDERGAST et al., 2009; STORCH; WEITZ, 2009). Os mutantes para o gene Per 1 demonstraram a atividade, sugerindo que o Per 1 não tem participação crítica no processo (FEILLET et al., 2006). O Cry 1 e Cry 2 parecem não ser indispensáveis, mas têm algum envolvimento, pois a mutação no gene que codifica essas proteínas esteve associada a menor estabilidade e atraso da AAA (IJIJIMA et al., 2005). Também, o Clock tem sido interpretado como sendo dispensável para o FEO, pois é evidenciada persistência da AAA em camundongos Clock-mutantes (PITTS; PERONE; SILVER, 2003).

2.6. Perturbações dos Ritmos Circadianos

O NSQ gera e transmite as informações temporais aos osciladores periféricos. Assim, o marca-passo central é capaz de dirigir a expressão gênica rítmica nesses osciladores de acordo com o ciclo claro-escuro. Em algumas situações, sinais provindos do NSQ rumo aos osciladores periféricos são negligenciados pelos tecidos-alvo gerando uma incompatibilidade entre as informações recebidas do NSQ e aquelas originadas de outras fontes (SALGADO-DELGADO et al., 2013). O conflito de informações pode ser causado pelo trabalho noturno, privação de sono ou exposição à luz durante a noite. A atividade no período normal de descanso, por exemplo, induz a ingestão alimentar (SALGADO-DELGADO et al., 2013) a qual ocorre naturalmente no período de atividade e não durante a noite, quando o indivíduo está dormindo. A oferta temporal de alimentos é capaz de influenciar a expressão gênica dos

relógios periféricos e, assim, sinais temporais advindos do NSQ e aqueles da própria alimentação divergem (IJIMA et al., 2005).

Eventos que causam a dessincronização circadiana estão associados ao desenvolvimento de componentes da síndrome metabólica. O trabalho noturno está associado à obesidade, hipertrigliceridemia, HDL baixo, diabetes e doenças cardiovasculares (KARLSSON; KNUTSSON; LINDAHL, 2001). Estudos clínicos demonstram que indivíduos saudáveis para os quais o tempo de sono foi reduzido a 4 horas por seis noites consecutivas exibiram tolerância à glicose e responsividade insulínica reduzidas (VAN CAUTER; KNUTSON, 2008). Dados experimentais mostram que a exposição à luz tênue na fase escura aumentou o consumo de alimento na fase clara e a massa corporal de camundongos com aproximadamente 12 semanas (FONKEN et al., 2013). A exposição à luz tênue ainda reduziu a expressão de *Per 1*, *Per 2* e *Cry 2* no NSQ e de *Rev erb* no fígado e tecido adiposo (FONKEN et al., 2013).

Ao contrário das experiências que acontecem durante a vida adulta, quando o organismo está completamente formado, experiências adversas nos períodos pré-natal e pós-natal precoce causam perturbações no sistema circadiano com consequências tardias. A dieta hipoproteica (caseína 8%) durante a gestação e a lactação diminuiu a expressão do gene relógio *Per 1* no hipotálamo da prole aos 35 dias de vida durante a fase escura do ciclo (OROZCO-SÓLIS, 2011). Análise da expressão da PER 1 em fibroblastos de ratos wistar desnutridos durante gestação e lactação encontrou efeito significativo da dieta sobre a expressão da proteína PER 1 em animais com idade entre 45 e 55 dias (NASCIMENTO et al., 2013). Esses achados demonstram a vulnerabilidade do sistema durante os períodos iniciais da vida. Isto acontece porque esses são períodos críticos, ou seja, um momento que não vai ser repetido mais tarde. Nessa fase os processos organizacionais cerebrais acontecem em alta velocidade e são modificados mais facilmente (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Nesse contexto, ocorre o desenvolvimento do NSQ (MOORE; BERNSTEIN, 1989).

Em ratos, os neurônios do NSQ são formados por volta dos dias 13 e 17 de vida intra-uterina, e já se apresentam como um núcleo distinto do hipotálamo por volta do dia 18 (MOORE; BERNSTEIN, 1989). As sinapses se desenvolvem rapidamente a partir do 4º dia de vida pós-natal, também se desenvolve o TRH e forma-se então uma rede neural que capacita o neonato a sincronizar seus ritmos pelo principal *Zeitgeber* ambiental, o ciclo claro-escuro (MOORE; BERNSTEIN, 1989). Antes disso, no entanto, os ritmos da prole são sincronizados pela mãe.

Lesões do NSQ materno durante a gestação (DAVIS; GORSKI, 1988) ou manipulações do ciclo de presença e ausência da mãe (VISWANATHAN, 1989) demonstram a importância do NSQ materno na ritmicidade dos filhotes. A supressão da melatonina plasmática materna por exposição constante à luz anulou a oscilação dos genes relógio *Per 2* e *Bmal 1* na glândula adrenal fetal (MENDEZ et al., 2012). Esse efeito é revertido após reposição do hormônio, indicando que a melatonina é um possível sinal temporal materno para o feto (MENDEZ et al., 2012). A separação dos filhotes das mães por 6 horas diariamente (OHTA et al., 2003) ou a mudança para uma mãe adotiva com uma fase diferente da mãe biológica (OHTA et al., 2002) é capaz de alterar a fase da expressão dos genes relógio *Per 1* e *Per 2* dos filhotes no NSQ. Além disso, a restrição alimentar materna adianta a fase de expressão do *Per 1* no NSQ fetal (OHTA et al., 2008). Esses achados ressaltam a importância da relação mãe-feto na ontogênese do sistema circadiano.

O ambiente nutricional materno atua diretamente sobre o sistema circadiano da prole. A inadequação nutricional é um dos principais fatores não genéticos que perturba o desenvolvimento cerebral, afetando-o permanentemente (MORGANE; MOKLER; GALLER, 2002). Comparações entre três estados do ciclo sono-vigília, o sono de movimento oculares rápidos (REM), o sono de ondas lentas (SWS) e a vigília, entre animais controles e desnutridos durante a gestação demonstrou que os animais desnutridos passaram maior tempo no sono REM e menor no sono SWS com relação aos seus controles (DURÁN et al., 2006). A desnutrição proteica gestacional altera o padrão temporal de atividade locomotora, induzindo maior atividade na fase clara em animais com hábito noturno, somado a aumento da expressão de *Clock* e *Bmal 1* e diminuição da expressão do *Per 2* no córtex cerebral (SUTTON; CENTANNI; BUTLER, 2010). Filhotes oriundos de mães desnutridas durante a gestação e lactação apresentaram alterações no padrão circadiano de ingestão alimentar com dois maiores picos de alimentação no ciclo escuro comparados a um pico nos animais controles (OROZCO-SÓLIS, 2011).

Esses achados sugerem que a desnutrição proteica perinatal apresenta efeitos programadores sobre o sistema circadiano com consequências sobre o padrão do comportamento alimentar na vida adulta.

3. HIPÓTESE

A desnutrição proteica perinatal diminui a imunorreatividade da PERIOD 1 no núcleo supraquiasmático de forma semelhante ao núcleo arqueado hipotalâmico em ratos.

4. OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre o perfil circadiano da imunorreatividade da PERIOD1 nos núcleos supraquiasmático e arqueado de ratos jovens.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar entre 35 e 38 dias de vida pós-natal:

- O perfil circadiano da ingestão alimentar em intervalos de quatro horas;
- A imunorreatividade circadiana, com intervalos de quatro horas, da proteína PERIOD1 nos núcleos hipotalâmicos supraquiasmático e arqueado.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar provenientes da colônia do Departamento de Nutrição – UFPE. Os animais foram mantidos em biotério com temperatura de $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro invertido de 12/12h (luzes acesas às 18:00 e apagadas às 06:00 horas). Fêmeas entre 90 e 120 dias foram acasaladas no estro para obtenção das ninhadas. A identificação de espermatozóide no esfregaço vaginal diagnosticou a possível prenhez. Após esta etapa, as fêmeas foram separadas para obtenção da ninhada controle (17% de proteína) ou desnutrida (8% de proteína). A composição das dietas pode ser observada na tabela 1. Um dia após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para que contivessem 8 ratos, machos ou fêmeas na mesma proporção cada um, escolhidos aleatoriamente. As dietas continuaram sendo administradas até o desmame (21º dia).

Tabela 1 - Composição das dietas experimentais oferecidas durante o período de gestação e lactação.

Constituintes	Dieta hipoprotéica (8%)	Dieta normoprotéica (17%)
g %	100,00	100,0
Proteínas	8,10	17,30
Carboidratos	75,10	65,90
Lipídios	7,00	7,00
Fibras	5,00	5,00
Vitaminas	1,00	1,00
Minerais	3,50	3,50
Metionina	0,30	0,30
% Kcal	362,48	363,44

6.1. Grupos Experimentais

Foram constituídos dois grupos experimentais de acordo com as dietas oferecidas às mães durante os períodos de gestação e lactação: grupo controle, proveniente de mães alimentadas com dieta normoprotéica (17% de proteína) e grupo desnutrido, proveniente de mães alimentadas com dieta hipoprotéica (8% de proteína). As dietas seguiram as recomendações do American Institute of Nutrition (AIN 93). Aos 28 dias os filhotes machos foram separados aleatoriamente em gaiolas individuais, um para cada horário (8:00, 12:00, 16:00, 20:00, 24:00, 4:00). Ao desmame os animais foram alimentados com dieta padrão do biotério, labina, a qual possui a seguinte composição por quilograma: Proteína bruta 230g,

Extrato Etéreo 40g, Fibra bruta 50g, Matéria Mineral 100g. Aos 28 dias eles foram alocados em gaiolas individuais e passaram por um período de adaptação ao novo ambiente de 7 dias ao final dos quais foram realizados os procedimentos descritos a seguir.

6.2.Peso corporal

No 21º, 28º e 35º dias pós-natais foi avaliado o peso corporal. Os dados foram obtidos utilizando-se uma balança eletrônica com capacidade para 4Kg e sensibilidade de 0,1g(Marte, modelo S-4000).

6.3.Consumo Alimentar

A ingestão alimentar foi avaliada aos 35 dias. Os dados do consumo foram obtidos a partir da subtração da cota oferecida pela cota rejeitada em intervalos de 4 em 4 horas. Esses intervalos são representativos do período de 24 horas (OROZCO-SÓLIS, 2011).

6.4.Perfusão Transcardíaca e obtenção do Encéfalo

Os animais foram anestesiados com ketamina (60mg/kg de peso corporal) e xilasina (7,5 mg/kg de peso corporal). O efeito do anestésico foi confirmado através do reflexo palpebral passando-se a pinça oftálmica de secção curva em frente ao olho do animal, o não piscar, somado à ausência dos reflexos de preensão foi o sinal para o início da cirurgia. Esta foi realizada com o animal deitado com a região ventral voltada para cima e devidamente fixado pelos membros anteriores em superfície apropriada. Suspenso o tecido da região ventral na linha mediana, um corte foi realizado a partir da região abdominal até a torácica. A partir do processo xifóide foi efetuado um corte em forma de “V” na musculatura e costelas, abrindo a cavidade torácica de maneira que expusesse o coração permitindo o acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida a cânula para a perfusão a qual esteve presa à área por uma pinça de keller.

Afastando-se os pulmões, a aorta descendente foi pinçada impedindo, assim, que toda a sua área de irrigação fosse perfundida. A bomba peristáltica, na qual a cânula esteve acoplada, foi acionada mantendo-se a velocidade de infusão da solução compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. 100ml de solução salina (NaCl, 0,9%) foram infundidos inicialmente à temperatura ambiente para remoção sanguínea dos vasos,

evitando a formação de coágulos e proporcionando a correta penetração do fixador nos tecidos. Em seguida foram infundidos 400 mL de solução fixadora (4% de paraformaldeído, pH 7,4, em 4° C). A chegada do fixador na região dos membros anteriores foi constatada pela contração destes, então foi adicionado gelo sobre a cabeça do animal para minimizar a degradação protéica.

Ao final da infusão os encéfalos fixados foram retirados do crânio e imersos na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (20%) durante 4 horas. Em seguida, foram armazenados em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio PBS - mais sacarose 20%) por 6-24 h. Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-se criomicrotomo de congelamento. Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, em placa de acrílico (25 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20°C.

6.5. Análise Imunohistoquímica

Uma série de cortes coronais, dos encéfalos foi submetida a reações de imunohistoquímica contra a *Period 1*. Este procedimento constou de duas reações básicas:

Reação Primária: Nesse procedimento os cortes coronais da série foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a três séries de lavagens em PBS (3 x 10min). Em seguida foram incubados em solução com 0,1% de Triton-x mais 3% de soro normal de cabra (NGS) e 5% de albumina bovina durante duas horas à temperatura de 4°C. Em seguida, os cortes foram incubados em solução com anticorpo primário anti-Per 1 (Santa Cruz Biotechnology®) por 48 h a 4°C. A solução para incubação foi formada por PBS (0,1%), Triton (0,3 %), soro normal de cabra (NGS 5 %) e anticorpo contra a proteína Per 1 (1:2000).

Reação Secundária: Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário (antigoat-sigma®) (1:500) por 2 horas. Logo após os cortes foram lavados com PBS (4 x 10min), e incubação no Complexo Peroxidase-Antiperoxidase 1% (ABC, Kit Vector Laboratories) por 1,5 hora. Em seguida houve outra lavagem em PBS (2X10min), e uma posterior lavagem no tampão Na-acetato à 0,1M (2 x 10 min).

Para revelação os cortes foram submersos em solução com DAB (3,3-diaminobenzidina (3ml), Níquel amônio sulfato (NAS) e acetato de sódio (0,2 M), cloreto de amônio e β-d-glicose. Logo após esse período, foi adicionada à solução com a enzima Glicose Oxidase aguardando-se a obtenção de cortes de cor marrom claro/púrpura. A

neutralização da reação foi realizada submetendo a lavagens com Na-acetato (0,1M) (2 x 10 min) e, em seguida, com PBS (2 x 10 min).

Após a montagem dos cortes em lâminas previamente gelatinizadas, estes foram submetidas ao processo de desidratação em concentrações crescentes de alcoóis (50 %, 70 %, 90%, 100% -I, 100%-II, 5 min cada) e diafanizados em xilol (Xilol-I, Xilol-II, 5 min cada). As lâminas foram recobertas com Entelan e lamínula. A identificação dos núcleos supraquiasmático e arqueado foi realizada com auxílio de microscopia óptica de campo claro e do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (1998).

6.6.Análise quantitativa de células PER 1-IR

Após a montagem das lâminas, foram obtidas fotomicrografias dos cortes utilizando câmara digital (Samsung SHC – 410 NAD) acoplada a um microscópio (Olympus BX50). A aquisição das imagens foi feita com objetiva de 20x e captura pelo software TV Turner Application. Foi utilizada uma média de quatro animais em cada horário, sendo obtidos dois cortes por animal. Esses cortes equivalem às faixas de bregma -0,48mm e -0,96mm para o núcleo supraquiasmático e -2,76mm a -3,48mm para o núcleo arqueado. A delimitação dos núcleos supraquiasmático e arqueado foi realizada com auxílio do atlas estereotáxico de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2006). A contagem de neurônios foi feita manualmente, em duplicata, pela ferramenta de contagem de células do programa Image J. Foram quantificadas todas as células com marcação evidente na região do núcleo supraquiasmático e arqueado dos hemisférios direito e esquerdo dos ratos.

6.7.Análise estatística

Os dados de peso corporal e consumo alimentar foram expressos em média \pm desvio padrão da média. A imunorreatividade da PER 1 no núcleo supraquiasmático e no núcleo arqueado foi apresentada pela média \pm erro padrão da média. As comparações dos dois grupos em cada horário foi realizado pelo *Teste t de Student*. Todos os dados foram analisados usando o Graphpad Prism 5 (versão 7).

7. RESULTADOS

7.1. Peso corporal

O grupo desnutrido (D) apresentou menor peso corporal em relação ao grupo controle (C) no 21º, 28º e 35º dias de vida (21º: C $51,5 \pm 2,6$, n=9 vs D 28 ± 5 , n=9, $p < 0,001$; 28º: C $70,2 \pm 9,4$, n=9 vs D $52,8 \pm 2,5$, n=9, $P < 0,001$; 35º: C $121,9 \pm 8,5$, n=9 vs D $94,5 \pm 17,1$, n=9, $P < 0,001$).

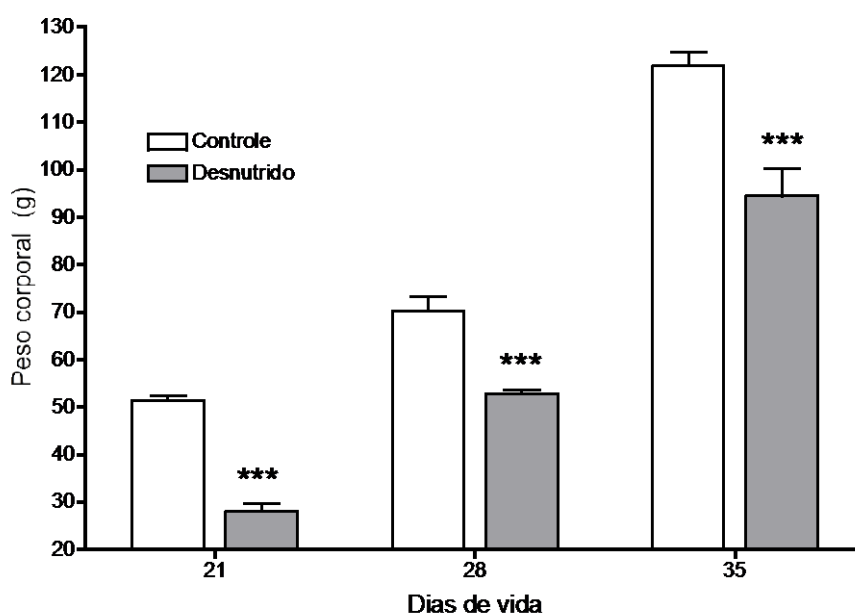


FIGURA 1: Efeito da desnutrição perinatal sobre o peso corporal de ratos. Ratos receberam dieta hipoproteica (8% de proteína) ou normoproteica (17% de proteína) durante a gestação e a lactação. Os pesos corporais foram aferidos nos dias 21, 28 e 35 de idade. Valores representados em média±DP, *** $p < 0,001$. Teste *t de student*.

7.2. Consumo alimentar circadiano

Animais desnutridos apresentaram maior consumo às 8:00 e 16:00 horas em relação aos controles (8h: Controles $3,8 \pm 0,5$, $n=9$ vs Desnutridos $4,8 \pm 0,6$, $n=9$, $p<0,0001$; 16h: Controles $2,8 \pm 0,6$, $n=9$ vs Desnutridos $3,8 \pm 0,4$, $n=9$, $p<0,05$).

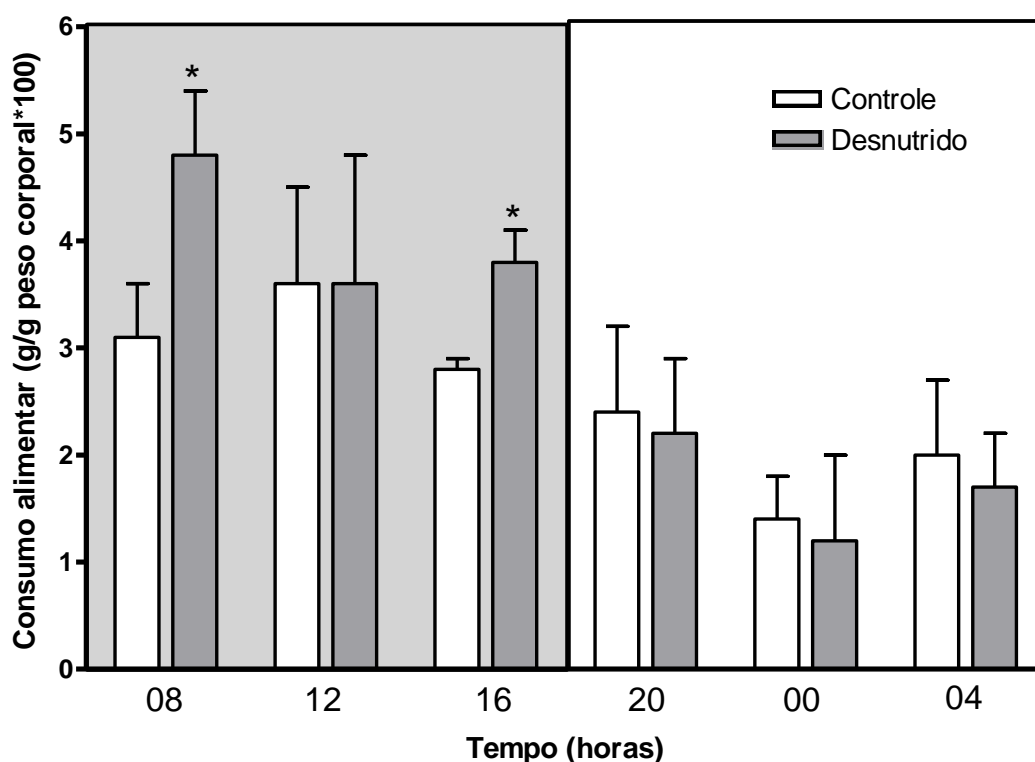


Figura 2: Efeito da desnutrição perinatal sobre o consumo alimentar circadiano em ratos. O consumo alimentar foi obtido em intervalos de quatro horas de ratos machos aos 35 dias de idade nascidos de mães alimentadas com dieta normoprotéica (17% de proteína) ou hipoprotéica (8% de proteína) durante gestação e lactação. Valores representados em média \pm DP, * $p<0.05$. Teste *t de student*. Controle $n=9$; Desnutrido $n=9$

7.3. Imunorreatividade da PERIOD 1 no núcleo supraquiasmático

O número de células imunorreativas ao PER 1 no núcleo supraquiasmático do hipotálamo foi igual entre os grupos controle e desnutrido em todos os períodos analisados.

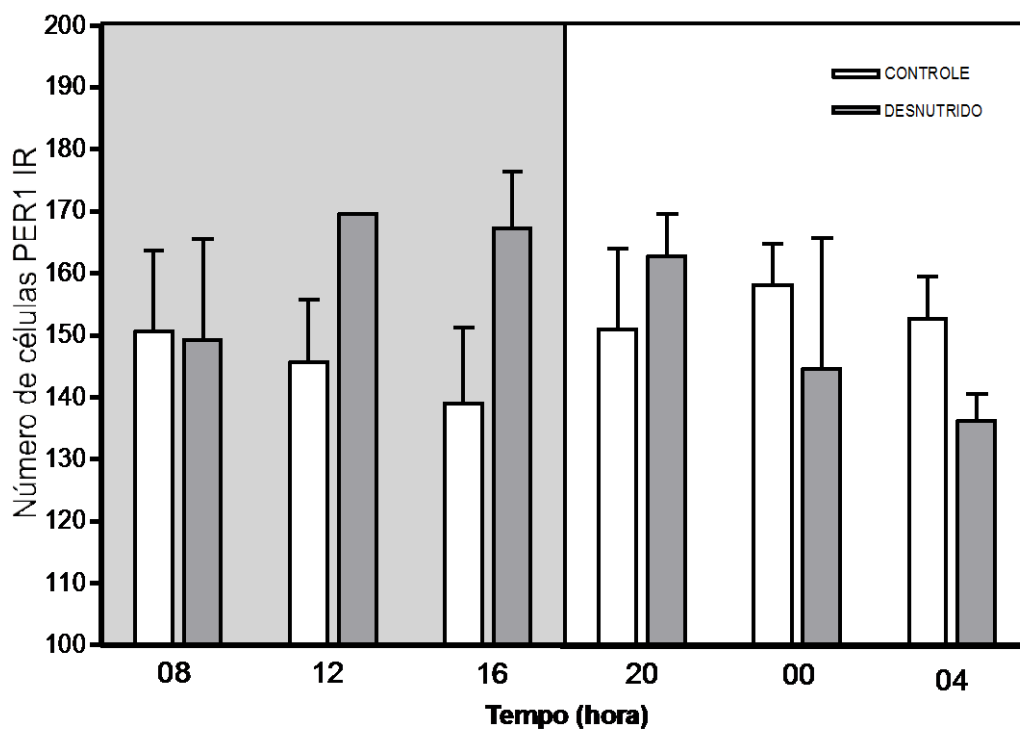


Figura 3: Efeito da desnutrição sobre o número de neurônios imunorreativos a PER 1 no NSQ. Os encéfalos analisados foram obtidos de ratos machos aos 35 dias de idade nascidos de mães alimentadas com dieta normoprotéica (17% de proteína) ou hipoprotéica (8% de proteína) durante gestação e lactação. A análise foi realizada em cortes coronais do NSQ em intervalos de 4 horas na fase clara (área em branco no gráfico) ou escura (área cinza no gráfico). Teste *t de student*. Nível de significância $p < 0,05$. Faixas de bregma -0,48mm e -0,96mm. Controle $n=3$; Desnutrido $n=4$.

7.4. Imunorreatividade da PERIOD 1 no núcleo supraquiasmático por hemisférios

A análise do núcleo supraquiasmático por hemisférios demonstrou maior imunorreatividade ao PER 1 no hemisfério esquerdo às 16 horas em animais desnutridos (Controle=69± 6.1, n=3 vs Desnutridos= 92±4.2, n=4, $p<0.05$, t test), quando comparados aos controles. O número de células imunorreativas ao PER 1 no hemisfério direito foi igual entre os grupos controle e desnutrido em todos os períodos analisados.

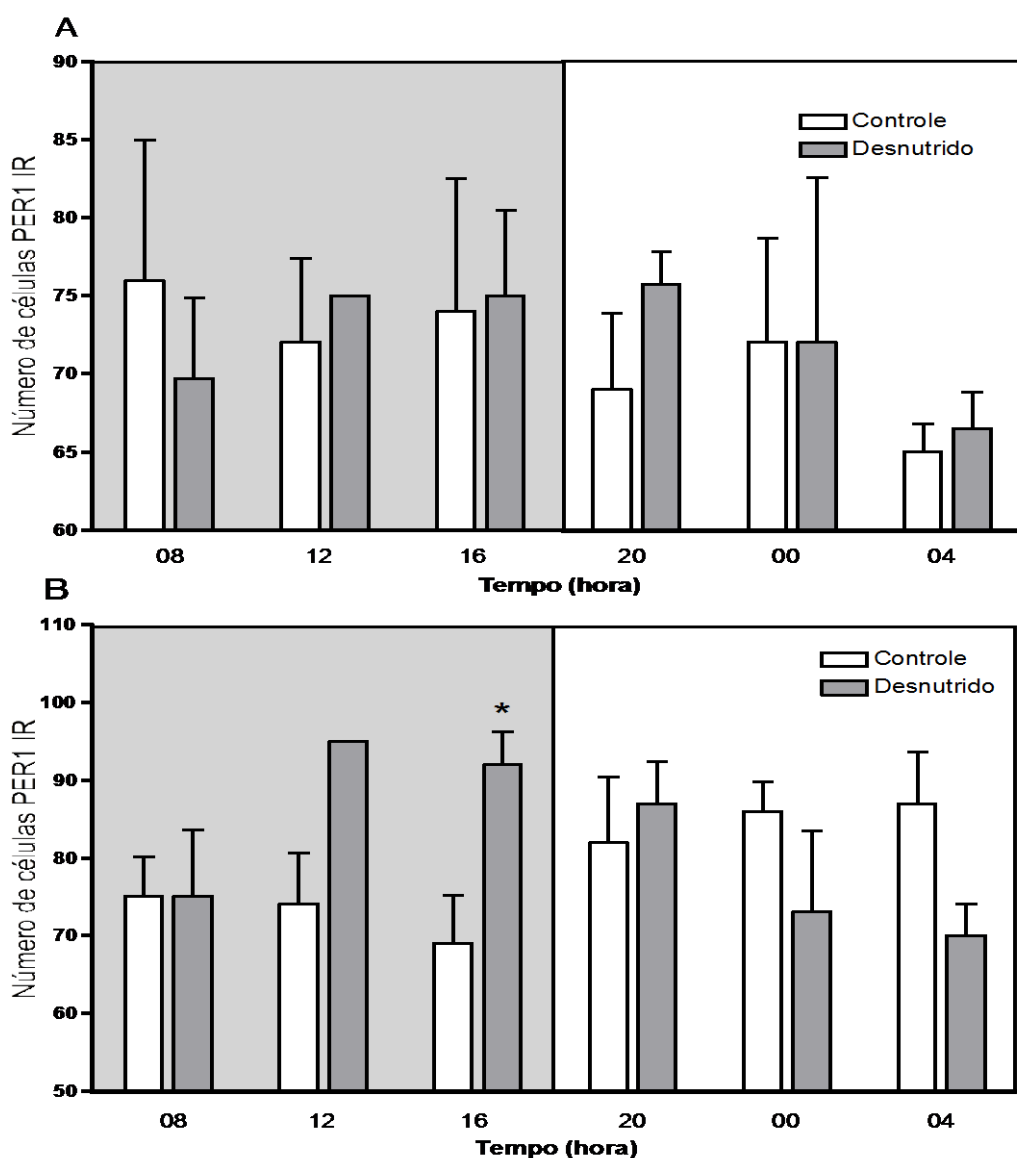


Figura 4: Efeito da desnutrição sobre o número de neurônios imunorreativos a PER 1 no NSQ direito (A) e esquerdo (B). Os encéfalos analisados foram obtidos de ratos machos aos 35 dias de idade nascidos de mães alimentadas com dieta normoprotéica (17% de proteína) ou hipoprotéica (8% de proteína) durante gestação e lactação. A análise foi realizada em cortes coronais do Núcleo Supraquiasmático (NSQ) em intervalos de 4 horas na fase clara ou escura. Teste *t de student*. Faixas de bregma -0,48mm e -0,96mm. Controle n=3; Desnutrido n=4

7.5.Imunorreatividade da PERIOD 1 no núcleo arqueado

O número de células imunorreativas ao PER 1 no núcleo arqueado do hipotálamo foi menor para animais desnutridos às 0 horas (Controles $616,1 \pm 3,4$, $n=6$ vs Desnutridos $214,2 \pm 66,4$, $n=4$, $p<0,001$) e às 20 horas (Controles $525,8 \pm 24,7$, $n=6$, vs Desnutridos $341,6 \pm 46,4$, $n=4$, $p<0,01$) comparados aos controles.

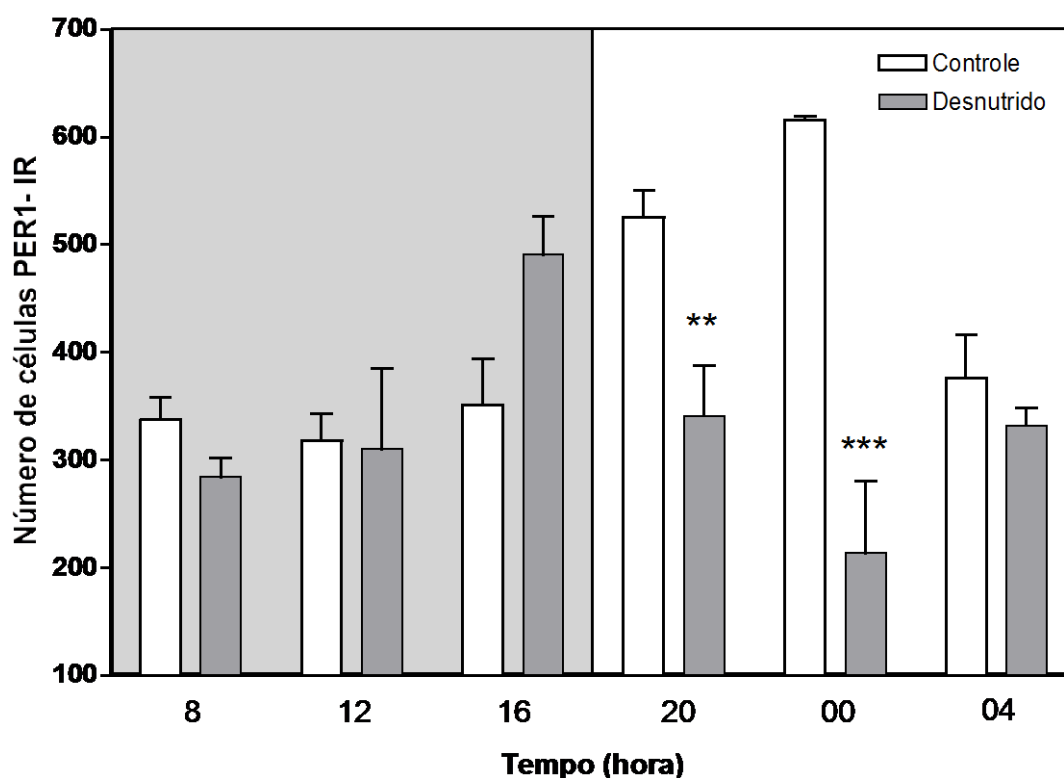


Figura 5: Efeito da desnutrição sobre o número de neurônios imunorreativos a PER 1 no núcleo arqueado do hipotálamo. Os encéfalos analisados foram obtidos de ratos machos aos 35 dias de idade nascidos de mães alimentadas com dieta normoprotéica (17% de proteína) ou hipoprotéica (8% de proteína) durante gestação e lactação. A análise foi realizada em cortes coronais do núcleo arqueado em intervalos de 4 horas na fase clara ou escura. Teste *t de student*. Faixas de Bregma 2,76mm a -3,48mm. Controle $n=6$; Desnutrido $n=4$.

8. DISCUSSÃO

Os resultados de peso corporal demonstram que a dieta hipoproteica oferecida às gestantes e lactantes foi eficiente para desnutrição dos filhotes. O menor peso corporal apresentado pelos animais desnutridos ao desmame foi persistente durante todo o experimento alcançando apenas 77,5% do peso controle aos 35 dias de vida (Fig 1). Outros estudos também observaram que ratos que sofreram desnutrição proteica durante a gestação e lactação apresentaram baixo peso ao nascer persistentes aos 35 dias (AGUILAR-ROBLERO et al., 1997; OROZCO-SÓLIS, 2011). Em contraposição, animais que foram desnutridos apenas durante a gestação alcançaram pesos semelhantes aos controles em idades mais avançadas (DURÁN et al., 2005). Recém-nascidos com baixo peso ao nascer e pequenos para a idade gestacional apresentam um período de rápido crescimento pós-natal denominado *catch up* (JAIN; SINGHAL, 2012). Embora os animais do presente estudo apresentassem peso inferior aos controles aos 35 dias, o aumento de peso foi de aproximadamente 231% em relação àquele do nascimento, enquanto que o do grupo controle esteve por volta de 136%. Isso sugere que os animais deste estudo experimentaram o *catch up* do crescimento.

A desnutrição proteica perinatal promoveu hiperfagia aos 35 dias de vida. Outros estudos encontraram resultados semelhantes em animais que experimentaram a mesma manipulação nutricional na gestação e lactação (LOPES DE SOUZA et al., 2008; OROZCO-SÓLIS, 2011). Diminuição na responsividade dos receptores serotoninérgicos (LOPES DE SOUZA et al., 2008), nas vias anorexigênicas (DELAHAYE et al., 2008) e aumento do NPY no decorrer do ciclo circadiano (OROZCO-SÓLIS, 2011) são prováveis mecanismos subjacentes a essas alterações. No presente estudo não foi evidenciada alteração no padrão circadiano de ingestão alimentar. Ratos da linhagem *Wistar* são mais ativos durante a noite e, conseqüentemente, ingerem a maior parte de sua alimentação nesse período (SALGADO-DELGADO et al., 2013). Como esperado, os animais desnutridos exibiram maior ingestão alimentar durante a fase escura do ciclo quando comparada à fase clara, sugerindo que a geração do padrão circadiano de alimentação se mantém estável após a desnutrição.

A desnutrição proteica durante a gestação e lactação não alterou a imunorreatividade da PER 1 no NSQ entre animais desnutridos e controles. Protocolo de desnutrição proteica com início duas semanas antes do acasalamento e durante toda a gestação, também não promoveu modificações na expressão dos genes relógio na região medial basal do hipotálamo, na qual se localiza o NSQ, em animais com oito semanas de idade (SUTTON; CENTANNI; BUTLER, 2010). Por outro lado, a expressão do *Per 1* esteve diminuída no hipotálamo de

animais com 35 dias de vida submetidos à desnutrição proteica durante a gestação e lactação, mesmo período utilizado no presente estudo (OROZCO-SÓLIS, 2011). Essas diferenças parecem depender da região, do período de desnutrição e das idades em que as análises foram realizadas. Sutton e colaboradores avaliaram apenas a região medial basal do hipotálamo de animais com oito semanas desnutridos durante a gestação, enquanto que Orozco-Solís analisou o extrato hipotalâmico como um todo em animais com 35 dias, desnutridos durante a gestação e a lactação. Uma vantagem da técnica de imunohistoquímica utilizada no presente estudo foi a individualização dos núcleos hipotalâmicos e a mensuração dos níveis proteicos em áreas específicas, uma vez que a técnica permite a localização de antígenos, neste caso a PER 1, no tecido. O hipotálamo possui vários núcleos relacionados à regulação de diferentes funções no organismo, dentre elas a função endócrina, a regulação da temperatura, o comportamento reprodutivo, o comportamento alimentar e os ritmos biológicos (MOORE; EICHLER, 1972). Assim, a depender da maior ou menor participação da PER em cada uma dessas funções, o organismo pode priorizar a expressão normal em determinado núcleo em detrimento de outro.

No caso do núcleo supraquiasmático, a ausência da PER 1 contribui para a perda de um relógio circadiano funcional. Após suas transcrições, as proteínas PER e CRY se acumulam no citoplasma e, então, retornam ao núcleo para inibir a própria transcrição. Esta é promovida pela ligação do heterodímero CLOCK-BMAL1 à região promotora dos genes *Per* e *Cry*. Assim, há momentos do dia em que os níveis de PER e CRY estão elevados e os de CLOCK e BMAL 1 estão diminuídos e vice-versa. As oscilações nas concentrações dessas proteínas relógio contribuem para a geração dos ritmos. Há três proteínas PERIOD homólogas. Destas, a PER 1 e a PER 2 são essenciais para a manutenção da ritmicidade circadiana, enquanto é sugerido que a PER 3 pode não ser necessária à geração dos ritmos (BAE et al., 2001). A mutação do gene *Per 1* gera animais com um período menor que 24 horas (ZHENG et al., 2001). Embora a mutação do *Per 3* tenha efeitos semelhantes, uma característica particular da mutação do *Per 1* é que o relógio apresenta reduzida precisão e estabilidade com relação ao período de cerca de 24 horas. Isso indica que a mutação do *Per 1* causa uma maior perturbação do relógio do que a mutação do *Per 3* (ZHENG et al., 2001). Análises com animais mantidos em escuro constante ressaltam a importância do *Per 1* no funcionamento do relógio circadiano. Nessas condições, mesmo o animal estando desprovido do ciclo claro-escuro como pista ambiental espera-se que ele continue expressando os ritmos circadianos. A expressão, nesse caso, reflete o ritmo produzido endogenamente, sem sincronização com o ambiente. A inativação gênica do *Per 1* e *Per 2* levou à perda da

ritmicidade circadiana da atividade locomotora em animais mantidos sob escuro constante (BAE et al., 2001), indicando que ambos são essenciais para a manutenção da ritmicidade circadiana.

Possuir um relógio funcional não é indispensável ao desenvolvimento, uma vez que animais mutantes para os genes *Per 1* e *Per 2* se reproduzem e são morfológicamente iguais aos seus controles (ZHENG et al., 2001). No entanto, manter a ritmicidade circadiana é importante para a adaptação do animal ao meio em que vive. O gene *Per 1* foi indicado como um possível adaptador do relógio circadiano às mudanças sazonais do ciclo claro-escuro. A inativação gênica do *Per 1* em camundongos gerou animais com maiores dificuldades de adaptação a um fotoperíodo maior que 12 horas. Isso indica que animais noturnos que possuem o gene apresentam uma vantagem para sincronizarem seus relógios internos ao ciclo claro-escuro externo (MASUBUCHI et al., 2005). Uma maior adaptação ao meio se reflete em vantagens para a sobrevivência, uma vez que permite aos animais escapar de inimigos e encontrar o alimento (CLOUDSLEY-THOMPSON, 1960; DECOURSEY; WALKER; SMITH, 2000). Assim, a manutenção dos níveis da *PER 1* em animais desnutridos pode representar uma tentativa do organismo em manter a capacidade adaptativa dos animais ao meio.

Entretanto, também é possível que a *PER 1* no NSQ possua uma menor susceptibilidade à manipulação nutricional quando comparada a outras manipulações. A sensibilidade ao sinal fótico se desenvolve durante o período pós-natal precoce. O *Per 1* já mostra sensibilidade a um pulso de luz de 30 minutos no primeiro dia pós-natal, antes do *Per 2*, o qual se mostra sensível no terceiro dia (MATEJU et al., 2009). Assim, manipulações do fotoperíodo durante o período do desenvolvimento podem ter maiores repercussões sobre as proteínas relógio do NSQ do que a manipulação nutricional perinatal. A exposição a diferentes fotoperíodos, curto e longo, durante a gestação e lactação modificou permanentemente a expressão gênica do *Per 1* em fatias do NSQ de camundongos com 7 semanas de idade. Animais expostos a longos períodos de luminosidade (16 horas no claro) durante o desenvolvimento do NSQ apresentaram menores períodos de expressão do *Per 1* e picos com menor duração. Ao contrário, animais expostos a curtos períodos de luminosidade (8 horas no claro) durante o desenvolvimento apresentaram maiores períodos de expressão do *Per 1* e picos com maior duração (CIARLEGLIO et al., 2011). Já a desnutrição proteica durante a gestação não alterou a expressão de genes relógio na região medial basal do hipotálamo, que abriga o NSQ, de camundongos com 8 semanas de idade. Este estudo, no entanto, avaliou apenas dois momentos do ciclo circadiano, 0 e 12 horas (SUTTON;

CENTANNI; BUTLER, 2010). Ao nosso conhecimento o presente estudo é o primeiro a avaliar a imunorreatividade de um componente da maquinaria molecular circadiana durante 24 horas após insulto nutricional no período do seu desenvolvimento. E os resultados corroboram parcialmente com os de *Sutton* e colaboradores, pois ele avaliou outros genes relógio, sugerindo que a expressão da PER 1 no NSQ é menos vulnerável às alterações promovidas pela desnutrição proteica perinatal.

Outro aspecto mostrado pelos achados anteriores é que, embora o NSQ não tenha demonstrado alterações na imunorreatividade da PER 1 após as manipulações nutricionais, outras áreas encefálicas apresentaram alteração (SUTTON; CENTANNI; BUTLER, 2010). Dessa forma, no presente estudo, a desnutrição proteica durante a gestação e lactação diminuiu a imunorreatividade da PER 1 no núcleo arqueado de animais desnutridos quando comparados aos seus controles.

O núcleo arqueado possui neurônios que exibem ritmicidade circadiana (CHEN et al., 2004). Análise *in vitro* demonstra que o núcleo apresenta oscilação rítmica na expressão gênica do *Per 1*, indicando a presença de um oscilador circadiano nesse núcleo (ABE et al., 2002). Esse oscilador pode ser responsável pela capacidade do núcleo de antecipar o período do dia em que o alimento estará disponível (VERHAGEN et al., 2011). A restrição do período de oferta de alimento a apenas algumas horas durante o dia promove uma maior expressão de Fos, um indicador de ativação neuronal, algumas horas antes do alimento ser disponibilizado indicando uma capacidade do núcleo de antecipar o período de sua oferta (VERHAGEN et al., 2011). Essa capacidade preditiva envolve a expressão do *Per 1*. A restrição alimentar promoveu aumento da expressão do *Per 1* momentos antes do período de acesso ao alimento demonstrando a sensibilidade do núcleo e de sua maquinaria circadiana aos sinais alimentares (MENDOZA et al., 2010). Essa sensibilidade ao sinal alimentar pode ser responsável pelas alterações na expressão do *Per 1* no núcleo arqueado em resposta a desnutrição proteica perinatal.

Estudos realizando manipulações nutricionais nos períodos críticos do desenvolvimento, como a gestação e lactação, demonstram perturbações da ritmicidade circadiana após restrição alimentar nesses períodos (DURÁN et al., 2005; ROJAS-CASTAÑEDA et al., 2008; VILELA et al., 2005). Essas perturbações podem advir das alterações dos componentes moleculares do relógio circadiano em regiões extra-NSQ. A desnutrição proteica com início duas semanas antes do acasalamento e mantida durante a gestação não promoveu alterações dos níveis de genes relógio no NSQ de ratos com 8 semanas de idade. No entanto, foi evidenciado nesses animais aumento dos níveis do *Bmal 1*

e *Clock* e diminuição do *Per 2* cortical às 12 horas além de aumento do *Bmal 1* e *Per 2* e diminuição do *Rev-erb α* no fígado no mesmo horário. Essas mudanças foram associadas à hiperfagia na fase clara do ciclo circadiano, quando comparado aos controles, com ingestão normal durante a fase escura do ciclo (SUTTON; CENTANNI; BUTLER, 2010). Assim, é possível que alterações permanentes do oscilador circadiano do núcleo arqueado, decorrentes de um ambiente nutricional pobre durante os períodos críticos do desenvolvimento, desempenhem um papel causador dos fenótipos anormais do comportamento alimentar observados nesses animais na vida adulta.

Essas alterações podem envolver a sinalização por leptina no núcleo arqueado (LI et al., 2012). Receptores para o hormônio estão presentes em vários tipos celulares do núcleo que participam do controle da ingestão alimentar (BASKIN; SCHWARTZ; SEELEY, 1999). A destruição de neurônios do arqueado que expressam esses receptores em ratos, mantendo-se o NSQ intacto, aboliu o ritmo de alimentação (LI et al., 2012). Ratos Zucker, os quais possuem receptores de leptina com baixa afinidade para o hormônio e hipofuncionais (YAMASHITA et al., 1997) apresentam padrões alimentares alterados, o que também é observado em ratos *ob/ob*, que não produzem leptina (MISTLBERGER; LUKMAN; NADEAU, 1998). A desnutrição por redução da quantidade de dieta durante a gestação aumentou os níveis plasmáticos de leptina e diminuiu os níveis hipotalâmicos de receptores para o hormônio, marcadores de resistência à leptina, em ratos com quatro semanas de idade. Esses animais apresentaram maior ingestão alimentar que os controles na fase clara e o oposto foi verdadeiro na fase escura (BRETON; LUKASZEWSKI, 2009). A desnutrição proteica durante a gestação aumentou os níveis de leptina da prole de camundongos com 16 semanas de idade (PEIXOTO-SILVA et al., 2011). Também houve aumento dos níveis de leptina em relação à quantidade de tecido adiposo de ratos adultos que experimentaram a desnutrição proteica durante a lactação (LISBOA, 2012). No entanto, foi demonstrado redução da leptina em animais com desnutrição proteica (QASEM et al., 2012). Os resultados opostos podem depender das diferenças entre as idades avaliadas e do período em que ocorreu a manipulação nutricional e demonstram a falta de um consenso em relação aos efeitos da nutrição materna sobre o sistema endócrino da prole. Assim, a desnutrição em períodos críticos do desenvolvimento cerebral parece alterar o padrão de ingestão alimentar via modificações na sinalização por leptina no núcleo arqueado.

Ainda, a sinalização por leptina pode ter efeitos sobre a expressão dos componentes moleculares do relógio, como a *PER 1*. O tratamento com Interferon alfa (IFN- α), de células de hepatoma em cultura, diminuiu a expressão gênica e os níveis proteicos do *Clock* e do

Bmal 1 via aumento da proteína STAT 1 (*Ing. Signal Transducer and Activator of Transcription 1*). Isso indica que o IFN- α tem um efeito inibitório sobre a expressão do *Clock* e do *Bmal 1* através da ativação da via de sinalização JAK-STAT (KOYANAGI; OHDO, 2002). Essa via, ativada pelos interferons, interleucinas e citocinas, também é ativada após a ligação da leptina ao seu receptor de isoforma longa (FRÜHBECK, 2006). A administração de IFN- α em camundongos também diminuiu a imunorreatividade do CLOCK e BMAL 1 e de genes controlados por eles como o *Per 1*, *Per 2*, *Cry 1* e vasopressina no NSQ, e do *Per 1* e *dpb* no fígado, sugerindo uma correlação negativa entre a via JAK-STAT e a expressão de genes do relógio tanto periférico quanto central *in vivo* (KOYANAGI; OHDO, 2002). Assim, um aumento na sinalização por leptina no núcleo arqueado poderia diminuir a imunorreatividade da PER 1 nesse núcleo, como observado no presente estudo.

Em contrapartida, o aumento da sinalização por leptina no núcleo arqueado não levaria à diminuição da ingestão alimentar devido a alterações das projeções do arqueado para o núcleo paraventricular (DELAHAYE et al., 2008). Durante o desenvolvimento cerebral de roedores há um aumento dos níveis de leptina por volta do 5º dia pós-natal atingindo um pico entre os dias 9 e 10. Nesse período, o hormônio não parece estar relacionado à modulação do comportamento alimentar e do gasto energético, como ocorre no animal adulto. Durante os períodos críticos a leptina parece agir mais como um fator trófico para o desenvolvimento hipotalâmico, incluindo o aumento de densidade e tamanho dos axônios do núcleo arqueado (GRANADO et al., 2012). A redução em 50% da dieta materna a partir do 14º dia gestacional e durante toda a lactação diminuiu os níveis de POMC, mas não de NPY, no núcleo arqueado. Além disso, também diminuiu as projeções de neurônios que contêm POMC, mas não dos que contêm NPY, para o núcleo paraventricular indicando que a desnutrição materna perinatal parece afetar preferencialmente vias anorexigênicas em ratos (DELAHAYE et al., 2008). Isso explicaria a manutenção de hiperfagia aos 35 dias encontrados neste estudo.

Um ponto a ser discutido inclui a presença de marcadores de resistência à leptina observada em animais que foram desnutridos no início da vida, como o aumento da leptina circulante e diminuição dos receptores para o hormônio (BRETON; LUKASZEWSKI, 2009; LADYMAN, 2008). Uma possibilidade é que na idade avaliada neste estudo (38 dias), os animais ainda não tenham desenvolvido a resistência à leptina. Ratos transgênicos que expressavam níveis elevados de leptina foram avaliados em dois momentos distintos, entre 6 e 9 semanas e entre 33 e 36 semanas. Apesar dos níveis elevados de leptina desde uma idade bem jovem o início da resistência começou a se evidenciar por volta de 20 semanas de idade. Os animais passaram de um estado de quase depleção dos estoques de gordura na idade

jovem, indicando que a leptina estava agindo nessa fase, para um estado de acúmulo normal de gordura nas idades mais avançadas (QIU et al., 2001). Isso indica que a resistência se desenvolve gradualmente mediante exposição contínua ao hormônio e assim, a leptina poderia estar agindo na diminuição dos níveis da PER 1 no arqueado.

Há muito tempo se sabe que o NSQ expressa receptores para a leptina (GUAN et al., 1997). No entanto, uma hipersinalização por leptina no núcleo poderia não ter os mesmos efeitos que a sinalização normal teria num animal normonutrido. Isso tornaria o oscilador central muito vulnerável a estímulos capazes de alterar seu funcionamento. Osciladores periféricos respondem prontamente a estímulos, como a sinalização por glicocorticoides, a qualquer momento do dia, alterando suas expressões gênicas. Isso é esperado para um oscilador submisso ao marcapasso central. Ao contrário, o NSQ possui um período refratário a estímulos capazes de alterar sua expressão gênica (BALSALOBRE, 2000). A desnutrição parece diminuir a capacidade do NSQ de responder a estímulos. A avaliação da atividade locomotora é uma maneira de acessar o funcionamento do relógio central. Alterações da atividade locomotora em resposta a dois pulsos de luz a cada 12 horas, sugerem que os animais que sofreram desnutrição proteica são hiporresponsivos à luz (AGUILAR-ROBLERO et al., 1997). Assim, embora a manutenção da PER 1 pudesse representar uma tentativa de manter a capacidade adaptativa do animal, a soma de outras alterações diminuiria essa capacidade. Tais alterações incluem, por exemplo, a diminuição do número de neurônios imunorreativos para a arginina-vasopressina (AVP) e para o polipeptídeo vasoativo intestinal (VIP) no NSQ de ratos Wistar desnutridos. Tanto o AVP quanto o VIP são necessários à atividade sincronizada do NSQ (MAYWOOD ES, CHESHAM JE, O'BRIEN JA, 2011; ROJAS-CASTAÑEDA et al., 2008). No entanto, modificações na atividade locomotora também podem representar uma dificuldade na transmissão da informação temporal do NSQ para os efetores (AGUILAR-ROBLERO et al., 1997). Assim, mais estudos são necessários para esclarecer as alterações moleculares e celulares da desnutrição sobre os osciladores circadianos.

A diminuição do AVP e VIP em animais desnutridos sugere que a desnutrição pode perturbar a atividade sincronizada do núcleo supraquiasmático (ROJAS-CASTAÑEDA et al., 2008). Achados com inibição da sinalização por VIP e AVP sugerem que ambos contribuem para a comunicação entre os hemisférios direito e esquerdo do NSQ (MICHEL et al., 2013). Distúrbios na comunicação inter-hemisférica têm sido relacionados à “divisão” (*splitting*) de padrões comportamentais de 24 horas em dois componentes de 12 horas (BUTLER et al., 2012; MICHEL et al., 2013). Esse padrão ultradiano (inferior a 24 horas) é observado após

manutenção de roedores noturnos sob luz constante (BOULOS; TERMAN, 1979; BUTLER et al., 2012). Nesses animais, não apenas o padrão comportamental é alterado, mas também a expressão gênica do *Per 1* e *Per 2* (DE LA IGLESIA et al., 2000). A divisão dos ritmos de atividade em hamsters mantidos sob luz constante entre 6 e 8 semanas foi acompanhada de expressão assimétrica dos genes *Per 1* e *Per 2* entre os NSQ localizados no hemisfério direito e esquerdo (DE LA IGLESIA et al., 2000). Semelhantemente, no presente estudo foi observada uma assimetria na imunorreatividade da PER 1, com maior expressão no núcleo localizado no hemisfério esquerdo. Embora esses animais não tenham sido submetidos a ciclos constantes de luminosidade, a desnutrição, por si, nos períodos críticos do desenvolvimento é sugerida como capaz de causar uma divisão (*splitting*) dos ritmos de atividade locomotora em animais na vida adulta (AGUILAR-ROBLERO et al., 1997). Isso tem sido atribuído ao desacoplamento entre dois osciladores localizados em cada um dos núcleos nos diferentes hemisférios (AGUILAR-ROBLERO et al., 1997). Assim, é possível que a desnutrição proteica perinatal promova um desacoplamento entre os osciladores do hemisfério esquerdo e direito evidenciado pela assimetria na imunorreatividade da PER 1.

Os achados deste trabalho demonstram que a desnutrição proteica perinatal está associada ao aumento da ingestão alimentar em animais com 35 dias de vida. Não houve alteração da imunorreatividade da PERIOD 1 no núcleo supraquiasmático como ocorre no núcleo arqueado hipotalâmico, no qual a imunorreatividade diminui. Porém, a desnutrição promoveu uma expressão dessincronizada da proteína, com maior expressão no NSQ localizado no hemisfério cerebral esquerdo, sugerindo a ocorrência de alterações na comunicação interhemisférica.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este estudo ressalta a influência do ambiente nutricional pré-natal e pós-natal precoce sobre o desenvolvimento, a qual tem sido demonstrada por estudos experimentais que servem de base para pesquisas epidemiológicas e clínicas. É evidente que a desnutrição proteica perinatal tem consequências permanentes sobre a estrutura e função do sistema nervoso, uma vez que se incide sobre períodos críticos do seu desenvolvimento. As modificações que ocorrem nos osciladores circadianos centrais e periféricos têm sido implicadas na gênese de distúrbios metabólicos. Apesar disso, ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar os efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre o relógio central localizado no núcleo supraquiasmático (NSQ) hipotalâmico. Este trabalho demonstrou que um dos componentes moleculares do relógio central permanece inalterado após a desnutrição proteica perinatal, sugerindo que a manutenção da oscilação circadiana é um processo altamente estável. No entanto, o estudo não descarta a possibilidade de que outras alterações no núcleo aconteçam e comprometam a função circadiana. Alterações circadianas comportamentais observadas após modelos de desnutrição no início da vida reforçam essa ideia. Além disso, modificações estruturais observadas no NSQ após a desnutrição podem comprometer sua função na vida adulta. Assim, mais investigações no sentido de identificar essas alterações e associá-las aos distúrbios comportamentais e metabólicos são necessárias. Também é preciso comparar os efeitos sobre o NSQ de manipulações na vida adulta em relação àquelas que ocorrem nos períodos precoces da vida.

Muitos estudos descrevem aumento do consumo alimentar em animais desnutridos durante períodos críticos do desenvolvimento. No entanto, não estão na mesma proporção os trabalhos que têm associado tais consequências a mudanças permanentes do relógio circadiano. Os achados deste estudo indicam que alterações duradouras da maquinaria circadiana após a desnutrição em períodos críticos, como a diminuição da PER 1 no arqueado, constituem as bases moleculares dos distúrbios comportamentais observados nesses animais. Outras proteínas relógio precisam ser investigadas. A mutação do Clock está associada à hiperfagia. Assim, torna-se necessário avaliar as modificações permanentes na expressão do Clock após a desnutrição proteica perinatal. Além disso, a possível ação da leptina sobre a expressão da PER 1 pode representar uma das maneiras de comunicação do estado energético corporal ao sistema responsável pela organização temporal interna e, conseqüentemente, precisa ser avaliada. O NSQ controla os ritmos de atividade e, assim, outras análises comportamentais, como a da atividade locomotora, podem ser acrescentadas para uma melhor

caracterização dos efeitos da desnutrição sobre o relógio central e os ritmos por ele controlados.

REFERÊNCIAS

- ABE, M. et al. Circadian rhythms in isolated brain regions. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 350–6, jan. 2002.
- AGUILAR-ROBLERO, R. et al. Organization of circadian rhythmicity and suprachiasmatic nuclei in malnourished rats. **The American journal of physiology**, v. 273, n. 4 Pt 2, p. R1321–31, out. 1997.
- AKASHI, M; TAKUMI, T. The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 5, p. 441–448, 2005.
- ALAMY, M.; BENGELLOUN, W. A. Malnutrition and brain development: an analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 36, n. 6, p. 1463–80, jul. 2012.
- BAE, K. et al. Differential Functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN Circadian Clock. **Neuron**, v. 30, n. 2, p. 525–536, 2001.
- BALMFORTH, A. J. et al. Inter-subject differences in constitutive expression levels of the clock gene in man. **Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease**, v. 4, n. 1, p. 39–43, mar. 2007.
- BALSALOBRE, A. Resetting of Circadian Time in Peripheral Tissues by Glucocorticoid Signaling. **Science**, v. 289, n. 5488, p. 2344–2347, 29 set. 2000.
- BASKIN, D.; SCHWARTZ, M.; SEELEY, R. Leptin receptor long-form splice-variant protein expression in neuron cell bodies of the brain and co-localization with neuropeptide Y mRNA in the arcuate nucleus. **The journal of Histochemistry & citochemistry**, v. 47, n. 3, p. 353–362, 1999.
- BLACK, R. E. et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **Lancet**, v. 382, n. 9890, p. 427–51, ago. 2013.
- BLUM, I. D.; LAMONT, E. W.; ABIZAID, A. Competing clocks: metabolic status moderates signals from the master circadian pacemaker. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 36, n. 1, p. 254–70, jan. 2012.
- BOULOS, Z.; TERMAN, M. Splitting of circadian rhythms in the rat. **Journal of comparative physiology**, v. 83, p. 75–83, 1979.
- BRETON, C.; LUKASZEWSKI, M. Maternal prenatal undernutrition alters the response of POMC neurons to energy status variation in adult male rat offspring. **American Journal of physiology**, v. 296, n. 3, p. 462–472, 2009.
- BUHR, E. D.; YOO, S.-H.; TAKAHASHI, J. S. Temperature as a universal resetting cue for mammalian circadian oscillators. **Science (New York, N.Y.)**, v. 330, n. 6002, p. 379–85, 15 out. 2010.

BUTLER, M. P. et al. Twelve-hour days in the brain and behavior of split hamsters. **The European journal of neuroscience**, v. 36, n. 4, p. 2556–66, ago. 2012.

CHABOT, C. C.; CONNOLLY, D. M.; WARING, B. B. The effects of lighting conditions and food restriction paradigms on locomotor activity of common spiny mice, *Acomys cahirinus*. **Journal of circadian rhythms**, v. 10, n. 1, p. 6, jan. 2012.

CHAUDHARY, R. et al. Physiological slowing and upregulation of inhibition in cortex are correlated with behavioral deficits in protein malnourished rats. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e76556, jan. 2013.

CHEN, C. P. et al. Chronic ethanol consumption impairs the circadian rhythm of pro-opiomelanocortin and period genes mRNA expression in the hypothalamus of the male rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 88, n. 6, p. 1547–1554, fev. 2004.

CHEON, S. et al. Glucocorticoid-mediated Period2 induction delays the phase of circadian rhythm. **Nucleic acids research**, v. 41, n. 12, p. 6161–74, jul. 2013.

CIARLEGLIO, C. M. et al. Perinatal photoperiod imprints the circadian clock. **Nature neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 25–7, jan. 2011.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. Adaptive Functions of Circadian Rhythms. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 25, p. 345–355, jan. 1960.

COOMANS, C. P. et al. The suprachiasmatic nucleus controls circadian energy metabolism and hepatic insulin sensitivity. **Diabetes**, v. 62, n. 4, p. 1102–8, abr. 2013.

DAMIOLA, F. Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. **Genes & Development**, v. 14, n. 23, p. 2950–2961, 1 dez. 2000.

DAVIS, F. C.; GORSKI, R. A. Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. **Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology**, v. 162, n. 5, p. 601–10, abr. 1988.

DE LA IGLESIA, H. O. et al. Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5492, p. 799–801, out. 2000.

DEBASSIO, W. A. Prenatal Malnutrition Effect on Pyramidal and Granule Cell Generation in the Hippocampal Formation. **Brain research bulletin**, v. 35, n. 1, p. 57–61, 1994.

DECOURSEY, P. J.; WALKER, J. K.; SMITH, S. A. A circadian pacemaker in free-living chipmunks: essential for survival? **Journal of comparative physiology. A, Sensory, neural, and behavioral physiology**, v. 186, n. 2, p. 169–80, fev. 2000.

DELAHAYE, F. et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 470–5, fev. 2008.

DÍAZ-MUÑOZ, M. et al. Daytime food restriction alters liver glycogen, triacylglycerols, and cell size. A histochemical, morphometric, and ultrastructural study. **Comparative hepatology**, v. 9, n. 1, p. 5, jan. 2010.

DIBNER, C.; SCHIBLER, U.; ALBRECHT, U. **The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks**. [s.l: s.n.]. v. 72p. 517–49

DUEZ, H.; STAELS, B. The nuclear receptors Rev-erbs and RORs integrate circadian rhythms and metabolism. **Diabetes & vascular disease research : official journal of the International Society of Diabetes and Vascular Disease**, v. 5, n. 2, p. 82–8, jun. 2008.

DURÁN, P. et al. Prenatal protein malnutrition induces a phase shift advance of the spontaneous locomotor rhythm and alters the rest/activity ratio in adult rats. **Nutritional neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 167–72, jun. 2005.

DURÁN, P. et al. Prenatal malnutrition and sleep states in adult rats: effects of restraint stress. **Physiology & behavior**, v. 89, n. 2, p. 156–63, 30 set. 2006.

FAO. **FAO Statistical Yearbook**. [2013]. p. 67–80

FEILLET, C. A et al. Lack of food anticipation in Per2 mutant mice. **Current biology : CB**, v. 16, n. 20, p. 2016–22, 24 out. 2006.

FONKEN, L. K. et al. Dim light at night disrupts molecular circadian rhythms and increases body weight. **Journal of biological rhythms**, v. 28, n. 4, p. 262–71, ago. 2013.

FRÜHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. **The Biochemical journal**, v. 393, n. Pt 1, p. 7–20, jan. 2006.

FULLER, P. M.; LU, J.; SAPER, C. B. Differential rescue of light- and food-entrainable circadian rhythms. **Science**, v. 320, n. 5879, p. 1074–1077, 2012.

GARDNER, G. F.; FELDMANZ, J. F. THE frq LOCUS IN NEUROSPORA CRASSA: A KEY ELEMENT IN CIRCADIAN CLOCK ORGANIZATION. **Genetics**, p. 877–886, 1980.

GRANADO, M. et al. Leptin in early life: a key factor for the development of the adult metabolic profile. **Obesity facts**, v. 5, n. 1, p. 138–50, jan. 2012.

GUAN, X. M. et al. Differential expression of mRNA for leptin receptor isoforms in the rat brain. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 133, n. 1, p. 1–7, 30 set. 1997.

GUILLAUMOND, F. et al. Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. **Journal of biological rhythms**, v. 20, n. 5, p. 391–403, out. 2005.

HAO, H. et al. A circadian enhancer mediates PER-dependent mRNA cycling in Drosophila melanogaster. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 7, p. 3687–93, 1997.

HASTINGS, M. H.; REDDY, A. B.; MAYWOOD, E. S. A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 8, p. 649–61, ago. 2003.

HILLEBRAND, J. J. G.; DE WIED, D.; ADAN, R. A H. Neuropeptides, food intake and body weight regulation: a hypothalamic focus. **Peptides**, v. 23, n. 12, p. 2283–306, dez. 2002.

HIRSCHEY, M. D. et al. SIRT3 regulates mitochondrial protein acetylation and intermediary metabolism. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 76, p. 267–77, jan. 2011.

IJIMA, M. et al. Altered food-anticipatory activity rhythm in Cryptochrome-deficient mice. **Neuroscience research**, v. 52, n. 2, p. 166–73, jun. 2005.

JAIN, V.; SINGHAL, A. Catch up growth in low birth weight infants: striking a healthy balance. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 13, n. 2, p. 141–7, jun. 2012.

KALRA, S. P. et al. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. **Endocrine reviews**, v. 20, n. 1, p. 68–100, fev. 1999.

KARLSSON, B.; KNUTSSON, A; LINDAHL, B. Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population based study of 27,485 people. **Occupational and environmental medicine**, v. 58, n. 11, p. 747–52, nov. 2001.

KENNAWAY, D. J. et al. Global loss of *bmal1* expression alters adipose tissue hormones, gene expression and glucose metabolism. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e65255, jan. 2013.

KOJIMA, S.; SHINGLE, D. L.; GREEN, C. B. Post-transcriptional control of circadian rhythms. **Journal of cell science**, v. 124, n. Pt 3, p. 311–20, 1 fev. 2011.

KONOPKA, R. J.; BENZER, S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 9, p. 2112–6, set. 1971.

KOYANAGI, S.; OHDO, S. Alteration of intrinsic biological rhythms during interferon treatment and its possible mechanism. **Molecular pharmacology**, v. 62, n. 6, p. 1393–9, dez. 2002.

LADYMAN, S. Leptin resistance during pregnancy in the rat. **Journal of neuroendocrinology**, v. 20, n. 2, p. 269–277, jan. 2008.

LAVOIE, J.; HÉBERT, M.; BEAULIEU, J.-M. Glycogen synthase kinase-3 β haploinsufficiency lengthens the circadian locomotor activity period in mice. **Behavioural brain research**, v. 253, p. 262–5, 15 set. 2013.

LEHMAN. Circadian Rhythmicity Restored by Neural Transplant. Immunocytochemical Characterization of the Graft and Its Integration with the Host Brain. **The journal of neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 1626–1638, 1987.

LI, A.-J. et al. Leptin-sensitive neurons in the arcuate nuclei contribute to endogenous feeding rhythms. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 302, n. 11, p. R1313–26, jun. 2012.

LISBOA, P. C. ET AL. Postnatal low protein diet programs leptin signaling in the hypothalamic- pituitary-thyroid axis and pituitary TSH response to leptin in adult male PubMed Commons. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 2, p. 114–22, 2012.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **The European journal of neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1400–8, mar. 2008.

LU, X.-Y. Diurnal Rhythm of Agouti-Related Protein and Its Relation to Corticosterone and Food Intake. **Endocrinology**, v. 143, n. 10, p. 3905–3915, 1 out. 2002.

MASUBUCHI, S. et al. Mouse Period1 (mPER1) acts as a circadian adaptor to entrain the oscillator to environmental light/dark cycles by regulating mPER2 protein. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, n. 19, p. 4719–24, maio 2005.

MATEJU, K. et al. Development of the light sensitivity of the clock genes Period1 and Period2, and immediate-early gene c-fos within the rat suprachiasmatic nucleus. **The European journal of neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 490–501, fev. 2009.

MAYWOOD ES, CHESHAM JE, O'BRIEN JA, H. M. A diversity of paracrine signals sustains molecular circadian cycling in suprachiasmatic nucleus circuits. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 34, p. 14306–11, 2011.

MENDEZ, N. et al. Timed maternal melatonin treatment reverses circadian disruption of the fetal adrenal clock imposed by exposure to constant light. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42713, jan. 2012.

MENDOZA, J. et al. The cerebellum harbors a circadian oscillator involved in food anticipation. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 30, n. 5, p. 1894–904, fev. 2010.

METCOFF, J.; COLE, T. J.; LUFF, R. Fetal growth retardation induced by dietary imbalance of threonine and dispensable amino acids, with adequate energy and protein-equivalent intakes, in pregnant rats. **The Journal of nutrition**, v. 111, n. 8, p. 1411–24, ago. 1981.

MICHEL, S. et al. Mechanism of bilateral communication in the suprachiasmatic nucleus. **The European journal of neuroscience**, v. 37, n. 6, p. 964–71, mar. 2013.

MISTLBERGER, R. E.; LUKMAN, H.; NADEAU, B. G. Circadian rhythms in the Zucker obese rat: assessment and intervention. **Appetite**, v. 30, n. 3, p. 255–67, jun. 1998.

MOKLER, D. J. et al. Stress-induced changes in extracellular dopamine and serotonin in the medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus of prenatally malnourished rats. **Brain research**, v. 1148, p. 226–33, 7 maio 2007.

MOORE, R. Y.; EICHLER, V. B. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. **Brain research**, v. 42, n. 1, p. 201–6, 13 jul. 1972.

MOORE, R. Y.; LENN, N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 146, n. 1, p. 1–14, set. 1972.

MOORE, Y. J.; BERNSTEIN, E. Synaptogenesis in the Rat Suprachiasmatic Nucleus Demonstrated by Microscopy and Synapsin I Immunoreactivity. **The journal of neuroscience**, v. 9, n. 6, p. 2151–2162, 1989.

MORGANE, P. J.; MOKLER, D. J.; GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 26, n. 4, p. 471–83, jun. 2002.

NAGAI, K. et al. Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. **Brain research**, v. 142, n. 2, p. 384–9, 24 fev. 1978.

NAKAHATA, Y. et al. The NAD⁺-dependent deacetylase SIRT1 modulates CLOCK-mediated chromatin remodeling and circadian control. **Cell**, v. 134, n. 2, p. 329–40, 25 jul. 2008.

NASCIMENTO, E. et al. Long-lasting effect of perinatal exposure to L-tryptophan on circadian clock of primary cell lines established from male offspring born from mothers fed on dietary protein restriction. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56231, jan. 2013.

OHTA, H. et al. Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 12, p. 1953–1960, jun. 2002.

OHTA, H. et al. Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. **European Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1628–1634, abr. 2003.

OHTA, H. et al. Maternal feeding controls fetal biological clock. **PloS one**, v. 3, n. 7, p. e2601, jan. 2008.

OROZCO-SÓLIS. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. **International journal of obesity**, v. 35, n. 7, p. 990–1000, jul. 2011.

OSTER, H. et al. The circadian rhythm of glucocorticoids is regulated by a gating mechanism residing in the adrenal cortical clock. **Cell metabolism**, v. 4, n. 2, p. 163–73, ago. 2006.

OUYANG, Y. et al. Resonating circadian clocks enhance fitness in cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8660–4, 21 jul. 1998.

PASLEY JN, BARNES CL, R. P. Circadian rhythms of serum gastrin and plasma cholecystokinin in rodents. **Prog Clin Biol Res**, v. 227, p. 371–8, 1987.

- PAULA-BARBOSA, M. M. et al. Cell loss in the cerebellum and hippocampal formation of adult rats after long-term low-protein diet. **Experimental neurology**, v. 103, n. 2, p. 186–93, fev. 1989.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.: s.n.].
- PEEK, C. B. Circadian Clock NAD⁺ Cycle Drives Mitochondrial Oxidative Metabolism in Mice. **Science**, v. 342, 2013.
- PEEK, C. B. et al. Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 342, n. 6158, p. 1243417, 1 nov. 2013.
- PEIXOTO-SILVA, N. et al. Maternal protein restriction in mice causes adverse metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations. **The British journal of nutrition**, v. 106, n. 9, p. 1364–73, nov. 2011.
- PENDERGAST, J. S. et al. Robust food anticipatory activity in BMAL1-deficient mice. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. 4860, jan. 2009.
- PENEDO, L. A. et al. Nutritional tryptophan restriction impairs plasticity of retinotectal axons during the critical period. **Experimental neurology**, v. 217, n. 1, p. 108–15, maio 2009.
- PEZUK, P. et al. Circadian organization is governed by extra-SCN pacemakers. **Journal of biological rhythms**, v. 25, n. 6, p. 432–41, dez. 2010.
- PITTS, S.; PERONE, E.; SILVER, R. Food-entrained circadian rhythms are sustained in arrhythmic *Clk/Clk* mutant mice. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 285, n. 1, p. 57–67, jul. 2003.
- QASEM, R. J. et al. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. **Physiology & behavior**, v. 105, n. 5, p. 1182–93, 20 mar. 2012.
- QIU, J. et al. Transgenic mice overexpressing leptin accumulate adipose mass at an older, but not younger, age. **Endocrinology**, v. 142, n. 1, p. 348–358, 2001.
- RAMSEY, K. M. et al. Circadian clock feedback cycle through NAMPT-mediated NAD⁺ biosynthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 324, n. 5927, p. 651–4, 1 maio 2009.
- REPPERT, M. Effects of damage to the suprachiasmatic area of the anterior hypothalamus on the daily melatonin and cortisol rhythms in the rhesus monkey. **The journal of neuroscience**, v. 1, n. 12, p. 1414–1425, 1981.
- RIEDIGER, T. The receptive function of hypothalamic and brainstem centres to hormonal and nutrient signals affecting energy balance. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, n. 4, p. 463–77, nov. 2012.
- RIPPERGER, J. A; ALBRECHT, U. The circadian clock component PERIOD2: From molecular to cerebral functions. **Progress in brain research**, v. 199, p. 233–45, jan. 2012.

ROJAS-CASTAÑEDA, J. et al. Immunoreactive vasoactive intestinal polypeptide and vasopressin cells after a protein malnutrition diet in the suprachiasmatic nucleus of the rat. **Laboratory animals**, v. 42, n. 3, p. 360–8, jul. 2008.

SACK RL, BRANDES RW, K. A. Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 15, p. 1070–1077, 2000.

SALGADO-DELGADO, R. C. et al. Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e60052, jan. 2013.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661–671, 2000.

SHEWARD, W. J. et al. Entrainment to feeding but not to light: circadian phenotype of VPAC2 receptor-null mice. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 16, p. 4351–8, 18 abr. 2007.

SHIMBA, S. et al. Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e25231, jan. 2011.

STORCH, K.-F.; WEITZ, C. J. Daily rhythms of food-anticipatory behavioral activity do not require the known circadian clock. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6808–13, 21 abr. 2009.

SUTTON, G. M.; CENTANNI, A. V; BUTLER, A. A. Protein malnutrition during pregnancy in C57BL/6J mice results in offspring with altered circadian physiology before obesity. **Endocrinology**, v. 151, n. 4, p. 1570–80, abr. 2010.

SZENTIRMAI, E. et al. Restricted feeding-induced sleep, activity, and body temperature changes in normal and preproghrelin-deficient mice. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, n. 2, p. R467–77, fev. 2010.

TAKAHASHI, J. S. et al. The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. **Nature reviews. Genetics**, v. 9, n. 10, p. 764–75, out. 2008.

TAKATA, M. et al. Daily expression of mRNAs for the mammalian Clock genes Per2 and clock in mouse suprachiasmatic nuclei and liver and human peripheral blood mononuclear cells. **Japanese journal of pharmacology**, v. 90, n. 3, p. 263–9, nov. 2002.

TUREK, F. W. et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 308, n. 5724, p. 1043–5, 13 maio 2005.

VAN CAUTER, E.; KNUTSON, K. L. Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. **European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies**, v. 159 Suppl , p. S59–66, dez. 2008.

VERHAGEN, L. A. W. et al. Anticipation of meals during restricted feeding increases activity in the hypothalamus in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 9, p. 1485–1491, nov. 2011.

VICENTIC, A. et al. CART peptide diurnal rhythm in brain and effect of fasting. **Brain research**, v. 1032, n. 1-2, p. 111–5, 25 jan. 2005.

VILELA, M. C. R. et al. Differential vulnerability of the rat retina, suprachiasmatic nucleus and intergeniculate leaflet to malnutrition induced during brain development. **Brain research bulletin**, v. 64, n. 5, p. 395–408, jan. 2005.

VISWANATHAN. Presence-absence cycles of the mother and not light-darkness are the zeitgeber for the circadian rhythm of newborn mice. **Experientia**, v. 45, p. 383–385, 1989.

VITATERNA, M. H. et al. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. **Science (New York, N.Y.)**, v. 264, n. 5159, p. 719–25, abr. 1994.

VUJOVIC. Sympathetic input modulates , but does not determine , phase of peripheral circadian oscillators. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 4328, p. 355–360, 2008.

WHITMORE, D.; FOULKES, N. S.; SASSONE-CORSI, P. Light acts directly on organs and cells in culture to set the vertebrate circadian clock. **Nature**, v. 404, n. 6773, p. 87–91, 2 mar. 2000.

YAMASHITA, T. et al. Leptin Receptor of Zucker Fatty Rat Performs Reduced Signal Transduction. **Diabetes**, v. 46, n. 6, p. 1077–1080, 1997.

YAMAZAKI, S. Resetting Central and Peripheral Circadian Oscillators in Transgenic Rats. **Science**, v. 288, n. 5466, p. 682–685, 28 abr. 2000.

YAMAZAKI, S. et al. Ontogeny of circadian organization in the rat. **Journal of biological rhythms**, v. 24, n. 1, p. 55–63, fev. 2009.

YANG, S. et al. The role of mPer2 clock gene in glucocorticoid and feeding rhythms. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2153–60, maio 2009.

YOO, S.-H. et al. PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 15, p. 5339–46, 13 abr. 2004.

ZHANG, Y.; WEI, J.; YANG, Z. Perinatal undernutrition attenuates field excitatory postsynaptic potentials and influences dendritic spine density and morphology in hippocampus of male rat offspring. **Neuroscience**, v. 244, p. 31–41, 6 ago. 2013.


ZHENG, B. et al. Nonredundant roles of the mPer1 and mPer2 genes in the mammalian circadian clock. **Cell**, v. 105, n. 5, p. 683–94, jun. 2001.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

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



Recife, 16 de setembro de 2011.

Ofício nº 393/11

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profa. Sandra Lopes de Souza**
Departamento de Anatomia
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.024858/2011-42

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Efeitos da desnutrição perinatal sobre o perfil circadiano da expressão de genes relógios envolvidos no controle do comportamento alimentar"**.

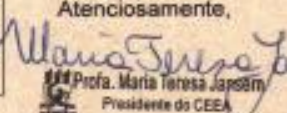
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals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

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

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

Origem dos animais: Biotério de criação da colônia do Departamento de Nutrição; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: Machos; Idade: 35 dias; Peso: 60-90g; Número de animais previsto no protocolo: 96 ratos.

Atenciosamente,



Profa. Maria Tereza Janssen
Presidente do CEEA

