



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA

DEBORA SANTOS ALVES

AValiação da Neurotransmissão Glutamatérgica no Núcleo do
Trato Solitário de Ratos submetidos à Desnutrição Proteica
Perinatal

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO,
ATIVIDADE FÍSICA E PLASTICIDADE FENOTÍPICA

DEBORA SANTOS ALVES

AVALIAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO NÚCLEO DO
TRATO SOLITÁRIO DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA
PERINATAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.

Orientador: Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2017

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

- A474a Alves, Debora Santos.
Avaliação da neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário de ratos submetidos à desnutrição proteica perinatal / Debora Santos Alves. Vitória de Santo Antão, 2017.
73 folhas: il.
- Orientador: João Henrique da Costa Silva
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, 2017.
Inclui referências e anexo.
1. Desnutrição Proteica - ratas. 2. Hipertensão – ratos. I. Silva, João Henrique da Costa (Orientador). II. Título.

571.946 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-089/2017

DEBORA SANTOS ALVES

**AVALIAÇÃO DA NEUROTRANSMISSÃO GLUTAMATÉRGICA NO NÚCLEO DO
TRATO SOLITÁRIO DE RATOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA
PERINATAL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.

Aprovado em: 23/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Alice Valença Araújo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Josiane de Campos Cruz (Examinador Externo)
Universidade Federal de João Pessoa

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal de João Pessoa

Aos meus avós Boaventura (*in memoriam*) e Maria.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais, José e Luiza, pelo amor incondicional, pela boa educação que me permitiram ter e por sempre acreditarem no meu potencial.

Aos meus irmãos Vanessa, Thiago e Jonathan pelo amor e companheirismo. Mesmo distantes vocês sempre se fazem presentes na minha vida.

Ao meu noivo, Félix, por ser o meu melhor amigo, pelo apoio constante e por fazer os meus dias mais leves e felizes.

Ao meu orientador, prof. João Henrique, pelas oportunidades concedidas, pela paciência, pelos ensinamentos e, acima de tudo, pela confiança.

A todos os membros do grupo de pesquisa Controle Cardiorrespiratório e Plasticidade Fenotípica e demais colegas do Laboratório de Educação Física do CAV por todo apoio, amizade, incentivo e aprendizado que cada um me proporcionou.

Aos colegas de mestrado, que compartilharam comigo tantas experiências de aprendizado e crescimento, sobretudo pelo convívio alegre e acolhedor.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica e todo o seu corpo docente e técnico, por todo o aprendizado, assistência e presteza.

A todos vocês, muito obrigada!

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less.”

Marie Curie

RESUMO

A restrição proteica materna durante gestação e lactação constitui importante fator de risco que predispõe a hiperativação simpática e, conseqüentemente, a instalação de hipertensão arterial na prole adulta. Porém os mecanismos centrais envolvidos na etiologia da hipertensão ainda são mal compreendidos. Dessa forma, a desregulação da neurotransmissão glutamatérgica emerge como um suposto gatilho de indução de hipertensão neural. Neste estudo testamos a hipótese de que a disfunção da neurotransmissão glutamatérgica em regiões-chave do controle cardiorrespiratório, como o núcleo do trato solitário (NTS), leva à hipertensão arterial nesta condição experimental. Ratos *Wistar* foram alimentados com uma dieta controle (normoproteica, NP, 17% de proteína) ou hipoproteica (HP, 8% de proteína) durante a gestação e lactação, e as proles de machos foi avaliada entre 70-90 dias de vida. Medidas diretas da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) foram registradas em ratos anestesiados e não-anestesiados. Os efeitos da neurotransmissão glutamatérgica no NTS comissural (coordenadas estereotáticas: AP-14 mm, LL: $\pm$ 0,5 mm, DV: -9 mm em relação ao bregma) sobre o sistema cardiovascular foram avaliados através de microinjeção unilateral de glutamato (L-glu 0.5 nmol/50 nL) e bilateral de ácido quinurênico (Kyn 2.5 nmol/50 nL). Além disso, foi realizado RT-PCR quantitativo para avaliar a expressão de RNAm de receptores glutamatérgicos (Grin1, Gria1 e Grm1) e proteína associada ao receptor GABA (A) 1 (Gabarapl1) no tronco cerebral. Os ratos dos grupos NP e HP foram comparados utilizando o teste *t* de *Student* não pareado, sendo o valor de $p < 0,05$ significativo. Animais HP apresentaram menor peso entre 1-60 dias e maior PAM entre 70-90 dias de vida. Aos 22 dias, o grupo HP apresentou menores níveis plasmáticos de proteínas totais, albumina, triglicérides, colesterol e maior glicemia de jejum. Aos 30 dias, os ratos HP ainda apresentavam níveis plasmáticos mais baixos de proteínas totais e albumina, mas triglicérides mais elevados. O grupo HP anestesiado apresentou maior resposta em relação ao Δ FC, e ambos animais anestesiados e não-anestesiados HP apresentaram maior resposta e sensibilidade à microinjeção de L-glu no NTS sobre Δ MAP quando comparado ao grupo controle. Além disso, os níveis de expressão de RNAm de Gabarapl1 estavam reduzidos no tronco cerebral do grupo HP ($p < 0,05$, teste *t*). Nossos dados sugerem que a dieta materna hipoproteica durante gestação e lactação pode alterar a neurotransmissão glutamatérgica no NTS, tornando-se um fator de risco para o aumento de pressão arterial na idade adulta.

Palavras-chave: Desnutrição proteica materna. Hipertensão. NTS. Sistema glutamatérgico.

ABSTRACT

Maternal protein restriction during gestation and lactation is an important risk factor that predisposes to sympathetic hyperactivation and, consequently, an installation of arterial hypertension in adult offspring. However, the central mechanisms involved in the etiology of hypertension are still malicious. Thus, a deregulation of glutamatergic neurotransmission emerges as a putative inducer of neural hypertension. This study tested the hypothesis that the dysfunction of glutamatergic neurotransmission in key regions of cardiorespiratory control, such as the nucleus of the solitary tract (NTS), leads to arterial hypertension in this experimental condition. Wistar rat dams were fed with a control (normal-protein, NP; 17% protein) or low-protein (LP; 8% protein) diet during pregnancy and lactation, and male offspring was studied at 70-90d of age. Direct measurements of baseline arterial blood pressure (ABP), heart rate (HR) and respiratory frequency (RF) were recorded in anesthetized and conscious offspring. The effects of glutamatergic neurotransmission in the commissural NTS (stereotaxic coordinates: AP -14 mm, LL: $\pm$ 0.5 mm, DV: -9 mm relative to bregma) on the cardiovascular system were assessed by unilateral glutamate microinjection (L-glu 0.5 nmol/100 nL). In addition, quantitative RT-PCR was used to assess the mRNA expression of glutamatergic receptors (Grin1, Gria1 and Grm1) and GABA(A)-receptor-associated protein like 1 (Gabarapl1). The rats of the NP and LP groups were compared using the unpaired Student's t-test, with the value of $p < 0.05$ being significant. LP rats exhibited lower weight and higher ABP. At 22-d-old, the LP group showed lower plasmatic levels of total proteins, albumine, triglycerides, cholesterol, and higher fasting glucose. At 30-d-old, the LP rats still showed lower plasmatic levels of total proteins and albumine, but higher triglycerides. Anesthetized LP presented higher response over Δ HR, and both anesthetized and conscious LP animals presented higher response and sensitivity to L-glu microinjection into the NTS over Δ MAP when compared to control group. Moreover, the mRNA expression levels of Gabarapl1 were downregulated in medullary tissue of LP rats ($p < 0.05$, t-test). Thus, our data suggest that perinatal low-protein diet alters glutamatergic neurotransmission into the NTS, which may be predisposing factors to increase arterial blood pressure at adulthood.

Keywords: Maternal protein malnutrition. Hypertension. NTS. Glutamatergic system.

LISTA DE ABREVIACÕES

Δ	Delta
ABP	Arterial blood pressure
AIN	American Institute of Nutrition
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propiônico (receptor glutamatérgico)
AP	Ântero-posterior
CNS	Central Nervous System
CO ₂	Gás carbônico
CS	<i>calamus scriptorius</i>
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar (DNA complementar)
DV	Dorso-ventral
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
Gabarapll	GABA(A)-receptor-associated protein like 1
Gria1	Glutamate receptor ionotropic AMPA
Grin1	Receptor ionotropic NMDA 1
Grm1	Glutamate receptor metabotropic 1
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HP	Hipoproteico
HR	Heart rate
i.m.	Intramuscular

i.p.	Intraperitoneal
KA	Cainato
Kyn	Ácido quinurênico
LF	Low frequency
L-glu	Glutamato
LL	Latero-lateral
MAP	Media arterial pressure
NMDA	N-metil-D-aspartato
NP	Normoproteico
NTS	Núcleo do Trato Solitário
O ₂	Oxigênio
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCRq	Reação em cadeia da polimerase quantitativo
RF	Respiratory frequency
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Ambiente perinatal, nutrição e plasticidade fenotípica.....	15
2.2 Desnutrição proteica, alterações simpatorrespiratórias e a gênese da hipertensão arterial.....	18
2.3 Mecanismos de regulação da pressão arterial.....	21
2.4 Controle neural da função cardiorrespiratória.....	22
2.5 Neurotransmissão glutamatérgica.....	23
3 OBJETIVOS.....	26
3.1 Objetivo geral.....	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 Animais e manipulação nutricional.....	27
4.2 Avaliação do peso da prole.....	28
4.3 Análise bioquímica.....	28
4.4 Protocolo experimental para ratos anestesiados.....	28
4.4.1 Procedimento cirúrgico para implante de cateter em artéria femoral.....	28
4.4.2 Procedimento cirúrgico de craniotomia parcial para alcance do NTS.....	29
4.4.3 Protocolo de microinjeção no NTS.....	29
4.5 Protocolo experimental para ratos não-anestesiados.....	29
4.5.1 Procedimento cirúrgico estereotáxico.....	29
4.5.2 Procedimento cirúrgico para implante de cateter em artéria femoral.....	30
4.5.3 Protocolo de microinjeção no NTS.....	30
4.6 Perfusão transcardíaca, crioproteção e histologia.....	31
4.7 Preparação do tronco cerebral.....	31

4.8 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR quantitativo (qPCR).....	32
4.9 Análise dos dados.....	32
5 ARTIGO.....	33
6 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO A.....	73

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, milhares de pessoas, em sua maioria crianças, morrem anualmente ou apresentam um retardo no desenvolvimento fisiológico devido a deficiências nutricionais e modificações no ambiente perinatal, que compreende gestação e lactação (WHO, 2013). Em muitos casos, estes problemas estão relacionados ao baixo peso ao nascer e à deficiência nutricional decorrentes da subnutrição materna, que repercutem sobre as crianças e que têm sido considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doenças na vida adulta, dentre elas a hipertensão arterial (BARKER; OSMOND, 1986; LAPILLONNE, 2011). Estudos com ratos têm demonstrado que a redução no conteúdo de proteínas da dieta (6-9 % g/g de dieta) materna durante a gestação, lactação ou após o desmame leva ao aumento nos níveis basais de pressão arterial na prole (COSTA-SILVA *et al.*, 2009; DE BRITO-ALVES *et al.*, 2014, 2015). Neste sentido, estudos recentes de nosso laboratório têm verificado que ratos, provenientes de mães que receberam dieta hipoproteica (8% de proteína) durante gestação e lactação, apresentam um aumento significativo nos níveis basais de pressão arterial a partir dos 90 dias de vida, o qual persiste na vida adulta do animal (DE BRITO-ALVES *et al.*, 2014, 2015, 2016). Porém, ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos periféricos e centrais que contribuem para o desenvolvimento do aumento nos níveis de pressão arterial nesta condição experimental. Por isso, o nosso laboratório tem se dedicado ao entendimento destes mecanismos, e tem sugerido que disfunções do sistema respiratório contribuem para a instalação da hipertensão arterial nos animais provenientes de mães que sofreram desnutrição proteica perinatal.

Estudos têm proposto que modificações na geração e modulação do ritmo respiratório basal (COSTA-SILVA *et al.*, 2010; MORAES *et al.*, 2014) e alterações na quimiossensibilidade periférica e central ao O₂ e CO₂ podem desencadear a hiperativação do sistema nervoso simpático e, conseqüentemente, hipertensão arterial (GREENBERG *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2006; ZOCCAL, 2011; MORAES *et al.*, 2014; COSTA-SILVA *et al.*, 2012, 2015, 2016), sugerindo que mecanismos respiratórios podem estar envolvidos no processo de instalação desta patologia. Diante do crescente número de evidências propondo que a geração e modulação da atividade respiratória podem interferir sobre a geração da atividade simpática e controle cardiovascular, o nosso laboratório tem investigado a hipótese de que animais de mães que sofreram desnutrição proteica perinatal podem apresentar deficiências no desenvolvimento e amadurecimento do sistema respiratório, especialmente no

sistema de controle reflexo da ventilação, que pode ser um fator de risco para a instalação da hipertensão arterial. Neste sentido, estudos do nosso grupo de pesquisa têm observado que animais desnutridos apresentam um aumento no ritmo respiratório basal e na quimiossensibilidade ao O₂ e CO₂ aos 30 dias de vida (NOGUEIRA *et al.*, 2012; DE BRITO-ALVES *et al.*, 2014). Alterações ventilatórias parecem estar relacionadas a uma maior sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos (DE BRITO-ALVES *et al.*, 2014), especialmente os localizados na bifurcação das artérias carótidas e que são sensíveis a quedas na pressão parcial de O₂ (pO₂) e no pH, bem como aumentos na pressão parcial de CO₂ (pCO₂). Além disso, tem sido sugerido que estas alterações são decorrentes da plasticidade fenotípica induzida pela dieta hipoproteica durante o período perinatal, que pode interferir no sistema de neurotransmissão de células nervosas em regiões-chave no controle cardiorrespiratório, como o núcleo do trato solitário (NTS). Assim, acredita-se que a plasticidade age promovendo as alterações ventilatórias e induzindo uma hiperatividade do sistema nervoso simpático, o que deve contribuir para o estabelecimento da hipertensão arterial neste modelo experimental (BARROS *et al.*, 2014, 2015).

Estudos anatômicos e funcionais indicam que é no NTS que ocorrem as primeiras sinapses das aferências provenientes da periferia relacionadas com o controle cardiorrespiratório (CIRIELLO *et al.*, 1994). Essas sinapses neuronais têm como principal neurotransmissor excitatório o L-glutamato, que desempenha um importante papel na modulação da atividade cardiovascular (via sistema nervoso simpático e parassimpático) e respiratória, inclusive em modelos experimentais de hipertensão arterial, atuando no processo de instalação desta patologia (ZHANG; MIFFLIN, 1993; MACHADO; BONAGAMBA, 2005; BRACCIALLI *et al.*, 2008; COSTA-SILVA *et al.*, 2010; COSTA-SILVA *et al.*, 2012). Assim, nossa hipótese de trabalho é de que a maior ativação de neurônios envolvidos na geração da atividade simpática, observada em nosso laboratório (BARROS *et al.*, 2014), esteja relacionada a uma modificação na neurotransmissão glutamatérgica no NTS destes animais provenientes de mães que sofreram desnutrição proteica durante a gestação e lactação.

Ademais, neste estudo testou-se também a hipótese de que animais provenientes de mães que sofreram desnutrição proteica durante gestação e lactação apresentam uma maior influência excitatória (neurotransmissão glutamatérgica) sobre os neurônios do NTS, que estão envolvidos na geração e modulação da atividade simpática e respiratória. Assim, sugere-

se que estas alterações funcionais podem estar envolvidas nas alterações cardiorrespiratórias e desenvolvimento da hipertensão arterial no modelo experimental de desnutrição proteica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ambiente perinatal, nutrição e plasticidade fenotípica

O conhecimento dos processos relacionados ao crescimento e ao desenvolvimento humano contribui para maior compreensão dos mecanismos associados à saúde e à doença ao longo da vida. Identificar quais são, quando e como atuam tais mecanismos pode ser a melhor alternativa para evitar que as doenças se instalem. Entretanto, apenas nas últimas décadas, estudos associaram o surgimento de distúrbios e doenças na vida adulta com eventos do período perinatal (SILVEIRA *et al.*, 2007).

A gestação, lactação e primeira infância são períodos em que ocorrem rápida proliferação e diferenciação celular, tal como a maturação de órgãos e sistemas e, devido a essas características, este momento pode ser denominado de ‘período crítico do desenvolvimento’ (DOBBING, 1968, 1981; SMART, 1991; MORGANE *et al.*, 1993). Estudos têm proposto que um insulto nutricional ao longo dessa fase é capaz de acarretar prejuízos ao processo de crescimento celular e desenvolvimento fetal, contribuindo para o surgimento de doenças na vida adulta, tais como hipertensão arterial, doenças coronarianas, diabetes *mellitus* e obesidade (LUCAS, 1991, 1994; BARKER *et al.*, 1993; CALKINS; DEVASKAR, 2011).

A relação entre ambiente perinatal e modificações celulares pode ser compreendida através dos mecanismos epigenéticos, onde o ambiente é peça-chave para a indução de modificações de DNA através de processos de metilação e acetilação, modificações da cromatina e modulação da expressão de genes durante a gestação (WADDINGTON, 1957; GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007). Estudos sugerem que o período fetal é o mais sensível à instalação das alterações epigenéticas, que são capazes de influenciar a expressão gênica celular e tecidual, o dimorfismo sexual e a predisposição de distúrbios e doenças ao longo da vida (WEST-EBERHARD, 1986, 2005; BOGDARINA *et al.*, 2007).

A hipótese de origem fetal da doença no adulto tem sido fundamentada no conceito de “thrifty phenotype” ou “fenótipo poupador”, no qual o feto é capaz de se adaptar e sobreviver a um ambiente de restrição nutricional, mesmo que para isso seja preciso diminuir o seu crescimento somático (HALES; BARKER, 1992; HALES, 2001). A flexibilidade de ajustar a trajetória de crescimento em resposta às diferentes condições ambientais é denominada ‘plasticidade fenotípica’, ou seja, a capacidade do organismo de, a partir de um único

genótipo, desenvolver fenótipos variados em resposta aos diferentes estímulos ambientais (WEST-EBERHARD, 1989; HANSON *et al.*, 2011).

A partir disso, Gluckman *et al.* (2005) enunciaram a hipótese de uma “resposta adaptativa preditiva” ao meio ambiente. A plasticidade do desenvolvimento seria evocada por alterações ambientais no início da vida e geraria resposta fenotípica adaptativa cujas vantagens se manifestariam principalmente ao curto prazo. Dessa maneira, a plasticidade fenotípica pode ter conferido vantagens à espécie humana para enfrentar ambientes com restrição nutricional, permitindo a sua sobrevivência. Todavia, quando submetidos a um ambiente diferente do programado, com maior enriquecimento nutricional, por exemplo, os indivíduos teriam resposta exacerbada e poderiam desenvolver doenças ao longo prazo. Portanto, a resposta adaptativa preditiva significa uma vantagem adaptativa quando a “previsão” sobre o ambiente está correta (*match*), porém pode determinar desvantagem quando está errada (*mismatch*), o que caracteriza a plasticidade fenotípica (GLUCKMAN *et al.*, 2005).

Ademais, os modelos teóricos de Jonathan Wells afirmam que o baixo peso ao nascer e a trajetória de crescimento constituem os principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas (WELLS, 2007). Um exemplo clássico seriam as crianças que nasceram com baixo peso e que, posteriormente, apresentaram uma rápida trajetória de crescimento (*catch up*), com um acelerado ganho de peso e de gordura. Tal “ajuste” resulta em uma alta carga metabólica às funções vitais do corpo e, conseqüentemente, predispõe o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta.

Wells (2011) também propôs um modelo conceitual de má nutrição materna *versus* risco de doenças nos filhos, baseado nas características fenotípicas. Para o autor, os fenótipos possuem tanto capacidade metabólica (diversidade de aspectos estruturais e funcionais de órgãos e sistemas adquiridos na vida fetal e infância), quanto carga metabólica (carga imposta ao organismo e sua condição fisiológica sobre a capacidade metabólica homeostática). Sendo assim, um insulto nutricional durante a gestação e/ou lactação é capaz de reduzir a capacidade metabólica da prole e, uma vez exposta a um ambiente de sobrecarga metabólica (ex.: consumo de dietas hipercalóricas e/ou exacerbada em macronutrientes, sedentarismo, stress, etc.), a razão capacidade metabólica e carga metabólica entra em desequilíbrio, predispondo o surgimento de doenças. Porém, é difícil precisar o momento em que tal instabilidade ocorre, tendo em vista que cada organismo possui sua particularidade fisiológica, podendo expressar as alterações fenotípicas ao curto ou ao longo prazo (WELLS, 2011).

O sistema cardiovascular é o primeiro sistema a funcionar no embrião de mamíferos, principalmente devido à necessidade de um método eficiente de captação de oxigênio e nutrientes. O desenvolvimento deste sistema se dá no início da gestação e leva semanas ou até meses após o nascimento para amadurecer (SEGAR, 1997). Sendo assim, os períodos de gestação e primeira infância possibilitam interações pré e pós-natais com o meio ambiente que podem incluir insultos, a exemplo da desnutrição, da hipóxia aguda ou crônica, da hiperóxia, e de exposições a drogas ou toxinas. A plasticidade ocorre quando tais experiências, durante períodos críticos do desenvolvimento, resultam em alterações ao longo prazo na estrutura ou função da rede neural do controle cardiorrespiratório (CARROLL, 2003).

Um período crítico pode ser entendido como uma janela de tempo durante o desenvolvimento dedicado à conformação estrutural e/ou funcional dos sistemas neurais do controle cardiorrespiratório. Experiências vivenciadas durante um período crítico podem interromper e alterar a trajetória de desenvolvimento, ao passo que a mesma experiência antes ou depois desse período tem pouco ou nenhum efeito (BERARDI *et al.*, 2000). Os efeitos da plasticidade sobre o controle cardiorrespiratório podem ocorrer em vários locais durante a formação das redes neurais do tronco cerebral e das vias quimioaférentes, em vários momentos durante o desenvolvimento, e por vários mecanismos (CARROLL, 2003). Conceitos anteriores que afirmavam que a maturação do sistema cardiorrespiratório estava tão rigidamente predeterminada por um mapa genético já cederam a uma visão atual diferente, em que as interações extremamente complexas entre genes, fatores de transcrição, fatores de crescimento e outras variáveis genéticas moldam o sistema de controle cardiorrespiratório, e as experiências sofridas nas ‘janelas do desenvolvimento’ desempenham um papel-chave para guiar o desenvolvimento normal ou não desse sistema. O insulto nutricional em períodos precoces da vida também pode levar a alterações no desenvolvimento e maturação do controle cardiorrespiratório (BOGDARINA *et al.*, 2007). Dessa forma, condições patológicas decorrentes de um desequilíbrio do controle cardiorrespiratório podem ter suas raízes, pelo menos em parte, na plasticidade fenotípica.

Um número considerável de estudos epidemiológicos e clínicos relaciona a desnutrição perinatal ao desenvolvimento de doenças crônicas no adulto (BARKER, 1995; LANGLEY-EVANS, 2015; MIRZAEI; SUAREZ; LONGO, 2014). Além disso, estudos experimentais com modelos animais têm sido amplamente utilizados na investigação dos efeitos da má nutrição materna sobre a saúde, crescimento e desenvolvimento da prole. A indução de uma desnutrição moderada em ratas durante gestação e lactação tem sido o

modelo mais utilizado, o qual consiste em fornecer a um grupo de mães uma dieta normoproteica (17% de proteína) e a ao outro grupo uma dieta hipoproteica (8% de proteína). A partir disso, é possível fazer comparações e investigar as repercussões da desnutrição sobre a prole (MARTIN-GRONERT; OZANNE, 2007; FALCAO-TEBAS *et al.*, 2012; DE MELO MONTENEGRO *et al.*, 2012; DE BRITO ALVES *et al.*, 2015).

Portanto, um aporte nutricional adequado e equilibrado, principalmente durante os períodos críticos do desenvolvimento, torna-se indispensável ao feto, tendo em vista que neste período há maior suscetibilidade a estímulos ambientais, com geração de respostas adaptativas morfológicas, fisiológicas e/ou comportamentais (BARKER, 2007; HANSON; GLUCKMAN, 2011). Assim sendo, modelos de desnutrição têm sido utilizados para estudar os principais mecanismos geradores de doenças na vida adulta, sobretudo a hipertensão arterial (LUZARDO *et al.*, 2011; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014, 2015, 2016; DE BARROS *et al.*, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015, 2016).

2.2 Desnutrição proteica, alterações simpatorrespiratórias e a gênese da hipertensão arterial

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) é uma doença crônica não-comunicável, que afeta quase 1 bilhão de pessoas e é reconhecida como uma das principais causas de morbimortalidade no mundo (WHO, 2013). Além disso, a HAS consiste num fator de risco altamente prevalente e significativo para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral e doença arterial periférica (LANDSBERG *et al.*, 2013; WILLIAMS, 2016). No entanto, a causa subjacente da hipertensão tem sido de difícil identificação devido à sua natureza multifatorial.

A hipertensão pode surgir a partir de uma combinação de fatores genéticos e comportamentais relacionados ao estilo de vida. Além do mais, parece haver uma forte relação entre as condições do ambiente fetal e pós-natal inicial com a predisposição ao desenvolvimento da HAS. Quando o ambiente fetal é pobre, do ponto de vista nutricional, o organismo do feto passa por um processo de programação no qual há uma proteção em relação ao desenvolvimento de alguns órgãos (ex.: cérebro, coração), mas em contrapartida ocorrem alterações metabólicas que podem repercutir em fases mais avançadas da vida. Estudos com humanos têm demonstrado que indivíduos que apresentaram baixo peso ao nascer manifestam uma forte tendência à HAS na vida adulta (BARKER *et al.*, 1989, 2007). De fato, isso pode ser justificado pelo considerável aumento das catecolaminas plasmáticas e

pela insuficiência uteroplacentária decorrentes da desnutrição perinatal, possíveis mecanismos subjacentes ao surgimento da hipertensão (FRANCO *et al.*, 2008; JONES *et al.*, 2012).

Bogdarina *et al.*, (2007) observaram uma redução de metilação na região promotora proximal do receptor de angiotensina e, em contrapartida, um aumento na expressão do receptor angiotensinérgico na glândula adrenal de ratos de mães que sofreram desnutrição proteica durante a gestação. Outro estudo também encontrou um aumento na expressão de RNAm do angiotensinogênio, assim como da enzima conversora de angiotensina, e uma diminuição na expressão de RNAm do receptor de angiotensina II na prole de ratos exposta a restrição proteica perinatal (GOYAL *et al.*, 2010). Tais alterações epigenéticas são importantes na compreensão dos mecanismos subjacentes ao surgimento da hipertensão em modelos experimentais de desnutrição proteica no contexto da plasticidade fenotípica (BARKER *et al.*, 2005; WEST-EBERHARD, 2005; LABAYEN *et al.*, 2006; ANDERSEN *et al.*, 2009; BIOSCA *et al.*, 2011; DE BRITO ALVES *et al.*, 2016).

O modelo de restrição proteica na dieta materna durante a gestação e/ou lactação é um dos modelos mais estudados em animais para a investigação dos efeitos da plasticidade fenotípica (OZANNE; HALES, 2004; COSTA-SILVA *et al.*, 2009; FALCÃO-TEBAS *et al.*, 2012; FIDALGO *et al.*, 2013; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014). Estudos mostram que o consumo de uma dieta hipoproteica (8% de proteína) durante gestação e lactação, seguido de um consumo de dieta equilibrada, pode levar à restrição do crescimento somático, redução do peso e da maturação de órgãos, aumento da pressão arterial sistólica, assim como das concentrações de insulina plasmática em jejum (OZANNE; HALES, 2004; FIDALGO *et al.*, 2013; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014).

Ainda, estudos com ratos têm evidenciado que a redução do conteúdo de proteínas da dieta (6-9% de proteína) durante a gestação (MESQUITA *et al.*, 2010), lactação (LUZARDO *et al.*, 2011) e/ou pós-desmame (COSTA-SILVA *et al.*, 2009) leva ao aumento dos níveis basais de pressão arterial na prole, devido à redução do número e na função de néfrons, redução da taxa de filtração glomerular, e da disfunção no sistema renina-angiotensina-aldosterona (PAIXÃO, 2001; NUYT; ALEXANDER, 2009; PAIXÃO; ALEXANDER, 2013; SIDDIQUE *et al.*, 2014). Todavia, a rede de controle da pressão arterial não se limita apenas ao sistema renal. A regulação da pressão arterial é uma das funções fisiológicas de maior complexidade, que depende de ações integradas dos sistemas cardiovascular, renal, neural e endócrino, que será melhor discutido no próximo tópico.

Para justificar o surgimento da HAS no modelo de desnutrição proteica, a hipótese da hiperativação simpática na instalação da hipertensão em organismos que sofreram insulto nutricional no início da vida leva destaque (GREENBERG *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2006; ZOCCAL, 2010; COSTA-SILVA *et al.*, 2012, MORAES *et al.*, 2014; DE BARROS *et al.*, 2015; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015). A hiperativação simpática é caracterizada por um aumento na intensidade e na frequência das despolarizações elétricas do nervo simpático e também por um aumento nos níveis plasmáticos de catecolaminas (MALPAS, 1998; ZOCCAL *et al.*, 2008), promovendo constrição dos vasos sanguíneos periféricos, aumento na resistência vascular periférica e, conseqüentemente, aumento nos níveis basais de pressão arterial. Recentemente, foi demonstrado que ratos adultos que foram submetidos à desnutrição proteica materna apresentam principalmente um desbalanço simpato-vagal para o coração e um aumento da variabilidade da pressão arterial, com aumento das bandas de baixa frequência (LF), sugerindo desequilíbrio autonômico e predominância simpática sobre o sistema cardiovascular desses animais (BARROS *et al.*, 2015).

Sabe-se que a ritmicidade do sistema nervoso simpático pode modular a pressão arterial e o ritmo cardíaco a frequências regulares (TSENG *et al.*, 2009). Estas flutuações rítmicas nas variáveis cardiovasculares sugerem uma medida de equilíbrio autonômico cardiovascular (JAPUNDZIC-ZIGON, 1998). Por conseguinte, as oscilações das bandas LF da pressão arterial sistólica estão normalmente aumentadas durante os estados de ativação simpática (JULIEN, 2006) e, ao que parece, estão aumentadas na prole de ratos submetida à restrição proteica durante o período perinatal, o que poderia contribuir sobremaneira para o desenvolvimento de hipertensão arterial (DE BRITO ALVES *et al.*, 2015).

Outros estudos também propuseram a contribuição das disfunções simpatorrespiratórias no desenvolvimento da hipertensão induzidas pela dieta materna (COSTA-SILVA; ZOCCAL; MACHADO, 2010; FORSTER; SMITH, 2010; MORAES *et al.*, 2014; BARROS, *et al.*, 2015; DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015). Além disso, sugere-se que as mudanças na geração ou modulação da função respiratória podem contribuir no estabelecimento da HAS (SIMMS *et al.*, 2009, 2010; COSTA-SILVA *et al.*, 2012; MORAES *et al.*, 2014). Ratos submetidos à restrição proteica na dieta durante gestação e lactação apresentaram disfunção respiratória, que foi associada à hiperatividade simpática e ao aumento da sensibilidade dos corpos carotídeos à hipóxia (DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; NANDURI; PRABHAKAR, 2015; PRABHAKAR *et al.*, 2015).

O mecanismo por trás dessas alterações pode estar relacionado aos altos níveis do fator indutor de hipóxia (HIF- 1α) nos quimiorreceptores periféricos de ratos desnutridos (ITO *et al.*, 2011, 2012; DE BRITO ALVES *et al.*, 2015).

Estudos do nosso laboratório têm verificado que animais jovens (30 dias de vida), provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica perinatal, apresentam modificações no padrão ventilatório basal e no seu controle reflexo, antes mesmo de desenvolverem hipertensão arterial (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014). Além disso, sugere-se que tais alterações ventilatórias nos animais levariam ao quadro de hiperatividade simpática aos 30 dias de vida, que persiste até a vida adulta da prole (DE BRITO ALVES, 2014; DE BRITO ALVES *et al.*, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2014). Assim, acredita-se que a plasticidade age promovendo as alterações ventilatórias e induzindo uma hiperatividade do sistema nervoso simpático, o que deve contribuir para o estabelecimento da hipertensão arterial neste modelo experimental (BARROS *et al.*, 2014, 2015).

A compreensão da participação do sistema nervoso central na geração e manutenção da hipertensão é de grande importância para o entendimento da fisiopatogenia da doença. Além disso, tem sido sugerido que as alterações decorrentes da plasticidade fenotípica induzida pela dieta hipoproteica durante o período perinatal pode interferir no sistema de neurotransmissão de células nervosas em regiões-chave do controle cardiorrespiratório (MORAES *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2014).

2.3 Mecanismos de regulação da pressão arterial

A regulação da pressão arterial é o resultado da atividade de sistemas de retroalimentação que operam ao curto e ao longo prazo (SHEPHERD; MANCIA, 1986, DAMPNEY, 1994). O principal mecanismo de controle ao curto prazo é realizado pelos reflexos cardiovasculares, que têm origem nos barorreceptores e quimiorreceptores arteriais, e também nos receptores de estiramento da região cardiopulmonar, que são capazes de responder em questão de segundos às variações da hemodinâmica circulatória. A este respeito, a informação periférica detectada é processada no sistema nervoso central (SNC) e regressa para a periferia através das eferências do sistema nervoso autônomo, ou seja, do sistema nervoso simpático e do sistema nervoso parassimpático, para manter a homeostase (MACHADO *et al.*, 1997). Já os mecanismos de regulação ao longo prazo, referem-se a sistemas humorais, tais como o sistema renina-angiotensina, cujo desequilíbrio contribui para o desenvolvimento e/ou manutenção da alta resistência periférica e hiperreatividade vascular,

observada na hipertensão (FERGUSON; BAINS, 1997; MENDOZA; LAZARTIGUES, 2015).

Ambos os sistemas de regulação de curto e longo prazo desempenham papéis importantes em condições fisiológicas e patológicas. A patogênese de doenças cardiovasculares, a exemplo da hipertensão, pode estar associada ao desequilíbrio da regulação autonômica cardíaca, principalmente através da hiperatividade do sistema nervoso simpático (SINSKI *et al.*, 2006). Embora seja especulado que a hiperatividade simpática pode ser a alteração-chave em indivíduos hipertensos que sofreram desnutrição, a sequência de eventos entre o prejuízo da atividade simpática e outras anormalidades ainda não foram determinadas (MANCIA; GRASSI, 2014).

2.4 Controle neural da função cardiorrespiratória

O núcleo do trato solitário (NTS) é a matriz inicial de processamento de toda informação que chega ao cérebro a respeito de pressão arterial, frequência e atividade cardíaca, enchimento venoso, composição química do sangue etc. Estudos prévios têm demonstrado que no NTS ocorrem as primeiras sinapses das aferências dos barorreceptores arteriais, bem como dos quimiorreceptores periféricos e dos receptores cardiopulmonares e, por isso, essa região possui um importante papel na modulação da atividade eferente simpática e parassimpática do sistema cardiovascular (PALKOVITZ; ZÁBORSZKY, 1977; ANDRESEN; KUNZE, 1994; SAPRU, 1996; JOHNSON; THUNHORST, 1997; GRILL HAYES, 2009; ZOCCAL *et al.*, 2014).

O NTS é constituído por diferentes populações de neurônios e está localizado na porção dorso-medial do bulbo, estendendo-se como colunas bilaterais de aproximadamente 2,5 mm de extensão no seu sentido rostro-caudal (CIRIELLO *et al.*, 1994; PAXINOS; WATSON, 1998). O NTS, no seu sentido rostro-caudal, pode ser dividido funcionalmente em três sub-regiões: NTS rostral, NTS intermediário e NTS caudal (LOEWY, 1990). O NTS rostral, com uma extensão ântero-posterior de aproximadamente 1 mm, está envolvido com a recepção de informações provenientes do sistema digestório. O NTS intermediário, com uma extensão ântero-posterior de aproximadamente 0,6 mm, está envolvido com a recepção de informações principalmente relacionadas ao barorreflexo e reflexos pulmonares, enquanto que o NTS caudal, estendendo-se por aproximadamente 0,9 mm, está relacionado principalmente

com o processamento das informações provenientes dos quimiorreceptores periféricos (LOEWY, 1990).

As vias do barorreflexo, do quimiorreflexo e do reflexo cardiopulmonar fazem parte dos principais sistemas aferentes cardiovasculares envolvidos na regulação autonômica da pressão arterial (DAMPNEY, 1994; MACHADO *et al.*, 1997). Assim sendo, as diferentes informações levadas à periferia são processadas no NTS para produzir resposta autonômica adequada, de acordo com os ajustes necessários para manter-se o equilíbrio da pressão arterial (MACHADO *et al.*, 1997). A partir do NTS, a informação processada e analisada irá circular pelo cérebro, em particular nas áreas ventrolaterais da medula oblonga e no hipotálamo.

Na ativação das aferências cardiovasculares ocorre liberação de aminoácidos excitatórios no NTS, o qual estimula diferentes neurônios pós-sinápticos que projetam a informação para diferentes áreas do SNC, envolvidas na gênese e no controle da atividade autonômica. O L-glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido nas vias eferentes cardiovasculares (TALMAN; PERRONE; REIS, 1980). Quando ativadas, as projeções do NTS para o Núcleo Ambíguo produzem a excitação de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos, promovendo um aumento do tônus vagal para o coração (MACHADO *et al.*, 1997). Já as vias simpato-inibitórias envolvem uma projeção excitatória do NTS para a região caudoventrolateral do bulbo (CVLM) e uma projeção inibitória do CVLM para o bulbo rostroventrolateral (RVLM), que é o sítio de geração do tônus simpático vasomotor (GUYENET; KOSHIYA, 1992).

As modificações no estado fisiológico de um indivíduo decorrentes da desnutrição proteica é capaz de levar a alterações nos sistemas cardiovascular e respiratório, com o propósito de manter a homeostase. Portanto, tais sistemas não são estáticos e facilmente se adaptam às diferentes circunstâncias. O mesmo pode se inferir sobre os circuitos do tronco cerebral, que controlam esses sistemas (KLINE, 2008).

2.5 Neurotransmissão glutamatérgica

O glutamato (L-Glu) é o principal e mais abundante neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos, exercendo um papel crucial em mecanismos subjacentes ao controle cardiovascular. O L-glu fica armazenado em vesículas sinápticas e, quando ocorre o impulso nervoso, é liberado no neurônio pré-sináptico para ligação aos seus receptores presentes na membrana pós-sináptica permitindo, assim, a transmissão do sinal (WATKINS; JANE, 2006; ZHOU; DANBOLT, 2014). Os receptores glutamatérgicos estão

divididos em duas classes: receptores ionotrópicos (acoplados a canais iônicos, de resposta rápida) e receptores metabotrópicos (acoplados a proteína G, de resposta lenta). Ainda, os receptores ionotrópicos estão subdivididos em: N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainato (KA). Os receptores KA e AMPA medeiam a despolarização rápida na maioria das sinapses no cérebro e na medula espinhal, geralmente associados a canais de influxo de íons sódio. Os receptores NMDA, por sua vez, estão relacionados à entrada de íons cálcio na célula, sendo controlados pelo glutamato e também por voltagem. Isto ocorre devido aos receptores (que se encontram bloqueados por magnésio nos potenciais de membrana em repouso) requererem, para a sua ativação, não apenas a ligação do glutamato, mas também a despolarização simultânea da membrana pós-sináptica conseguida pela ativação de receptores AMPA e KA em sinapses próximas de neurônios de entrada diferentes. Assim, percebe-se que os receptores NMDA são ativados, em geral, quando há descarga simultânea de dois ou mais neurônios distintos (BRUNTON; GOODMAN; GILMAN, 2012).

Os receptores metabotrópicos, por sua vez, estão subdivididos em três grupos: mGlu I, II e III. Tais receptores possuem atividade mais expressiva em termos pré-sinápticos, para regulação por *feedback* da liberação do neurotransmissor. Além disso, esses receptores podem estar presentes em células não-neuronais (BRUNTON; GOODMAN; GILMAN, 2012).

Estudos de Talman, Perrone e Reis (1980) mostraram que a microinjeção de L-glu no NTS de ratos anestesiados promove respostas semelhantes àsquelas provocadas pela ativação dos barorreceptores (hipotensão e bradicardia), sugerindo então que o L-glu seria o neurotransmissor liberado pelos aferentes barorreceptores no NTS. Entretanto outros estudos (MACHADO; BONAGAMBA, 1992; COLOMBARI *et al.*, 1994), mostraram que a microinjeção de L-glu no NTS de ratos não-anestesiados promove respostas semelhantes àsquelas provocadas pela ativação dos quimiorreceptores (hipertensão e bradicardia). Esses trabalhos sugerem que os anestésicos teriam uma importante influência nas vias neurais ativadas pelo L-glu no NTS.

Diversos estudos na literatura reportam que a desnutrição, independentemente do modelo utilizado, pode causar alterações na concentração de neurotransmissores no sistema nervoso central, na afinidade de neurotransmissores/receptores (GOTOH *et al.*, 1996; PLAGEMANN *et al.*, 2000, 2006; ZIPPEL *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2012) e na população neuronal e/ou morfologia do núcleo no SNC (PLAGEMANN *et al.*, 2000, 2006).

Gressens *et al.*, (1997) encontraram uma série de alterações no desenvolvimento cerebral de ratos submetidos à desnutrição proteica, dentre elas atraso na formação de astrócitos, diferenciação anormal de neurônios e alterações na sinaptogênese. Tais alterações no desenvolvimento cerebral podem ser responsáveis por déficits de memória e de aprendizagem (HALL *et al.*, 1983; GRAY, 1989; PLAGEMANN *et al.*, 2000, 2006), do comportamento afetivo (GALLO, 1981; HALL *et al.*, 1983), da atividade motora (GALLO, 1981; PLAGEMANN *et al.*, 2000, 2006), do sistema endócrino (BENABE; MARTINEZ-MALDONADO, 1993; SAWAYA *et al.*, 2003; PLAGEMANN; HARDER, 2009) e do sistema cardiovascular (LOSS *et al.*, 2007; PENITENTE *et al.*, 2007; TROPICIA *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2012; DE-BRITO-ALVES *et al.*, 2015; COSTA-SILVA *et al.*, 2015).

Portanto, as alterações na liberação de neurotransmissores e/ou sensibilidade aos seus receptores podem ser decorrentes do impacto da desnutrição sobre o sistema neural do controle cardiovascular. Aliado a isso, ratos submetidos à desnutrição proteica apresentam resposta pressórica aumentada à ativação do quimiorreflexo (PENITENTE *et al.*, 2007; DE-BRITO-ALVES *et al.*, 2015), outro reflexo cardiovascular importante. Loss *et al.*, (2007) mostraram que o início dos efeitos da excitação simpática e parassimpática está alterado em ratos desnutridos. Estas observações reforçam a hipótese de uma modulação autonômica alterada em animais submetidos à desnutrição, no entanto os mecanismos subjacentes a essa alteração não estão esclarecidos.

Considerando que o NTS desempenha um importante papel no controle cardiovascular por receber as primeiras sinapses das aferências cardiovasculares e que o L-glu é o principal neurotransmissor excitatório dessa área, decidimos, então, estudar os efeitos da microinjeção de L-glu no NTS, tendo como pressuposto que a neurotransmissão glutamatérgica está aumentada nessa região em ratos adultos que sofreram desnutrição proteica perinatal.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a participação da neurotransmissão glutamatérgica no núcleo do trato solitário (NTS) sobre o controle cardiorrespiratório de ratos provenientes de mães que sofreram desnutrição proteica durante gestação e lactação.

3.2 Objetivos específicos

Em ratos machos provenientes de mães submetidas à desnutrição proteica durante a gestação e lactação:

- Analisar os efeitos da desnutrição proteica materna sobre o peso corporal e os parâmetros bioquímicos da prole;
- Avaliar os efeitos da microinjeção de L-glutamato no NTS sobre os níveis de pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação;
- Investigar a participação da neurotransmissão glutamatérgica no NTS, através da microinjeção de um antagonista dos receptores glutamatérgicos, sobre o controle cardiorrespiratório.
- Analisar a expressão gênica de receptores glutamatérgicos do tronco cerebral.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais e manipulação nutricional

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

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

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

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

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

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

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

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

* A caseína utilizada continha 85% de pureza, analisada pelo método de Kjeldahl.

4.2 Avaliação do peso da prole

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

A partir do 70º até o 90º dia de vida, os animais foram pesados 3x/sem para início das avaliações funcionais (quando atingem o peso aproximado de 290g), mas sem fins de comparação.

4.3 Análise bioquímica

Aos 22 e 30 dias de idade, os animais de ambos os grupos passaram por jejum *overnight* e, em seguida, foram anestesiados com ketamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) i.p. para coleta de amostras de sangue através de perfuração do plexo retro-orbital, visando à comparação dos grupos e verificação da indução de desnutrição. As amostras de soro foram coletadas para quantificação de proteínas totais, albumina, glicose de jejum, triglicerídeos e colesterol total, utilizando-se, para isso, kits comerciais (Labtest Diagnóstica SA).

4.4 Protocolo experimental para ratos anestesiados:

4.4.1 Procedimento cirúrgico para implante de cateter em artéria femoral

Os animais de ambos os grupos NP e HP foram profundamente anestesiados com Uretana (1,2 mg/kg), e em seguida, foi realizada uma cirurgia para implante de cateter de polietileno em artéria femoral para registro da pressão arterial. A partir disso foi possível avaliar os registros de pressão arterial e frequência cardíaca por meio da conexão da cânula da artéria femoral com o transdutor mecanoelétrico de pressão, cujo sinal foi devidamente amplificado (ML866/P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia), digitalizado por meio de uma interface analógico/digital e amostrado a 2000 Hz em um microcomputador equipado com um *software* apropriado (LabChart™ Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália), para posterior análise. A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram derivadas da pressão arterial pulsátil (PAP) por meio deste sistema de aquisição.

4.4.2 Procedimento cirúrgico de craniotomia parcial para alcance do NTS

Ainda profundamente anestesiados, os animais foram posicionados em aparelho estereotáxico e, em seguida, foi realizada uma craniotomia parcial do osso occipital para alcance do NTS. Para tanto, foi adotado como ponto de referência o *calamus scriptorius*, onde foi considerado NTS as regiões que compreendiam as coordenadas latero-lateral 0.5 mm relativas a ele.

4.4.3 Protocolo de microinjeção no NTS

Os animais do grupo NP e HP anestesiados receberam microinjeções unilaterais de L-glutamato (0.5 nmol/50 nL; MORAES *et al.*, 2011) no NTS. As microinjeções foram feitas utilizando-se uma seringa de Hamilton de 1 µl conectada a uma cânula injetora (30 G curta, Unoject, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por meio de um tubo de polietileno PE-10. O volume injetado foi sempre de 50 nL. Os efeitos sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca foram continuamente registrados e analisados posteriormente. Após o término do procedimento experimental, foi microinjetado o corante azul de metileno para averiguação da região onde ocorreu a microinjeção.

4.5 Protocolo experimental para ratos não-anestesiados:

4.5.1 Procedimento cirúrgico estereotáxico

Cinco dias antes dos experimentos de microinjeção, os animais do grupo NP ou HP entre 70-90 dias de vida foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) i.p. e posicionados em aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, CA) e duas cânulas-guia

em aço inox (15 mm de extensão) foram implantadas em direção ao NTS (ântero-posterior: -14 mm; latero-lateral: ± 0.5 mm; e dorso-ventral: -9 mm em relação ao bregma) de acordo com as coordenadas descritas no atlas de Paxinos e Watson (1997). As cânulas-guia foram fixadas ao osso com resina acrílica odontológica e um fio de aço foi mantido dentro de cada cânula-guia para evitar a oclusão das mesmas. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais receberam injeção profilática subcutânea (1 ml/kg) de antibiótico (Pentabiotico veterinário - 2400 UI) e intramuscular de antiinflamatório (Cetoprofeno - 0,1ml) (MACHADO *et al.*, 2004).

4.5.2 Procedimento cirúrgico para implante de cateter em artéria femoral

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

4.5.3 Protocolo de microinjeção no NTS

Após repouso cirúrgico de 18-24h da canulação, foi iniciado o protocolo de microinjeção onde, inicialmente, os animais do grupo NP ou HP passaram por um período de 1 hora de adaptação nas câmaras de registro e, em seguida, receberam microinjeções unilaterais de L-glutamato (0.5 nmol/50 nL; MORAES *et al.*, 2011) no NTS, com um intervalo de 10 minutos entre elas. Em seguida, foi microinjetado bilateralmente ácido quinurênico (2.5 nmol/50 nL; COSTA-SILVA *et al.*, 2010), antagonista dos receptores ionotrópicos do glutamato. As microinjeções foram feitas utilizando-se uma seringa de Hamilton de 1 μ l conectada a uma cânula injetora (30 G curta, Unoject, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) por meio de um tubo de polietileno PE-10. A cânula injetora utilizada foi de 2,0 a 2,5mm mais longa que a cânula-guia, com o intuito de que as microinjeções fossem realizadas exatamente no sítio pretendido. Os efeitos sobre a pressão arterial, a frequência cardíaca e a

frequência respiratória foram continuamente registrados e analisados posteriormente. Após o término do procedimento experimental, foi microinjetado o corante azul de metileno para averiguação das regiões onde ocorreram as microinjeções. Os animais que apresentaram microinjeções negativas, ou seja, microinjeções fora do NTS foram descartados da amostra.

4.6 Perfusão transcardíaca, crioproteção e histologia

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

Suspensa o tecido da região ventral na linha mediana, um corte foi realizado a partir da região abdominal até a torácica. A partir do processo xifóide foi efetuado um corte em forma de “V” na musculatura e costelas, abrindo a cavidade torácica de maneira que expusesse o coração e permitindo o acesso ao ventrículo esquerdo, onde foi introduzida a cânula para a perfusão a qual estava presa à área por uma pinça de *keller*. Afastando-se os pulmões, a aorta descendente foi pinçada impedindo, assim, que toda a sua área de irrigação fosse perfundida. A bomba peristáltica, na qual a cânula estava acoplada, foi acionada mantendo-se a velocidade de infusão da solução compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Foram infundidos 100ml de solução salina (NaCl, 0,9%) inicialmente à temperatura ambiente para remoção do sangue no interior 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). A chegada do fixador na região dos membros anteriores foi constatada pela contração destes, então foi adicionado gelo sobre a cabeça do animal para minimizar a degradação proteica.

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

4.7 Preparação do tronco cerebral

A despeito dos experimentos de microinjeção, outros animais dos grupos NP e HP foram mortos por decapitação. Os troncos cerebrais foram rapidamente recolhidos, congelados em azoto líquido e armazenados a -80 ° C até a extração de RNA. Todos os ratos foram mortos entre 14h00-17h00 após um período de jejum de 4-5 horas. O CS foi utilizado como referência para a coleta do tronco cerebral. Para isso, adotamos as coordenadas de aproximadamente 2 mm rostral e 3 mm caudal do CS, conforme descrito no atlas estereotático. Para a análise da expressão gênica, utilizamos os troncos completos.

4.8 Extração de RNA, transcrição reversa e PCR quantitativo (qPCR)

Para a extração total de RNA do tronco cerebral foi utilizado o reagente Tripure (Roche, Meylan, França). A transcrição reversa foi realizada utilizando-se um kit de RT-TAKARA adotando 1 µg de RNA como padrão. Os níveis de expressão de mRNA dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA 1 (*Grin1*) e AMPA (*Gria1*), metabotrópicos do receptor de glutamato 1 (*Grm1*) e proteína associada ao receptor GABA (A) 1 (*Gabarapl1*) foram quantificados a partir de DNAc derivados do tronco. Todos os resultados foram representados como unidades arbitrárias (A.U.) derivadas de uma curva de calibração padrão derivada de uma amostra de referência. Realizou-se PCR para cada amostra em duplicata para todos os cDNAs e para a proteína ribossomal L19 (*RPL19*) como controle de carga. Para um controle adicional, os amplicões de qPCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (dados não ilustrados).

4.9 Análise dos dados

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

5 ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA REVISTA **BRAIN RESEARCH**.

Maternal protein restriction affects the pressor, but not respiratory response to L-glutamate microinjection into the NTS of conscious rats

Running title: protein-undernourished rats and glutamatergic neurotransmission

Source of financial support

This work was supported by Pernambuco Research Foundation (FACEPE; IBPG 1436-4.05/14), and National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPQ; MCTI/CNPq N° 459341/2014-6).

Conflict of interest statement

The authors declare no competing financial interests.

Abstract

Purpose: Maternal protein restriction during gestation and lactation is an important risk factor that predisposes to sympathetic hyperactivation and, consequently, an installation of arterial hypertension in adult offspring. However, the central mechanisms involved in the etiology of hypertension are still malicious. Thus, a deregulation of glutamatergic neurotransmission emerges as a putative inducer of neural hypertension. This study tested the hypothesis that the dysfunction of glutamatergic neurotransmission in key regions of cardiorespiratory control, such as the nucleus of the solitary tract (NTS), leads to arterial hypertension in this experimental condition. **Methods:** Wistar rat dams were fed with a control (normal-protein, NP; 17% protein) or low-protein (LP; 8% protein) diet during pregnancy and lactation, and male offspring was studied at 70-90d of age. Direct measurements of baseline arterial blood pressure (ABP), heart rate (HR) and respiratory frequency (RF) were recorded in anesthetized and conscious offspring. The effects of glutamatergic neurotransmission in the commissural NTS (stereotaxic coordinates: AP -14 mm, LL: $\pm$ 0.5 mm, DV: -9 mm relative to bregma) on the cardiovascular system were assessed by unilateral glutamate microinjection (L-glu 0.5 nmol/100 nL). In addition, quantitative RT-PCR was used to assess the mRNA expression of glutamatergic receptors (Grin1, Gria1 and Grm1) and GABA(A)-receptor-associated protein like 1 (Gabarapl1). The rats of the NP and LP groups were compared using the unpaired Student's t-test, with the value of $p < 0.05$ being significant. **Results:** LP rats exhibited lower weight and higher ABP. At 22-d-old, the LP group showed lower plasmatic levels of total proteins, albumine, triglycerides, cholesterol, and higher fasting glucose. At 30-d-old, the LP rats still showed lower plasmatic levels of total proteins and albumine, but higher triglycerides. Anesthetized LP presented higher response over Δ HR, and both anesthetized and conscious LP animals presented higher response and sensitivity to L-glu microinjection into the NTS over Δ MAP when compared to control group. Moreover, the mRNA expression levels of Gabarapl1 were down regulated in medullary tissue of LP rats ($p < 0.05$, t-test).

Conclusion: Thus, our data suggest that perinatal low-protein diet alters glutamatergic neurotransmission into the NTS, which may be predisposing factors to increase arterial blood pressure at adulthood.

Keywords: Maternal protein malnutrition, hypertension, nucleus of the solitary tract, glutamatergic system.

1 Introduction

Maternal malnutrition or protein restriction during perinatal life (gestation, lactation and first infancy) has been considered as risk factors for the development of metabolic diseases and hypertension in adult offspring [11, 16, 2, 19]. However, the mechanisms relating perinatal protein restriction and adult offspring hypertension are not fully understood.

Experimental models have supported the role of the sympathetic nervous system in the generation of hypertension [15, 29, 69]. It has been shown that the maternal protein restriction alters the central control of arterial blood pressure (ABP) by mechanisms that include respiratory dysfunction and enhanced sympathetic-respiratory coupling at early life, which may contribute to adult hypertension [15]. Recently, our laboratory reported that rats exposed to protein restriction during gestation and lactation exhibited an increase in ABP associated to sympathetic and respiratory overactivity [2, 15, 16]. However, the mechanisms that predispose to increase of sympathetic-respiratory activities and hypertension in maternal diet induced-hypertension model are yet poorly understood.

It is well recognize that modifications in the generation and modulation of basal respiratory rhythm [13, 47] and changes in the central and peripheral chemosensitivity to O_2 and CO_2 may trigger the overactivation of the sympathetic nervous system and, consequently, leads to hypertension [28, 3, 69, 47, 14, 10, 12], suggesting that respiratory mechanisms may be involved in the installation process of this disease. Studies from our laboratory have observed that perinatal protein restriction leads to an increase in the basal respiratory rate and chemosensitivity to O_2 and CO_2 at 30 days of life [16]. In addition, it has been suggested that these alterations are due to phenotypic plasticity induced by the low protein diet during the perinatal period, which may interfere in the neurotransmission system of cells in key regions of cardiorespiratory control, such as the nucleus tractus solitarii (NTS). Thus, it is believed that plasticity acts by promoting ventilatory changes and inducing overactivity of the sympathetic nervous system, which should contribute to the establishment of hypertension in this experimental model [2].

Despite these findings, the neural mechanism leading to hypertension in a condition of perinatal protein-restriction remains to be clarified. Therefore, the aim of present study was to assess the effects of maternal protein restriction on the glutamatergic neurotransmission into the NTS of adult rat offspring.

2 Materials and methods

The experimental protocol was approved by the Ethical Committee (protocol 23076.047690/2015-77) of the Federal University of Pernambuco, Brazil. The Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals were followed and all efforts were made to minimize animal discomfort and the number of animals used.

2.1 Animals and experimental groups

Virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were obtained from the biotery of the Academic Center of Vitória (CAV), Federal University of Pernambuco, Brazil. Animals were maintained at room temperature of $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with controlled light–dark cycle (dark 18:00–06:00 hours). Laboratory chow (52% carbohydrate, 21% protein, and 4% lipids –Nuvilab CR1-Nuvital, Brazil) and water were given *ad libitum* up to the 3-month, when rats were mated (2 females for 1 male). The day on which spermatozoa was identified in vaginal smear was considered as the conception day, and pregnant rats/dams were transferred to individual cages: dams were fed with either a 17% protein diet (normal protein group, NP, n=5) or 8% protein diet (low protein group, LP, n=5). Both diets were isoenergetic (Table 1) and were offered *ad libitum* throughout pregnancy and lactation. Diets were elaborated at the Laboratory of Experimental Nutrition-CAV, Federal University of Pernambuco, according to the American Institute of Nutrition – AIN-93 [57]. The low protein diet differed from the normal protein diet in the content of carbohydrate and protein. The casein used in diet preparations was previously analyzed and showed 85% of purity (85g of protein for each 100g of casein).

During the lactation period, offspring were maintained as litters of eight pups. At weaning, four male offspring of each litter were randomly housed in collective cages and received a laboratory chow and water *ad libitum*. The experimental groups were formed with one or two rats from each mother.

2.2 Evaluation of the weight of offspring

The body weight of pups was recorded at 1, 22, 30, and 60-d-old with an appropriate balance (model AS-1000; Marte), having an error range of 0.01 g. The body weight of pups was used to compare the groups and to verify the malnutrition induction.

2.3 Biochemical analysis

At 22 and 30 d of age, offspring from both groups were anaesthetised with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and blood samples (approximately 1 ml) were collected by plexus retro-orbital disruption. Serum samples were collected for the quantification of albumin, total protein, fasting glucose, triglycerides, and total cholesterol with commercial kits (Labtest Diagnostica SA). The animals were fasted overnight.

2.4 Experimental protocols for anesthetized rats

2.4.1 Femoral arterial catheterization surgery

The animals of both groups were deeply anesthetized with Urethane (1.2 g/kg), and then surgery was performed to implant a polyethylene catheter in the femoral artery to record blood pressure. From the catheter it was possible to evaluate the blood pressure and heart rate registers by connecting the femoral artery cannula to the pressure transducer, whose signal was properly amplified (ML866/P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia), digitized through an analogue/digital interface and sampled at 2000 Hz on a microcomputer equipped with appropriate software (LabChart™ Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Australia) for further analysis. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were derived from pulsatile arterial pressure (PAP) through this acquisition system.

2.4.2 Partial craniotomy surgery

Still deeply anesthetized, the animals were placed in a stereotaxic device and then a partial craniotomy of the occipital bone was performed to reach the NTS. For this purpose, the *calamus scriptorium* (CS) was adopted as reference. We used approximately 0.5 latero-lateral from CS to consider the NTS area, as described in the stereotaxic atlas.

2.4.3 Microinjections into the NTS

The anesthetized animals of NP and LP group received unilateral microinjection of L-glutamate (0.5 nmol/50 nL) [48] into the NTS. Microinjections were made by using a 1 µl Hamilton syringe connected to an injection cannula (30 G short, Unoject, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) by means of a PE-10 polyethylene tube. The effects of the microinjection over PAP, MAP, and HR were continuously recorded and analyzed later. After the end of the experimental procedure, the methylene blue dye was microinjected to investigate the region where the microinjection occurred.

2.5 Experimental protocol for conscious rats

2.5.1 Stereotaxic surgery

Seven days before the experiments, animals from the NP and LP group weighing 270-290 g and between 70-90 days of life were anesthetized with ketamine (80 mg / kg) and xylazine (10 mg / kg) i.p. and positioned in a stereotaxic apparatus (David Kopf, Tujunga, CA), and two stainless steel guide capsules (15 mm extension) were implanted towards the NTS AP: -14 mm, LL: +/- 0 , 5 mm and DV: -9 mm in relation to bregma) according to the coordinates described in the Paxinos and Watson atlas (1997). As guide cannulae were fixed to the bone with acrylic dental resin and a steel wire to be kept inside each guide cannula to prevent occlusion of the same. At the end of the surgical procedure, the animals received subcutaneous (1 ml/kg) antibiotic (Veterinary Pentabiotic - 2400 IU) and intramuscular anti-inflammatory (Ketoprofen - 0.1 ml) [43], and were allowed to recover for 5 days.

2.5.2 Femoral arterial catheterization surgery

One day before the experiments, the animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and the femoral artery was cannulated (PE-50 connected to PE-10; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA) as described previously [2, 16]. Briefly, the catheters were filled with heparinized saline solution (NaCl 0.9%, in heparin concentration - 0.5%), tunneled subcutaneously and exteriorized through the back of the neck. After surgery, the animals received intramuscular injection antiinflammatory (Ketoprofen - 0.1 ml) and were allowed to recover for 24 hours.

2.5.3 Cardiovascular and respiratory evaluations

The next day, rats were acclimatized during 1 hour and mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) baseline were recorded for 50 min in awake, freely-moving animals by connecting the arterial catheter to a pressure transducer. The signals were amplified (ML866/P, ADInstruments, Power Lab, Bella Vista, NSW, Australia). All data were analyzed off-line using appropriate software (LabChart 7 Pro, ADInstruments).

2.5.4 Experimental protocols and microinjections into the NTS

After acclimatization period the animals of the NP and LP group received unilateral microinjection of L-glutamate (0.5 nmol/50 nL) [48] into the NTS, with an interval of 10 minutes between them. After, it was then microinjected bilaterally kinurenic acid (2.5 nmol/50 nL) [13], an antagonist of ionotropic glutamate receptors. The microinjections were made in animals under conscious condition using a 1 µl Hamilton syringe connected to an injection cannula (30 G short, Unoject, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) through a PE-10 polyethylene tube. The injection cannula used was 2.0 to 2.5 mm longer than the guide cannula, in order that microinjections were performed exactly at the intended site. The effects on blood pressure, heart rate and pulmonary ventilation were continuously recorded and analyzed later.

2.5.5 Histological analysis

After the end of the experimental procedure, the methylene blue dye was microinjected to investigate the regions where the microinjections occurred. The animals were deeply anesthetized with ketamine (80mg / kg) and xilasin (10mg / kg) i.p. and were perfused with 4% formaldehyde. At the end of the infusion the fixed brainstems were removed from the skull and immersed in cryoprotectant solution (PBS sodium phosphate plus sucrose 30%) for 48 hours. The brainstems were cryosected in coronal sections of 40µm using a freezing cryostat (Leica) and the tissues were colored with toluidine blue. The animals which presented negative microinjections, that is, microinjections outside the NTS were discarded from the sample.

2.6 Medulla-tissue preparation

Despite the microinjections experiments, other animals from NP and LP were dead by decapitation. Medullas were quickly collected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at – 80°C until RNA extraction. All rats were dead between 2:00 and 5:00 pm after a 4-5 hours fasting period. Rat medulla-tissue was collected using the CS as reference. We used approximately 2 mm rostral and 3 mm caudal from CS, as described in the stereotaxic atlas. For the gene expression analysis, we used the full medullas.

2.7 RNA extraction, reverse transcription and quantitative PCR (qPCR)

Total RNA was extracted from medulla tissues with Tripure reagent (Roche, Meylan, France). Reverse transcription was performed using an RT-TAKARA kit using 1µg of RNA as template. mRNA expression levels of glutamate receptor ionotropic NMDA 1 (Grin1), glutamate receptor ionotropic AMPA (Gria1), glutamate receptor metabotropic 1 (Grm1) and GABA(A)-receptor-associated protein like 1 (Gabarapl1) were quantified from medulla-derived cDNAs. All results were represented as arbitrary units (A.U.) derived from a standard calibration curve derived from a reference sample. A PCR for each sample was carried out in duplicate for all cDNAs and for the ribosomal protein L19 (RPL19) as loading control. As a further control, qPCR amplicons were analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel (data not shown).

2.8 Statistical analysis

Results are expressed as means $\pm$ s.e.m. Comparisons were made between groups with repeated measures unpaired Student's test where appropriate. Limits of probability considered significant were 5 % or less. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6.0 software.

3 Results

Impact of maternal protein restriction on offspring's body weight

Fig 1 shows the evolution of weight gain at 1- 60-d-old from rats offspring submitted to NP or LP diet during gestation and lactation. The LP rats offspring showed lower weight at 1-d-old (NP: 7 ± 0.1 g, n=20 vs. LP: 5.7 ± 0.1 g, n=23; $p<0.001$), at 22-d-old (NP: 45.8 ± 1.5 g, n=21 vs. LP: 29.9 ± 0.4 g, n=23; $p<0.0001$), at 30-d-old (NP: 100.4 ± 2.2 g, n=17 vs. LP: 64.3 ± 1 g, n=23; $p<0.0001$), and 60-d-old (NP: 266 ± 6.1 g, n=20 vs. LP: 226.2 ± 3.9 g, n=23; $p<0.001$) when compared to the control group. In other words, the LP rats showed 18.6%, 34.8%, 36%, and 15% less body weight when compared to the control group at the ages of 1, 22, 30, and 60-d-old, respectively.

Effects of maternal protein restriction on offspring's biochemical parameters

After weaning, at 22-d-old, the LP rats showed alterations in all the biochemical parameters evaluated, with a decrease in total protein plasma levels (NP: 6.0 ± 0.1 g/dL, n=57 vs. LP: 5.2 ± 0.1 g/dL, n=59; $p=0.0001$), albumin (NP: 2.6 ± 0.1 g/dL, n=47 vs. LP: 2.1 ± 0.06 g/dL, n=60, $p<0.0001$), triglycerides (NP: 130.8 ± 8.5 mg/dL, n=44 vs. LP: 77.4 ± 6.1 mg/dL, n=30; $p<0.0001$), and total cholesterol (NP: 122.8 ± 11.8 mg/dL, n=38 vs. LP: 90.7 ± 6.7 mg/dL, n=49; $p=0.014$), as well as increased fasting glycemia (NP: 107.9 ± 3.7 mg/dL, n=56 vs. LP: 124 ± 5.3 mg/dL, n=60; $p=0.017$) when compared to the NP group (Table 3).

At 30-d-old, the LP group maintained reduced levels of total protein (NP: 6.3 ± 0.2 g/dL, n=31 vs. LP: 5.6 ± 0.1 g/dL, n=34; $p=0.009$) and albumin (NP: 3.1 ± 0.1 g/dL, n=30 vs. LP: 2.8 ± 0.1 g/dL, n=31; $p=0.03$). But at this age the LP rats showed an increase in plasma triglyceride levels (NP: 164.4 ± 14 mg/dL, n=27 vs. LP: 260.4 ± 20 mg/dL, n=16; $p=0.006$) when compared to control group. However, the levels of fasting glycemia (NP: 102.3 ± 5.2 mg/dL, n=24 vs. LP: 91.7 ± 2.5 mg/dL, n=29; $p=0.006$) and total cholesterol (NP: 88.4 ± 4.9 mg/dL, n=27 vs. LP: 79.3 ± 4.2 mg/dL, n=29; $p=0.161$) were normalized in LP group (Table 3).

Cardiovascular responses to L-glutamate microinjection into the NTS of anesthetized rats

Anesthetized rats from the LP group had no statistical difference in baseline MAP (NP: 79.7 ± 9.9 mmHg, n=3 vs. LP: 91.6 ± 9.6 mmHg, n=5; $p=0.451$) and neither HR (NP: 333 ± 20 bpm, n=3 vs. LP: 363 ± 19 bpm, n=5; $p=0.343$) when compared to the control group.

Fig 2a shows a representative tracing after L-glu microinjection into the NTS over PAP, MAP, and HR of 70-90 d-old NP and LP anesthetized rats. Fig 4a shows the microinjections sites into the NTS of anesthetized rats and Fig 4b shows a representative micrography. After L-glu microinjection, LP group presented an increased response over Δ MAP (NP: -6.1 ± 1.5 mmHg, n=3 vs. LP: -13.1 ± 1.3 mmHg, n=5; $p=0.018$ Fig 2b) and Δ HR (NP:

9.5±10 bpm, n=3 vs. HP: -67.5±22 bpm, n=5; $p=0.048$ Fig 2c) when compared to the control, suggesting a higher sensitivity to L-glu microinjection into the NTS in this experimental condition.

Impact of maternal protein restriction on arterial blood pressure of conscious rats

Fig 3a shows a representative PAP, MAP, RF, and HR baseline recordings from 70-90-d-old NP and LP conscious rats. Rats from dams exposed to protein restriction during pregnancy and lactation exhibited an increase in baseline systolic blood pressure (SBP) (NP: 128.6±4.7 mmHg, n=18 vs. LP: 142.9±4.9 mmHg, n=15; $p=0.04$) and MAP (NP: 104.3±3.7 mmHg, n=18 vs. LP: 115.7±3.2 mmHg; $p=0.03$ Fig 3b), without changes in baseline HR (NP: 363.6±6.7 bpm, n=18 vs. LP: 343.1±7.5 bpm; $p=0.05$, Fig 3c) and respiratory frequency (RF) (NP: 100.8±2.7 cpm, n=17 vs. LP: 100.7±5.7 cpm, n=13; $p=0.989$).

Cardiovascular and respiratory responses to L-glutamate microinjection into the NTS of conscious rats

Fig 4c shows the microinjections sites into the NTS of conscious rats and Fig 4d shows a representative micrography. The microinjection of vehicle (saline) generated negligible changes over the Δ MAP (NP: 10.8±1.8 mmHg, n=16 vs. LP: 6.5±1.8 mmHg, n=12; $p=0.114$), Δ HR (NP: -35.5±11.9 bpm, n=16 vs. LP: -23.1±13.7 bpm, n=13, $p=0.5$), and Δ RF (NP: 9.9±2.8 cpm, n=12 vs. LP: 13.7±3.3 cpm, n=10; $p=0.38$), without differences between the groups.

Fig 3d shows a representative tracing of PAP, MAP, HR, and RF after L-glu microinjection into the NTS from NP and LP animals. The LP group presented a higher response evoked by L-glu microinjection into the NTs over Δ MAP (NP: 29±2.5 mmHg, n=14 vs. LP: 40.6±5 mmHg, n=14; $p=0.04$ Fig 3e), suggesting once more that maternal protein restriction affect the pressor response to its neurotransmitter in the adult offspring, through an increased sensitivity of neuronal cells into the NTS after L-glu microinjection. However, similar responses were found over Δ HR (NP: -52.9±17.3 bpm, n=14 vs. LP: -49.77±13 bpm, n=14; $p=0.88$ Fig 3f), and Δ RF (NP: 23.4±2.7 cpm, n=11 vs. LP: 26.4±6.4 cpm, n=11; $p=0.502$ Fig 3g) between the groups.

The microinjection of glutamatergic ionotropic receptors antagonist, kynurenic acid (Kyn) evoked similar responses over Δ MAP (NP: 21.3±4.3 mmHg, n=12 vs. LP: 24.5±3.8 mmHg, n=13; $p=0.582$), Δ HR (NP: -7.6±7 bpm, n=12 vs. LP: -24.2±4.6 bpm, n=13; $p=0.058$), and Δ RF (NP: 23.6±3.2 cpm, n=11 vs. LP: 32.9±5.4 cpm, n=9; $p=0.141$) between the groups.

Gene expression of glutamatergic and gabaergic receptors in the medulla-tissue

At the transcriptional level, we found a similar mRNA expression of glutamate receptor ionotropic Grin1 and Gria 1 (Fig 5a and 5b, respectively), as well as a similar gene expression of glutamate receptor metabotropic Grm1 (Fig 5c) in the medullary tissue of NP and LP rats. However, we found a significant decrease in the mRNA expression of Gabarapl1 in the medulla-tissue of the LP group (NP: 0.86 ±0.05 vs. LP: 0.65±0.04, $p<0.01$, Fig 5d).

4 Discussion

Male rats exposed to protein restriction during pregnancy and lactation exhibited lower body weight than control group. Maternal low protein diet may induce a deficit in the transport of maternal-fetal amino acids through the placenta, leading to fetal growth restriction and, consequently, resulting in low birth weight [51, 46, 38, 20, 18]. Previous studies have already demonstrated that perinatal low protein diet exposure leads to lower weight in the offspring, suggesting that the equality in body weight between NP and LP animals may occur around 240-d-old [20, 38, 51].

We reported that low birth weight caused by prenatal protein restriction is associated to reduction in serum albumin and total serum proteins. After birth, maternal protein restriction during lactation affects the levels of proteins contained in breast milk [29], which can be considered as protein intake of the pups and lead to a reduction in plasma levels of total proteins and albumin, as observed at 22-d-old and 30-d-old.

In relation to the increase in fasting glycemia in malnourished animals at 22-d-old, Park *et al.* (2003) [52] observed that malnutrition, even for a short period of time, is capable of causing a non-liver mitochondrial effect and not muscle skeletal malnourished animals, which are the main organs affected by insulin, which could justify the increased fasting blood glucose levels found in the LP group. In rats, an activity and gene expression of insulin-sensitive liver enzymes is altered in situations of protein malnutrition, such as a reduction of glycokinase activity and increased activity of phosphoethanolpyruvate carboxinase. Moreover, metabolic alterations secondary to malnutrition occurring in the pancreas can impair the development of β -cells and, consequently, decrease insulin secretion in response to glucose [21, 52, 19].

On the other hand, Hales *et al.* (1996) [33] suggest that, over time, insulin target organs of LP animals undergoing nutritional rehabilitation increase their sensitivity to insulin action and, as a consequence, normalise the levels of fasting glucose in these animals, as observed in our experimental group at 30-d-old. Furthermore, our laboratory recently found in 30d-old LP rats an impairment of glucose utilization by the muscle, which LP rats showed that gene expression of important enzymes involved in glucose transport and glycolysis in EDL muscle it were downregulated: hexokinase (HK2) and phosphofructokinase (PFK). In contrast, it was observed that gene expression of beta hydroxyacyl-coenzyme a dehydrogenase (β HAD), an enzyme involved in lipolytic metabolism in soleus muscle, it was upregulated [17]. These data suggest the rate of glycolysis and use of glucose as fuel energy might be impaired in skeletal muscle of protein-restricted rats.

In relation to the reduction of plasma triglyceride levels at 22-d-old of LP group, similar data were obtained by Madani *et al.* (2000) [44] who observed that the consumption of diets with low casein concentration (10% protein) leads to evident decrease in concentrations of plasma triglycerides and VLDL. Nassir *et al.* (1997) [49] also found lower concentrations of triglycerides and VLDL in rats fed 8% protein, when compared to animals fed 16% and 32% protein. These findings are consistent with studies that indicate a relationship of lower protein intake and decreased hepatic synthesis of VLDL, which is an important endogenous carrier of triglycerides, besides the increased lipid oxidation for energy purposes in malnourished animals [24].

However, a nutritional rehabilitation of animals submitted to protein malnutrition to a long term increase in plasma triglyceride levels, which is associated with type 2 diabetes and cardiovascular diseases [31, 25]. The early increase of triglycerides found in 30-d-old LP rats only emphasizes the risk of the development of metabolic diseases due to perinatal malnutrition.

In relation to the total cholesterol concentration at the 22-d-old, the LP animals had lower levels when compared to the control. At the 30-d-old the levels were normalized. It appears that a deficiency in protein

synthesis caused by perinatal protein restriction does not interfere with the removal of the chylomicron cholesterol, nor does it contribute to the increase of the total cholesterol levels in the animals [16]. Therefore, there is no difference in the level of HDL, LDL and VLDL is not the result obtained without total cholesterol at 22-day-old of the animals from LP group.

As previously reported, rats exposed to protein restriction during pregnancy and lactation exhibited higher ABP at 70-90-d-old [2, 10, 16]. Our data corroborate with these studies, since conscious adult LP rats presented an increase in the baseline SBP and MAP but similar baseline HR and RF when compared to control group, suggesting that malnutrition induced by maternal low protein diet was able to increase the ABP in this experimental model, but the mechanisms involved in this condition needs to be elucidated. However, it is known that maternal diet induced-hypertension is associated with an increase in the cardiovascular sympathetic tone in adulthood [2, 37].

The sympathetic nervous system is regulated by different sites into the brainstem, mainly by the neurons located in the ventral medulla [6, 36], which determine the central sympathetic outflow and also by the neurons located in dorsal medulla, which receive inputs from peripheral baroreceptors and chemoreceptors, regulating the presympathetic neuron activity of the ventral medulla. It was reported that the neurons of the nucleus of the solitary tract (NTS), in the dorsal medulla, are essential for the processing and coordination of respiratory and sympathetic activities [68]. The NTS is the first synaptic station of the cardiorespiratory afferent inputs, including peripheral chemoreceptors, baroreceptors and pulmonary stretch receptors [68]. There is evidence indicating that the excitatory amino acid L-glutamate is the neurotransmitter released by the afferents of the different cardiovascular reflexes in the NTS [40, 62, 25, 42], and the different subtypes of ionotropic receptors (NMDA and non-NMDA) play an important role in this neurotransmission [40, 1, 9].

The combination of anatomical, neurochemical and electrophysiological features of the NTS neurons allow this nucleus to selectively integrate the sensory information and recruits specific neural pathways to generate appropriate cardiorespiratory responses. Given this importance, it is evident that changes in the normal function of the NTS neurons have great impact on the control of sympathetic and respiratory activities with pathological relevance, such as observed in animal models of hypertension [66, 68].

Previous studies suggest that changes in glutamate and GABA signaling in the CNS contribute to the elevated SNA and ABP in models of hypertension [4, 20]. In this regard, we investigated whether maternal protein restriction could alter the glutamatergic neurotransmission into the NTS of the offspring, leading to increase in the cardiovascular sympathetic tone and hypertension in adulthood, like previously reported [2, 15, 12].

With respect to L-glu microinjection into the NTS results, our data corroborate with Machado and Bonagamba (1992) [41], who found a response similar to baroreflex activation (hypotension and tachycardia) when bilaterally injecting L-glu into the NTS of anesthetized animals. But in conscious rats, there is a response to chemoreflex activation (hypertension and bradycardia) after L-glu microinjection into the NTS. Such findings indicate that anesthesia is capable of blocking the reflex pathways of the chemoreceptors and, consequently, alters the cardiovascular responses, which could be masking the hemodynamic values of the animals. This may justify why LP rats did not show a difference between MAP and HR baseline values when compared to the control group.

Nevertheless, the main observation of the present study is that the microinjection of L-glutamate into the NTS of malnourished rats provokes higher HR response in LP anesthetized animals and also higher pressor responses in both anesthetized and in awaked, freely moving condition, in comparison to the control group. These data suggest that maternal protein restriction affect the pressor response to its neurotransmitter in the adult offspring, through an increased sensitivity of neuronal cells into the NTS to L-glu microinjection. In agreement with this observation, several studies report that malnutrition, irrespective of the model used, can lead to changes in the neurotransmitter concentration in the CNS, in neurotransmitter/receptor affinity [26, 54, 55, 66, 58] and in the neuronal population and/or CNS nucleus morphology [54, 55]. These alterations may be responsible for deficits in memory and learning [27, 32, 54, 55], motor activity [22, 54, 55], affective behavior [22, 32], endocrine [56, 59] and cardiovascular systems [39, 53, 64] observed in malnourished animals. Therefore, these changes in neurotransmitter release and/or receptor sensibility may also be responsible for the impact of malnutrition on the cardiovascular system.

In the present study we did not find differences between the NP and LP groups in response to the microinjection of ionotropic glutamate receptor antagonist (kinurenic acid, Kyn) into the NTS, suggesting the higher sensitivity to L-glu of the LP group by NTS do not involve a greater participation of ionotropic receptors in this region.

Besides, a role for brain oxidative stress in sympathetic regulation of ABP has been suggested in several types of hypertensive animal models. Indeed, the reactive oxygen species (ROS) level is increased in brain stem sites that subserve the generation, maintenance, and regulation of sympathetic vasomotor tone, including the NTS, in spontaneously hypertensive rats (SHR) or stroke-prone SHRs [7, 34, 35, 50, 61]. It is commonly stipulated that oxidative stress in the NTS or in the ventrolateral medulla (RVLM) results in an augmentation of sympathetic vasomotor tone, depression of baroreflex, and hypertension [5].

It was reported that ROS in the RVLM enhances glutamatergic neurotransmission [15, 45, 65], and attenuates GABAergic inhibitory inputs [15, 60], leading to higher sympathoexcitatory inputs to RVLM neurons. In spite of these receptor-dependent responses, we did not observe changes the mRNA levels of the glutamatergic ionotropic receptor NMDA1 (Grin1), AMPA 1 (Gria1) and glutamate metabotropic receptor 1 (Grm1). However, we found that mRNA expression of GABA(A)-receptor-associated protein 1 (Gabarapl1) was downregulated in the medullary tissue of protein-restricted rats. These data suggest the maternal protein restriction leads to a decrease in inhibitory neurotransmission network and, consequently, an overlap of the excitatory neurotransmission network in the medulla. But future studies investigating glutamatergic or GABAergic neurotransmission into the NTS of protein-restricted rats will be needed to better clarify our findings. Allied to this, multiple methodological approaches are required to reveal how glutamatergic neurotransmission functionality into the NTS of LP offspring is, including investigating the distributions of genes and/or protein expression within the neural substrate, as well as understanding how single units respond under maternal protein restriction condition.

In conclusion, the present study suggests that maternal protein restriction may affects the central mechanisms involved in cardiovascular regulation, especially regarding the glutamatergic pathways of the NTS - the site in the brain stem in which the first synapses of the baro-, chemo-, and cardiopulmonary reflex afferents occur in the CNS. However, we did not found changes in the glutamatergic receptors expression in the tissue-medulla neither in response to microinjection of a glutamatergic receptors antagonist (Kyn) in this experimental

condition. Further studies are necessary to evaluate the network of excitatory and inhibitory neurotransmission, the cascades of intracellular signaling of neurons and the sensitivity of ion channels of glutamatergic receptors into the NTS. The complete understanding of the central mechanisms involved in the autonomic imbalance found in malnourished individuals could lead to the development of therapeutic strategies and governmental policies to improve public health.

References

1. Aylwin ML, Horowitz JM, Bonham AC (1997). NMDA receptors contribute to primary visceral afferent transmission in the nucleus of the solitary tract. *J. Neurophysiol.* 77: 2539–2548.
2. Barros MAV, De Brito Alves JL, Nogueira VO, Wanderley AG, Costa-Silva JH (2015). Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD* 25:123-130. doi 10.1016/j.numecd.2014.07.011.
3. Braga VA, Soriano RN, Machado BH (2006). Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol.* 2006 Nov;91(6):1025-31.
4. Brennan TJ, Haywood JR, Ticku MK (1983). GABA receptor binding and hemodynamic responses to ICV GABA in adult spontaneously hypertensive rats. *Life Sci* 33: 701-709.
5. Chan SHH, Chan JYH (2012). Brain stem oxidative stress and its associated signaling in the regulation of sympathetic vasomotor tone. *J Appl Physiol* 113: 1921–1928, doi:10.1152/japplphysiol.00610.2012.
6. Chan SHH, Chan JYH (2014). Brain stem NOS and ROS in neural mechanisms of hypertension. *Antioxidants & redox signaling* 20:146-163. doi 10.1089/ars.2013.5230.
7. Chan SHH, Tai MH, Li CY, Chan JYH (2006). Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic Biol Med* 40: 2028–2039.
8. Chan SHH, Wang LL, Tseng HL, Chan JYH (2007). Upregulation of AT1 receptor gene on activation of protein kinase Cbeta/nicotinamide adenine dinucleotide diphosphate oxidase/ERK1/2/c-fos signaling cascade mediates long-term pressor effect of angiotensin II in rostral ventrolateral medulla. *Journal of hypertension* 25:1845-1861. doi 10.1097/HJH.0b013e328217b286.
9. Colombari E, Bonagamba LGH, Machado BH (1997). NMDA receptor antagonist blocks the bradycardic but not the pressor response to L-glutamate microinjected into the NTS of anesthetized rats. *Brain Res.* 749: 209–213.
10. Costa-Silva JH, de Brito-Alves JL, Barros MA, Nogueira VO, Paulino-Silva KM, de Oliveira-Lira A, Nobre IG, Fragoso J, Leandro CG (2015). New Insights on the Maternal Diet Induced-Hypertension: Potential Role of the Phenotypic Plasticity and Sympathetic-Respiratory Overactivity. *Front Physiol* 6:345. doi 10.3389/fphys.2015.00345.
11. Costa-Silva JH, Silva PA, Pedi N, Luzardo R, Einicker-Lamas M, Lara LS, Bezerra AM, Castro-Chaves C, Vieyra A (2009). Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential

- hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *European journal of nutrition* 48:437-445. doi 10.1007/s00394-009-0032-z.
12. Costa-Silva JH, Simões-alves AC, Fernandes MP (2016). Developmental Origins of Cardiometabolic Diseases: Role of the Maternal Diet. *Frontiers in Physiology*, v. 7, p. 1.
 13. Costa-Silva JH, Zoccal DB, Machado BH (2010). Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. *J Neurophysiol*. 2010 Apr;103(4):2095-106.
 14. Costa-Silva JH, Zoccal DB, Machado BH (2012). Chronic intermittent hypoxia alters glutamatergic control of sympathetic and respiratory activities in the commissural NTS of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 302, R785–R793. doi:10.1152/ajpregu.00363.2011.
 15. De Brito Alves JL, Nogueira VO, Cavalcanti Neto MP, Leopoldino AM, Curti C, Colombari DS, Colombari E, Wanderley AG, Leandro CG, Zoccal DB, Costa-Silva JH (2015). Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. *The Journal of nutrition* 145:907-914. doi 10.3945/jn.114.202804.
 16. De Brito Alves JL, Nogueira VO, de Oliveira GB, da Silva GS, Wanderley AG, Leandro CG, Costa-Silva JH (2014). Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *The British journal of nutrition* 111:606-615. doi 10.1017/S0007114513002833.
 17. De Brito Alves JL, Toscano AE, Da Costa Silva JH, Vidal H, Leandro CG, Pirola L. Transcriptional response of skeletal muscle to a low protein perinatal diet in rat offspring at different ages: The role of key enzymes of glucose-fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem*. 41:117-123. doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.12.002.
 18. Estrela DC *et al.* (2014). Effects of short-term malnutrition in rats. *Scientia Plena* 10, 071101.
 19. Falcao-Tebas F, Bento-Santos A, Fidalgo MA, de Almeida MB, dos Santos JA, Lopes de Souza S, et al. (2012). Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. *Br J Nutr*. 2012 Feb;107(3):372-7.
 20. Gabor A, Leenen FH (2012). Cardiovascular effects of angiotensin II and glutamate in the PVN of Dahl salt-sensitive rats. *Brain Res* 1447: 28–37.
 21. Galdino R *et al.* (2000). Protein malnutrition does not impair glucose metabolism adaptations to exercise-training. *Nutr Res*. 2000 Abr;20(4):527-535.
 22. Gallo PV (1981). Physiological and behavioral consequences of maternal and post-weaning protein restriction. *Physiol Behav*. 26, 77-84.
 23. Gill JMR, Hardman AE (2003). Exercise and postprandial lipid metabolism: an update on potential mechanisms and interactions with high-carbohydrate diets. *J Nutr Biochemistry* Mar;14(3):122-132.
 24. Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A (2005). Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res*. 2005; 36: 232-0.
 25. Gordon FJ, Talman WT (1992). Role of excitatory amino acids and their receptors in bulbospinal control of cardiovascular function. In *Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation*, Vol. 2. G. Kunos & J. Ciriello, Eds.: 209–225. Birkhauser. Boston.

26. Gotoh M *et al.* (1996). Starvation reduces norepinephrine activities in both hypothalamus and heart in rats. *Brain Res.* 706, 351-354.
27. Gray GE (1989). Nutrition and dementia. *J Am Diet Assoc.* 89, 1795-1802.
28. Greenberg HE *et al.* (1999). Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. *J App. Physiol.* 86, 298–305.
29. Grigor MR *et al.* (1986). Milk composition of rats feeding restricted litters. *Biochem J* 233, 917–919.
30. Guyenet PG (2006). The sympathetic control of blood pressure. *Nature reviews. Neuroscience* 7:335-346. doi 10.1038/nrn1902.
31. Hales CN *et al.* (1996). Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans.* 24: 341-0.
32. Hall RD (1983). Is hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? *Dev. Psychobiol.* 16, 395-411.
33. Holness MJ *et al.* (1998). Moderate protein restriction during pregnancy modifies the regulation of triacylglycerol turnover and leads to dysregulation of insulin's anti-lipolytic action. *Mol Cell Endocrinol.* 1998; 142: 25-3.
34. Kishi T, Hirooka Y, Kimura Y, Ito K, Shimokawa H, Takeshita A (2004). Increased reactive oxygen species in rostral ventrolateral medulla contribute to neural mechanisms of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 109: 2357–2362.
35. Kishi T, Hirooka Y, Konno S, Ogawa K, Sunagawa K (2010). Angiotensin II type 1 receptor-activated caspase-3 through ras/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase in the rostral ventrolateral medulla is involved in sympathoexcitation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 55: 291–297.
36. Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K (2008). High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 31:2075-2083. doi 10.1291/hypres.31.2075.
37. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA (1999). Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci.* 1999;64(11):965-74.
38. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhaes de Castro R, Bolanos-Jimenez F (2008). Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci.* 2008 Mar;27(6):1400-8.
39. Loss IO *et al.* (2007). Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. *Life Sci.* 81, 944-950.
40. Machado BH (2001). Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Annals of the New York Academy of Sciences* 940, 179–196.
41. Machado BH, Bonagamba LGH (1992). Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Research* 576, 131-138.
42. Machado BH, Mauad H, Chianca JR DA, Haibara AS, Colombari E (1997). Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 533–544.

43. Machado BH, Mauad H, Chianca JR DA, Haibara AS, Colombari E (2005). Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal commissural NTS of awaked rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. *Auton Neurosci* 117, 25-32.
44. Madani S, Prost J, Belleville J (2000). Dietary protein level and origin (casein and highly purified soybean protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport and antioxidative defense status in the rat. *Nutrition*. 2000 Maio/Jun;16(5):368-375.
45. McMullen S, Langley-Evans SC (2005). Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 288:R85-90. doi 10.1152/ajpregu.00435.2004.
46. Miñana-Solis MC, Escobar C (2008). Post-weaning protein malnutrition in the rat produces short and long term metabolic impairment, in contrast to earlier and later periods. *Int J Biol Sci*. 2008 4(6):422-432.
47. Moraes DJ *et al.* (2014). Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. *J Physiol*. 592(Pt9), 2013–2033. doi:10.1113/jphysiol.2013.262212.
48. Moraes DJ, Bonagamba LG, Zoccal DB, Machado BH (2011). Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 300, R1476–R1486. doi: 10.1152/ajpregu.00825.2010
49. Nassir F *et al.* (1997). Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in the rat. *Brit J Nutr*. 1997 Mar;78(3):493-500.
50. Nozoe M, Hirooka Y, Koga Y, Sagara Y, Kishi T, Engelhardt JF, Sunagawa K (2007). Inhibition of Rac1-derived reactive oxygen species in nucleus tractus solitarius decreases blood pressure and heart rate in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 50: 62–68.
51. Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al (2009). Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav*. 2009 Mar 2;96(3):481-92.
52. Park KS *et al.* (2003). Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. *J Nutr*. 2003 Out;(10):3085-3090.
53. Penitente AR *et al.* (2007). Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awaked rats. *Life Sci*. 2007 Jul 26;81(7):609-14.
54. Plagemann A *et al.* (2000). Hypothalamic Nuclei Are Malformed in Weanling Offspring of Low Protein Malnourished Rat Dams. *J Nutr*. October 1, 2000 vol. 130 no. 10 2582-2589.
55. Plagemann A *et al.* (2006). Developmental programming of the hypothalamus: a matter of insulin. A comment on: Horvath, T. L., Bruning, J. C.: Developmental programming of the hypothalamus: a matter of fat. *Nat. Med.* (2006) 12: 52-53.
56. Plagemann A, Harder T (2009). Hormonal programming in perinatal life: leptin and beyond. *Br J Nutr*. 101, 151-152.
57. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (1993). AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition* 123:1939-1951.

58. Rodrigues FA, Chianca-Jr DA, Fernandes LG (2012). Malnutrition affects the pressor response to microinjection of L-glutamate into the RVLM of awake rats. *Biol Res* 45: 337-343.
59. Sawaya AL, Roberts S (2003). Stunting and future risk of obesity: principal physiological mechanisms. *Cad Saude Pública*. 19(Suppl.1),S21–S28.doi: 10.1590/S0102-311X2003000700003.
60. Sousa LE, Magalhaes WG, Bezerra FS, Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Isoldi MC, Alzamora AC (2015). Exercise training restores oxidative stress and nitric oxide synthases in the rostral ventrolateral medulla of renovascular hypertensive rats. *Free radical research*:1-28. doi 10.3109/10715762.2015.1069291.
61. Tai MH, Wang LL, Wu KL, Chan JYH (2005). Increased superoxide anion in rostral ventrolateral medulla contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats via interactions with nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 38: 450–462.
62. Talman WT, Perrone MH, Reis DJ (1980). Evidence of L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. *Science* 209: 813–815.
63. Toney GM, Pedrino GR, Fink GD, Osborn JW (2010). Does enhanced respiratory-sympathetic coupling contribute to peripheral neural mechanisms of angiotensin II-salt hypertension? *Experimental physiology* 95:587-594. doi 10.1113/expphysiol.2009.047399.
64. Tropa FC *et al.* (2001). Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold–Jarisch reflex in conscious rats. *Nutritional Neuroscience* 4, 99–107, 2001.
65. Yara S, Lavoie JC, Levy E (2015). Oxidative stress and DNA methylation regulation in the metabolic syndrome. *Epigenomics* 7:283-300. doi 10.2217/epi.14.84.
66. Zhang J, Mifflin SW (1993). Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am J Physiol*, 265, H770-H773.
67. Zippel U, Plagemann A, Davidowa H (2003). Altered action of dopamine and cholecystokinin on lateral hypothalamic neurons in rats raised under different feeding conditions. *Behav Brain Res*. 2003;147(12):89–94.
68. Zoccal DB, Furuya WI, Bassi M, Colombari DSA, Colombari E (2014). The nucleus of the solitary tract and the coordination of respiratory and sympathetic activities. *Front. Physiol.*, 25 June 2014 | <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00238>.
69. Zoccal DB, Machado BH (2011). Coupling between respiratory and sympathetic activities as a novel mechanism underpinning neurogenic hypertension. *Curr Hypertens Rep* 13, 229-236.
70. Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF, Machado BH (2008). Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *The Journal of physiology* 586:3253-3265. doi 10.1113/jphysiol.2008.154187.

Figure captions

Fig 1. Evolution of weight gain at 1-60-d-old from offspring rats submitted to NP or LP diet during gestation and lactation. Values are mean $\pm$ SEM, n=17-23. ***Different from NP, $p < 0.001$ (unpaired Student t-test). NP, control offspring rats from dams that received a normoprotein diet (17% protein) during gestation and lactation. LP, experimental offspring rats from dams that received a low protein diet (8% protein) during gestation and lactation. All pups were fed a standard chow diet up from weaning.

Fig 2. Changes evoked by unilateral L-glu microinjection into the NTS over cardiovascular parameters of anesthetized rats from NP and LP group at 70-90 d-old. Panel a shows representative tracing of pulsatile arterial pressure (PAP) and heart rate (HR), after L-glutamate microinjection (L-glu; 0.5 nmol/50nL) into the NTS from NP and LP animal. The arrow indicates the moment of microinjection. Panel b and c show the responses evoked by L-glu microinjection over Δ MAP and Δ HR in NP (17% protein; n=3) and LP (8% protein; n=5) group. All pups were fed a standard chow diet up from weaning. Values are mean $\pm$ SEM (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Fig 3. Changes evoked by unilateral L-glu microinjection into the NTS over cardiovascular and respiratory parameters of conscious rats from NP and LP group at 70-90-d-old. Panel a shows a representative tracing of baseline pulsatile arterial pressure (PAP), media arterial pressure (MAP), respiratory frequency (RF), and heart rate (HR) from NP and LP animal. Panel b shows the evaluation of MAP and panel c shows the HR at rest. Panel a shows d representative tracing of pulsatile arterial pressure (PAP), media arterial pressure (MAP), respiratory frequency (RF), and heart rate (HR) after L-glu microinjection into the NTS from NP and LP animal. The arrow indicates the moment of microinjection. Panel e, f and g show the responses evoked by L-glu microinjection over Δ MAP, Δ HR and Δ RF in NP (17% protein; n=11-16) and LP (8% protein; n=9-14) group. All pups were fed a standard chow diet up from weaning. Values are mean $\pm$ SEM (* $p < 0.05$, Student's t-test).

Fig 4. Microinjection sites into the NTS of anesthetized and conscious rats submitted to NP (or LP diet during gestation and lactation at 70-90-d-old. Schematic representation of the unilateral L-glutamate microinjection sites (L-glu; 0.5 nmol/50 nL) into the commissural NTS of rats, confirmed by histology. The black spots represent the locations where microinjections occurred in the anesthetized (panel a) and conscious rats (panel c) from NP and LP group. Panel b and d show the micrographs after unilateral L-glu microinjection into the commissural NTS of an animal representative, anesthetized and conscious, respectively. The arrow indicates the location where the microinjections occurred. NP, control offspring rats from dams that received a normoprotein diet (17% protein) during gestation and lactation. LP, experimental offspring rats from dams that received a low protein diet (8% protein) during gestation and lactation.

Fig 5. Protein-restricted rats during pregnancy and lactation exhibit loss mRNA expression of GABA(A)-receptor-associated protein like 1 (Gabarapl1), but not glutamatergic receptors in medulla at 90-d-old. Evaluation of mRNA of Grin1 (panel A), Gria1 (panel B), Grm1 (panel C) and Gabarapa1 (paned D) in

medullar-tissue. Black bars represent NP group (17% protein, n=5) and white bars LP group (8% protein, n=5). All pups were fed a standard chow diet up from weaning. Values are mean $\pm$ SEM (* p <0.05, Student's t-test)

Fig 1

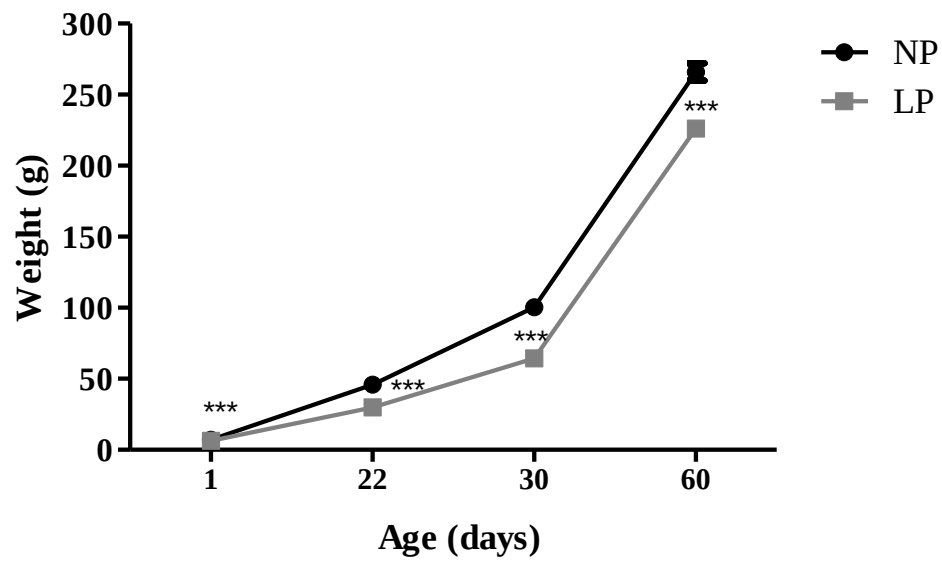


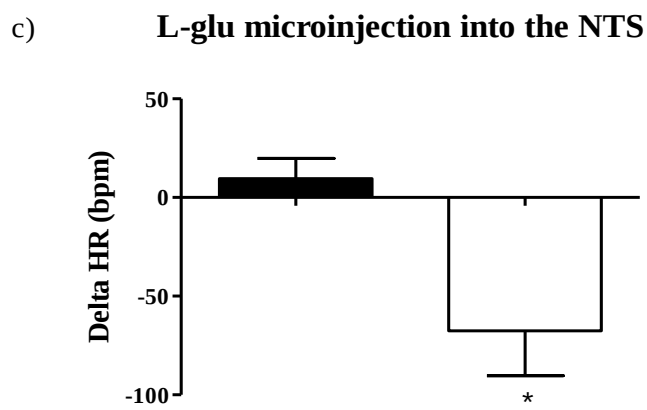
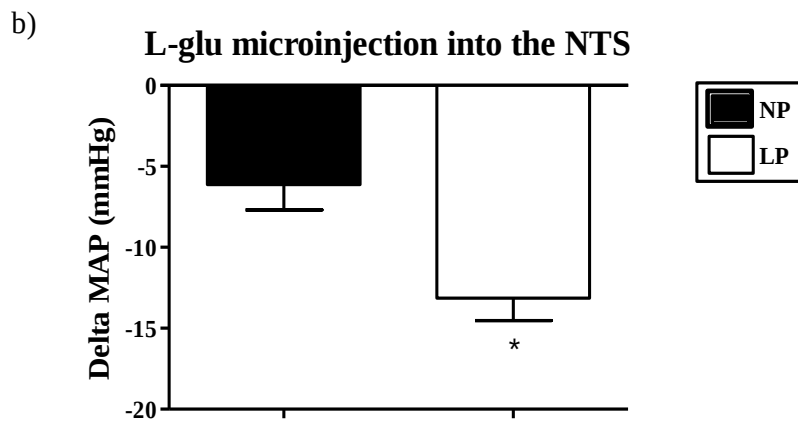
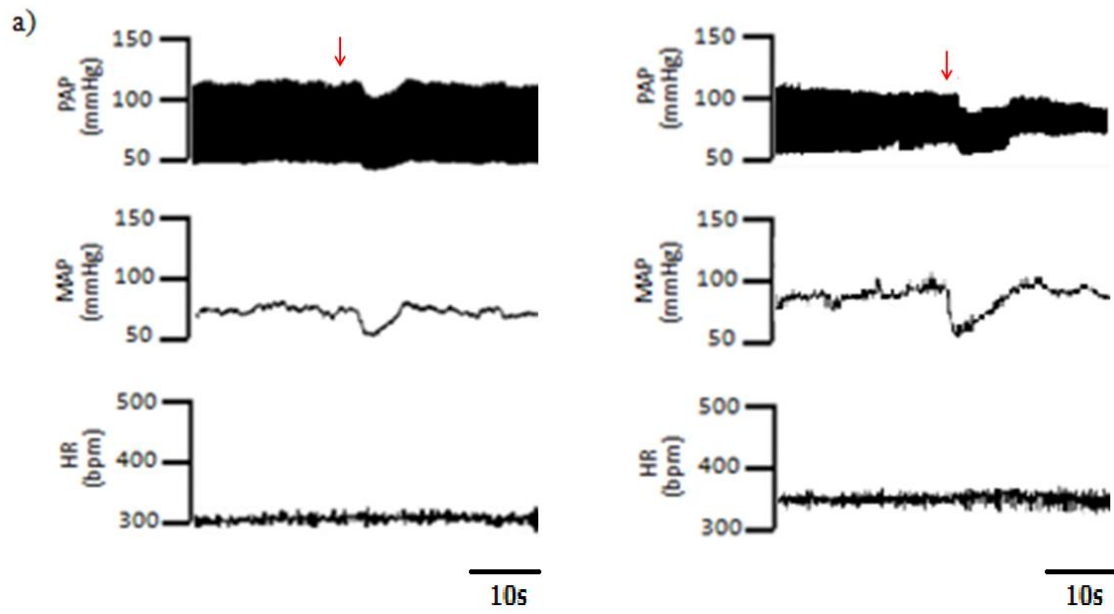
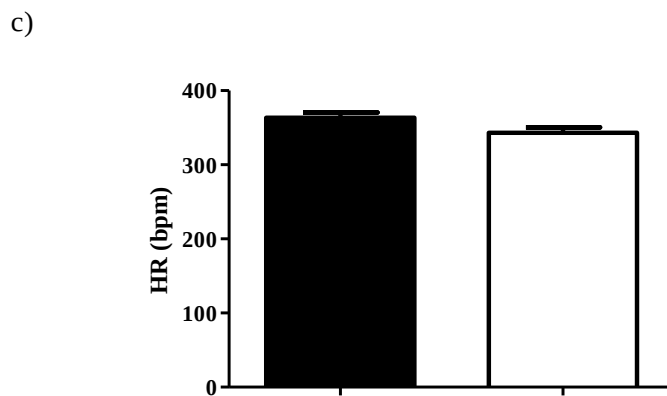
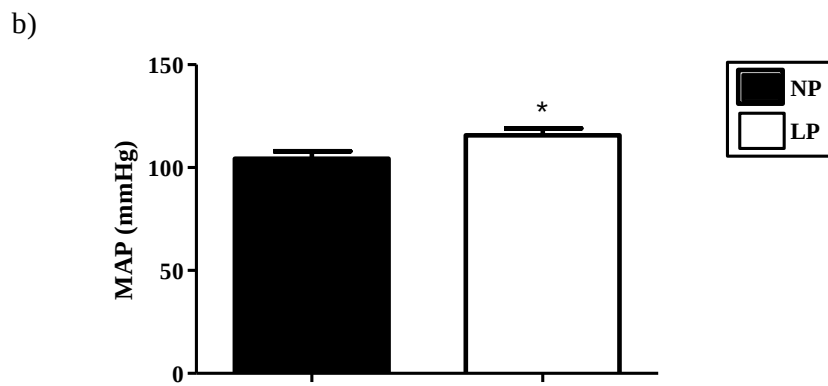
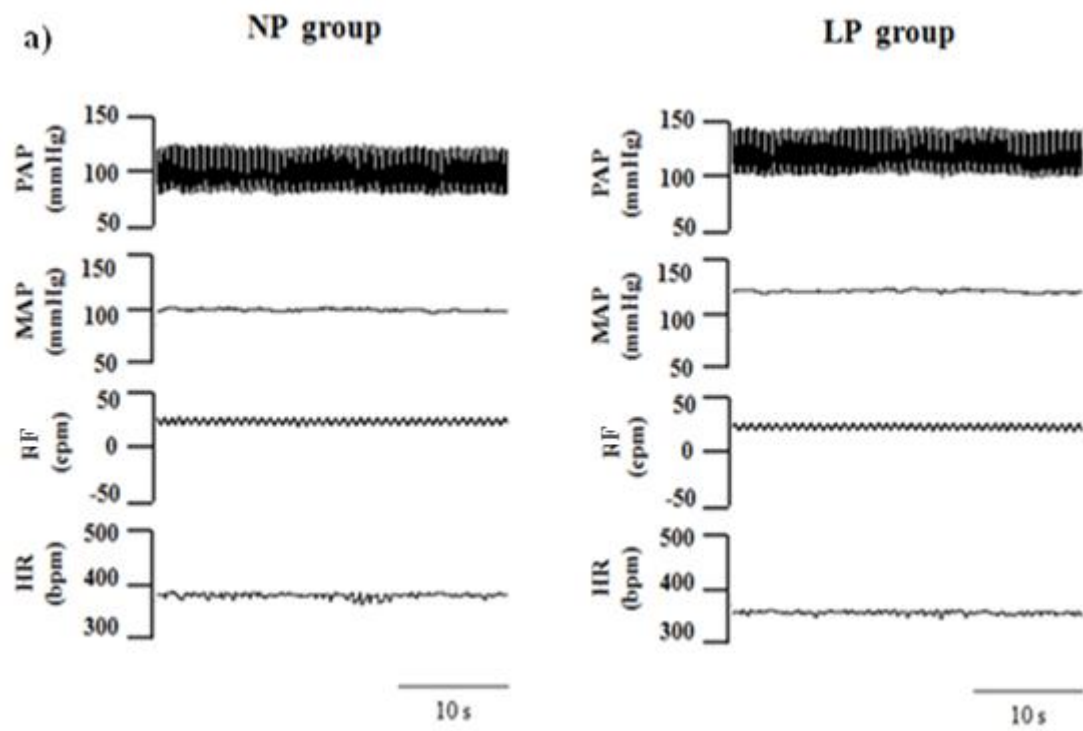
Fig 2

Fig 3



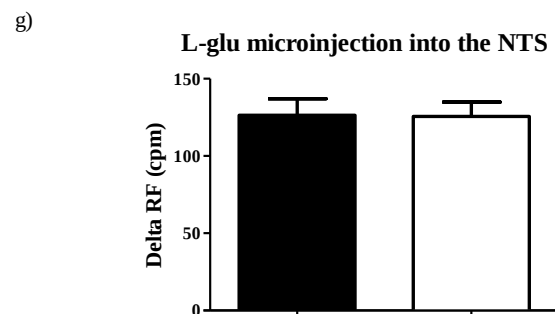
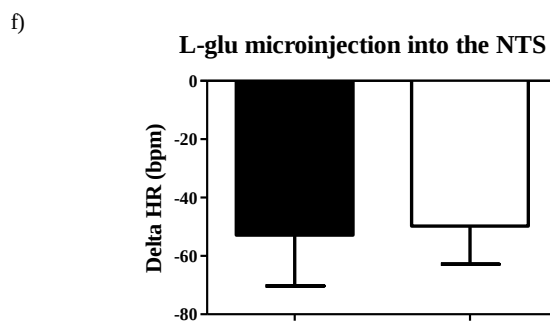
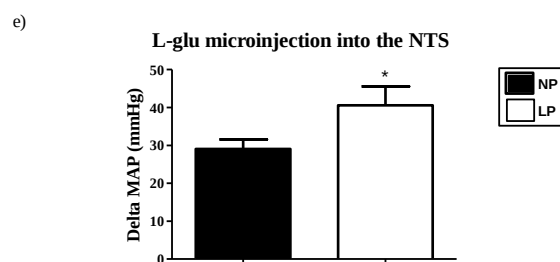
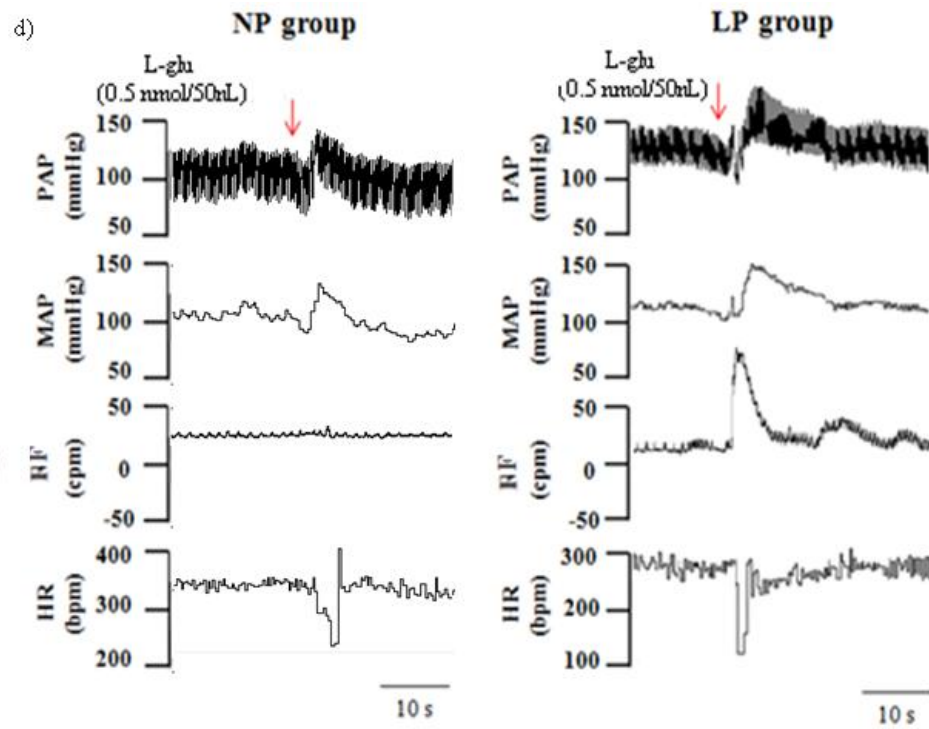


Fig 4

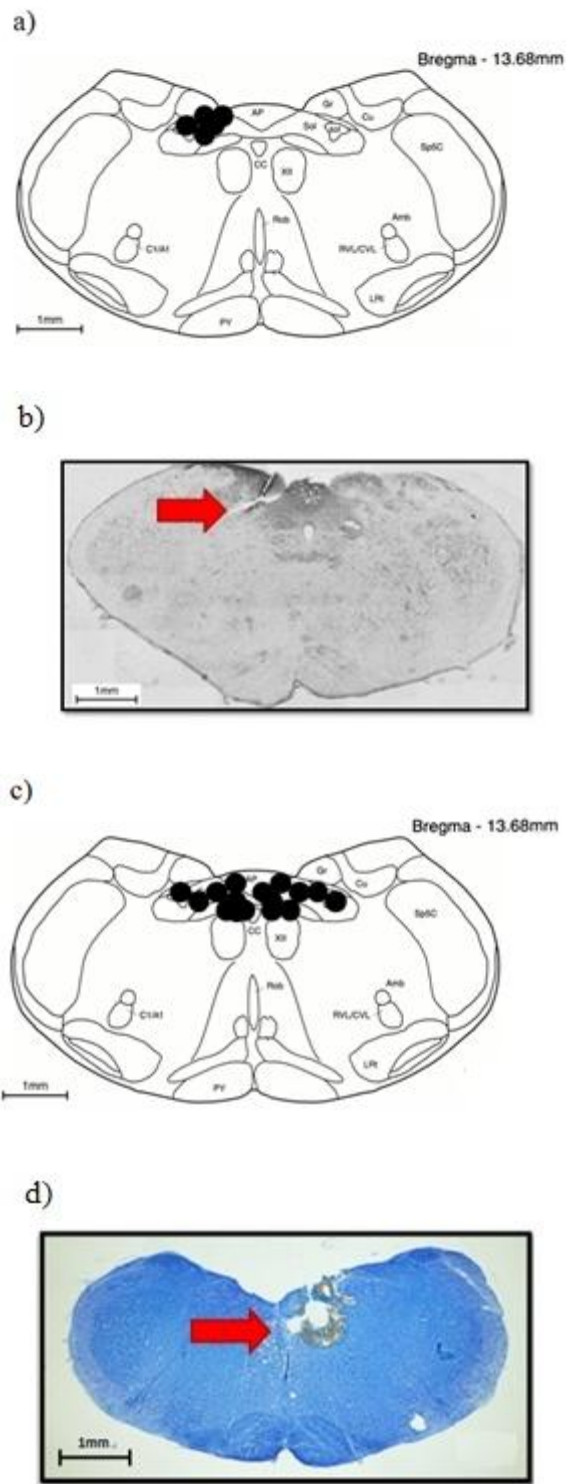


Fig 5

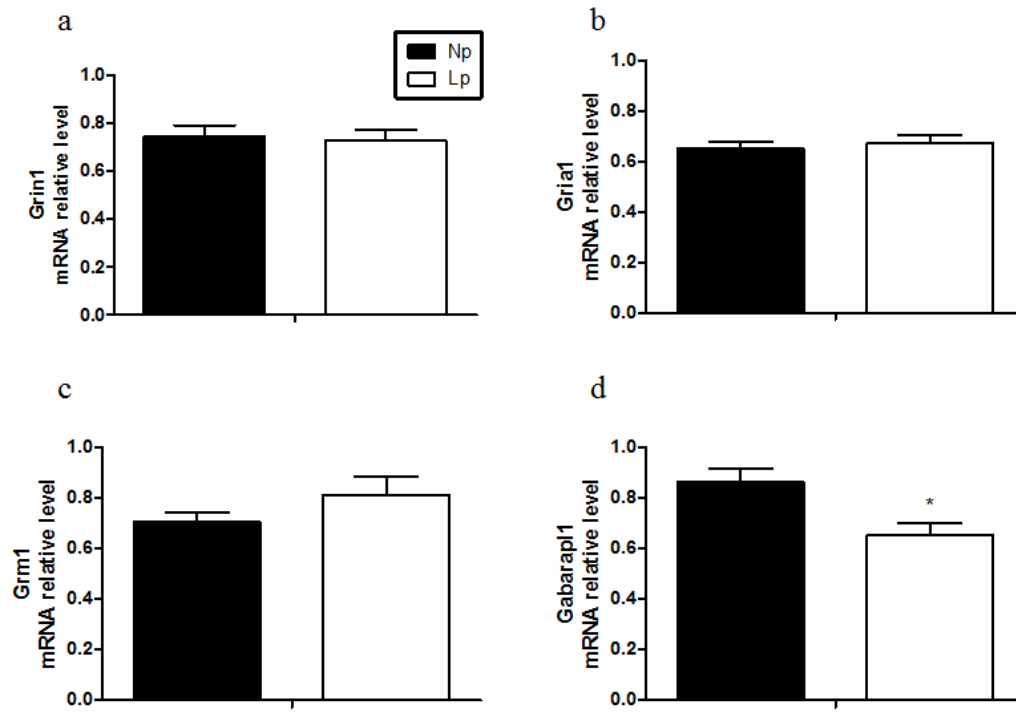


Table 1. Nutritional Composition of the experimental diets (g/100g diet)

Nutrient	Normal protein (17% protein)	Low protein (8% protein)
Casein (85%)*	20	9.41
Dextrin cornstarch	13	13
Cellulose	5	5
Sucrose	10	10
Cornstarch	39.74	50.34
Soybean oil	7	7
Choline	0.25	0,25
Methionine	0.3	0.3
Vitamin mix	1	1
Mineral mix	3.5	3.5
Energy density (kJ/g)	16.26	16.26

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

Table 2. Primers sequence used to perform qRT-PCR

Gene	Foward/Reverse	Tm	Sequence 5'-3'	Amplicon size
Grin1	F	60°C	TACAACCTGGAACACATCATCC	149 bp
	R		TGTCATAGGACAGTTGGTCGAG	
Gria1	F	60°C	TGTTTGCCCTACATTGGAGTGAG	145 bp
	R		GAACCACAGGCTGTTGAATATG	
Grm1	F	60°C	CTATCATAGCCATCGCCTTTTC	143 bp
	R		GAGGAAAATAACCAGCCAGAATG	
Gabarapl1	F	58°C	CGTGGAGAAGGCTCCTAAAG	92 bp
	R		AGAAGTAGAACTGGCCAAC	

Table 3. Biochemical parameters of adult rat offspring from dams fed with normal protein (NP; 17% protein) or low protein (LP; 8% protein) diet during gestation and lactation

Biochemical parameters	22 d-old		30 d-old		
	NP	LP	NP	LP	H
	Mean SEM	Mean SEM	Mean SEM	Mean SEM	
Total protein (g/dL)	6.0±0.1	5.2±0.1***	6.3±0.2	5.6±0.1**	
Albumin (g/dL)	2.6±0.1	2.1±0.06***	3.1±0.1	2.8±0.1**	
Triglycerides (mg/dL)	130.8±8.5	77.4±6.1***	164.4±14	260.4±20***	
Total cholesterol (mg/dL)	122.8±11.8	77.4±6.1***	88.4±4.9	79.3±4.2	

Fasting glucose (mg/dL)	107.9±3.7	124±5.3 [*]	102.3±5.2	91.7±2.5
-------------------------	-----------	----------------------	-----------	----------

6 CONCLUSÃO

O NTS é a matriz que recebe as primeiras sinapses das aferências cardiovasculares periféricas, com importante papel na regulação autonômica e de pressão arterial. O glutamato é o principal neurotransmissor utilizado nas sinapses nervosas do NTS.

Nossos resultados demonstram que a desnutrição proteica materna durante gestação e lactação pode induzir a um menor peso corporal da prole nas idades de 1, 22, 30 e 60 dias de vida; alterações deletérias sobre o perfil bioquímico da prole nas idades de 22 (diminuição de proteínas totais, albumina, triglicerídeos e colesterol total, aumento de glicemia de jejum) e 30 dias (diminuição de proteínas totais e albumina, aumento de triglicerídeos); aumento dos níveis basais de pressão arterial sistólica e média entre 70-90 dias; aumento de sensibilidade ao neurotransmissor glutamato no NTS de ratos anestesiados e não anestesiados com 70-90 dias; bem como menor expressão gênica de receptores gabaérgicos no tronco cerebral aos 90 dias de vida, sugerindo que a desnutrição proteica materna leva a uma diminuição da rede de neurotransmissão inibitória (gabaérgica) e uma possível sobreposição de neurotransmissão excitatória (glutamatérgica) sobre o controle cardiorrespiratório central da prole de ratos desnutridos. No entanto, no nosso modelo experimental de desnutrição, não encontramos alterações respiratórias basais e nem após a microinjeção de L-glutamato no NTS quando comparado ao grupo controle. Também não encontramos diferença nas respostas evocadas pela microinjeção de antagonista glutamatérgico (ácido quinurênico) entre os grupos NP e HP, sugerindo assim que o aumento de sensibilidade ao glutamato no grupo desnutrido não deva envolver uma maior participação dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos sobre o controle cardiorrespiratório do NTS.

Em conclusão, sugerimos que o aumento de neurotransmissão glutamatérgica no NTS esteja contribuindo para o desenvolvimento de hipertensão observada na vida adulta de animais expostos à desnutrição proteica na fase perinatal. Todavia, mais estudos são necessários para avaliar o balanço das redes de neurotransmissão excitatória e inibitória do NTS, as cascatas de sinalização intracelular de neurônios, bem como a sensibilidade dos canais iônicos de receptores glutamatérgicos no NTS de animais submetidos à desnutrição perinatal. A compreensão completa dos mecanismos centrais envolvidos no desequilíbrio autonômico encontrado em indivíduos desnutridos pode levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas e políticas governamentais para melhorar a saúde pública.

REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, L.G. *et al.* Birth weight in relation to leisure time physical activity in adolescence and adulthood: meta-analysis of results from 13 nordic cohorts. **PLoSOne**, San Francisco, v. 4, n. 12, p. e8192, dez. 2009.
- ANDRESEN, M. C., KUNZE, D. L. Nucleus tractus solitarius: gateway to neural circulatory control. **Annu Rev Physiol**, Palo Alto, v. 56, p. 93–116, mar. 1994.
- BARKER, D.J. Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ**, London, v. 311, n. 6998, p. 171-4, jul. 1995.
- _____. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, Tomtebodavägen, v.261, n. 5, p. 412-7, mai. 2007.
- BARKER, D.J. *et al.* Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, Bristol, v. 36, n. 1, p. 62–7, jan. 1993.
- BARKER, D.J. *et al.* Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. **N Engl J Med**, Massachusetts, v. 353, n. 17, p. 1802–9, out. 2005.
- BARKER, D.J., OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet**. Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 1077–81, mai. 1986.
- BARROS, M. A. V. *et al.* Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 123–30, jan. 2015.
- BARROS, M. A. V. *et al.* Efeitos da desnutrição proteica perinatal sobre o controle autonômico cardíaco em ratos. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR, 18. 2014, Londrina - PR. **Resumos...** Londrina: UEL, 2014.

BENABE, J. E. *et al.* Modulation of ANG II receptor and its mRNA in normal rat by low-protein feeding. **Am J Physiol**, Washington, v. 265, n.5, p. F660-9, nov. 1993.

BERARDI, N. *et al.* Molecular basis of plasticity in the visual cortex. **Trends Neurosci**, Amsterdam v. 26, n. 7, p. 369–78, jul. 2003.

BIOSCA, M., *et al.* Central adiposity in children born small and large for gestational age. **Nutr Hosp**, Madrid, v. 26, n. 5, p. 971–6, set. 2011.

BOGDARINA, I. *et al.* Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. **Circ Res**, Baltimore, v. 100, n. 4, p. 520-6, mar. 2007

BRACCIALLI, A.L., BONAGAMBA, L.G., MACHADO, B.H. Glutamatergic and purinergic mechanisms on respiratory modulation in the caudal NTS of awake rats. **Respir Physiol Neurobiol**, Amsterdam, v. 161, n. 3, p. 246-52, mai. 2008.

BRAGA, V.A., SORIANO, R.N., MACHADO, B.H. Sympathoexcitatory response to peripheral chemoreflex activation is enhanced in juvenile rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Exp Physiol**, Cambridge, v. 91, n. 6, p. 1025-31, nov. 2006.

BRUNTON, L.L., GOODMAN, L. S., GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012.

CALKINS, K., DEVASKAR, S.U. Fetal origins of adult disease. **Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care**, St. Louis, v. 41, n. 6, p. 158-76, jul. 2011.

CAMPOS JR., R. *et al.* Hipertensão arterial: o que tem a dizer o sistema nervoso. **Rev Bras Hipertens**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 41-54, mar. 2001. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/8-1/006.pdf>> Acesso em: 10 maio 2016.

CARROLL, J.L. Developmental plasticity in respiratory control. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v. 94, n. 1, p. 375–89, jan. 2003.

CIRIELLO, J., HOCHSTENBACH, S.L., RODER, S. **Central projections of baroreceptor afferent fiber in the rat.** Nucleus of the Solitary Tract. Ed: Robin A. Barraco, London: CRC Press, p.35-50, 1994.

COLOMBARI, E., BONAGAMBA, L. G. H, MACHADO, B. H. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Washington, v. 266, n. 3, p.R730–8, mar. 1994.

COSTA-SILVA, J.H., *et al.* Chronic undernutrition alters renal active Na⁺ transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? **Eur J Nutr**, Darmstadt, v. 48, n. 7, p. 437-45, out. 2009.

COSTA-SILVA, J.H., ZOCCAL, D.B., MACHADO, B.H. Glutamatergic antagonism in the NTS decreases post-inspiratory drive and changes phrenic and sympathetic coupling during chemoreflex activation. **J Neurophysiol**, Bethesda, v. 103, n. 4, p. 2095-106, abr. 2010.

_____. Chronic intermittent hypoxia alters glutamatergic control of sympathetic and respiratory activities in the commissural NTS of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 302, n. 6, p. R785-93, mar. 2012.

COSTA-SILVA, J.H., *et al.* New insights on the maternal diet induced-hypertension: potential role of the phenotypic plasticity and sympathetic-respiratory overactivity. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, vol. 24, n. 6, p. 345, nov. 2015.

COSTA-SILVA, J.H.; SIMÕES-ALVES, A.C.; FERNANDES M.P. Developmental Origins of Cardiometabolic Diseases: Role of the Maternal Diet. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 7, n. 1, p. 504, nov. 2016.

DAMPNEY, R.A.L. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol Rev**, Washington, v. 74, n. 2, p. 323-64, abr. 1994.

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

DE BRITO ALVES, J.L., *et al.* Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. **J Nutr**, Springfield, v. 145, n. 5, p. 907–14, mai. 2015.

DE BRITO ALVES *et al.* Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Oxford, v. 43, n. 12, p. 1177-84, dez. 2016.

DE BRITO ALVES *et al.* Transcriptional response of skeletal muscle to a low protein perinatal diet in rat offspring at different ages: The role of key enzymes of glucose-fatty acid oxidation. **J Nutr Biochem**, Stoneham, v. 41, n. 1, p. 117-23, mar. 2017.

DE MELO MONTENEGRO, I.H., *et al.* Effects of a Moderate Physical Training on the Leptin Synthesis by Adipose Tissue of Adult Rats Submitted to a Perinatal Low-protein Diet. **Horm Metab Res**, Stuttgart, v. 44, n. 11, p. 814-8, out. 2012.

DOBBING, J. **Vulnerable periods in developing brain**. Applied Neurochemistry. Oxford, Ed: Blackwell, p. 287–316, 1968.

_____. **Nutritional growth restriction and the nervous system**. The Molecular Basis of Neuropathology, London, Ed: Arnold, p. 221–33, 1981.

FALCAO-TEBAS, F., *et al.* Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. **Br J Nutr**, Cambridge, v. 107, n. 3, p. 372-7, fev. 2012.

FERGUSON, A.V., BAINS, J. S. Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 96–101, jan. 1997.

FIDALGO, M., *et al.* Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, Cambridge, v. 109, n. 3, p. 449–56, fev. 2013.

FORSTER, H. V., SMITH, C. A. Contributions of central and peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO_2/H^+ . **J Appl Physio**, Bethesda, v. 108, n. 4, p. 989–94, abr. 2010.

FRANCO, M.C., *et al.* Circulating renin-angiotensin system and catecholamines in childhood: is there a role for birthweight? **Clin Sci**, London, v. 114, n. 5, p. 375-80, mar. 2008.

GALLO, P.V. Physiological and behavioral consequences of maternal and post-weaning protein restriction. **Physiol Behav**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 77-84, jan. 1981.

GLUCKMAN, P. D., *et al.* The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk. **Early Hum Dev**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 51-9, jan. 2005.

GOLDBERG, A.D., ALLIS, C.D., BERNSTEIN, E. Epigenetics: A landscape takes shape. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 635-8, fev. 2007.

GOTOH, M., *et al.* Starvation reduces norepinephrine activities in both hypothalamus and heart in rats. **Brain Res**, Amsterdam, v. 706, n. 2, p. 351-4, jan. 1996.

GOYAL, R., *et al.* Brain renin-angiotensin system: fetal epigenetic programming by maternal protein restriction during pregnancy. **Reprod Sci**, Thousand Oaks, v. 17, n. 3, p. 227-38, mar. 2010.

GRAY, G. E. Nutrition and dementia. **J Am Diet Assoc**, Chicago, v. 89, n. 12, p. 1795-1802, dez. 1989.

GREENBERG, H. E., *et al.* Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic responsiveness to hypoxia and hypercapnia. **J App Physiol**, Bethesda, v. 86, n. 1, p. 298–305, jan. 1999.

GRESSENS, P., *et al.* Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. **Developmental Brain Research**, Amsterdam, v. 103, n. 1, p. 21–35, out. 1997.

GRILL, H. J., HAYES, M. R. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. **Int J Obes**, London, v. 33, n. 1, p. S11-15, abr. 2009.

GUYENET, P. G., KOSHIYA, N. **Respiratory-sympathetic integration in the medulla oblongata**. In: KUNOS, G., CIRIELLO, J., editors. Central Neural Mechanisms in Cardiovascular Regulation. II. Boston: Birkhauser; pp. 226–247, 1992.

HALES, C. N., BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, Berlin, v. 35, n. 7, p. 595–601, jul. 1992.

HALL, R. D. Is hippocampal function in the adult rat impaired by early protein or protein-calorie deficiencies? **Dev Psychobiol**, New York, v. 16, n.5, p. 395-411, set. 1983.

HANSON, M., *et al.* Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. **Prog Biophys Mol Biol**, New York, v. 106, n. 1, p. 272-80, jul. 2011.

HANSON, M., GLUCKMAN, P. Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 94, n. 6, p. 1754S-58S, dez. 2011.

ITO, T., *al.* Aberrant expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in the fetal heart is associated with maternal undernutrition. **Tohoku J Exp Med**, Sendai, v. 224, n. 3, p. 163–71, jul. 2011.

ITO, T., *et al.* Maternal undernutrition induces the expression of hypoxia-related genes in the fetal brain. **Tohoku J Exp Med**, Sendai, v. 226, n. 1, p. 37–44, jan. 2012.

JOHNSON, A. K., THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, New York, v. 18, n. 3, p. 292–353, jul. 1997.

JONES, J. E., *et al.* Mechanisms of fetal programming in hypertension. **Int J Pediatr**, Washington, v. 2012, n. 584831, p. 1-7, jan. 2012.

JULIEN, C. The enigma of Mayer waves: facts and models. **Cardiovas Res**, London, v. 70, n. 1, p. 12–21, abr. 2006.

KLINE, D. D. Plasticity in glutamatergic NTS neurotransmission. **Respir Physiol Neurobiol**, Amsterdam, v. 164, n. 1-2, p. 105–11, dez. 2008.

LABAYEN, I.; *et al.* Early programming of body composition and fat distribution in adolescents. **J Nutr**, Springfield, v. 136, n. 1, p. 147-52, jan. 2006.

LANDSBERG, L., *et al.* Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of the obesity society and the american society of hypertension. **J Clin Hypertens**, Greenwich, v. 15, n. 1, p. 14-33, jan. 2013.

LANGLEY-EVANS, S.C. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. **J Hum Nutr Diet**. Oxford, v. 28, n. 1, p. 1–14, jan. 2015.

LAPILLONNE, A. Intrauterine growth retardation and adult outcome. **Bull Acad Natl Med**, Paris, v. 195, n. 3, p. 477-84, mar. 2011.

LOEWY, A. D. **Central autonomic pathways**. In: Central regulation of autonomic functions (Loewy AD, Spyer KM, eds), New York: Oxford UP, p. 88–103. 1990.

LOSS, I. O., *et al.* Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. **Life Sci**, Oxford, v. 81, n. 11, p. 944-50, ago. 2007.

LUCAS, A. **Programming by early nutrition in man.** In: The Childhood Environment and Adult Disease CIBA Foundation Symposium 156. Wiley, Chichester, p. 38–55, 1991.

_____. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. **Arch Dis Child**, London, v. 71, n. 4, p. 288–90, out. 1994.

LUZARDO, R., *et al.* Metabolic programming during lactation stimulates renal Na⁺ transport in the adult offspring due to an early impact on local angiotensin II pathways. **PLoS One**. v. 6, n. 7, e21232, jul. 2011

MACHADO, B. H., *et al.* Autonomic processing of cardiovascular reflex in the Nucleus Tractus Solitarii. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 533-43, abr. 1997.

MACHADO, B. H., BONAGAMBA, L. G. H. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. **Brain Research**, Amsterdam, v. 576, n. 1, p. 131-8, out. 1992.

_____. Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal commissural NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. **Auton Neurosci**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 25-32, jan. 2005.

MALPAS, S. C. The rhythmicity of sympathetic nerve activity. **Prog Neurobiol**, Oxford, v. 56, n. 1, p. 65-96, out. 1998.

MANCIA, G., GRASSI, G. (2014). The autonomic nervous system and hypertension. **Circulation Research**, Baltimore, v. 114, n. 11, p. 1004-21, mai. 2014.

MARTIN-GRONERT, M. S., OZANNE, S. E. Experimental IUGR and later diabetes. **J Intern Med**, Oxford, v. 261, n. 5, p. 437-52, mai. 2007.

MENDOZA, A., LAZARTIGUES, E. The compensatory renin-angiotensin system in the central regulation of arterial pressure: new avenues and new challenges. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, London, v. 9, n. 4, p. 201-8, ago. 2015.

MESQUITA, F. F., GONTIJO, J. A., BOER, P. A. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 43, n. 11, p. 1010-8, nov. 2010.

MIRZAEI, H., SUAREZ, J. A., LONGO, V. D. Protein and amino acid restriction, aging and disease: from yeast to humans. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 25, n. 11, p. 558-66, nov. 2014.

MORAES, D.J., *et al.* Short-term sustained hypoxia induces changes in the coupling of sympathetic and respiratory activities in rats. **J Physiol**, London, v. 592, n. 9, p. 2013–33, mai. 2014.

MORGANE, P. J., *et al.* Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev**, New York, v. 17, n. 1, p. 91-128, 1993.

NANDURI, J., PRABHAKAR, N. R. Epigenetic regulation of carotid body oxygen sensing: clinical implications. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 860, n. 1, p. 1–8, mai. 2015.

NOGUEIRA, V. O. *et al.* Effects of perinatal protein undernutrition on the respiratory function and central chemoreception in offspring of rats. In: 47º Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fisiologia e 3º Encontro Científico do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2012, Gramado - RS. **Anais...** Gramado: SBFis, 2012.

NUYT, A.M., ALEXANDER, B.T. Developmental programming and hypertension. **Curr Opin Nephro Hypertens**, Philadelphia, v. 18, n. 2, p. 144–152, mar. 2009.

OZANNE, S. E., HALES, C. N. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. **Nature**. London, v. 427, n. 6973, p. 411-2, jan. 2004.

PAIXÃO, A.D., *et al.* Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. **Biol Neonate**, Basel, v. 80, n. 3, p. 239-46, fev. 2001.

PAIXÃO, A. D., ALEXANDER, B. T. How the kidney is impacted by the perinatal maternal environment to develop hypertension. **Biology of reproduction**, Champaign, v. 89, n. 6, p. 144, nov. 2013.

PALKOVITS, M., ZABORSKY, L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arc. **Prog Brain Res**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 9-34, fev. 1977.

PAXINOS G, WATSON C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. London: Academic, 1998.

PENITENTE, A. R., *et al.* Malnutrition enhances cardiovascular responses to chemoreflex activation in awake rats. **Life Sci**, Oxford, v. 81, n. 7, p. 609-14, jul. 2007.

PLAGEMANN, A., *et al.* Hypothalamic Nuclei Are Malformed in Weanling Offspring of Low Protein Malnourished Rat Dams. **J Nutr**, Springfield, v. 130, n. 10, p. 2582-9, out. 2000.

PLAGEMANN, A., *et al.* Developmental programming of the hypothalamus: a matter of insulin. A comment on: Horvath, T. L., Bruning, J. C.: Developmental programming of the hypothalamus: a matter of fat. *Nat. Med.* v. 12, p. 52-53. **Neuro Endocrinol Lett**, Stockholm, v. 27, n. 1-2, p.70-2, abr. 2006.

PLAGEMANN, A., HARDER, T. Hormonal programming in perinatal life: leptin and beyond. **Br J Nutr**. Cambridge, v. 101, n. 2, p. 151-2, jan. 2009.

PRABHAKAR, N.R., *et al.* Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. **Compr Physiol**, Bethesda, v. 5, n. 2, p. 561–77, abr. 2015.

RODRIGUES, F.A., CHIANCA-JR, D.A., FERNANDES, L.G. Malnutrition affects the pressor response to microinjection of L-glutamate into the RVLM of awake rats. **Biol Res**, Santiago, v. 45, n. 4, p. 337-43, jan. 2012.

SALDIVA, S. R., *et al.* Prevalence of obesity in preschool children from five towns in Sao Paulo State, Brazil. **Cad Saude Publica**. Rio de Janeiro, v. 20, n. 6, p. 1627-32, nov. 2004.

SAPRU, H.N. Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 410, n. 1, p. 357-64, 1996.

SAWAYA, A.L., ROBERTS, S. Stunting and future risk of obesity: principal physiological mechanisms. **Cad Saude Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. S21-8, jan. 2003.

SEGAR, J. L. Ontogeny of the arterial and cardiopulmonary baroreflex during fetal and postnatal life. **American Physiological Society**. Washington, v. 273, n. 2, p. R457-71, ago. 1997.

SHEPHERD, J. T., MANCIA, G. Reflex control of the human cardiovascular system. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, Berlin, v. 105, p. 1-99, 1986.

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

SILVEIRA *et al.* Developmental origins of health and disease (DoHaD). **J Pediatr**. Rio de Janeiro, v. 83, n. 6, dez. 2007.

SIMMS, A. E., *et al.* Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? **J Physiol**, Oxford, v. 587, n. 3, p. 597-610, fev. 2009.

- SIMMS, A. E., *et al.* Is augmented central respiratory-sympathetic coupling involved in the generation of hypertension? **Respir Physiol Neurobiol**, Amsterdam, v. 174, n. 1-2, p. 89-97, nov. 2010.
- SINSKI, M., *et al.* Why study sympathetic nervous system? **J physiol pharmacol**, Kraków, v. 57, n.11, p.79-92, nov. 2006.
- SMART, J. L. Critical periods in brain development. **Ciba Found Symp**, Amsterdam, v. 156, p. 109-24, 1991.
- TALMAN, W.T., PERRONE, M. H., REIS, D. J. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferent nerve fibers. **Science**, New York, v. 209, n. 4458, p. 813-5, ago. 1980.
- TROPIA, F.C., *et al.* Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold–Jarisch reflex in conscious rats. **Nutritional Neuroscience**, Amsterdam, v. 4, n. 2, p. 99–107, fev. 2001.
- TSENG, W. T., *et al.* Correlation of discharges of rostral ventrolateral medullary neurons with the low- frequency sympathetic rhythm in rats. **Neurosci Lett**, Limerick, v. 454, n. 1, p. 22–7, abr. 2009.
- WADDINGTON, C. H. **The Strategy of the Genes**: a Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology. London: Allen & Unwin, 1957.
- WATKINS, J. C., JANE, D. E. The glutamate story. **Br J Pharmacol**, London, v. 147, n. 1, p. S100-8, jan. 2006.
- WELLS, J. C. The programming effects of early growth. **Early Hum Dev**, Amsterdam, v. 83, n. 12, p. 743-8, dez. 2007.
- WELLS, J. C. The thrifty phenotype: An adaptation in growth or metabolism? **Am J Hum Biol**, New York, v. 23, n. 1, p. 65-75, fev. 2011.

WEST-EBERHARD, M. J. Alternative adaptations, speciation, and phylogeny (A Review). **Proc Nati Acad Sci**, Washington, v. 83, n. 5, p. 1388-92, mar. 1986.

_____. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. **Ecol Evol Syst**, Washington, v. 20, p. 249-278, nov. 1989.

_____. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **J Exp Zool B Mol Dev Evol**, Hoboken, v. 304, n. 6, p. 610–8, nov. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). World Health Statistics, 2013. Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2013en/>. Acesso em: 23 ago 2015.

WILLIAMS, B. Vascular ageing and interventions: lessons and learnings. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, London, v. 10, n. 3, p.126-32, jun. 2016.

ZHANG, J., MIFFLIN, S.W. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. **Am J Physiol**, Washington, v. 265, n. 2, p. H770-3, ago. 1993.

ZHOU, Y., DANBOLT, N. C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **J Neural Transm**, Vienna, v. 121, n. 8, p. 799-817, ago. 2014.

ZIPPEL, U., PLAGEMANN, A., DAVIDOWA, H. Altered action of dopamine and cholecystokinin on lateral hypothalamic neurons in rats raised under different feeding conditions. **Behav Brain Res**, Amsterdam, v. 147, n. 12, p. 89–94, dez. 2003.

ZOCCAL, D. B., *et al.* Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **J Physiol**, London, v. 586, n. 13, p. 3253-65, jul. 2008.

ZOCCAL, D. B., *et al.* The nucleus of the solitary tract and coordination of respiratory and sympathetic activities. **Front Physiol**, Lausanne, v. 5, n. 1, p. 238, jun. 2014

ZOCCAL, D.B., MACHADO, B.H. Coupling between respiratory and sympathetic activities as a novel mechanism underpinning neurogenic hypertension. **Curr Hypertens Rep**, Springer, v. 13, n. 3, p. 229-36, jun. 2011.

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

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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

Recife, 08 de março de 2016.

Ofício nº 09/16

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

Para: **Prof. João Henrique da Costa Silva**
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.047690/2015-77

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

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

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

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

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

Atenciosamente,

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