

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Sebastião Sérgio Lima dos Santos

Alteração das reservas de glicogênio em núcleos hipotalâmicos de ratos submetidos à malnutrição protéica durante o período neonatal

Rio de Janeiro 2009 Sebastião Sérgio Lima dos Santos

Alteração das reservas de glicogênio em núcleos hipotalâmicos de ratos submetidos à malnutrição protéica durante o período neonatal

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Frank Tenório de Almeida Costa

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

S237 Santos, Sebastião Sérgio Lima dos. Alteração das reservas de glicogênio em núcleos hipotalâmicos de ratos submetidos à malnutrição protéica durante o período neonatal / Sebastião Sérgio Lima dos Santos. - 2009. 115 f. : il.
Orientador : Frank Tenório de Almeida Costa. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.
1. Desnutrição - Teses. 2. Glicogênio - Teses. 3. Hipotálamo - Teses. 4. Lactação - Teses. 1. Costa, Frank Tenório de Almeida. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Santos.

CDU 613.24

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Sebastião Sérgio Lima dos Santos

Alteração das reservas de glicogênio em núcleos hipotalâmicos de ratos submetidos à malnutrição protéica durante o período neonatal

Dissertação apresentada, como requisito para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 10 de fevereiro de 2009.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Olga Maria Martins Silva de Almeida Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Arthur Giraldi Guimarães - CBB-UENF

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Frank Tenório de Almeida Costa por me aturar desde a iniciação científica.

À Penha Cristina Barradas Daltro-Santos por dividir esse fardo com o Frank.

Aos meus familiares por todo suporte. Minha mãe e meus irmãos vocês são muito especiais.

Ao Tiagão que vem me acompanhando e amadurecendo comigo desde a entrada na faculdade.

Aos meus companheiros de laboratório, Bruninha, Michael, Marcelo, Claudinha, Marcelle, Alexandre, Everton, P.P., Léo, Bia, Luiz, Vivi, Mácia, Fabio, Gabi, Andrea, Marquinhos e Olga.

Aos nossos colaboradores Anicet, Ive, Léo, Juarez, Cássia, Cristiane e Dona Geni.

Ao Jorge pelo auxílio em atividades tanto no laboratório como fora dele.

À Amélia Gomes e Alex Christan Manhães; obrigado por terem apostado em mim.

À Ângela Gadelha por ter me ajudado no percurso até o Mestrado.

Também fica meu agradecimento aos meus amigos do Cap, Raquel e Paulo, Cláudia Valéria e todos os não citados, mas igualmente importantes.

À Intruder por ter resistido até o fim.

E especialmente a minha esposa multitarefa, que me ajudou muito até mesmo sem perceber. Te Amo. T.A.

Obrigado a todos, e por fim e acima de tudo a Deus.

RESUMO

SANTOS, Sebastião Sérgio. Alteração das reservas de glicogênio em núcleos hipotalâmicos de ratos submetidos à malnutrição protéica durante o período neonatal. 2009. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

O estado nutricional perinatal tem influência persistente sobre o desenvolvimento neural e a função cognitiva. Em humanos e outros animais, a malnutrição protéica durante o período perinatal acarreta alterações permanentes, incluindo a síndrome metabólica na idade adulta. A alimentação é modulada principalmente por fatores neuronais e hormonais que chegam ao hipotálamo. As reservas de glicogênio hipotalâmicos são uma fonte de glicose em altas demandas energéticas, como durante o desenvolvimento dos circuitos neurais. Como alguns circuitos hipotalâmicos estão sendo formados durante o período de lactação, focamos o estudo nos efeitos da desnutrição protéica, durante os primeiros 10 dias de lactação, sobre as reservas de glicogênio em núcleos hipotalâmicos envolvidos no controle do metabolismo energético. Ratas grávidas foram aleatoriamente separadas individualmente em gaiolas e alimentadas ad libitum com uma dieta normoproteíca (22% proteína). Após o parto, cada mãe ficava com 6 filhotes machos. Durante os 10 primeiros o grupo experimental recebia uma dieta isenta de proteína (D) e o grupo controle uma dieta normoproteíca (C). Em P10 a marcação para as reservas de glicogênio era muito intensa nos animais C no núcleo argueado (ARC) e eminência média (EM). Em P20 no animais C, as reservas eram menores em comparação com P10. Os animais D apresentaram uma marcação menor do que os controles. Após P45 foi difícil determinar diferença entre os grupos porque o as reservas estavam diminuídas. Nós também mostramos que os tanicitos eram as células que apresentavam reservas de glicogênio. Nossos dados reforçam que o estado nutricional materno durante a lactação é crítico para a maturação cerebral, pois a malnutrição materna resulta em menor marcação nas reservas de glicogênio no hipotálamo, o que pode ser crítico para o estabelecimento da circuitaria neural.

Palavras-chave: Glicogênio. Malnutrição. Hipotálamo. Impressão metabólica. Tanicitos.

ABSTRACT

Perinatal nutrition has persistent influences on neural development and cognition. In humans and other animals protein malnutrition during the perinatal period causes permanent changes, inducing to adulthood metabolic syndrome. Feeding is mainly modulated by neural and hormonal inputs to the hypothalamus. Hypothalamic glycogen stores are a source of glucose in high energetic demands, as during development of neural circuits. As some hypothalamic circuits are formed during lactation, we attempt to study the effects of malnutrition, during the first 10 days of lactation, on glycogen stores in hypothalamic nuclei involved in the control of energy metabolism. Female pregnant rats were fed ad libitum with a normorprotein diet (22% protein). After delivery each dam was kept with 6 male pups. During the first 10 days of lactation dams from experimental group received a protein free diet and the control group a normoprotein diet. By P10 glycogen stores were very high in the arcuate nucleus and median eminence of control group. Glycogen stores decreased during development. In P20 control animals, glycogen stores were lower when compared to P10 control animals. Animals submitted to malnutrition presented a staining even lower than control ones. After P45 it was difficult to determine differences between control and diet groups because glycogen stores were reduced. We also showed that tanycytes were the cells presenting glycogen stores. Our data reinforce that maternal nutritional state during lactation may be critical for neurodevelopment since it resulted in a low hypothalamic glycogen store, which may be critical for establishment of neuronal circuitry.

Keywords: Glycogen. Malnutrition. Hypothalamus. Metabolic imprinting. Tanycytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do hipotálamo de rato	16
Figura 2 - Figura esquemática do hipotálamo de rato	26
Figura 3 - Reserva hipotalâmica de glicogênio em P10 e P20	27
Figura 4 - Reserva hipotalâmica de glicogênio em P45	28
Figura 5 - Reserva hipotalâmica de glicogênio e identificação fenotípica de células	gliais
	29
Figura 6 - Reserva hipotalâmica de glicogênio em células imunomarcadas	com
anticorpo anti-vimentina	30
Figura 7 - Reserva hipotalâmica de glicogênio em células imunomarcadas com	
anticorpo anti-GLUT 2	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios para diagnóstico de Síndrome Metabólica	6
Quadro 2 - Peso dos animais controle e dieta nas diferentes idades estudadas	s ± desvio
padrão	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Animais utilizados	19
Tabela 2 - Composição e modo de preparo da ração artesanal utilizada	20
Tabela 3 - Composição das rações comercial e manipulada	21

LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Ácido graxo
AGL	Ácido graxo livre
AgRP	Peptídeo relacionado a agouti
ARC	Núcleo arqueado
ATP	Trifosfato de adenosina
CART	Transcrito regulado por cocaína e anfetamina
ССК	Colecistoquinina
CFS	Fluído cerebroespinhal
DAB	Diaminobenzidina tetraidroclorido
DMH	Hipotálamo dorso medial
EM	Eminência média
EME	Eminência média externa
EMI	Eminência média interna
GFAP	Proteína ácida fibrilar de glia
GLP1	Peptídeo similar ao glucagon
GLUT2	Proteína transportadora de glicose 2
GS	Glicogênio sintase
IL	Interleucina
IGFI	Fator de crescimento similar à insulina 1
IGFII	Fator de crescimento similar à insulina 2
IMC	Índice de massa corporal
LH	Hipotálamo lateral
MBP	Proteína básica de mielina
MCP1	Proteína 1 quimiotática de monócito
NPY	Neuropeptídeo Y
MSH	Hormônio estimulador de monócito
NTS	Núcleo do trato solitário
OCT	Meio ótimo para inclusão
ON	Óxido nítrico

- P10 Décimo dia de vida pós-natal
- P11 Décimo primeiro dia de vida pós-natal
- P16 Décimo sexto dia de vida pós-natal
- P20 Vigésimo dia de vida pós-natal
- P45 Quadragésimo quinto dia de vida pós-natal
- PBS Salina tamponada com fosfato
- PE Peri-ventricular
- PPG Proteína para glicogênio
- POMC Pro-opiomilanocortina
- PVN Núcleo paraventricular
- PYY Hormônio derivado de célula L
- SNC Sistema nervoso central
- TG Triglicerídeo
- TNF α Fator de necrose tumural α
- VIP Pepitídeo vasoativo intestinal
- VMH Núcleo hipotalâmico ventro-medial
- WHO Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Fome e desnutrição	1
1.2	Programação metabólica	2
1.3	Obesidade e Síndrome Metabólica	4
1.3.1	Controle da fome e saciedade	9
1.3.2	Malnutrição protéica e hipotálamo	11
1.4	Glicogênio	12
1.5	Tanicitos	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2.	Objetivos específicos	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Animais	19
3.2	Dieta	19
3.3	Perfusão	21
3.4	Criosecção	22
3.5	Histoquímica do PAS	22
3.6	Imunohistoquímica	23
3.7	Terminologia	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Desenvolvimento ponderal	25
4.2	Reservas de glicogênio	25
5	DISCUSSÃO	31

6	CONCLUSÕES	35
7	REFERÊNCIAS	36

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Fome e Desnutrição

A fome está intimamente relacionada com a dificuldade de acesso ou falta de alimentos para contemplar a quantidade de energia requerida para a manutenção do organismo e execução das atividades diárias de um indivíduo. Já a desnutrição é resultado da inadequação quantitativa e/ou qualitativa dietética ou de doenças como infecções que provem sinais clínicos característicos (Monteiro, 1995; Sawaya e cols., 2003).

A avaliação do estado nutricional de crianças deve ser realizada utilizando-se os indicadores peso e estatura para a idade (OMS, 1995). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de um terço das mortes infantis no mundo pode ser atribuída à desnutrição, sendo a pobreza a causa central desta. Segundo estimativa da OMS, cerca de 178 milhões de crianças no mundo têm retardo no crescimento decorrente de desnutrição (OMS, 1995). Os dados da Pesquisa Nacional sobre Demografia de Saúde (PNDS) do IBGE de 1996, complementam que as crianças são as mais afetadas por desnutrição, variando entre 8,1 e 27,3% do total de crianças no Brasil, dependendo da região (PNDS, 1996).

Já entre as mulheres, o índice de massa corporal (IMC) abaixo do valor normal, ou seja, 18,5 Kg/m2, perfazem entre 10 a 19% na maioria dos países, segundo a WHO. Tal problema se torna mais evidente em países da África Sub-Sahariana e sudeste e centro-sul da Ásia, onde os valores se aproximam de 20% (Onis e cols., 1993). No Brasil, em crianças menores de cinco anos, o déficit severo de peso para altura, peso abaixo de 3 desvios-padrão, está em torno de 3,5 % em países em desenvolvimento (Monteiro, 1995).

Durante a segunda guerra mundial em 1940, os países baixos foram invadidos por tropas alemãs as quais impuseram um embargo no transporte de mercadorias e alimentos. Como resultado, no ano seguinte, ocorreu racionamento de alimento com escassez de gêneros alimentícios para toda a população. Esta recebia em torno de 1500Kcal/dia por volta de setembro de 1944. Como a produção local de alimentos era muito baixa, o embargo levou rapidamente à falta de alimentos, resultando em fome principalmente nas grandes cidades de Amsterdam, Rotterdam, Hague, Utrecht, Leiden e Haarlem. Em fevereiro de 1945, os alimentos disponíveis eram pães, batatas, beterrabas, sendo a oferta de alimento ainda menor, em torno de 1000 Kcal/dia. A fome teve seu pico nas 4 semanas anteriores à libertação que ocorreu em maio de 1945 quando o avanço das forças aliadas separou totalmente a região oeste do resto do território. Este período ficou conhecido como o "inverno de fome" (Dutch famine) e resultou na morte de 20.000 pessoas por causas relacionadas à mesma. Há uma grande importância acadêmica deste período para o entendimento dos efeitos da carência nutricional sobre o desenvolvimento do individuo, principalmente por sua precisão em termos de circunstância, tempo e severidade da mesma (Susser e cols., 1998).

Processos fisiopatológicos semelhantes aos evidenciados pelos estudos com sobreviventes do "inverno da fome holandês" provavelmente acometem à população malnutrida do Brasil e do mundo.

1.2 - Programação Metabólica

A hipótese que postula que doenças crônicas na fase adulta possam ter origem fetal ou pós-natal vem sendo corroborada em estudos epidemiológicos como os do "inverno de fome holandês" e dados experimentais. Fatores ambientais, principalmente nutricionais, durante os primeiros momentos da vida tornam o individuo mais suscetível a doenças cardiovasculares e metabólicas na fase adulta (Barker e cols., 1990; Barker e cols., 2002; Barker e cols., 2005a; Barker, 2005b). Os primeiros achados dessa relação são de 1934 com o trabalho de Kermack e colabores (1934), onde foi concluído que melhores condições ambientais na infância resultam em menores taxas de mortalidade.

Uma série de mecanismos foi proposta para elucidar tal processo (para revisão ver McMillen e Robinson, 2005). Hales e Barker (1992) sustentam a hipótese do fenótipo poupador (thrifty phenotype), a qual sugere que o ambiente fetal pobre induz uma resposta adaptativa que favorece o desenvolvimento de alguns órgãos em detrimento de outros, alterando o metabolismo pós-natal, com o intuito de aumentar a sobrevida em situações de carência constante ou intermitente de nutrientes. Entretanto, tais adaptações

tornam-se prejudiciais quando o ambiente pós-natal é mais abundante em nutrientes (Hales e Barker, 2001).

Esse conceito de adaptação embrionária, em resposta à situação nutricional, resultando em consequências não reversíveis se encaixa perfeitamente na definição de programação metabólica proposta por Lucas (1991). Tal definição contempla ainda que, se um insulto ocorrer em uma janela crítica do desenvolvimento, isto pode levar a alterações funcionais persistentes.

O termo impressão metabólica também tem sido usado para descrever o fenômeno metabólico que relaciona o estado nutricional embrionário e/ou dos primeiros momentos de vida com desfechos de saúde na fase adulta. Tal processo é caracterizado por: i) susceptibilidade restrita a determinado período no desenvolvimento, chamado de janela crítica ontogênica; ii) efeito persistente até a fase adulta; iii) desfecho específico variável quantitativamente entre indivíduos; iv) relação dose-dependente entre exposição e desfecho (Waterland e Garza, 1999).

Uma segunda hipótese é a da plasticidade evolucionária (Barker, 2004). Esta hipótese foi proposta com base no conceito de que um genótipo é capaz de produzir mais de um estado fisiológico em resposta ao tipo de ambiente no qual o indivíduo foi exposto. Essa capacidade é conhecida em diversos animais e em processos fisiológicos e a influência materna em resposta a situação ambiental pode ser notada nas gerações seguintes, não somente na prole (Bateson e cols., 2004). Se um indivíduo for exposto durante o desenvolvimento à alta oferta de alimentos, quanto melhor for a sua situação nutricional na vida adulta melhor será sua saúde, porém se a situação nutricional no desenvolvimento for pobre e tornar-se rica na fase adulta pior será sua condição de saúde (Bateson e cols., 2004). A plasticidade evolucionária estabelecida durante o desenvolvimento representa uma vantagem adaptativa imediata, porém inapropriada em ambientes diferentes em longo prazo (Gluckman e Hanson, 2004).

Um indicador do desenvolvimento fetal e do aporte nutricional para o embrião é o peso ao nascer. O baixo peso ao nascer é definido quando a criança apresenta massa corporal inferior a 2,5 kg (OMS, 1995). Outro indicador é o tamanho para a idade gestacional, entretanto variáveis importantes devem ser consideradas ao avaliar o desenvolvimento fetal, como

a influência genética sobre tais indicadores (Lee e cols., 2003). Está bem estabelecido que o crescimento fetal é limitado pelo tamanho da mãe e sua capacidade de ofertar nutrientes, fenômeno conhecido como coação materna (Thame e Wilks, 1997). No entanto, grandes alterações nutricionais sofridas pela mãe são repassadas em menor intensidade para o feto, pois a placenta tem grande capacidade de ajustar o transporte de nutrientes (Harding, 2001). Outro importante fator é a qualidade da alimentação materna, estudos realizados em uma população relativamente bem nutrida mostraram que a combinação de dieta rica em carboidratos durante o início da gravidez e pobre em proteína no fim da gestação foi associada com baixo peso ao nascer e placenta reduzida (Godfrey e cols., 1996; Godfrey e cols., 1997). Portanto, existe uma forte correlação entre o estado nutricional materno e o fetal.

O tamanho ao nascer tem sido associado com a insulina, com o fator de crescimento similar à insulina I e o II (IGFI e II) e com suas proteínas ligantes e receptores do IGFII no plasma do cordão umbilical (Matsuda e cols., 1997). A desordem na secreção ou ação da insulina pode justificar o rápido ganho de peso ("catch up") observado em jovens que tiveram restrições na fase fetal seguida de alimentação normal na fase pós-natal. Ong e colaboradores (2000), em um estudo de coorte, viram em uma população relativamente bem nutrida que o rápido ganho de peso e baixo ganho de peso ("catch down") ocorrem em aproximadamente 30 e 25% dos indivíduos, respectivamente, sendo que o restante continua no mesmo percentil de origem ao nascer. Os que apresentaram rápido ganho de peso foram os com o menor peso e altura ao nascer, que tinham pais altos e mães que apresentaram baixo peso ao nascer. Segundo Karlberg e colaboradores (1995), aproximadamente 90% das crianças que nasceram pequenas para a idade gestacional apresentavam algum crescimento acelerado nos 6 primeiros meses de vida. Em comunidades ricas, crianças com baixo peso ao nascer que apresentaram o rápido ganho de peso cedo, tendem a ter aumento do IMC e da massa adiposa (Ong e cols., 2000).

1.3 Obesidade e Síndrome Metabólica

A obesidade é a doença metabólica mais comum no mundo, sua prevalência tem aumentado nas ultimas décadas em todo o mundo (McClean e

cols., 2008). No Brasil, sendo mais incidente nas classes sociais com menor renda, que também apresentam maiores taxas de desnutrição materno-infatil (Monteiro e cols., 2004). Definida como "acúmulo de gordura excessivo ou anormal que pode ser prejudicial à saúde", estimativas da OMS declaram que em 2015, o excesso de peso acometerá cerca de 2,3 bilhões de pessoas e destas, 700 milhões de adultos serão obesos, o que representará aproximadamente 10% da população mundial. (WHO, 2006). O método de avaliação mais usado em trabalhos epidemiológicos e na prática clínica é o Índice de Massa Corporal (IMC) que corresponde ao peso em quilogramas sobre a altura em metros elevado ao quadrado. Para adultos, valores entre 18,5 e 24,9 Kg/m2 são considerados normais, entre 25 e 29,9 Kg/m2 sobrepeso e acima de 30 Kg/m2 obesidade. (para revisão ver Fomigueira e Canton, 2004).

A obesidade é fator de risco para a Síndrome Metabólica (SM), que se caracteriza pela ocorrência simultânea de anormalidades metabólicas como intolerância a glicose, dislipidemia, hipertensão, podendo acarretar em problemas individuais, como risco aumentado de doenças cardiovasculares e diabetes, acidente vascular encefálico, alguns tipos de câncer e morte prematura. (Valdez e cols; 1994; Chan e cols., 1994; Krauss e cols., 1998; Rexrode e cols., 1997; Kurth e cols., 2002; Calle e Kaaks, 2004; Calle e cols., 2003; Hu e cols., 2004; Lee e cols., 1993). Nos EUA, é estimado que cerca de 24% da população apresenta SM, e com o envelhecimento da população esse valor deve elevar-se (Ford e cols., 2002). A síndrome metabólica é diagnosticada em um indivíduo quando ao menos três dos cinco critérios a seguir são encontrados: 1 obesidade abdominal avaliada pelo aumento na circunferência do abdômen; 2 pressão arterial aumentada: 3 hipertrigliceridemia; 4 hiperglicemia; 5 redução no HDL colesterol (Quadro 1) (ATPIII, 2001). Algumas alterações metabólicas como disfunção endotelial, inflamação sistêmica, aumento no estresse oxidativo e estado pró-trombótico também podem ser encontradas, mas não são critérios diagnósticos.

Critérios para diagnóstico de Síndrome Metabólica				
Glicemia de jejum	≥110 mg dl⁻¹			
Circunferência da cintura				
Homens	> 102 cm			
Mulheres	> 88 cm			
Trigliceridemia	≥ 150 mg dl ⁻¹			
HDL colesterol				
Homens	< 40 mg dl⁻¹			
Mulheres	< 50 mg dl⁻¹			
Pressão sanguínea	≥ 130/85 mmHg			

Quadro 1 - Adaptado de adult Treatment Panel III (2001)

O Diabetes Mellitus (DM) compreende um grupo de desordens metabólicas que convergem para um quadro comum de hiperglicemia, e diversos tipos de DM já foram descritos. Dependendo de sua etiologia, fatores como resistência a insulina, redução de secreção/produção de insulina, menor captação de glicose, e/ou aumento na produção de glicose são responsáveis pela hiperglicemia.

A classificação é baseada na sua patogenia: tipo 1 onde há destruição das células β por ataque autoimune ou causa desconhecida, levando a deficiência de insulina; tipo 2 compreende desordens caracterizadas por níveis diferentes de resistência a insulina, alteração na secreção de insulina e aumento na produção de glicose; defeitos genéticos na ação/secreção de insulina; distúrbios metabólicos que levam a alteração na secreção de insulina; endocrinopatias induzidas por fármacos; síndromes genéticas; e anormalidades mitocôndriais.

O DM tipo 2 tem íntima relação com obesidade e a supernutrição crônica associada à predisposição genética e ao sedentarismo, que levam a alterações na sinalização de insulina. Tais alterações são resumidas em resistência a insulina, que passa a não desempenhar de maneira efetiva seu papel como hormônio associado à abundância de energia. Quando existe abundância de energia proveniente da alimentação, em especial carboidratos, a insulina é secretada em grandes quantidades para estimular seu armazenamento, no caso da glicose, na forma de glicogênio no músculo e fígado principalmente, ou convertida em ácidos graxos. (para revisão ver Deborah e cols., 2008).

A alteração na sensibilidade à insulina pode ser resultado do aumento da massa adiposa. Em indivíduos magros, os adipócitos possuem uma grande capacidade de sintetizar e armazenar triglicerídeos (TGs) durante a alimentação, da mesma forma que oxidá-los e liberá-los durante o jejum (Rosen e Spiegelman, 2006; Kalderon e cols., 2000). Dentro da célula, os ácidos graxos são esterificados com a coenzima A para reduzir suas propriedades detergentes e tóxicas, e são rapidamente oxidados na mitocôndria. Nesses indivíduos a sensibilidade à insulina e captação de glicose no músculo esquelético é normal. Em situação de hiperfagia indutora de obesidade, com aumento da quantidade de calorias ingeridas e redução da atividade física, os adipócitos aumentam devido ao acúmulo de triglicerídeos. Em estágios iniciais, tais adipócitos continuam com atividade normal, mantendo taxas de lipólise basais durante o jejum (Christianson e cols., 2007; Frayn e cols., 1994). Os níveis de ácidos graxos livres aumentam e a sensibilidade muscular a insulina se mantém. Nesse momento já começa a se estabelecer o quadro de dislipidemia.

Conforme os adipócitos aumentam, sua habilidade como células endócrinas se torna afetada (Qatanani e Lazar, 2007; Rajala e Scherer, 2003; Kershaw e Flier, 2004). Nesse momento, moléculas que regulam indiretamente o metabolismo de triglicerídeos (TG) e ácidos graxos (AG) estão alteradas, como a Proteína 1 quimiotática de monócito (MCP1) e o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF α). O adipócito hipertrofiado libera grandes quantidades de MCP1 (Sartipy e Loskutoff, 2003), que atrai macrófagos para o tecido adiposo, contribuindo para o estado pro-inflamatório em obesos (Curat e cols., 2004). Macrófagos e adipócitos secretam nesse momento mais MCP1 e outras citocinas inflamatórias como a interleucina 1 Beta (IL1 β) e o TNF α . O resultado sobre o adipócito é um aumento na lipólise e decréscimo na síntese de triglicerídeos, favorecendo o aumento de AG livres no plasma. Que ao se acumularem no tecido muscular esquelético, hepatócitos e células β na forma de cadeias longas de ácidos graxos ligados a acil-CoA éstereficada (LC-CoAs)

desempenham papel de disruptor metabólico (Unger, 1995; Unger, 2002), contribuindo então para a abertura do quadro de DM.

O DM e a dislipidemia são as principais comorbidades apresentadas por pacientes com hipertensão arterial sistêmica, caracterizada por aumento crônico da pressão arterial em repouso. No estudo populacional realizado em Banbuí, cidade de Minas Gerais, foi observado que somente de 6% a 8% dos hipertensos não apresentavam outras comorbidades. E de 31% a 42% dos hipertensos, dependendo da faixa etária, apresentavam três ou mais fatores de risco para acidente coronariano, sendo a dislipidemia e o DM os principais (Barreto e cols., 2001).

O aumento do LDL-colesterol plasmático, um indicador de dislipidemia, aumenta a expressão do receptor 1 de angiotensina (AT1) em células musculares lisas do endotélio (Nickenig e cols., 1997), e da enzima conversora de angiotensina (John, 1999). Essas duas alterações recorrentes da dislipidemia favorecem a disfunção endotelial e o aumento no estresse oxidativo (Nickenig e Harrison, 2002a, Nickenig e Harrison, 2002 b). Esse aumento no estresse oxidativo associado ao estado pró-inflamatório do individuo dislipidêmico e ou obeso favorecem o inicio do processo arterosclerótico (para revisão ver Sposito, 2004), o ajuda a explicar a alta incidência de acidentes cardiovasculares em indivíduos com SM.

Intervenções não farmacológicas como redução do sedentarismo, perda de massa corporal, redução no consumo de sal e aumento no consumo de alimentos ricos em potássio, vêm se mostrando eficientes em pacientes com SM, (Appel, 2003). Estudos que utilizaram a dieta Dash, uma dieta escassa em gorduras saturadas e rica em frutas, vegetais e micronutrientes, mostraram que os indivíduos não hipertensos podem reduzir a pressão sistólica em 3,1 mmHg e em hipertensos a queda pode chegar a 11,4 mmHg (para revisão ver Appel e cols., 1997). Kwnowler e colaboradores (2002) em um estudo de coorte mostraram que em indivíduos com intolerância à glicose a atividade física e a perda ponderal de peso são intervenções eficientes compatíveis com o tratamento farmacológico com a metformina.

1.3.1 - Controle da Fome e Saciedade

As primeiras evidências de controle hipotalâmico da fome vêm de cirurgias experimentais (lesões) no hipotálamo lateral (LH) que acarretavam em afagia. Já lesões experimentais no hipotálamo medial (DMH) geravam hiperfagia e obesidade. Destes estudos surgiram os termos "Centro da fome" e "Centro da Saciedade". Tais termos foram contestados posteriormente, pois os hiperfágicos com o tempo se estabilizavam em um novo peso superior ao précirúrgico e os afágicos, se alimentados forçadamente para prevenir a morte atingiam um peso de equilíbrio abaixo do pré-cirúrgico e não morriam de fome (Card e cols., 1999).

Se esses núcleos influenciavam, porém não determinavam por completo o processo de fome-saciedade; outros processos deveriam estar envolvidos. Thomas e Mayer (1968) relacionaram o tempo entre as refeições com a quantidade de alimento ingerido, ou seja, se um animal comia muito, o intervalo para a próxima refeição seria longo, mas um longo período de jejum não determinava a quantidade de alimento a ser ingerido na próxima refeição. A vista disso sugeriu-se que os outros processos envolvidos deveriam ser periféricos.

Atualmente são conhecidos diversos sinais de saciedade: nervoso, proveniente da cavidade oral, que leva informação através do núcleo do trato solitário e do córtex gustatório; nervosos vagais, eferentes do estômago, que assinalam o seu enchimento pela distensão da parede gástrica, repassando a informação ao HL pelo núcleo do trato solitário; hormonal, pela secreção de colecistocinina (CCK), liberado pelo estômago agindo sobre o núcleo do trato solitário e área postrema, somando-se ao estímulo vagal. Outros exemplos de hormônios são glucagon, leptina, neurotensina e a bombesina.

A palavra leptina é uma tradução da palavra grega leptos que significa magro, e recebeu esse nome por causa do seu efeito anti-obesidade, primeira função creditada a esse hormônio. A glicemia pós-prandial aumentada é um potente estimulador da secreção de insulina e leptina. Esses hormônios sinalizam a quantidade de energia acumulada no organismo. A leptinemia é proporcional à massa de tecido adiposo, portanto funciona como um sinal de

"controle de estoque". Esses hormônios reduzem o apetite por ação hipotalâmica. (Cintra e cols., 2007).

O núcleo arqueado (ARC) tem papel fundamental no processo de percepção, pois está localizado próximo à eminência média e essa região apresenta alterações na barreira hematoencefálica (Broadwell e Brightman, 1976). Alguns hormônios periféricos como peptídeo YY (PYY) e peptídeo similar ao glucagon 1(GLP1) são capazes de atravessar a barreira através de mecanismos não saturáveis. (Nowak e cols., 2000; Kastin e cols., 2002), entretanto outros sinais como leptina e insulina são transportados por mecanismos saturáveis (Banks e cols., 1996; Banks, 2004). O ARC possui duas populações primárias de neurônios, uma inibe a hiperfagia através da secreção de pro-opiomilanocortina (POMC) e transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART) (Elias e cols., 1998; Kristensen e cols., 1998), e a outra estimula a ingestão através da sinalização de neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado a agouti (AgRP) (Broberger e cols., 1998; Hahn e cols., 1998).

O NPY reflete o estado nutricional do indivíduo, os níveis RNAm de NPY e sua secreção aumentam no jejum e decrescem após as refeições (Sanacora e cols., 1990), assim como o AgRP (Swart e cols., 2002). Os neurônios NPY+ projetam-se para o núcleo paraventricular (PVN) ipsolateral (Bai e cols., 1985). Injeções repetidas de NPY nesse núcleo levam a hiperfagia e obesidade (Stanley e cols., 1986; Zarjevski e cols., 1993) e aumento na insulinemia e cortisoloemia independente do aumento no consumo alimentar (Wynne e cols., 2005).

O POMC é um precursor de melanocortinas, sendo o principal hormônio estimulador de melanócitos (MSH), e também reflete o estado energético do corpo. Durante o jejum os níveis de RNAm do POMC estão reduzidos e aumentam com administração exógena de leptina ou alimentação (Schwartz e cols., 1996). Receptores de MSH encontram-se no ARC, VMH e PVN (Harrold e cols., 1999; Mountjoy e cols., 1994) e reduções na expressão (Fan e cols., 1997; Lubrano-Berthelier e cols., 2003a; Lubrano-Berthelier e cols., 2003b) ou polimorfismos (Argyropoulos e cols., 2002) levam à obesidade. O AgRP atua como antagonista ao receptor MSH bloqueando a redução do

consumo de alimentos promovendo aumento no consumo alimentar. (Rossi e cols., 1998).

O CART é co-expresso com o MSH no ARC (Elias e cols., 1998; Kristensen e cols., 1998) e em situações de restrição alimentar há redução em seus níveis de RNAm (Kristensen e cols., 1998). Esses neurônios projetam-se para o HL e para PVN (Couceyro e cols., 1997).

Esses são os principais responsáveis pelo sistema de controle hipotalâmico da fome e saciedade através dos núcleos ARC, VMH, PVN, HL e DMH. Neurônios NPY/AgRP e POMC/CART positivos do ARC emitem projeções para os núcleos PVN, HL e DMH. (Elias e cols., 1998; Elmquist e cols., 1998; Kmiec., 2006). Quando temos um aumento da massa adiposa, a leptina e a insulina estimulam os neurônios POMC no ARC que aumentam a expressão e secreção de Amsh no PVN e LH resultando em redução no consumo alimentar. Esses hormônios periféricos também inibem os neurônios NPY/AgRP+ no ARC que, ao deixarem de secretar estes peptídeos, reduzem a inibição da via das melanocortinas favorecendo ainda mais a afagia. Porém, com a redução de massa adiposa, temos redução de leptina e insulina, o que gera o estímulo dos neurônios NPY/AgRP+, que antes estavam inibidos. Esses neuropeptídeos estimulam a ingestão de alimentos diretamente e indiretamente por inibir o receptor de Amsh. A produção de melacortinas está reduzida, pois os neurônios POMC+ estão inibidos nessa situação metabólica (Kmiec, 2006). A partir desse equilíbrio dinâmico ocorre a manutenção da massa corporal.

1.3.2 - Malnutrição protéica e hipotálamo

Moura e colaboradores. (2002) utilizaram um modelo experimental onde as ratas lactantes eram submetidas a uma dieta aprotéica durante os 10 primeiros dias de lactação. Após este período, estas ratas recebiam ração comercial com o conteúdo padrão de proteínas. Os filhotes era então avaliados em diferentes idades do desenvolvimento. Moura e colaboradores. (2002) observaram então que os animais experimentais apresentaram maiores leptinemia e insulinemia em P10, somente retornando aos níveis normais na fase adulta em P60. Além disto, estes animais apresentaram maior susceptibilidade ao desenvolvimento de SM. Em nosso laboratório utilizando o mesmo protocolo de dieta, Marcelino e colaboradores (2004), observaram um atraso na expressão da óxido nítrico sintase em alguns núcleos hipotalâmicos envolvidos com o controle do metabolismo energético nos animais malnutridos. A circuitaria hipotalâmica responsável pelo controle da fome e saciedade em roedores ainda está se desenvolvendo em idades pós-natais precoces. As projeções eferentes do ARC de fibras NPY/AGRP somente chegam aos núcleos hipotalâmicos aferentes entre P11 e P16 (para revisão ver Grove e Smith, 2003). Para formar adequadamente os circuitos neurais é de fundamental importância a estabilização das sinapses e o óxido nítrico tem importante participação na sinaptogênese durante o neurodesenvolvimento (Gally e cols., 1990). Estes dados sugerem que a malnutrição possa estar afetando o desenvolvimento dos circuitos neurais hipotalâmicos que poderiam regular o metabolismo energético.

1.4 - Glicogênio

O glicogênio é um polímero ramificado relativamente grande de glicose classificado como um polissacarídeo. As moléculas de glicose estão ligadas em sua maioria pelos carbonos 1 e 4 de forma linear, e em geral existe a cada 8 moléculas uma ligação entre o 6º e o primeiro carbono, originando assim as ramificações. Essa estrutura espacial favorece a solubilidade e permite a liberação simultânea de mais moléculas de glicose.

O glicogênio, localizado no citoplasma, na forma de grânulos com diâmetros variáveis entre 10 e 40 nm (Brown, 2004), é armazenado principalmente no fígado e nos músculos esqueléticos, mas também é encontrado em outros locais como no encéfalo. Representando entre 1 e 2% do peso da musculatura esquelética, de 6 a 8% do fígado (Shulman e cols., 1995) e somente 0,1% do cérebro. Por apresentar quantidade tão pequena no cérebro, teve sua importância cerebral descartada, o que resultou em poucos estudos.

No cérebro o glicogênio é armazenado em neurônios e células gliais em concentrações que variam durante o desenvolvimento. Apenas certos neurônios do tronco cerebral, plexo coróide e região ependimal contêm glicogênio na fase adulta (Magistretti e cols., 1993). A maior parte do glicogênio cerebral está localizada nos astrócitos (Cataldo e Briadwell, 1986),

principalmente nas áreas com maior densidade sináptica, sugerindo uma relação com a atividade neuronal (Koizumi e Shiraishi, 1970a; Koizumi e Shiraishi, 1970b; Phelps, 1972). Sua distribuição pelas regiões do cérebro não é uniforme, por exemplo, estruturas na matriz cinzenta apresentam mais glicogênio do que na branca (Duffy e cols., 1972; Koizumi, 1974; Swanson e cols., 1989a).

A enzima glicogênio sintase (GS) está distribuída pelo cérebro, em maior quantidade no cerebelo, hipocampo e bulbo olfatório. Sua expressão é estimulada pelo peptídeo vasoativo intestinal (VIP) e noradrenalina (Pellegri e cols., 1996; Sorg e Magsitretti, 1992) que estimulam a síntese de proteínas, como a proteína para glicogênio (PPG) (Allaman e cols., 2000).

A PPG, abundante nos astrócitos, facilita a ligação da fosfatase 1 ao glicogênio resultando na desfosforilação e ativação da GS (Allaman e cols., 2000). A glicogênio fosforilase, também muito presente nos astrócitos, catalisa a degradação de glicogênio (Ignácio e cols., 1990; Pfeiffer e cols., 2003) apresentando-se na forma fosforilada ativa e desfosforilada inativa. Sua fosforilação é controlada por fosforilases quinases e por ligação alostérica com AMP e glicose, mostrando assim sensibilidade ao estado energético da célula (para revisão ver Brown, 2004).

O aumento do glicogênio cerebral é estimulado por glicose, IGF-1, IGF-2, insulina, glutamato, metionina, sulfoximina. (Magistretti e cols., 1999; Swanson e cols., 1989; Baskin e cols., 1987; Daniel e cols., 1977; Hamai e cols., 1999). O mais expressivo fator é a insulina, cuja concentração no parênquima cerebral é menor do que no plasma, de onde é transportada via barreira hematoencefálica por meio de transportadores específicos (Baskin e cols., 1987; Banks e cols., 1997). Chesler e Himwich (1944), em seu trabalho em cães com hipoglicemia induzida por insulina, mostraram que o glicogênio reduziu-se primeiro nas áreas com maior taxa metabólica e que esta redução depende mais da atividade metabólica do que dos níveis iniciais de glicogênio. O mesmo foi mostrado em coelhos (Goncharova, 1957).

Choi (2003), utilizando a técnica espectroscopia por ressonância nuclear magnética que permite a mensuração de glicose marcada incorporada ao glicogênio cerebral sem a necessidade de matar o animal, mostrou depleção do glicogênio cerebral em ratos anestesiados com hipoglicemia induzida, após

a glicose cerebral cair à zero. Quando a demanda por glicose excede a oferta ao cérebro, o glicogênio começa a ser degradado e, caso exista uma hipoglicemia crônica, a função cerebral reduz e lesões irreversíveis podem ocorrer (Auer, 1986; Frier e Fisher, 1999). Whatley e colaboradores (1981) observaram que culturas de neurônios apresentavam maior sobrevida na presença de células gliais, sugerindo uma relação metabólica entre eles. Em estudo subseqüente, Swanson e Choi (1993) determinaram que o estoque astrocitário de glicogênio era vital para manutenção de neurônios em cultura e não o número de astrócitos.

Cater e colaboradores (2001), em seu trabalho, incubaram fatias organotípicas de hipocampo de ratos durante quatorze dias em meio com 30mM de glicose, quantidade suficiente para aumentar consideravelmente os níveis de glicogênio. Após a retirada da glicose exógena, pelo período de uma hora, não foi observado efeito significativo sobre os picos de atividade emitidos pela população neuronal. Em preparações com nervo óptico isolado em meio sem glicose, o glicogênio pode manter a atividade neural por 30 minutos em ratos (Wender e cols., 2000). Os achados desses dois pesquisadores contradizem Siesjö (1978) e Clarke e Sokoloff (1999) que afirmam que o cérebro só se mantém por poucos minutos com a reserva de glicogênio.

Em casos de isquemia, onde a ausência de oxigênio é concomitante à de glicose, o lactato oriundo da degradação do glicogênio não pode ser oxidado. E nessa situação a função cerebral é mantida por pequenos períodos de tempo, pois a eficiência da via anaeróbica é baixa em comparação com a via aeróbica (Hansen, 1985). Baltan e colaboradores (2003) mostraram que a matriz branca cerebral é mais resistente a anóxia que a cinzenta, e a energia produzida anaerobicamente continua sendo insuficiente para manter a função celular por longos períodos.

O glicogênio cerebral acumula-se durante o sono (Karnovsky e cols., 1983). Em ratos o aumento chega próximo aos 70% em poucos minutos após indução de sono de ondas lentas (Benington e Hellre, 1995). A explicação mais plausível para esse fenômeno baseia-se nos transmissores que estimulam a glicogênio fosforilase como noradrenalina e serotonina, pois como são secretados em maior quantidade durante a vigília, é presumível que a

glicogenólise esteja mais estimulada durante esse período. Portanto, durante o sono a glicogênese ocorre com mais facilidade (para revisão ver Brown, 2004).

1.5 - Tanicitos

Grande parte do volume celular do sistema nervoso central é composta por células gliais. As glias participam de diversas funções durante o desenvolvimento, como: migração neuronal; controle da extensão, direcionamento, fasciculação e embainhamento de axônios; promoção da sinaptogênese; secretção de fatores tróficos que modulam a proliferação e diferenciação de neurônios e das próprias glias. E na fase adulta: manutenção do microambiente; mediação entre endotélio e SNC; metabolismo de neurotransmissores; e participação no sistema imunológico local.

Durante a formação do SNC, o tubo neural é formado por um epitélio pseudoestratificado, onde os núcleos das células estão em diferentes níveis e apresentam dois prolongamentos principais. O primeiro está voltado para o lúmem do tubo, os futuros ventrículos e canal central da medula. O segundo está voltado para a pia mater, meninges ou membranas que envolvem o encéfalo ou medula espinhal. As células do tipo glial radial primordial que durante o desenvolvimento atrofiam ou perdem o segundo tipo de prolongamento e desenvolvem o primeiro, tornam-se células ependimárias, que são cubóides ou colunares, constituindo uma monocamada que reveste os ventrículos. (para revisão ver Carvalho e cols., 2005).

As glias radiais primordiais que perderam o primeiro tipo de prolongamento e desenvolveram o segundo, tornam-se glias limitantes como os astrócitos subpiais. Os astrócitos do parênquima cerebral são formados por astrócitos subpias que desenvolveram um terceiro tipo de projeção que parte do corpo celular e está relacionado com o contato neuronal.

Durante o período perinatal uma subpopulação de glia radial diferencia-se em tanicitos, células que possuem funções fisiológicas similares a astrócitos e glias radiais, mas morfologia, expressão de moléculas e outras funções diferentes. Quatro subpopulações de tanicitos são distinguíveis: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$. Tais subtipos expressam moléculas que conferem algumas funções diferentes, como transportadores de glicose e glutamato; receptores de neuropeptídeos e hormônios periféricos; fatores de crescimento; prostaglandinas (para revisão ver Rodríguez e cols., 2005).

Os tanicitos β 1 estão localizados na região lateral baixa do terceiro ventrículo e são capazes de desenvolver processos que se conectam a capilares e neurônios do ARC. Já os β 2 localizam-se no assoalho do terceiro ventrículo e suas projeções podem se conectar à superfície da pia mater ou aos capilares da eminência média. A parte proximal desses tanicitos faz contato com o fluido cérebro-espinhal do terceiro ventrículo e, ao mesmo tempo, com as junções oclusivas presentes entre essas células, formam a barreira da eminência média. Os tanicitos α 1 e α 2 estendem-se pela parede lateral e dorsal do terceiro ventrículo e suas projeções conectam-se ao núcleo VMH (Figura 1) (para revisão ver García e cols., 2003).



Figura 1 Representação esquemática do hipotálamo de rato. As células diretamente identificadas são: 1) ependimócitos ciliados revestindo a parede rostral do terceiro ventrículo (3V); 2) Tanicitos α1,2 localizados na região dorsal da parede lateral do 3V; 3) Tanicitos β1 localizados na região inferior da parede lateral do 3V; 4) Tanicitos β2 localizados na eminência média (EM). Essas células formam a barreira eminência média-cerebroespinhal (Linha em

negrito). As projeções dos tanicitos β1 e β2 se conectam com os capilares porta-hipotalâmios da EM e "pars tuberalis" (indicados com V-) que se caracterizam pela ausência de barreira hematoencefálica. Existem evidências experimentais que tanicitos e neurônios da região inferior da parede do 3V expressam glucoquinases, receptor do peptídeo 1 similar ao glucagon (GLP-1) e canais de potássio sensíveis a ATP. Modificado de García e cols. (2003).

O transportador de glicose (GLUT2) e o canal de potássio sensível a ATP nas células β da ilhota pancreática são considerados parte fundamental do mecanismo de percepção dos níveis de glicemia (para revisão ver Schuit e cols., 2001). Os tanicitos também expressam tais proteínas, o que levou diversos autores a sugerirem que essas células possam ser responsáveis pelo mecanismo no qual o hipotálamo percebe alterações na concentração de glicose plasmática e do fluido cerebroespinhal do terceiro ventrículo (Alvarez e cols., 1996; Thomzig e cols., 2001).

2. OBJETIVO

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da desnutrição protéica durante um período restrito da amamentação sobre as reservas de glicogênio no hipotálamo de ratos machos Wistar.

2.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar as reservas de glicogênio no hipotálamo de ratos machos Wistar durante o desenvolvimento pós-natal;
- Comparar as reservas de glicogênio de ratos machos Wistar cujas mães sofreram desnutrição protéica na fase de lactação com animais cujas mães não sofreram desnutrição;
- Identificar que tipo de célula glial possui reservas de glicogênio no hipotálamo de ratos Wistar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos albinos da cepa Wistar, criados no biotério de animais do Depto de Farmacologia e Psicobiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. As fêmeas foram alimentadas com ração comercial (NUVILAB) ou ração manipulada. Após o nascimento, foi realizada a identificação do gênero com base na distância urogenital por profissional treinado. Somente ninhadas com seis ou mais animais foram utilizadas. Ainda no primeiro dia de vida pós-natal, as ninhadas foram reduzidas para seis animais, priorizando-se a manutenção dos machos. O grupo experimental (D) recebeu uma dieta manipulada em nosso laboratório, isenta de proteínas, a fim de estabelecer uma deficiência protéica. Já o controle recebeu dieta comercial (C). Todos os animais tiveram livre acesso à ração e água, em temperatura ambiente de 25 °C, e ciclo claro e escuro de 12 horas (7:00-19:00).

	P10		P10 P20		P30		P45		P60	
	С	D	С	D	С	D	С	D	С	D
Animais	17	20	9	10	15	15	5	4	5	5
Total	3	7	19		30)	9		10)

Tabela 1 Número de animais utilizados ("n") por de idade.

3.2 - Dieta

As nutrizes do grupo experimental receberam dieta comercial (NUVILAB) com 22% de proteínas, durante todo o período anterior ao parto, incluindo gestação e desenvolvimento. A dieta manipulada isenta de proteína (Tabela 2) era oferecida da data do parto até o décimo dia de vida da prole (P10), onde a dieta normoproteíca era restabelecida. As dietas divergem basicamente no percentual de proteínas e de carboidratos (Tabela 2), que estão aumentados a fim de compensar calóricamente a ausência de proteínas.

Tabela 2 Composição e modo de preparo da ração artesanal utilizada (adaptado de Costa, 2000).

Ingredientes	Mistura de sais			
Aderogil [®] (vitamina $D_3 e A$) 2 ml	Carbonato de Cálcio 87g			
Complexo B 15 ml	Fosfato de potássio dibásico 123g			
Vitamina K 1ml	Fosfato de Cálcio 28g			
Vitamina E 1m	Sulfato de magnésio 32g			
Vitamina C 5 ml	Cloreto de sódio 49g			
Vitamina B ₁₂ 1 ml	Citrato férrico 2g			
Ácido fólico 2 mg	lodeto de potássio 0,2g			
Óleo de soja 50 ml	Sulfato de manganês 0,2g			
Mistura de Sais 32 g	Sulfato de zinco 0,09g			
Maisena 900 g	Sulfato de cobre 0,09g			
Misturar os sais e a Maizena [®] , reservar. Diluir as vitaminas no óleo e acrescenta-los a mistura. Adicionar água destilada até dar o ponto para formar o biscoito, para então assar.				

Nutrientes	Nutrilab	Manipulada
Proteína	22%	0%
Carboidratos	72,6%	88,9%
Lipídeos	5,4%	11,1%
Kilocalorias	4,21 Kcal/g	4,05 Kcal/g
Vitamina A	12.000 Ui	11.000 Ui
Vitamina D ₃	1.800 Ui	2.000 Ui
Vitamina E	30 mg	40 mg
Vitamina K ₁		10 mg
Vitamina B1	5 mg	5 mg
Vitamina B2	9 mg	10 mg
Vitamina B6	7 mg	10 mg
Vitamina B12	20 mg	20 mg
Ácido Fólico	1 mg	2 mg
Biotina	1,5 mg	2,5 mg
Nicotinamida		50mg
Niacina	60 mg	60 mg
Ácido Pantotênico	20 mg	25 mg
Ferro	50 mg	50 mg
Zinco	60 mg	58 mg
Cobre	10 mg	10 mg
Manganês	60 mg	50 mg
Cálcio		4207 mg
Potássio	*	2765 mg
Sódio	*	1226 mg
Magnésio	*	606 mg

Tabela 3 Composição das rações comercial e manipula (Adaptado de Costa, 2000).

* dados não informados.

3.3 - Perfusão

A perfusão dos animais, somente machos, foi realizada entre as 9h e 11h da manhã, a fim de evitar a influência circadiana sobre a reserva de glicogênio. Primeiramente, os animais foram anestesiados com éter, tiveram sua caixa toráxica aberta por remoção do gradil costal para exposição do coração. As soluções da perfusão foram infundidas no ventrículo esquerdo por intermédio de uma cânula. Uma incisão realizada no átrio direito permitia o escoamento do sangue e das soluções após passarem pelo corpo. A primeira solução injetada, uma solução salina 0,9%, visava à remoção do sangue do animal sem provocar coagulação sanguínea. A segunda solução, tampão fosfato 0,1M pH7,4 com

4% de paraformaldeído, realizava a fixação dos tecidos. Posteriormente a solução fixadora acrescida de sacarose a 10%, iniciava a crioproteção. A salina foi injetada em temperatura fisiológica a fim de reduzir a vasoconstricção, e as demais foram mantidas resfriadas a uma temperatura em torno de 4°C durante todo o processo de perfusão.

Ao término da perfusão, iniciava-se a dissecção do cérebro, para que esse fosse mantido em uma solução fixadora acrescida de 10% de sacarose por 1 hora a 4°C e depois transferido para uma solução de tampão fosfato 0,1M pH7,4 acrescido de sacarose a 20% durante a noite a 4°C.

3.4 - Criosecção

A criosecção foi iniciada 22 horas após o fim da perfusão para que todas as amostras fossem expostas ao mesmo tempo de crioproteção. Para realizar a criosecção, cérebros foram aparados para serem cortados no plano coronal e embebidos em meio de inclusão (OCT tissue tek). O cérebro era colocado em recipientes de papel alumínio e cobertos com o OCT, para então serem congelados em nitrogênio líquido e cortados entre 13 e 30 µm em um criótomo a -25°C. Os cortes foram recolhidos em lâminas gelatinizadas de modo seriado. O atlas de Paxinos e Watson (1998) foi utilizado para auxiliar a identificação das regiões do cérebro.

3.5 - Histoquímica do ácido periódico de Shiff

A técnica do ácido periódico de Shiff (PAS) desenvolvida por Rosenberg e Dichter (1985) para detecção de glicogênio em cultura de células dissociadas foi minimamente alterada para permitir sua utilização em fatias de tecido cerebral de gambá por Barradas e colaboradores. (1989) e Cavalcante e Barradas (1996).

Protocolo este utilizado em nosso trabalho. As lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto a -20°C por 2 horas e, em seguida, transferidas para solução de etanol 80% para serem reagidas pelo método desenvolvido por Rosenberg e Dichter (1985): os cortes foram oxidados em ácido periódico a 1% dissolvido em etanol 80% por 1h, em seguida as lâminas
foram lavadas em etanol 80% e coradas com fucsina básica a 1%. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e clarificadas em xilol, quando então foram montadas usando Entellan® como meio.

Protocolo para técnica PAS para glicogênio:

- 1- Álcool absoluto a -20°C por 1h
- 2- Lavagem em álcool 80% por 1'
- 3- Periodato de Na 1% em álcool 70% por 1h
- 4- Lavagem em álcool 70% (2X) por 1'
- 5- Corar com fucsina de Rosenberg (no escuro) por 30'a 60'
- 6- Lavagem em álcool 80% por 1'

7- Álcool 90% por 3'

- 8- Álcool 95% por 3'
- 9- Álcool 90% por 3'
- 10- Álcool absoluto (2X) por 3'
- 11- Xilol PA (2X) por 3'
- 12- Montar com Entellan®

3.6 - Imunohistoquímica

Foram realizadas reações para imunoidentificação de Proteína Básica de Mielina (MBP), Vimentina, Proteína Transportadora de Glicose 2 (GLUT2) e Proteína Ácida Fibrilar de Glia (GFAP).

As lâminas com cortes adjacentes aos reagidos pela histoquímica (que foram guardadas a -20°C) foram lavadas com o tampão fosfato salina (PBS) em pH 7,4 acrescido de Triton 0,3%. Em seguida, foram incubadas em soro normal de cabra 10% (NGS) ou soro bovino 5% (BSA) em PBS pH 7,4 por 2h em temperatura ambiente. As lâminas destinadas à reação contra MBP passaram antes por metanol a -20°C durante meia hora de forma a facilitar a penetração do anticorpo, antes da lavagem com PBS Triton 0,3%. Após a incubação com NGS ou BSA, as lâminas foram escorridas e os cortes

incubados com o anticorpo primário (anti-Vimentina, anti-MBP, anti-GLUT2 ou anti-GFAP) por período de uma noite a 4°C.

No dia seguinte as lâminas ambientavam por uma hora para então serem lavadas em PBS. Depois foram incubadas por 1h em temperatura ambiente (25°C) com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (MBP e Vimentina), anti-IgG de coelho (GFAP) ou anti-IgG de burro (GLUT2) conjugados a biotina. As lâminas então foram lavadas novamente com PBS para então os cortes serem reagidos com o último reagente, a extravidina conjugada com peroxidase ou CY3 (cromógeno fluorescente) por uma hora.

A revelação dos cortes reagidos com extravidina conjugada a peroxidase ocorria com o uso do 3,3' diaminobenzidina tetraidroclorido (DAB). Depois de lavadas em tampão fosfato 1M, pH 7,4 e água destilada as lâminas secavam durante a noite. Posteriormente os cortes foram desidratados com concentrações crescentes de álcool e clarificados em xilol. Ao final, as lâminas foram montadas utilizando Entellan® como meio. Os cortes reagidos com extravidina conjugada com CY3 foram lavados com PBS e as lâminas foram montadas utilizando N-propilgalato como meio.

As lâminas foram observadas e fotografadas sob iluminação de campo claro ou fluorescência em um microscópio Olympus RX40 (Tokyo, Japan).

3.7 - Terminologia

A identificação da citoarquitetura e a terminologia das áreas do hipotálamo seguiram os critérios estabelecidos por Paxinos e Watson (1998) para animais adultos.

4. RESULTADOS

4.1 - Desenvolvimento Ponderal

Neste estudo foi utilizado um total de 107 animais dos quais 50 animais fizeram parte do grupo controle e 57 do grupo dieta. As idades estudadas variaram entre P10 e P60 (ver Tabela 1 na metodologia). O modelo de desnutrição utilizado provoca alterações em peso (Quadro 2) como visto em nosso laboratório por Montanha-Rojas e colaboradores (2005). Os animais submetidos à desnutrição possuem peso médio menor que os animais controle até os 90 dias de vida.

Quadro 2 Peso dos animais controle e dieta nas diferentes idades estudadas ± desvio padrão (Adaptado de Montanha-Rojas e cols., 2005).

	P10	P20	P30	P45	P60	P90
Controle	24,97±1,47	49,46±3,57	96,03±1,80	143,94±2,19	239,57±13,40	391,14±22,86
Dieta	11,80±1,27	28,82±0,91	76,07±4,73	118,8±1,38	207,4±4,77	345,14±21,52

4.2 - Reservas de Glicogênio

A técnica do PAS permite visualizar os grânulos de glicogênio presentes no interior das células que são evidenciados pela coloração com a Fucsina de Rosenberg. As reservas de glicogênio no hipotálamo de ratos apresentaram-se extremamente evidentes nas regiões destacadas no esquema abaixo (Fig. 2) as quais incluíram: núcleos periventricular (PE) e arqueado (ARC) e áreas do hipotálamo dorso medial (DMH) e eminência média (EM).



Figura 2 Figura esquemática de núcleos hipotalâmicos envolvidos com mecanismos de controle de fome e saciedade onde são observados tanicitos com reservas de glicogênio. Em vermelho o hipotálamo ventro medial (VMH); em verde o hipotálamo dorso medial (DMH); em azul o núcleo arqueado (ARC); em amarelo o núcleo periventricular (Pe) e a eminência média interna (MEI) e externa (MEE). Adaptado de Paxinos e Watson (1998).

A marcação para as reservas de glicogênio foi observada em corpos celulares presentes na parede ependimária e em prolongamentos radiais que deixam esta região penetrando o parênquima hipotalâmico (Fig. 3).

O padrão na distribuição de marcação do grupo submetido à malnutrição (D) foi bastante semelhante ao observado no grupo controle (C) (Fig. 3). Corpos celulares próximos à parede ependimária com prolongamentos que penetravam regiões do ARC, EM e DMH, intensamente marcados podiam ser observados em ambos os grupos de animais, no entanto, a marcação nos animais submetidos a malnutrição (Fig. 3b) foi menos intensa quando comparado aos animais do grupo controle (Fig. 3a) em P10.

Aos 20 dias pós-natal a marcação das reservas de glicogênio apresentou menor intensidade em relação à P10 em ambos os grupos de animais. No entanto, em P20 os animais D também apresentavam redução na marcação quando comparados com o grupo controle. (Figs. 3c e 3d).



Figura 3 Reserva hipotalâmica de glicogênio em P10 e P20. Reserva hipotalâmica de glicogênio nos animais controle (C) e malnutridos (D). C (a) apresenta mais marcação de glicogênio do que D (b) em P10. Em P20 ambos apresentam redução da marcação das reservas de glicogênio quando comparados a P10, no entanto, a diferença entre C (c) e D (d) permanece. Barra de calibração =100µm.

A redução na marcação das reservas de glicogênio progride, em P30 ambos os grupos apresentam menor marcação em relação à P20, porém as diferenças entre animais controle e malnutridos persistiram. Em P45 a redução é muito expressiva, tornando a diferenciação entre C e D visualmente difícil (Fig. 4). A distribuição da marcação das reservas de glicogênio nessa idade se apresenta muito mais predominante na EM e a morfologia se mantêm em ambos os grupos.



Figura 4 Reserva hipotalâmica de glicogênio em P45. Reserva hipotalâmica de glicogênio nos animais controle (C) e malnutridos (D). Nesta idade as reservas estão restritas à eminência média sendo muito raras em regiões como ARC ou DMH. A progressiva redução das reservas de glicogênio dificulta a diferenciação entre C (a) e D (b) em P45, no entanto ainda há indicação de menor intensidade de marcação em animais D. Barra de calibração =100µm.

De acordo com a literatura, o tipo de célula glial que, predominantemente, apresenta reservas de glicogênio em diversas regiões do cérebro são os astrócitos (para revisão ver Brown, 2004). Para identificação do tipo de célula glial que contém as reservas de glicogênio observadas nos núcleos hipotalâmicos DMH, ARC e EM foram realizadas, em cortes adjacentes aos marcados para glicogênio, imunohistoquímica para GFAP, MBP e vimentina. O tratamento com álcool e periodato utilizados na reação de identificação do glicogênio, inviabiliza qualquer reação de imunohistoquímica, portanto não foi possível realizar reação contra GFAP, MBP e vimentina nos mesmos cortes em que o glicogênio foi marcado. E a imunohistoquimica prejudica a reação do PAS por que expõem demasiadamente os cortes à água, o que dilui os grânulos de glicogênio inviabilizando sua identificação. A marcação com anticorpo anti-GFAP, uma proteína de filamento intermediário de citoesqueleto presente em células da linhagem astrocitária, estava presente em corpos celulares ventralmente ao terceiro ventrículo na EM. Sendo então, bastante diferente da marcação das reservas de glicogênio do corte adjacente, que estão evidenciadas em estruturas radiais na EM com corpos celulares na camada ependimária. (Fig. 5b, c, e e f). A marcação com anticorpo anti-MBP, uma proteína específica de células oligodendrogliais, está dispersa em diversos núcleos hipotalâmicos, no entanto apresenta uma marcação sob a forma de um feixe na região da eminência média interna (EMI), na região correspondente ao

infundíbulo. Os cortes adjacentes mostram marcação para as reservas de glicogênio em corpos celulares na parede ventricular e em prolongamentos destas células presentes em regiões da EMI e na EME (Fig. 5 a, b, d e e).



Figura 5 Reserva hipotalâmica de glicogênio e identificação fenotípica de células gliais. As marcações para MBP, Glicogênio e GFAP não parecem estar nas mesmas estruturas. MBP (a e d) e GFAP (c e f) estão em estruturas espacial e morfologicamente distintas de onde se encontra a marcação para glicogênio como observado (b e e) em cortes adjacentes. Em d, e e f, em maior aumento, podemos notar que células positivas para MBP e GFAP estão presentes em agrupamentos localizados ventralmente ao terceiro ventrículo (3V) (setas em d e f) e que não na região com os corpos celulares marcados para reservas de glicogênio (setas em e) localizados na camada ependimária da parede do 3V. * indica o terceiro ventrículo. Barra de calibração = 50µm.

A vimentina é uma proteína de filamento intermediário de citoesqueleto presente em células da glia radial. Nos núcleos hipotalâmicos a vimentina está presente em tanicitos, células gliais com características de astrócitos e glia radial. A marcação com anti-vimentina revelou estruturas radias com corpos celulares presentes na camada ependimária tanto no PE como na EM (Fig. 6a), a distribuição desta marcação muito se assemelhava com a marcação para reservas de glicogênio observadas nestas regiões (Fig. 6b). Esses dados sugerem fortemente que as reservas de glicogênio estão prioritariamente em tanicitos.



Figura 6 Reserva hipotalâmica de glicogênio em células imunomarcadas com anticorpo antivimentina. Em a, microfotografia do hipotálamo de um rato em P20, marcada para glicogênio. Em b, imunoidentificação de células positivas para vimentina. Notar que vimentina e glicogênio estão aparentemente nas mesmas estruturas. (caixas em a e b). Barra de calibração = 100µm.

Objetivando comprovar estes resultados foi realizada a imunohistoquímica com anticorpo anti-GLUT2 em cortes previamente reagidos para revelação das reservas de glicogênio através da técnica de PAS (Fig. 7). Durante a imunohistoquímica parte da marcação para as reservas de glicogênio foi perdida nas lavagens, mas é notória a co-localização de GLUT2 e glicogênio. Esse achado reforça consistentemente a presença de glicogênio em tanicitos no hipotálamo.



Figura 7 Reserva hipotalâmica de glicogênio em células imunomarcadas com anticorpo anti-GLUT 2. Em a, microfotografia do hipotálamo de um rato em P20 marcado para glicogênio. Em b, o mesmo corte imunoreagido com anticorpo anti-GLUT2. Notar que várias células contendo glicogênio são positivas para GLUT 2 (setas em a e b). Barra de calibração = 100µm.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram marcação para reservas de glicogênio em torno do terceiro ventrículo. Esta marcação preenchia os corpos celulares presentes na camada ependimária e em prolongamentos destas células que penetravam o parênquima hipotalâmico, principalmente ao nível dos núcleos DMH, PE, ARC e na EM. Esta marcação apresentou redução em sua distribuição e intensidade ao longo do desenvolvimento, sendo muito forte em P10 e menos intensa em P45. Corroborando nossos resultados, alguns estudos demonstraram que as reservas de glicogênio cerebral em ratos são transitórias sendo reduzidas em animais adultos (Borke e Nau, 1984). Borke e Nau (1984) utilizaram cortes ultrafinos de cérebro de ratos em diversas idades pré e pós-natais. Para detectar o glicogênio foi realizada uma técnica baseada também no PAS em diversos núcleos cerebrais como hipoglossal, núcleos mesencefálicos, núcleo ambíguo e abducente, área motora facial e células do corno ventral da medula. Nessas regiões todos os neurônios possuíam pelo menos alguma reserva de glicogênio na primeira semana pós-natal, mas em idades adultas não foi detectado glicogênio. Mais recentemente, tem sido aceito que o glicogênio pode agir como uma fonte de energia em situações de aglicemia mesmo em animais adultos e tem sido mostrado que as reservas de glicogênio reduzem significativamente durante intensas descargas axonais em estados normoglicêmicos. Brown e colaboradores (2005) mensuraram o tempo de atividade em nervo óptico de rato sob estímulo de alta frequência em meio normoglicêmico. Para definir se o glicogênio é utilizado nessa situação como fonte extra de energia utilizaram o mesmo modelo experimental em presença de um inibidor da degradação de glicogênio, a isofagomina, constatando então uma redução temporal da atividade de nervos ópticos nesta preparação, em resposta ao estímulo de alta freqüência. Assim sendo, concluíram que, o glicogênio é utilizado em situações de alto requerimento energético mesmo em uma situação normoglicêmica. Diversos outros estudos corroboram a hipótese da utilização de reservas de glicogênio mesmo em situações normoglicêmicas (Swanson e Choi, 1993) ou em resposta a um aumento da demanda energética (Glip e cols., 2002). Swanson e Choi, (1993), observaram que neurônios em cultura, mesmo em meio normoglicêmico, apresentam maior sobrevida na

presença de astrócitos, sugerindo que a reserva de glicogênio contido nestas células sejam o fator responsável por esta maior sobrevida. Já em 1965, Palladin demonstrou que o glicogênio acumulava-se no cérebro de ratos durante o sono e era depletado na privação de sono ou durante a vigília. Em estudos mais recentes, Gip e colaboradores (2002) avaliaram a guantidade de glicogênio em ratos submetidos à privação de sono, observando uma redução das reservas no cerebelo de ratos jovens, mas não no córtex, no entanto, em animais mais velhos foi observado também de reservas de glicogênio corticais. Nesse trabalho, também foram avaliadas as reservas de glicogênio em ratos que receberam uma dose de um anestésico, o halotano, como resultado foi demonstrado que todas as áreas apresentaram aumento nas reservas de glicogênio. Da mesma forma que a anestesia também já havia sido observado por Swanson (1992) que a hibernação também aumenta as reservas de glicogênio. Portanto há fortes indícios de que o glicogênio é utilizado não só em situações onde o suprimento de glicose está ausente ou baixo mas também em situações onde o aumento de atividade cerebral requer uma fonte extra de energia, servindo assim como fonte energética auxiliar. Brown (2007) sugere que o glicogênio cerebral seja utilizado como meio de evitar bruscas alterações no aporte energético para os neurônios, sendo degradado quando a atividade neuronal aumenta.

Em roedores, alguns circuitos hipotalâmicos, como o neuropeptidérgico Y que conecta o ARC com o PVN, ainda estão em formação em idades pósnatais precoces. As projeções eferentes do ARC de fibras NPY/AGRP somente chegam a todos os núcleos entre P11 e P16 e o processo até o estabelecimento de toda a circuitaria somente termina na idade adulta (para revisão ver Grove e Smith, 2003) Os processos de extensão dos neuritos, formação e estabilização de sinapses podem demandar alguma fonte de energia extra, em função do alto gasto metabólico. Desta forma, as reservas de glicogênio devem ser importantes durante esse período sendo reduzidas e menos necessárias na vida adulta.

Tem sido sugerido que os tanicitos, células bipolares que ligam o fluido cerebroespinhal (CSF) aos capilares porta-hipotalâmicos e provavelmente estão associado a eventos neuroendócrinos, também acumulam glicogênio (Barradas e cols., 1989; Bestetti e Rossi, 1980). Tais células assemelham-se

às células da glia radial, apresentam corpos celulares na camada epêndimal e seus prolongamentos estendem-se para o parênquima hipotalâmico. (para revisão ver Rodríguez e cols., 2005). Uma das semelhanças com a glia radial é a expressão de vimentina, uma proteína de filamento intermediário, porém apresentam morfologia e características moleculares e funcionais únicas e distintas. São descritas quatro subpopulações de tanicitos, α 1,2 e β 1,2. Eles moléculas expressam diferencial de importantes funcionais como transportadores de glicose e neurotransmissores (Shibata e cols., 1997; Peruzzo e cols., 2000). García e colaboradores (2003) demonstraram, através de imunocitoquímica, que, no hipotálamo, todas as subpopulações de tanicitos expressam GLUT2, um transportador de glicose e frutose de baixa afinidade. A maioria dos trabalhos aponta os astrócitos como detentores de glicogênio em diversas regiões cerebrais (Brown e cols., 2004; Wender e cols., 2000; Choi e cols., 2003; Cruz e Dienel, 2002). Nosso trabalho mostrou que células gliais hipotalâmicas que contém reservas de glicogênio em ratos são os tanicitos já que expressam o transportador de glicose presente somente em tanicitos em núcleos hipotalâmicos, o GLUT 2 (Garcia e cols., 2003). As células com marcação de glicogênio também apresentam vimentina, que nesse período está presente em células gliais com morfologia radial como a glia de Bergmam presente no cerebelo e tanicitos no hipotálamo (para revisão ver Rodrigues e cols., 2005). Nós realizamos imunohistoquímica para outros marcadores gliais como MBP e GFAP em seções adjacentes extremamente finas a fim de identificar outras células que poderiam apresentar reservas de glicogênio. As células positivas para GFAP ou MBP não apresentaram reservas de glicogênio nesse horário. Para confirmar tal achado são necessários experimentos com uso de microscopia eletrônica.

Reservas de glicogênio e tanicitos foram intensamente estudados no passado (Prasannan e cols., 1963a, Prasannan e cols., 1963b). A expressão de GLUT2 em tanicitos sugere que essas células em contato com neurônios dos núcleos ventromedial e arqueado estão envolvidos na captação de glicose, e como os tanicitos também expressam canais de potássio ATP-sensíveis tem sido sugerido que eles possam perceber a concentração de glicose no fluido cerebroespinhal e do plasma assim como células β pancreáticas onde esses

dois compostos são considerados parte fundamental do mecanismo de percepção dos níveis de glicemia (para revisão ver Schuit e cols., 2001)

Nossos resultados mostram que há redução nas reservas hipotalâmicas de glicogênio nos animais sofreram malnutrição durante os 10 primeiros dias de lactação, cujas mães foram expostas a uma dieta isenta de proteína e hiperglicidica. Patel e colaboradores (2000) sugeriram que o cluster enzimático hepático pode estar alterado durante a lactação em animais malnutridos expostos a dietas hipoproteicas ou aproteicas. Estas dietas podem provocar modificações na taxa metabólica de diferentes nutrientes, de modo a aumentar a metabolização de carboidratos durante o período de amamentação. A redução nas reservas de glicogênio observada por nós pode ser causada por uma menor disponibilidade de carboidratos para armazenamento nestes animais pelo fato dos mesmos estarem sofrendo metabolismo hepático mais intenso.

A malnutrição pode estar causando também a morte celular no hipotálamo durante esse período, onde os neurônios estão demandando mais fontes de energia para o desenvolvimento de novos circuitos, e os tanicitos podem estar em sua capacidade máxima de suprir essa demanda.

Este trabalho demonstrou que animais submetidos à malnutrição protéica, justamente no período em que vias hipotalâmicas envolvidas no controle do metabolismo energético estão se formando, sofreram uma redução na oferta de suprimento energético (por redução das reservas hipotalâmicas de glicogênio). Em estudos anteriores observamos um atraso na expressão da óxido nítrico sintase no hipotálamo de ratos submetidos a mesma dieta (Marcelino e cols., 2004). Estas alterações podem levar a possíveis modificações na formação destas vias de forma a gerar consequências que perdurem por toda vida do animal.

6. CONCLUSÕES

- Durante o desenvolvimento há redução nas reservas de glicogênio nos núcleos hipotalâmicos ARC e EM;
- As reservas de glicogênio nos núcleos ARC e EM do grupo D apresentaram-se menores em comparação as do grupo C durante o desenvolvimento;
- 3) Não foram observadas reservas de glicogênio em astrócitos ou em oligodendrócitos nos núcleos estudados em nenhuma etapa do desenvolvimento ou na vida adulta. De fato, as células gliais dos núcleos ARC e EM que contêm glicogênio são os tanicitos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allaman I., Pellerin L. e Magistretti P. J. Protein targeting to glycogen mRNA expression is stimulated by noradrenaline in mouse cortical astrocytes. *Glia* 2000 **30**:382–91.

Alvarez, E., Roncero, I., Chowen, J. A., Thorens, B., e Bla'zquez, E. Expression of the glucagon-like peptide-1 receptor gene in rat brain. *J. Neurochem.* 1996;**66**:920–27.

Appel L. J. *e cols*. For the DASH Collaborative Research Group: A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med* 1997;**336**:1117-24.

Appel L J. Lifestyle modification as a means to prevent the treat high blood pressure. *J Am Soc Nephrol* 2003;**14**:99-102.

Argyropoulos G., Rankinen T., Neufeld D.R., Rice T., Province M.A., Leon A.S., Skinner J.S., Wilmore J.H., Rao D.C. e Bouchard C. A polymorphism in the human agouti-related protein is associated with late-onset obesity. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002;**87**:4198–202.

ATP III; Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults: executive summary of the third report of the national cholesterol education program (ncep) expert panel on detection, valuation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel iii). *Jama* 2001;**285**:2486-97.

Auer R. N. Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* 1986;**17**: 699–708.

Bai F.L., Yamano M., Shiotani Y., Emson P.C., Smith A.D., Powell J.F. e Tohyama M. An arcuato-paraventricular and -dorsomedial hypothalamic neuropeptide Y-containing system which lacks noradrenaline in the rat. *Brain Research* 1985;**331**:172–5.

Baltan Tekko k S., Brown A. M. e Ransom B. R. Axon function persists during anoxia in mammalian white matter. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003;**23**: 1340–48.

Banks W. A., Jaspan J. B. e Kastin A. J. Selective, physiological transport of insulin across the blood–brain barrier: novel demonstration by species-specific radioimmunoassays. *Peptides* 1997;**18**:1257–62.

Banks W.A., Kastin A.J., Huang W., Jaspan J.B. e Maness L.M. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides.* 1996;**17**:305–311.

Banks W. A. The source of cerebral insulin. European Journal of Pharmacology 2004;**490**:5–12.

Barker D., Bull A., Osmond C., e Simmonds S. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990;**301**:259-62.

Barker D., Eriksson J., Forsen T., e Osmond C. Fetal origns of adult disease: strenght of efect and biologival basis. *Int J Epidemiol* 2002;**31**:1235-9.

Barker D. J. P. Developmental origins of adult health and disease. *J Epidemiol Community Health* 2004;**58**:114–5.

Barker D., Osmond C., Forsen T., Kajantie E., Eriksson J. Trajectories of growth among children who have coronary events as adults. *N Engl J Med* 2005a;**353**:1802-9.

Barker D. The developmental origns of insulin resistance. *Horm Res.* 2005b;**64** (suppl 3):S2-7.

Barradas P. C., Cavalcante L. A., Mendez-Otero R., e Vieira A. M. Astroglial differentiation in the opossum superior colliculus. *Glial* 1989;**2**:103-11.

Barreto S M e cols. Hypertinsion and clustering of cardiovascular risk factores in a community in Sotheast Brasil – The Bambuí Health and Ageing Study. *Arq Bras Cardiol* 2001;**77**:576-81.

Baskin D. G., Figlewicz D. P., Woods S. C., Porte D. Jr e Dorsa D. M. Insulin in the brain. *Annu. Rev. Physiol.* 1987;**49**:335–47.

Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Debal D, D'Udine B, Foley R, Gluckman P, Godfrey K, Kirkwood T, Lahr M, Mc-Namara J, Metcalfe N, Monaghan P, Spencer H, e Sultani S. Developmental plasticity and human health. *Nature* 2004;**430**:419–21.

Benington J. H. e Heller H. C. Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog. Neurobiol.* 1995;**45**:347–60.

Bestetti G., e Rossi G. L. Hypothalamic lesions in rats with long-term streptozotocin-induced diabetes mellitus. A semiquantitative light- and electron-microscopic study.

Acta Neuropathol. 1980;52(2):119-27.

Black, R. E.; et al. Maternal and child undernutrition. Lancet. 2008;371:243-260.

Borke R. C., e Nau M. E. Glycogen, its transient occurrence in neurons of the rat CNS during normal postnatal development. *Brain Res.* 1984;**318**:277-84.

Broadwell R.D. e Brightman M. W. Entry of peroxidase into neurons of the central and peripheral nervous systems from extracerebral and cerebral blood. *Comparative Journal of Neurology* 1976;**166**:257–283.

Broberger C., De Lecea L., Sutcliffe J.G. e Hokfelt T. Hypocretin/orexin- and melanin-concentrating hormone-expressing cells form distinct populations in the

rodent lateral hypothalamus: relationship to the neuropeptide Y and agouti gene-related protein systems. *Comparative Journal of Neurology* 1998;**402**:460–474.

Brown A. M., Baltan Tekko[°]k S. e Ransom B. R. Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. *J. Physiol.* 2003;**549**: 501–512.

Brown A. M. Brain glycogen re-awakened. *Jounal of Neurochemistry* 2004;**89**:537-52.

Brown, A. M., e Ramsom, B. R. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. Glia 2007;**55**:1263-71.

Brown, A. M., Tekkok, S. B. e Ransom, B.R. Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. *Neurochemistry international* 2004;**45**:529-36.

Brown A. M., Sickmann H. M., Fosgerau K., Lund T. M., Schousboe A, Waagepetersen H. S., e Ransom B. R. Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J Neurosci Res.* 2005;**79**:74-80.

Bruni, J. E., Clattenburg, R. E., e Millar, E. Tanycyte ependymal cells in the third ventricle of young and adult rats: A Golgi study. *Anat. Anz.* 1983;**153**:53-68.

Calle E. E., e Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Ver* 2004;**4**:579–91.

Calle E. E., Rodriguez C., Walker-Thurmond K., e cols. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of US adults. *N Engl J Med* 2003;**348**:1625–38.

Card, J. P., Swanson, L. W., e Moore, R. Y. The hypotothalamus: an review of regulatory systems. *Academic Press.* 1999;**37**:1013-1026.

Carvalho, H. F. e cols. Em: Células: uma abordagem multidisciplinar. *Ed Manole*. 1ª edição 2005.

Cataldo A. M., e Broadwell R. D. Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. I. *Neurons and glia. J. Elec.Micro. Techn.* 1986;**3**:413–37.

Cater H. L., Benham C. D. e Sundstrom L. E. Neuroprotective role of monocarboxylate transport during glucose deprivation in slice cultures of rat hippocampus. *J. Physiol.* 2001;**531**:459–66.

Cavalcante L. A., e Barradas P. C. Glycogem deposition in the neurons of the brain stem and hypothalamus in the opossum. Abstract in annual meeting of Society for neurocience. 1996.

Chan J. M., Rimm E. B., Colditz G. A., e cols. Obesity, fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care* 1994;**17**:961–9.

Chesler A., e Himwich H. E. Effect of insulin hypoglycaemia on glycogen content of parts of the central nervous system of the dog. *Arch. Neurol. Psychiat*.1944;**52**:114–6.

Christianson J. L., Nicoloro S., Straubhaar J., e Czech M. P. Stearoyl CoA desaturase 2 is required for PPARγ expression and adipogenesis in cultured 3T3-L1 cells. *Biol. Chem.* 2007;**283**:2906-16.

Choi I. Y., Seaquist E. R., e Gruetter R. Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J. Neurosci. Res.* 2003;**72**:, 25–32.

Cintra, D. E., Roppele, E. R., e Pauli, J. R., Brain regulation of food intake and expenditure energy: molecular action of insulin leptin and physycal exercises. *Review Neurology.* 2007;**45**:272-282.

Clarke D. D., e Sokoloff L. Circulation and energy metabolism of the brain. *Basic Neurochemistry* 1999;**6**:637–69.

Couceyro P. R., Koylu E. O., e Kuhar M. J. Further studies on the anatomical distribution of CART by in situ hybridization. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 1997;**12**:229–241.

Cruz N. F. e Dienel G. A. High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. J. Cereb. *Blood Flow Metab*. 2002;**22**:1476–89.

Curat, C. A. *e cols.* From blod monocytes of adpose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabettes* 2004;**53**:1285-92.

Daniel P. M., Love E. R., e Pratt O. E. The influence of insulin upon the metabolism of glucose by the brain. *Proc Royal Soc London B.* 1977;**196**:85–104.

Deborah M., Muoio B., e Christopher B. Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and β -cell failure in type 2 diabetes. *Nature Reviews* 2008;**9**:193-205.

Dobbind J., e Sands J. Vulnerability of developing brain: IX. The effect of nutrition growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Biol Neonate* 1971;**19**:363-78

Duffy T. E., Nelson S. R., e Lowry O. H. Cerebral carbohydrate metabolism during acute hypoxia and recovery. *J. Neurochem.* 1972;**19**:959–77.

Elias C. F., Saper C. B., Maratos-Flier E., Tritos N. A., Lee C., Kelly J., Tatro J.B., Hoffman G.E., Ollmann M.M., Barsh G.S., Sakurai T., Yanagisawa M. e Elmquist J. K. Chemically defined projections linking the mediobasal

hypothalamus and the lateral hypothalamic area. *Comparative Journal of Neurology* 1998;**402**:442–59.

Elmquist J. K., Maratos-Flier E., Saper C. B., e Flier J. S. Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nature Neuroscience* 1998;**1**:445–450.

Fan W., Boston B. A., Kesterson R. A., Hruby V. J., e Cone R. D. Role of Melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997;**385**:165–8.

Filho J. S. C., e Moura A. S. Undernutrition during early lactation period induces metabolic imprinting leading to glucose homeostasis alteration in aged rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.*2000;**108**:213-26.

Formiguera X., e Canton A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;**18**:1125–46.

Ford E. N., Giles W. H., e Dietz W. H. Prevalence of the metabolicsyndrome among US adults: findings fron the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* 2002;**287**:356-59.

Frayn, K. N. *e cols.* Regulation of fatty acid movement in human adipose tissue in the postabsortive-to-postprandial trasition. *Am. J. Physiol.* 1994;**266**:308-17.

Frier B. M., e Fisher B. M. *Hypoglycaemia in Clinical Diabetes*. John Wiley and Sons, Ltd, New York. 1999.

Gally J. A., Monantague P. R., Reeke G. N., e Edelman G. M. The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived, rapidly diffuseveble signal in the development and function of the nervous system. *Proc. Atl. Acad. Sci.* 1990;**87**:3547-51.

García, M. A., Milla'n, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zu'n[~] iga, F., Vera, J. C., On[~] ate, S. A., e Nualart, F. Hypothalamic ependymal–glial cells express the glucose transporter GLUT-2, a protein involved in glucose sensing. *J. Neurochem.* 2003;**86**:709–24.

Gip P., Hagiwara G., Ruby N. F., e Heller H. C. Sleep deprivation decreases glycogen in the cerebellum but not in the cortex of young rats. *Am. J. Physiol.* 2002;**283**:R54–R59.

Gluckman P. D., e Hanson M. A. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2004;**15**:183–7.

Godfrey K. M., Robinson J. S., Barker D. J. P., Osmond C., e Cox V. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *Bone Miner J* 1996;**312**:410–4.

Godfrey K. M., Barker D. J., Robinson S., e Osmond C. Maternal birthweight and diet in pregnancy in relation to the infant's thinness at birth. *Br J Obstet Gynaecol* 1997;**104**:663–7.

Goncharova E. D. Effect of insulin and adrenalin on the polysaccharide matabolism in the brain. *Rep. Acad. Sci. Ukranian USSR* 1957;**12**:183–5.

Grove K. L., e Smith M. S. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. *Physiology and Behavior* 2003;**79**:47-63.

Guerrero-Romero F., e Rodriguez-Moran M. Concordance between the 2005 International Diabetes Federation definition for diagnosing metabolic syndrome with the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III and the World Health Organization definitions. *Diabetes Care* 2005;**28**:2588-9.

Hales C. N., e Barker D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992 **35**:595–601

Hales C. N., e Barker D. J. P. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;**60**:5-20.

Hahn T. M., Breininger J. F., Baskin D. G., e Schwartz M. W. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nature Neuroscience* 1998;**1**:271–2.

Hansen A. J. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* 1985;**65**:101–48.

Hamai M., Minokoshi Y., e Shimazu T. L-Glutamate and insulin enhance glycogen synthesis in cultured astrocytes from the rat brain through different intracellular mechanisms. *J. Neurochem.* 1999;**73**:, 400–7.

Harding J. E. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 2001;**30**:15–23.

Harrold J. A., Widdowson P. S., e Williams G. Altered energy balance causes elective changes in melanocortin-4 (MC4-R), but not melanocortin-3 (MC3-R), receptors in specific hypothalamic regions: further evidence that activation of MC4-R is a physiological inhibitor of feeding. *Diabetes* 1999;**48**:267–271.

Hu F. B., Willett W. C., Li T., e cols. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med* 2004;**351**:2694–703.

Ignacio P. C., Baldwin B. A., Vijayan V. K., Tait R. C., e Gorin F. A. Brain isozyme of glycogen phosphorylase: immunohistological localization within the central nervous system. *Brain Res.* 1990;**529**:42–9.

John S. *e cols*. Low-density lipoprotein cholesterol determines vascular responsiveness to angiotensin II in normocholesterolaemic humans. *J Hypertens* 1999; **17**:1933-9.

Kalderon, B., Mayorek, N., Berry, E., Zevit, N., e Bar-Tana, J. Fatty acid cycling in the fasting rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000;**279**:E221-E227.

Kalra S. P., Dube M. G., Pu S., Xu B., Horvath T. L. e Kalra P. S. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocrine Reviews* 1999;**20**:68–100.

Karlberg J. P., Albertsson-Wikland K., Kwan E. Y., Lam B. C., e Low L. C. The timing of early postnatal catch-up growth in normal, full-term infants born short for gestational age. *Horm Res* 1995;**48**(1):17–24.

Karnovsky M. L., Reich P., Anchors J. M., e Burrows B. L. Changes in brain glycogen during slow-wave sleep in the rat. *J. Neurochem.* 1983;**41**:1498–1501.

Kastin A. J., Akerstrom V., e Pan W. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier. *Journal of Molecular Neuroscience* 2002;**18**:7–14.

Kermack W. O., McKendrick A. G., e McKinlay P. L. Death-rates in Great Britain and Sweden. Some general regularities and their significance. *Lancet* 1934;**i**:698–703.

Kershaw, E. E., e Flier, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004;**89**:2548-56.

Kmiec Z. Central regulation of food intake in ageing. *Journal Of Physiology And Pharmacology*, 2006;**57**:Supp 6, 7–16.

Knowler W. C. *e cols.* Reduction in the incidence of type 2 Diabettes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;**346**:393-403

Koizumi J. Glycogen in the central nervous system. *Prog. Histochem. Cytochem.* 1974;**6**:1–37.

Koizumi J., e Shiraishi H. Glycogen accumulation in dendrites of the rabbit pallidum following trifluoperazine administration. *Exp. Brain Res.* 1970a;**11**:387–91.

Koizumi J., e Shiraishi H. Ultrastructural appearance of glycogen in the hypothalamus of the rabbit following chlorpromazine administration. *Exp. Brain Res.* 1970b;**10**:276–82.

Krauss R. M., Winston M., Fletcher B. J., e cols. Obesity: impact on cardiovascular disease. *Circulation* 1998;**98**:1472–6.

Kristensen P., Judge M. E., Thim L., Ribel U., Christjansen K. N., Wulff B. S., Clausen J. T., Jensen P. B., Madsen O. D., Vrang N., Larsen P. J., e Hastrup S. Hypothalamic CART is a new anorectic peptide regulated by leptin. *Nature.* 1998;**393**:72–6.

Kurth T., Gaziano J. M., Berger K., e cols. Body mass index and the risk of stroke in men. *Arch Intern Med* 2002;**162**:2557–62.

Lee I. M., Manson J. E., Hennekens C. H., e cols. Body weight and mortality: a 27-year follow-up of middle-aged men. *JAMA* 1993;**270**:2823–8.

Lee P. A., Chernausek S. D., Hokken-Koelega A. C., e Czernichow P. International Small for Gestational Age Advisory Board consensus development conference statement: management of short children born small for gestational age. *Pediatrics* 2003;**111**:1253–61.

Lubrano-Berthelier C., Cavazos M., Dubern B., Shapiro A., Stunff C.L., Zhang S., Picart F., Govaerts C., Froguel P., Bougneres P. e cols. Molecular genetics of human obesity-associated MC4R mutations. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2003a;**994**:49–57.

Lubrano-Berthelier C., Durand E., Dubern B., Shapiro A., Dazin P., Weill J., Ferron C., Froguel P., e Vaisse C. Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Human Molecular Genetics* 2003b;**12**:145–53.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991;**156**:38-50.

Magistretti P. J., Pellerin L., Rothman D. L., e Shulman R. G. Energy on demand. *Science* 1999;**283**:496–7.

Magistretti P. J., Sorg O., e Martin J. L. Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: physiological, pharmacological, and pathological aspects: In: Astrocytes: Pharmacology and Function (Murphy, S., ed.), pp. 243–265. Academic Press, Inc., San Diego, Calif 1993.

Marcelino A. A., Moura A. S., Barradas P. C., e Tenório F. Hypothalamic nuclei nitric oxide synthase expression in rats malnoutrished during early lactation period. *Nutri Neroscience* 2004;**3** (7):177-84.

Matsuda J., Yokota I., Iida M., Murakami T., Naito E., Ito M., Shima K., e Kuroda Y. Serum leptin concentration in cord blood: relationship to birth weight and gender. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;**82**:1642–44.

McClean K. M., Kee F., Young I. S., e Elborn J. S. Obesity and the lung: 1. Epidemiology. *Thorax* 2008;**63**:576-7

McMillen I. C., e Robinson J. S. Developmantal origins of the Metabolic Syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005;**85**:571-633.

Monteiro C. A. A dimenção da pobreza, da fome e da desnutrição no Brasil. *Estudos Avançados* 1995;**24**:195-207.

Monteiro C. A., Conde W. L., e Popkin B. M. The burden of disease from undernutrition and overnutrition in countries undergoing rapid nutrition transition: a view from Brazil. *Am J Public Health* 2004;**94**:433–4.

Mountjoy K. G., Mortrud M. T., Low M. J., Simerly R. B., e Cone R. D. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Molecular Endocrinology* 1994;**8**:1298–308.

Moura A. S., Franco de Sá C. C. N., Cruz H. G., e Costa C. L. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Brazilian Journal* of Medical and *Biological Research* 2002;**35**:617-22.

Moura A. S., Carpinelli A. R, Barbosa F. B., Gravena C., e Mathias P. C. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1996;**92**:73-84

Nickenig G. e cols. Hypercholesterolemia is associated with enhanced angiotensin AT1-receptor expression. *Am J Physiol* 1997; **272**(6): H2701-7.

Nickenig G., e Harrison D. G. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part I: oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 2002a;**105**:393-6.

Nickenig G., e Harrison D. G. The AT(1)-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis: part II: AT(1) receptor regulation. *Circulation* 2002b;**105**:530-6.

Nowak K. W., Mackowiak P., Switonska M. M., Fabis M., e Malendowicz L. K. Acute orexin effects on insulin secretion in the rat: in vivo and in vitro studies. *Life Sciences* 2000;**66**:449–454.

Ong K. K., Ahmed M. L., Emmett P. M., Preece M. A., e Dunger D. B. Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study. *Bone Miner J* 2000;**320**:967–971.

Onís M., Monteiro C. A., Akré J., e Clugston G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO global database on child growth. Bull. *Wld. Hlth. Org.*, 1993;**71**:703-12.

Organização Mundial de Saúde (OMS). "Physical Status: the Use and Interpretation of Anthropometry". Report of a WHO Expert Committee. Technical Report Series No. 854. Geneva: WHO, 1995.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Definition, Diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complication. part 1. World Health Organization, Geneva; 1999.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Obesity and overweight. Fact sheet 2006;**311**. Disponível em: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/a/index.html. Acesso em: 03/07/2008.

Palladin A. V. Biochemistry of the Nervous System. (Herschkopf S, ed) Translated by M. Artman. Published pursuant to an agreement with The National Aeronautics and Space Administration and The National Science Foundation, Washington, D.C. Available from the U.S. Department of Commerce, Springfield, VA 22151. 1965

Patel, M. S., Srinivasan, M. e Aalinkeel, R. Metabolic programming by nutrition during early development. *Indian Journal of Experimental Biology* 2000;**38**:849-55.

Paxinos, G., e Watson, C., The rat brain in stereotaxic coordinates. Fourth edition. Academic Press, USA, 1998.

Pellegri G., Rossier C., Magistretti P. J. e Martin J. L. Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1996;**38**:191–9.

Peruzzo, B., Pastor, F. E., Blázquez, J. L., Schobitz, K., Peláez, B., Amat, P. e Rodríguez, E. M. A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. *Experimental Brain Research* 2000;**32**:10-26.

Pfeiffer-Guglielmi B., Fleckenstein B., Jung G. e Hamprecht B. Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J. Neurochem.* 2003;**85**:73–81.

Phelps C. H. Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. *Brain Res.* 1972;**39**:225–34.

Prasannan, K. G., Rajan, R., e Subrahmanyam, K. Brain glycogen in the fed and fasting state. *Indian Journal of Medical Research* 1963a;**51**:703-7.

Prasannan, K. G., Rajan, R., e Subrahmanyam, K. Effect of cortisone on the levels of glycogen in the brain and liver of the fasting rat. *Indian Journal of Medical Research* 1963b;**51**:933-6.

Qatanani, M., e Lazar, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007;**21**:1443-55.

Rajala, M. W., e Scherer, P. E. Minireview: the adipocyte-at the crossroads of energy homeostasis, inflamation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 2003;**144**:3765-73.

Rexrode K. M, Hennekens C. H., Willett W. C., e cols. A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA* 1997;**277**:1539–45.

Rodríguez E. M. e cols. Hypothalamic tanycytes: a key component of brainendocrine interaction. *International Review of Cytology* 2005;**247**:89-164

Rosen, E. D., e Spiegelman, B. M. Adypocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006;**444**:847-53.

Rosenberg P. A, e Dichter M. A. Glycogen accumulation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci Methods*. 1985;**15**:101-12.

Rossi M., Kim M. S., Morgan D. G., Small C. J., Edwards C. M., Sunter D., Abusnana S., Goldstone A. P., Russell S. H., Stanley S. A. e cols. A C-terminal fragment of Agouti-related protein increases feeding and antagonizes the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in vivo. *Endocrinology* 1998;**139**:4428–31.

Sanacora G., Kershaw M., Finkelstein J. A., e White J. D. Increased hypothalamic content of preproneuropeptide Y messenger ribonucleic acid in genetically obese Zucker rats and its regulation by food deprivation. *Endocrinology* 1990;**127**:730–7.

Sartipy, P., e Loskutoff, D. J. Monocyte chemoattractant protein in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;**100**: 7265-70.

Sawaya A. L., Solymos G. M. B., Florêncio T. M., e Martins P. A. Os dois Brasis: Quem são, onde estão e como vivem os pobres brasileiros. *Estudos Avançados* 2003;**48**:21-45.

Schuit F. C., Huypens P., Heimberg H., e Pipeleers D. G. Glucose sensing in pancreatic b-cells. A model for study of other glucose-regulate cells in gut, pancreas, and hypothalamus. *Diabetes* 2001;**50**:1-11.

Schwartz M. W., Seeley R. J., Campfield L. A., Burn P., e Baskin D. G. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *Journal of Clinical Investigation* 1996;**98**:1101-1106.

Schwartz M. W., Woods S. C., Porte D. Jr, Seeley R. J., e Baskin D.G. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000;**404**:661–671.

Siesjö B. K. Brain energy metabolism and catecholaminergic activity in hypoxia, hypercapnia and ischemia. *J Neural Transm* Suppl. 1978;**14**:17-22.

Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K., e Inoue, Y. Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage os developing mouse spinal cord. *Journal Neuroscience* 1997;**17**:9212-9219.

Shulman R. G., Bloch G., e Rothman D. L. In vivo regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1995;**92**:8535–42.

Sorg O., e Magistretti P. J. Vasoactive intestinal peptide and noradrenaline exert long-term control on glycogen levels in astrocytes: blockade by protein synthesis inhibition. *J. Neurosci.* 1992;**12**:4923–31.

Sposito A. Emerging insights into hypertension and dyslipidaemia synergies. *Eur Hart J* 2004;**6**(suppl G):8-12.

Stanley B. G., Kyrkouli S. E., Lampert S., e Leibowitz S. F. Neuropeptide Y chronically injected into the hypothalamus: a powerful neurochemical inducer of hyperphagia and obesity. *Peptides* 1986;**7**:1189–92.

Susser E., Hoek H. W., e Brown A. Neurodevelopmental disorders after prenatal famine the story of the Dutch Famine Study. *Am J Epidemiol* 1998;**147**:213-6.

Swanson R. A., e Choi D. W. Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1993;**13**:162–9.

Swanson R. A. Physiologic coupling of glial glycogen metabolism to neuronal activity in brain. *Can J Physiol Pharmacol* 1992;**70**:S138–S144,.

Swanson R. A., Sagar S. M., e Sharp F. R. Regional brain glycogen stores and metabolism during complete global ischaemia. *Neurol. Res.* 1989a;**11**:24–8.

Swart I., Jahng J. W., Overton J. M., e Houpt T.A. Hypothalamic NPY, AGRP, and POMC mRNA responses to leptin and refeeding in mice. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2002;**283**:R1020–R1026.

Thame M., Wilks R. J., McFarlane-Anderson N., Bennett F. I., e Forrester T. E. Relationship between maternal nutritional status and infant's weight and body proportions at birth. *Eur J Clin Nutr* 1997;**51**:134–8.

Thomas, D. W., e Mayer, Meal taking and regulation of food intake by normal and hypotalamic hyperphagic rats. J. *Journal of comparative physiological psycology.* 1968;**66**:642-53.U

Thomzig, A., Wenzel, M., Karschin, C., Eaton, M., Skatchkov, S. N., Karschin, A., e Veh, R. W. Kir6.1 is the principal pore-forming subunit of astrocyte but not neuronal plasma membrane K-ATP channels. *Mol. Cell Neurosci.* 2001;**18**:671–90.

Unger, R. H. Lipotoxici diseases. Annu. Rev med 2002;53:319-36.

Unger, R. H. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabettes* 1995;**44**:863-70.

Valdez R., Athens M. A., Thompson G. H., e cols. Birthweight and adult health outcomes in a biethnic population in the USA. *Diabetologia* 1994;**37**:624–31.

Waterland R. A., e Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999;**69**: 179-97.

Wender R., Brown A. M., Fern R., Swanson R. A., Farrell K., e Ransom B. R. Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *J. Neurosci.* 2000;**20**:6804–10.

Whatley S. A., Hall C., e Lim L. Hypothalamic neurons in dissociated cell culture: the mechanism of increased survival times in the presence of non-neuronal cells. *J. Neurochem.* 1981;**36**:2052–6.

Wynne K., Stanley S., McGowan B. and Bloom S. Appetite control. *Journal of Endocrinology* 2005;**184**:291–318.

Zarjevski N., Cusin I., Vettor R., Rohner-Jeanrenaud F., e Jeanrenaud B. Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* 1993;**133**:1753–8.

Artigo submetido à revista International Journal of Developmental Neuroscience. *Glycogen stores are impaired in hypothalamic nuclei of rats malnourished during early life*. Artigo em colaboração com a Profa. Cristiane F Ramos, submetido à revista Neuroscience Letters. *Maternal malnutrition during lactation alters gonadotropin-releasing hormone expression in the weaned male pups*.

Elsevier Editorial System(tm) for International Journal of Developmental

Neuroscience

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: GLYCOGEN STORES ARE IMPAIRED IN HYPOTHALAMIC NUCLEI OF RATS MALNOURISHED DURING EARLY LIFE

Article Type: Research Paper

Section/Category:

Keywords: maternal malnourishment; lactation; rat development; hypothalamus; tanycytes; glycogen.

Corresponding Author: Dr. Frank Tenorio, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universidade do Estado do Riode Janeiro

First Author: Sebastião S Lima , MsC

Order of Authors: Sebastião S Lima , MsC; Maria Claudia Lima dos Santos, undergraduate student; Marcelle P Sinder, undergraduate student; Anibal S Moura, PhD; Penha C Barradas, PhD; Frank Tenorio, Ph.D

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Perinatal nutritional status has a profound and persistent influence on neural development and cognitive function. In humans and other animals, it has been shown that protein malnutrition during the perinatal period leads to permanent changes, which in adulthood induces metabolic syndrome. Weight gain and feeding are mainly modulated by neural and hormonal inputs to the hypothalamus. Brain glycogen stores are present in hypothalamic nuclei and glycogen is now recognized as a source of glucose in high energetic demands, as during development of neural circuits. As some hypothalamic circuits are being formed during the lactation period, we attempt to study the effects of proteic malnutrition, during the first 10 days of lactation, on glycogen stores in hypothalamic nuclei involved in the control of energy metabolism. Female pregnant rats were randomly housed in individual cages fed ad libitum with a normorprotein diet (22% protein). After delivery each dam was kept with 6 male pups. During the first 10 days of lactation the dams of the experimental group received a protein free diet (diet group) and the control group a normoprotein diet. By P10 glycogen stores were very high in the arcuate nucleus and median eminence of the control group. Glycogen stores decreased during development. In P20 control animals, glycogen stores were lower in these regions when compared to P10 control animals and animals submitted to malnutrition presented a staining that was even lower than the control ones in the same age. After P45 it was very difficult to determine any differences between control and diet group because glycogen stores were very reduced. We also showed that tanycytes were the cells presenting glycogen stores in these animals. Our data reinforce the concept that maternal nutritional state during lactation may be critical for brain maturation since maternal malnutrition resulted in a low glycogen store stain in hypothalamus, which may be critical for the establishment of neuronal circuitry.
GLYCOGEN STORES ARE IMPAIRED IN HYPOTHALAMIC NUCLEI OF RATS MALNOURISHED DURING EARLY LIFE

Lima, S.S., Lima dos Santos, M.C., Sinder, M.P., Moura, A.S., Barradas, P.C. and Tenório, F.*

- 1. Depto. de Farmacologia e Psicobiologia.
- 2. Depto. de Ciências Fisiológicas

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - Universidade do Estado do Rio

de Janeiro - 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Running Title – glycogen in tanycytes of malnourished rats

Keywords – maternal malnourishment, lactation, rat development, hypothalamus, tanycytes, glycogen.

*to whom correspondence should be addressed

franktenorio@gmail.com

Depto. de Farmacologia e Psicobiologia Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes Universidade do Estado do Rio de Janeiro Av. 28 de setembro, 87, fds, 5º andar 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brasil FAX: 55 21 25876808

ABSTRACT

Perinatal nutritional status has a profound and persistent influence on neural development and cognitive function. In humans and other animals, it has been shown that protein malnutrition during the perinatal period leads to permanent changes, which in adulthood induces metabolic syndrome. Weight gain and feeding are mainly modulated by neural and hormonal inputs to the hypothalamus. Brain glycogen stores are present in hypothalamic nuclei and glycogen is now recognized as a source of glucose in high energetic demands, as during development of neural circuits. As some hypothalamic circuits are being formed during the lactation period, we attempt to study the effects of proteic malnutrition, during the first 10 days of lactation, on glycogen stores in hypothalamic nuclei involved in the control of energy metabolism. Female pregnant rats were randomly housed in individual cages fed ad libitum with a normorprotein diet (22% protein). After delivery each dam was kept with 6 male pups. During the first 10 days of lactation the dams of the experimental group received a protein free diet (diet group) and the control group a normoprotein diet. By P10 glycogen stores were very high in the arcuate nucleus and median eminence of the control group. Glycogen stores decreased during development. In P20 control animals, glycogen stores were lower in these regions when compared to P10 control animals and animals submitted to malnutrition presented a staining that was even lower than the control ones in the same age. After P45 it was very difficult to determine any differences between control and diet group because glycogen stores were very reduced. We also showed that tanycytes were the cells presenting glycogen stores in these animals. Our data reinforce the concept that maternal nutritional state during lactation may be critical for brain maturation since maternal malnutrition resulted in a low glycogen store stain in hypothalamus, which may be critical for the establishment of neuronal circuitry.

Perinatal nutritional status has a profound and persistent influence on neural development and cognitive function. Similarly, classic epidemiologic studies of survivors of Dutch famine of 1944-1945 suggest that perinatal nutrition influences adult body mass index, often considered a proxy for body composition. More recent evidence that links low birth weight to an increase risk of chronic diseases in old age has generated renewed interest in preventive approaches initiated in the perinatal period (see Waterland and Garza, 1999, for review). Fetal and neonatal growth regulation is a complex interactive process controlled by genetic, nutritional and environmental factors. The most influential factor during fetal and neonatal life limiting growth potential is probably substrate supply (see: Patel et al, 2000, for review). In humans and other animals, it has been shown that protein malnutrition during the prenatal period leads to permanent changes, which in adulthood induce impairment of blood pressure control, cholesterol metabolism, immunogenic response, insulin secretion and glucose uptake, predisposing the organism to obesity, vascular disease and diabetes mellitus (Barker, 1992, 1995; McKeigue, 1997; Ravelli et al, 1976).

Body weight gain is significantly lower in a model of restriction of nutrients during lactation, as compared to the corresponding ad libitum-fed controls. Growth is also reduced in animals fed a 10% protein diet as compared to those fed a 20% protein diet (Mohan and Nasaringa Rao, 1983). Animals that suffer overnutrition or undernutrition during lactation, also displayed a different pattern of weight gain, increased in overnourished animals and decreased in undernourished ones (Widdowson and McCance, 1963).

Weight gain and feeding are mainly modulated by neural and hormonal inputs to the hypothalamus. The hypothalamic circuitry controlling appetite and energy expenditure is complex and involves numerous neurotransmitter and neuropeptide systems, many of which functioning in parallel to either increase or decrease energy availability (Schwartz et al, 2000). Leptin, for example, is an anorexigenic hormone being released by adipocytes in response to high glucose blood levels (Frederich et al, 1995). Nitric oxide (NO) has been demonstrated to play an important role in the regulation of food intake as an orexigenic molecule (Morley et al., 1995;1996). Squadrito et al (1994) reported that in food deprived rats, a NOS inhibitor reduces food intake, indicating that NO plays a role in hyperphagia induced by food deprivation. We also showed in a model of proteic undernutrition in rats, during the first 10 days of lactation, that leptin levels (Moura et al., 2002) and hypothalamic nitric oxide synthase expression (Marcelino et al., 2004) were modified during development.

Glucose is the major energy source for the brain, under physiological conditions. In cases of acute, intense regional metabolic requirements, glycogen stores provide the demanded glucose (Lowry et al., 1964). Glycogenolisis is rapidly activated by several different neurotransmitters and neuropeptides (Quach et al., 1980, 1982; Magistretti et al., 1981, 1986; Cambray-Deakin et al., 1988a; Subbarao and Hertz, 1990; Coopersmith and Leon, 1995; Sorg et al., 1995; Eugenin et al., 1997), by glucose deprivation (Dringen and Hamprecht, 1992), by physiological changes in extracellular potassium (Cambray-Deakin et al., 1988b; Hof et al., 1988) and intracellular calcium concentrations (Ververken et al., 1982). Besides the glycogen presence, it has been shown that during insulin-induced hypoglycaemia in dogs, glycogen decreases in areas that present high metabolic rate (Chesler and Himwich, 1944). Similar data has been shown in rats and rabbits (Brown et al., 2003; Wender et al., 2000; Goncharova, 1957). Also, using nuclear magnetic resonance spectroscopic, it has been shown that glycogen degradation simultaneously occurs when glucose brain concentration is drastically reduced (Choi et al., 2003).

Studies demonstrating the effect of starvation on glucose metabolism and glycogenolisis in the brain also have been performed. Sagar et al. (1987), studying the regional distribution of brain glycogen, observed that the highest levels were in the cerebellum and the lowest ones in the striatum. Garriga and Cussó (1992) determined glycogen levels, by a fluometrical analysis, in different brain areas, including the cerebellum, striatum, hippocampus and hypothalamus, after starvation in rats. They did not find significant differences between the studied areas; five hours of fasting did not modify glycogen concentration in any region, whereas after 24 hours glycogen levels decreased significantly in all regions,

presenting the lowest values in all areas. After 48 hours of fasting, glycogen contents were partially recovered but not reaching the control values.

In the adult brain of mammals glycogen stores are predominantly localized in astrocytes (see, Brown and Ransom, 2007, for review), with smaller amounts found in oligodendrocytes, endothelia, ependyma, and epithelial cells of the choroid plexus. There is evidence, however, that some large neurons may also contain glycogen (Phelps, 1972; Borke and Nau, 1984; Cataldo and Broadwell, 1986; Barradas et al., 1989; Cavalcante et al., 1996). However, Borke and Nau (1984) observed that, in the rat, glycogen occurrence in neurons is transient lasting only during normal postnatal development.

Glycogen stores, once believed to be important as an emergency source of energy in cases of prolonged glucose deprivation is now recognized as a source of glucose in high energetic demands, as during development of neural circuits (Brown et al, 2004). As some hypothalamic circuits are being formed during lactation period (Grove and Smith, 2003), we attempt to study the effects of proteic malnutrition, during the first 10 lactation days, on glycogen stores in cells of hypothalamic nuclei involved in the control of energy metabolism.

Material and Methods

Animals

Wistar male rats from our breeding colony with ages ranging from post-natal day 10 to 90 (P10 to P90) were used. At least 5 animals from each age in both groups were used. Female rats were mated and the pregnant dams were randomly housed in individual cages at 23°C on a 12h light/dark cycle. The dams were fed *ad libitum* with a normoprotein diet (22% protein) during gestation. The use and handling of experimental animals followed the principles described in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Bayne, 1996). After delivery each lactating dam was kept with 6 male pups during the whole lactation period (Fishbeck and Rasmussen, 1987) and distributed in two groups. A total of 10 offsprings were used being 5 from lactating dams fed a normoprotein diet (22%)

protein) and 5 fed with a protein free diet (0% protein) during the first 10 days of lactation. Thereafter, all dams were fed with a normoprotein diet. After lactation (21 days) the pups were separated from the mother and received the normoprotein diet until being sacrificed. The groups were fed ad libitum and the diets were supplemented with vitamins and minerals following the recommendations of the American Institute of Rodent Nutrition Diet (Reeves et al., 1993). Animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (50mg/kg) and intracardially perfused with 0.9% saline solution followed by 4% paraformaldehyde (PF) in 100mM phosphate buffer (pH 7.4) and then by the same fixative plus 10% sucrose for cryoprotection. After dissection, the brains were immersed in 100mM phosphate buffer containing 20% sucrose, overnight at 4° C. Coronal slices were made in cryotome and kept in gelatinized slides.

Histochemical reaction for glycogen

Every other coronal section of 30µm were collected in gelatinized slides and immersed in absolute ethanol at -20°C in a Coplin jar which was then transferred to room temperature. After 1-2h, the sections were immersed into 80% ethanol and, thereafter, treated by the method of Horobin and Kavill-Davies (1971) for glycogen (periodic acid-Schiff – PAS) staining as modified by Rosenberg and Dichter (1985). Briefly, the oxidation step was in 1% periodic acid in 70% ethanol over 1h, followed by rinses in 80% ethanol and staining in 1% basic fuchsin dissolved in acid ethanol (glacial acetic: 1 vol; 80% ethanol: 100 vols.) for 30-60 min. After staining, the sections were rinsed in 80% ethanol, dehydrated, cleared in xylene, mounted in Entellan® (Merck) and coverslipped. Sections were analyzed under light microscopy using an Olympus BX 40 microscope. Image capturing was performed with a cooled-charged-coupled device camera (Sony DXC 151A). Gray scale images were taken using Adobe Photoshop software.

PAS stained sections from control and malnourished animals from all ages studied were observed in regions from Bregma -2,12mm to -3,30 mm (Paxinos and

Watson, 1998; Sherwood and Timiras, 1970) in a way that around 20 sections per animal were observed.

Immunohistochemistry

In an attempt to characterize glycogen stained profiles we performed immunohistochemistry reactions for some glial markers, glial fibrillary acidic protein (GFAP - astrocytes), myelin basic protein (MBP- oligodendrocytes) and vimentin (tanycytes). As PBS rinses could wash away the product of PAS reaction, immunohistochemistry was performed in sections immediately adjacent to 13µm thickness ones, previously stained for glycogen. After incubation in 5% bovine serum albumin (BSA) supplemented with 0.3% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 2h, sections were incubated with the primary antibody diluted in PBS (1:100, monoclonal anti-GFAP – Sigma; 1:100, monoclonal anti-MBP – Serotec; 1:8, monoclonal anti-vimentin – Boehringer) overnight at 4°C. After several rinses in PBS, sections were incubated with the avidin-biotin-peroxidase kit revealed using diaminobenzidine (DAB) as cromogen. Then the slides were dehydrated and coverslipped. Control sections were immunoprocessed with the secondary antibody in the absence of the primary antibodies.

As GLUT2 glucose transporter was pointed as an specific tanycyte marker in the hypothalamus (Garcia et al, 2003), sections previously stained for glycogen were incubated in 5% bovine serum albumin (BSA) supplemented with 0.3% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 2h. They were then incubated with the primary antibody diluted in PBS (1:200, polyclonal anti-GLUT2 – SantaCruz) overnight at 4°C. After several rinses in PBS, sections were incubated for 1h at room temperature (25°C) with biotinilated donkey anti-goat IgG (SantaCruz), washed several times with PBS and revealed with streptavidin conjugated with Cy3 (Zymed). Then the slides were rinsed in PBS and coverslipped using n-propyl-gallate as mounting medium.

Results

Animals from free protein dams showed a difference in body weight when compared to control animals as previously demonstrated by our group (Marcelino et al, 2004, Montanha-Rojas et al, 2005).

INSERT TABLE 1 - ABOUT HERE

Our results showed staining for glycogen in radial structures leaving the ependymal region and penetrating the hypothalamic parenchyma only in regions corresponding to the arcuate nucleus (ARC) and median eminence (ME). By P10, glycogen stores were very high in control animals (Fig. 1A) both in the ARC and the ME. Animals submitted to protein malnutrition presented lower glycogen stores in these areas (Fig. 1B). Glycogen stores decreased during development. In control animal at P20, glycogen stores were lower in these regions when compared to P10 control animals (Fig.1C, compare to fig. 1A) and animals submitted to malnutrition presented a staining that was even lower than the control ones in the same age (Fig.1D, compare to Fig 1C). By P30 glycogen stores continue to diminish in control animals and malnourished animals presented lower glycogen stores when compared to control animals at the same age (not shown). After P45 no differences between control and malnourished animals could be observed because older animals presented a very low glycogen stores.

INSERT FIGURE 1 – ABOUT HERE

These structures containing glycogen stores resemble tanycytes. Very few studies pointed tanycytes as glycogen storing cells (Cavalcante et al, 1996) but astrocytes were elected to have this role by several authors (see: Brown and Ransom, 2007, for review). To identify the cell types that presented glycogen stores, we performed immunohistochemistry using antibodies against some glial markers as MBP, GFAP and vimentin. GFAP and MBP staining were performed in thin adjacent slices and no co-localization were detect between glycogen staining

and immunostaining for these proteins (Fig.2). MBP staining was observed in the median eminence ventrally to the third ventricle wall and in some small cell bodies (Fig. 2 A and arrows in D), in a close adjacent session glycogen staining was observed in radial profiles leaving the ventricular wall and some cell bodies in the ependymal layer (Fig. 2 B and arrows in E), GFAP staining in a sequential session was restricted to cell bodies dispersed in the ME and ARC (Fig. 2 C and arrows in F).

INSERT FIGURE 2 – ABOUT HERE

Radial structures stained for glycogen in the ME (Fig. 3A) were also immunoreactive for vimentin (Fig. 3B) which suggest that these cells were tanycytes.

We also performed GLUT2 immunohistochemistry in a section previously processed for glycogen histochemistry. GLUT2 immunostaining was observed in all the profiles that stored glycogen (Fig. 4A, B), confirming that hypothalamic glycogen stores are present in tanycytes. As expected, glycogen staining in this sections was apparently lower than in other P20 control animals because immunohistochemistry proceedings washed away some of the dying used to detect glycogen.

INSERT FIGURES 3 AND 4 – ABOUT HERE

Discussion

We showed that glycogen stores diminished during development of the hypothalamus, indeed, some works showed that glycogen stores in rats are transitory, being reduced in adult animals (Borke and Nau, 1984). More recently it has been accepted that glycogen can act as an emergency energy source to support function during aglycaemia even in adult animals. It also has been shown that glycogen content is significantly decreased during intense axonal discharge under normoglycaemic conditions. Brown and Ransom (2007) demonstrated,

using mouse optic nerve preparations, that an increase in energetic demand imposed by a high frequency stimulus indeed, resulted in a decrease in glycogen content even in normoglycemic concentrations of glucose. Palladin, 1965 showed also that glycogen accumulates during sleep being depleted by sleep deprivation and is mobilized during waking. Some hypothalamic circuits, like the neuropeptide Y one from the ARC to the PVN, are still forming during post-natal ages (Grove and Smith, 2003) and the extension of neurites, formation and stabilization of synapses may demand an extra energy source as this circuitry maturates, so glycogen may be needed during this period of development more than at adult life. Indeed, we observed a reduction on glycogen stores as these circuits maturate and this may be occurring because glycogen stores may not be as needed as during formation of that neuropeptidergic circuit.

It has been suggested that tanycytes, bipolar cells that link the cerebrospinal fluid (CSF) to the portal capillaries and may be associated to neuroendocrine events, also accumulates glycogen (Barradas et al, 1989; Bestetti and Rossi, 1980). These cells resemble radial glial cells, presenting the cell body at the ependimal layer and processes extending from it and penetrating the hypothalamic parenchima (see Rodríguez et al, 2005, for review). They share some properties with radial glia, as, for example, the expression of vimentin, an intermediary filament, but display unique and distinct morphological, molecular and functional characteristics. There have been described four subpopulations of tanycytes, $\alpha_{1,2}$ and $\beta_{1,2}$. They express differentially important functional molecules, such as glucose and neurotransmiters transporters (García et al., 2003; Peruzzo et al., 2000; Berger and Hediger, 2001; Shibata et al., 1997). Garcia et al. (2003) have showed, by immunocytochemistry, that in the hypothalamus, both subpopulations of tanycytes express GLUT2, a low-affinity transporter of glucose and fructose. Our work showed that hypothalamic cells containing glycogen stores in rats were tanycytes as the profiles containing glycogen observed by us also express vimentin and the glucose transporter only present in tanycytes in hypothalamic nuclei, GLUT2 (Garcia et al, 2003). Most of works pointed astrocytes as glycogen stores in several brain regions (Brown et al., 2004; Wender et al., 2000; Choi et al., 2003;

Cruz and Dienel, 2002). In the hypothalamus, as suggested by our results, only tanycytes contain glycogen stores at postnatal ages examined. Profiles stained for glycogen during development also presented vimentin, which in this period is expressed only in glial cells with radial morphology as Bergman's glia in the cerebellum and tanycytes in the hypothalamus. We also performed immunohistochemystry for other glial markers as MBP and GFAP in thin adjacent sections in an attempt to identify whether other cells presented glycogen stores. GFAP or MBP stained cells did not present glycogen stores staining. To make sure of these results, electronic microscope experiments should by applied. Glycogen stores and tanycytes were intensely studied in the past (Prasannan et al, 1963a,b). Moreover, recently tanycytes have regained importance because works from Garcia et al (2003) suggested that these cells are involved in a glucose sensing mechanism in the hypothalamus.

The expression of GLUT2 in tanycytes suggest that these cells contacting ventromedial hypothalamic neurons and arcuate nucleus neurons are involved in glucose uptake, as tanycytes also express ATP-sensitive K+ channels, it has been suggested that they may sense CSF glucose concentrations.

Our results showed a reduction on glycogen stores in hypothalamic cells from animals that suffered proteic malnutrition during the first 10 days of lactation. The lactant mother was exposed to a non-proteic-high-carbohydrate pellet chow, Patel et al (2000) suggested that hepatic enzymatic clusters can be altered during lactation in undernourished animals exposed to these kind of diets by altering metabolic rates of different nutrients in a way that carbohydrates become being more metabolized during the suckling period. The reduction in glycogen stores observed by us may be due to a less offer of carbohydrates to these animals. Malnutrition could be also causing cell death in the hypothalamus during this period as neurons demand more energy sources for development of new circuits and tanycytes may be in its entire capacity to fulfill this demand.

References

Barker, D.J. (1992) Fetal growth and adult disease. British Journal Obstetrics Gynaecology 99: 275-276.

Barker, D.J. (1995) Fetal origin of coronary hearth disease. British Medical Journal 311:171-174.

Barradas, P.C., Cavalcante, L.A., Mendez-Otero, R. and Vieira, A.M. (1989)
Astroglial differentiation in the opossum superior colliculus. Glia 2: 103-111.
Bayne, K. (1996). Revised Guide for the Use and Care of Laboratory Animals avaible. American Physiological Society, Physiologist 39: 1939-1951.

Berger, U.V. and Hediger, M.A. (2001) Differential distribution of the glutamate transporters GLT-1 and GLAST in tanycytes of the third ventricle. Journal of Comparative Neurology 433: 101-114.

Bestetti G. and Rossi GL. (1980) Hypothalamic lesions in rats with long-term streptozotocin-induced diabetes mellitus. A semiquantitative light- and electron-microscopic study. Acta Neuropathologica 52:119-27.

Borke R.C. and Nau M.E. (1984) Glycogen, its transient occurrence in neurons of the rat CNS during normal postnatal development. Brain Research 318: 277-84. Brown A. M., Baltan Tekko"k S. and Ransom B. R. (2003) Glycogen regulation and functional role in mouse white matter. Journal of Physiology 549: 501–512. Brown, A.M., Tekkok, S.B. and Ransom, B.R. (2004) Energy transfer from astrocytes to axons: the role of CNS glycogen. Neurochemistry international 45: 529-536.

Brown, A.M. and Ramsom, B.R. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. Glia 55, 1263-1271.

Cambray-Deakin, M., Pearce, B., Morrow, C. and Murphy, S. (1988a) Effects of neurotransmitters on astrocytes glycogen stores in vitro. Journal of Neurochemistry 51: 1852-1857.

Cambray-Deakin, M., Pearce, B., Morrow, C. and Murphy, S. (1988b) Effects of extracellular potassium on glycogen stores of astrocytes in vitro. Journal of Neurochemistry 51: 1846-1851.

Cataldo A. M. and Broadwell R. D. (1986) Cytochemical identification of cerebral glycogen and glucose-6-phosphatase activity under normal and experimental conditions. I. *Neurons and glia*. Journal of Electron Microscopy Technichs 3:413–37.

Cavalcante, L.A., Barradas, P.C. and Vieira, A.M. (1996) The regional distribution of neuronal glycogen in the opossum brain, with special reference to hypothalamic systems. Journal of Neurocytology 25: 455-463.

Chesler A. and Himwich H. E. (1944) Effect of insulin hypoglycaemia on glycogen content of parts of the central nervous system of the dog. Archives of Neurolological Psychiatry 52:114–6.

Choi, I.Y., Seaquist, E.R. and Gruetter, R. (2003) Effect of hypoglycemia on brian glycogen metabolism in vivo. Journal of Neuroscience Research 72, 25-32.
Cruz, N.F. and Dienel, G.A. (2002) High glycogen levels in brains of rats with minimal environmental stimuli: implications for metabolic contributions of working astrocytes. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 22, 1476-1489.
Coopersmith, R. and Leon, M. (1995) Olfactory bulb glycogen metabolism: noradrenergic modulation in the young rat. Brain Research 674: 230-237.
Dringen, R. and Hamprecht, B. (1992) Glucose, insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. Journal of Neurochemistry 58: 51-517.

Eugenin, E.A., Sáez, C.G., Garcés, G and Sáez, J.C. (1997) Regulation of glycogen content in rat pineal gland by norepinephrine. Brain Research 760: 34-41. Fishbeck, K.L and Rasmussen, K.M. (1987). Effect on repeated cycles in maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. Journal of Nutrition 117: 18967-1975.

Frederich, R.C., Lollmann, B. Hamann, A. et al. (1995) Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents. Impact of nutrition and obesity. Journal Clinical Investigation 96: 1658-1663.

Garcia, M.A., Millan, C., Balmaceda-Aguilera, C., Castro, T., Pastor, P., Montecinos, H., Reinicke, K., Zúñiga, F., Vera, J.C., Oñate, S.A. and Nualart, F.

(2003) Hypothalamic ependymal-glial cells express glucose transporter GLUT-2, a protein involved in glucose sensing. Journal Neurochemistry 86: 709-724.

Garriga, J. and Cussó, R. (1992) Efect of starvation on glycogen and glucose metabolism in different areas of the rat brain. Brain Research 591: 277-282.

Goncharova E. D. (1957) Effect of insulin and adrenalin on the polysaccharide matabolism in the brain. Reports of the Academy of Sciences Ukranian USSR 12:183–185.

Grove K L, Smith M S. (2003) Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. Physiology and Behavior 79:47-63.

Hoett, J.J. and Hanson, M.A. (1999) Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. Journal of Physiology (London) 514: 617-627.

Hof, P.R., Pascale, E. and Magistretti, P.J. (1988) K+ at concentrations reached in the extracellular space during neuronal activity promotes a Ca ⁺²-dependent glycogen hydrolysis in mouse cerebral cortex. Journal of Neuroscience 8: 1922-1928.

Horoboin, R.W. and Kavill-Davies, I.M. (1971) A mechanistic study of the histochemical reactions between aldehydes and Basic Fuchsin in acid alcohol used as a simplified substitute for Schiff's reagent. Histochemical Journal 3: 371-378.
Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X. and Schulz, D.W. (1964) Effect of schemia on known substrates and cofactors in the glycolityc pathway in the Brain. Journal of Biological Chemistry 239: 18-30.

Marcelino A. A., Moura A. S., Barradas P. C. and Tenório F. (2004) Hypothalamic nuclei nitric oxide synthase expression in rats malnoutrished during early lactation period. Nutritional Neuroscience 3:177-84.

Mohan, P.F. and Narasinga Rao, B.S. (1983) Adaptation to Underfeeding in Growing Rats. Effect of Energy Restriction at Two Dietary Protein Levels on Growth, Feed Efficiency, Basal Metabolism and Body Composition. Journal of Nutrition 113: 79-85.

Magistretti, P.J., Hof, P.R. and Martin, J.-L. (1986) Adenosine stimulates glycogenolysis in mouse cerebral cortex: a possible coupling mechanism between

neuronal activity and energy metabolism. The Journal of Neuroscience 6: 2558-2562.

Magistretti, P.J., Morrison, J.H., Shoemaker, W.J., Sapin, V. and Bloom, F. E. (1981) Vasoactive intestinal polypeptide induces glycogenolysis in mouse cortical slices: A possible regulatory mechanism for the local control of energy metabolism. Proceedings of The National Academy of Sciences USA 78: 6535-6539.

McKaigue P.M. (1997) A life-course approach to chronic disease epidemiology. In: Kuh, D. and Bem-Shlomo, Y. (Editors), Life Course Influences on Adult Disease. (Oxford University Press, Oxford, UK, 78-100).

Montanha-Rojas, E. A., Ferreira, A.A., Tenório, F. and Barradas, P.C. (2005) Nutritional Neuroscience 8: 49-56.

Morley, J.E., Farr, S.A., Suarez, M.D. and Flood, J.F. (1995) Nitric oxide synthase inhibition and food intake: effects on motivation to eat and in female mice. Pharmacology Biochemical Behaviour 50: 369-373.

Morley, J.E. and Mattammal M.B. (1996) Nitric oxide synthase levels in obese Zucker rats. Neuroscience Letters 209: 137-139.

Moura, A.S., Franco de Sa, C.C., Cruz, H.G. and Costa, C.L. (2002) Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of isulin and leptin. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35: 617-622.

Palladin, A.V. (1965) Biochemistry of the nervous system. National Aeronautics and Space Administration.

Patel, M.S., Srinivasan, M. and Aalinkeel, R. (2000) Metabolic programming by nutrition during early development. Indian Journal of Experimental Biology 38: 849-855.

Paxinos, G. and Watson, C. (1998) The rat brain- In stereotaxic coordinates. Fourth edition, Academic Press, USA.

Peruzzo, B., Pastor, F.E., Blázquez, J.L., Schobitz, K., Peláez, B., Amat, P. and Rodríguez, E.M. (2000) A second look at the barriers of the medial basal hypothalamus. Experimental Brain Research 132: 10-26.

Phelps C. H. (1972) Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain. An electron microscopic study. Brain Research 39:225–34.

Prasannan, K.G., Rajan, R. and Subrahmanyam, K. (1963a) Brain glycogen in the fed and fasting state. Indian Journal of Medical Research 51: 703-707.

Prasannan, K.G., Rajan, R. and Subrahmanyam, K. (1963b) Effect of cortisone on the levels of glycogen in the brain and liver of the fasting rat. Indian Journal of Medical Research 51:933-936.

Quach, T.T, Duchemin, A.-M., Rose, C. and Schwartz, J.-C. (1980) ³H-Glycogen hydrolysis elicited by histamine in mouse brain slices: selective involvement of H₁ receptors. Molecular Pharmacology 17: 301-308.

Quach, T.T., Rose C., Duchemin, A.-M. and Schwartz, J.-C. (1982) Glycogenolysis induced by serotonin in brain: identification of a new class of receptor. Nature 298: 373-375.

Ravelli, G.P., Stein, Z.A. and Susser, M.W. (1976) Obesity in young men after famine exposure in utero and early infance. New England Journal of Medicine 295:349-353.

Rodriguez. E.M., Blázquez, J.L., Pastor, F.E., Peláez, B., Peña, P, Peruzzo, B. and Amat, P. (2005) Hypothalamic tanycytes: a key component of brain-endocrine interaction. International Review of Cytology 247:89-164.

Reeves, P.G., Nielsen, F.H. and Fahey, G.C. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing committee on the reformulation of AIN-76A. Journal of Nutrition 123: 1939-1951. Rosenberg P. A, Dichter M. A. (1985) Glycogen accumulation in rat cerebral cortex in dissociated cell culture. Journal of Neuroscience Methods 15:101-12.

Sagar, S.M., Sharp, S.R. and Swanson, R.A. (1987) The regional distribution of glycogen in rat brain fixed by microwave irradiation. Brain Research 417: 172-174. Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte Jr. D., Seeley, R.J. and Baskin, D.G. (2000) Central nervous system control of food intake. Nature 404: 661-671.

Sherwood, N.M. and Timiras, P.S. (1970) A stereotaxic atlas of the developing rat brain. First Edition, University of California Press, Ltd., USA.

Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K. and Inoue, Y. (1997). Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial gliaastrocyte lineage os developing mouse spinal cord. Journal Neuroscience 17: 9212-9219.

Sorg, O., Pellerin, L., Stoltz, M., Beggah. H. And Magsitretti, P.J. (1995) Adenosine triphosphate and arachidonic acid stimulate glycogenolysis in primary cultures of mouse cerebral cortical astrocytes. Neuroscience Letters 188: 109-112.

Squadrito, F., Calapai, G., Altavilla, D., Cucinotta, D., Zingarelli, B., Arcoraci, V., Campo, G.M. and Caputi, A.P. (1994) Food deprivation increases brain nitric oxide synthase and depresses brain serotonin levels in rats. Neuropharmacology 33:83-86.

Subbarao, K.V. and Hertz, L. (1990) Efect of adrenergic agonists on glycogenolysis in primary cultures of astrocytes. Brain Research 563: 220-226

Ververken, D., Van Veldhoven, P., Proost, C., Carton, H. And De Wulf, H. (1982) On the role of calcium ions in the regulation of glycogenolysis in mouse brain cortical slices. Journal of Neurochemistry 38: 1286-1295.

Waterland, R.A. and Garza, C. (1999) Potential mechanisms of metabolic impriting that lead to chronic disease. American Journal of Clinical Nutrition 69: 179-197. Wender, R., Brown, A.M., Fern, R., Swanson, R.A., Farrell, K., Ransom, B.R. (2000) Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. Journal of Neuroscience 20, 6804-6810. Widdwoson, E.M. and Mccance, R.A. (1963) The effects of finite periods of undernuttrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. Proccedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences 158:329-342.

LEGENDS TO THE FIGURES

Figure 1 – Glycogen stores in the hypothalamus of control and malnourished animals. At P10 control animals showed an intense staining in the arcuate nucleus and median eminence (A). Malnourished animals presented a less intense staining at that age (B). By P20 (C and D) both animals presented a reduction on glycogen staining but in malnourished animals glycogen staining is still less intense (D). Calibration bar: $100\mu m$.

Figure 2 – MBP and GFAP immunostained cells do not localize with cells that accumulate glycogen. Cells with glycogen stores (B and E) presented no colocalization with MBP (A and D) or GFAP (C and F) immunostaining in adjacent sections. In D, E and F, in a higher magnification, notice that MBP and GFAP positive cells are present in some discrete clusters ventrally to the ventricular wall (arrows in D and F) that not localize with cell bodies stained for glycogen (arrows in E) present in the ependimal layer of the ventricular wall. * indicates third ventricle. Calibration bar: $50\mu m$

Figure 3 – Cells that stored glycogen in the median eminence localizes with vimentin positive cells. In A, photomicrograph of hypothalamus of a P20 animal stained for glycogen. Notice in B that the same cells were stained for vimentin (Boxes in A and B). Calibration bar: $100 \mu m$.

Figure 4 – GLUT2 showed co-localization with glycogen stained profiles. In A, photomicrograph of the hypothalamus of a P20 animal submmited to PAS glycogen staining. In B, the same section was immunorreacted with an antibody against GLUT2. Notice that every glycogen stained process presented GLUT2 immunoreactivity.

Calibration bar: 100µm.









	P10	P20	P30	P45	P60	P90
Control	24,97 ± 1,47	49,46 ± 3,57	96,03 ± 1,8	143,94 ± 2,19	239,57 ± 13,4	391,14 ± 22,86
Diet	11,8 ± 1,27	28,82 ± 0,91	76,07 ± 4,73	118,8 ± 1,38	207,4 ± 4,77	345,14 ± 21,52

Table 1. Animals weights (g) in experimental groups.

All data are presented as mean \pm S.D. Data were analyzed by the paired Student's *t* test and the differences were significant in all ages.

Elsevier Editorial System(tm) for Neuroscience

Letters

Manuscript Draft

Manuscript Number: NSL-08-1470

Title: Maternal malnutrition during lactation alters gonadotropin-releasing hormone expression in the weaned male pups' hypothalamus

Article Type: Research Paper

Keywords: hypothalamus; GnRH; malnutrition; lactation; estradiol

Corresponding Author: Sra cristiane fonte ramos, PhD

Corresponding Author's Institution: UERJ

First Author: cristiane fonte ramos, PhD

Order of Authors: cristiane fonte ramos, PhD; Sebastião S Lima, graduated; Michael L Rocha, undergraduated; Bruna M Lotufo, undergraduated; Francisco J Sampaio, PhD; Penha C Barradas, PhD

Abstract: The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is the key hormone regulating reproduction. Its feedback regulation is exercised by estradiol. The early postnatal period is critical for sexual differentiation. Despite the fact that malnutrition-related reproductive suppression in rats is a well-documented phenomenon, we do not have preceding knowledge until now on how maternal malnutrition affects the GnRH expression and estradiol serum concentrations of weaned pups. Six pregnant Wistar rats were separated into three groups at delivery with 6 pups each: control group (C) with free access to a standard diet containing 23% protein; protein energy restricted group (PER) with free access to an isoenergy and 8% protein diet; and energy-restricted (ER) group receiving a standard diet in restricted quantities, which were calculated, according to the mean ingestion of the PER group. At 21 days post partum the animals were killed and the serum estradiol was evaluated by radioimmunoassay. Immunohistochemistry for GNRH was performed. The serum estradiol concentration was decreased in PER and ER groups compared with C (PER=34%, ER=19%; P<0.01) and the staining of GNRH was restricted to arcuate nucleus and median eminence in C while in PER and ER stained processes aligned with the third ventricle wall (periventricular nucleus) were present. In conclusion, our data reinforce the concept that maternal nutritional state during lactation is critical for sexual maturation since maternal malnutrition resulted in a neuron migration delay evidenced by an altered GnRH expression profile, probably in consequence to a low estradiol serum levels.

Suggested Reviewers: John G Parnavelas PhD j.parnavelas@ucl.ac.uk

Peter J Morgane petmorgan@yahoo.com

John Tonkiss tonkissj@mail.nih.gov

Leny A Cavalcante

lacav@abc.org.br

Roberto Lent rlent@anato.ufrj.br

Giancarlo Panzica giancarlo.panzica@unito.it

Iain J Clarke iain.clarke@med.monash.edu.au

serge carreau
serge.carreau@unicaen.fr



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes Departamento de Anatomia Av. 28 de setembro, 87, 20550-030, Rio de Janeiro, Brasil Tel: (021)25876499 Fax: (021) 25876121 cramos-uerj@yahoo.com.br

September, 26/2008

Neuroscience Letters

Editorial Office 525 B Street, Suite 1900 San Diego, CA 92101 USA Tel +1-619-699-6791 Fax +1-619-699-6801 Editor-in-Chief: S. G. Waxman

Dear Dr. S. G. Waxman,

We would like to submit the manuscript "Maternal malnutrition during lactation alters gonadotropin-releasing hormone expression in the weaned male pups' hypothalamus" to The Neurosciences Letters.

In this paper we analyzed if maternal malnutrition during lactation alters the expression of the gonadotropin-releasing hormone and its relation with the estradiol serum levels.

We believe that the findings reported in the enclosed manuscript could be of interest to the readers of *The Neurosciences Letters*. I would like to add that this work has not been, and will not be, submitted for publication elsewhere until the journal has reached a decision on whether to publish the paper.

Sincerely yours,

Cristiane da Fonte Ramos, PhD Associate Professor Anatomy Department Roberto Alcantara Gomes Biology Institute State University of Rio de Janeiro Maternal malnutrition during lactation alters gonadotropin-releasing hormone expression in the weaned male pups' hypothalamus.

Cristiane da Fonte Ramos¹, Sebastião Sérgio Lima², Michael Luis Martins Rocha², Bruna Messias Lotufo², Francisco José Barcelos Sampaio¹, Penha Cristina Barradas², Frank Tenório².

 Departamento de Anatomia, Unidade de Pesquisa Urogenital, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

 Departamento de Farmacologia e Psicobiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Number of text pages: 16

Number of figures and tables: 4

To whom correspondence concerning manuscript should be sent Dr. Cristiane da Fonte Ramos Urogenital Research Unit - UERJ Av. 28 de Setembro, 87 – fundos – FCM – terreo 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, BRAZIL Fax: + 55 21 2587-6133; Phone: + 55 21 2587-6121 E-mail: cristiane@pesquisador.cnpq.br

Key words: hypothalamus, GnRH, malnutrition, lactation, estradiol

Abstract

The gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is the key hormone regulating reproduction. Its feedback regulation is exercised by estradiol. The early postnatal period is critical for sexual differentiation. Despite the fact that malnutrition-related reproductive suppression in rats is a well-documented phenomenon, we do not have preceding knowledge until now on how maternal malnutrition affects the GnRH expression and estradiol serum concentrations of weaned pups. Six pregnant Wistar rats were separated into three groups at delivery with 6 pups each: control group (C) with free access to a standard diet containing 23% protein; protein energy restricted group (PER) with free access to an isoenergy and 8% protein diet; and energy-restricted (ER) group receiving a standard diet in restricted quantities, which were calculated, according to the mean ingestion of the PER group. At 21 days post partum the animals were killed and the serum estradiol was evaluated by radioimmunoassay. Immunohistochemistry for GNRH was performed. The serum estradiol concentration was decreased in PER and ER groups compared with C (PER=34%, ER=19%; P<0.01) and the staining of GNRH was restricted to arcuate nucleus and median eminence in C while in PER and ER stained processes aligned with the third ventricle wall (periventricular nucleus) were present. In conclusion, our data reinforce the concept that maternal nutritional state during lactation is critical for sexual maturation since maternal malnutrition resulted in a neuron migration delay evidenced by an altered GnRH expression profile, probably in consequence to a low estradiol serum levels.

Introduction

The decapeptide gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is the key hormone regulating reproduction. It is synthesized in neurons in the preoptic area–anterior hypothalamus (POA-AH) of rodent brains and released from neuroterminals in the median eminence into portal capillary vessels leading to the anterior pituitary gland to regulate the synthesis and release of LH and FSH. These peptides in turn travel through the general circulation to the gonads, affecting the synthesis and secretion of steroid hormones.

Feedback regulation of GnRH neurons by estradiol plays important roles in the neuroendocrine control of reproduction. Also, peripheral estradiol rather than local aromatization of testosterone directly reflect the inhibitory tone exerted by estrogens on gonadotropin release [12, 14].

The late embryonic/early postnatal period is the critical period for sexual differentiation in mice [11]. Hypothalamic GnRH content increases steadily during postnatal development and it has been reported that changes in GnRH biosynthesis, as determined by messenger RNA (mRNA) and proGnRH peptide levels, also increase during the postnatal period, through puberty [4].

Malnutrition during lactation alters a wide variety of endocrine systems of the offspring, being characterized as a multifactorial disease whose alterations persist until the adult life, a phenomenon called metabolic programming [9].

Regarding the reproductive system, it has been shown that adult animals submitted to food restriction present an inhibition of both the maintenance and onset of reproductive capability [3], reduction of luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone serum concentrations and gonadotrophs morphological alterations that are typical of those found in cells whose secretory activities are suppressed [6]

There are several papers showing that many of those alterations started during the lactation time. Weaned pups whose mothers were malnourished during lactation present low body weight, alterations in the testis structure, expression of aromatase, ER and AR receptors in testis and in the serum leptin levels [8, 13, 18].

Despite the fact that malnutrition-related reproductive suppression in rats is a welldocumented phenomenon, we do not have preceding knowledge until now on how maternal malnutrition affects the GnRH expression in the hypothalamus of weaned pups and its relation with estradiol serum concentrations.

Materials and Methods

Animals

Wistar rats were kept in a room with controlled temperature $(25\pm1^{0}C)$ and an artificial dark–light cycle (lights on from 0700 to 1900 h). Virgin female rats of 3 months of age were caged with one male rat at a proportion of 2:1. After mating, determined by the presence of a vaginal plug, each female was placed in an individual cage with free access to water and food until delivery. The handling of the animals was approved by the Animal Care and Use Committee of the Biology Institute of State University of Rio de Janeiro, which based their analysis on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, and the study design was approved by the local Ethical Committee for the care and use of laboratory animals.

Nutritional diet

The low-protein diet was prepared in our laboratory and its composition is shown in Table 1. Vitamins and mineral mixtures were formulated to meet the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendation for rodent diets [15].

Experimental design

Six pregnant Wistar rats were separated at delivery into three groups: (C) control group – with free access to a standard laboratory diet containing 23% protein; protein energy restricted (PER) group – with free access to an isoenergy and protein-restricted diet containing 8% protein; and energy-restricted (ER) group – receiving standard laboratory diet in restricted quantities, which were calculated, every day, according to the mean ingestion of the PER group and correspond to 60% of that consumed by the control group. The PER group, in spite of having free access to diet, consume about 60% of that consumed by the control group. In this way, the amount of food consumed in both ER and PER groups was almost the same and was measured every day (data not shown).

Within 24 h of birth, excess pups were removed, so that only six pups were kept per dam, because it has been shown that this procedure maximizes lactation performance. At weaning (21 days post partum), seven male pups of each group were killed under thiopental anesthesia (0.10 ml/100 g bodyweight) and perfused transcardially with 0,9% salin followed by a solution of 4% paraphormaldehyde in phosphate buffer, 0.1M, pH7.4 and the same solution plus 10% of sucrose always in the morning.

Immunohistochemistry: Brains were removed and kept in phosphate buffer plus 20% sucrose at 4°C, overnight. Coronal slices were made in cryostat and kept in gelatinized

slides. After washing in PBS 0.3% Triton X100, 0.1M, pH 7.4 and immunoblocking with normal goat serum 10% in the same buffer for 2 hours at room temperature, slices were incubated with a polyclonal anti-GnRH antibody (a gift from Dr. Benoit, Montreal) overnight at 4°C (1:4000 in PBS 0.3% triton X100, 0,1M, pH7.4). The day after, slices were washed in PBS 0.1M, pH, 7.4 and incubated with an Alexa 488 conjugated secondary antibody for 1 hour R.T. After washing in PBS slides were mounted in N-Propil-Galate and coverslipped. Sections were analyzed under epiflurescence using an Olympus BX 40 microscope. Image capturing was performed with a cooled-charged-coupled device camera (Sony DXC 151A). Gray scale images were taken using Adobe Photoshop software.

Steroid determinations: Blood was collected by cardiac puncture and the serum kept at -20° C for subsequent determination of estradiol levels. The serum estradiol concentration was determined by using specific RIA (ICN Pharmaceuticals, Inc, CA, USA). The intraand inter-assay variation coefficients were 6.4 and 5.9%. Sensitivity of the RIA was 0.8 pg/ml for estradiol

Statistical analysis: All results are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Student–Newman–Keuls test. Values of P<0.05 were considered significant.

Results

Body weight: The body weight of pups whose mothers were subjected to a PER or ER diets during lactation was significantly lower than that of controls from the first days of life until the end of lactation (Fig. 1). Hormone concentrations: The serum estradiol concentration was significantly decreased in both PER and ER groups compared with controls (PER=34%, ER=19%; P<0.01, Fig. 2).

GnRH profiles were detected by imunohistochemistry procedure: The staining revealed radial processes of cells, leaving the third ventricle wall, and entering the hypothalamic parenquima in the arcuate nucleus (ARC) and mediam eminence (ME). In control animals these processes were restricted to these areas while in PER animals, stained processes aligned with the third ventricle wall (periventricular nucleus) were present. ER animals also presented stained processes in the periventricular region, staining in the ME and ARC was similar to what was observed in C and PER animals (Fig. 3a, b).

Discussion

This study in agreement with the literature provides further evidence that early malnutrition can lead to endocrine disruption [8, 18]. The reduction in body weight observed in this study is in agreement with past results showing that maternal malnutrition during lactation is associated with growth retardation [8].

The late embryonic/early postnatal period is the critical period for sexual differentiation in mice [11]. Hypothalamic GnRH content increases steadily during postnatal development [4]. However, maternal malnutrition during lactation seems to disturb this differentiation process since there is a difference in the distribution of GnRH stained processes in the periventricular nucleus of both malnourished groups.

Gonadal hormones were shown to influence brain development [16]. Henderson et al [5] showed that, in mice, the medial-lateral and dorso-ventral cell migration that occurs during development and differentiation of the POA-AH is dependent on sex steroids. Testosterone and estrogen cause changes in cell number, density of axonal connections, dendritic architecture and transmitter phenotype in the limbic-hypothalamic circuitry [10]. Also, peripheral estradiol levels rather than local aromatization from testosterone directly reflect the inhibitory tone exerted by estrogens on gonadotropin release [14]. In this paper both malnourished groups presented a low estradiol serum levels what could be responsible for that misplaced GnRH stained profiles.

The reproductive system of mammals is very sensitive to the availability of energy from an external environment. Acute changes in energetic status of animals affect the hypothalamo-pituitary-gonadotropic (HPG) axis activity [2]. Leptin seems to have a crucial role in the regulation of food intake at the CNS level and, moreover, modulates the release of the LH, the principal regulator of reproductive processes [7].

It is known that leptin promotes the development of ARC projections to other hypothalamic nuclei as the paraventricular nucleus (PVN) and lateral hypothalamic nucleus (LH) [1]. We have showed previously that serum leptin levels in pups whose mothers were submitted to protein or energy restricted diets is low during the first half of the lactation period but increases significantly at the end of this period [17] So, we can not discard the possibility that the alteration observed in the GnRH staining can be consequent to the alterations in the serum leptin levels presented in both malnourished groups.

It is known that male and female offspring whose mothers were submitted to protein or energy restricted diets present a delay on the onset of puberty [19]. It is possible that the alteration observed here in the GnRH staining profile can be related to the delay on the onset of puberty that occurs in these animals.

In conclusion, our data reinforce the concept that maternal nutritional state during lactation is critical for sexual maturation since maternal malnutrition resulted in a neuron migration delay evidenced by an altered GnRH expression profile, probably in consequence to a low estradiol serum levels.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Robert Benoit (McGill University Health Centre) for kindly providing the anti GnRH antibody. This work was supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordination for Improvement of Post-Graduated Students (CAPES), and State University of Rio de Janeiro (UERJ–SR2), Brazil. The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

References

- S.G. Bouret, S.J. Draper, R.B. Simerly, Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding, Science (New York, N.Y 304 (2004) 108-110.
- [2] M.J. Cunningham, D.K. Clifton, R.A. Steiner, Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms, Biology of reproduction 60 (1999) 216-222.
- [3] C. Desjardins, M.J. Lopez, Environmental cues evoke differential responses in pituitary-testicular function in deer mice, Endocrinology 112 (1983) 1398-1406.
- [4] C.M. Dutlow, J. Rachman, T.W. Jacobs, R.P. Millar, Prepubertal increases in gonadotropin-releasing hormone mRNA, gonadotropin-releasing hormone

precursor, and subsequent maturation of precursor processing in male rats, The Journal of clinical investigation 90 (1992) 2496-2501.

- [5] R.G. Henderson, A.E. Brown, S.A. Tobet, Sex differences in cell migration in the preoptic area/anterior hypothalamus of mice, Journal of neurobiology 41 (1999) 252-266.
- [6] D.C. Herbert, Morphology of the mammotrophs and gonadotrophs in the anterior pituitary gland of rats with protein-calorie malnutrition, The American journal of anatomy 158 (1980) 521-531.
- [7] S.P. Kalra, M.G. Dube, S. Pu, B. Xu, T.L. Horvath, P.S. Kalra, Interacting appetiteregulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight, Endocrine reviews 20 (1999) 68-100.
- [8] M. Leonhardt, J. Lesage, D. Croix, I. Dutriez-Casteloot, J.C. Beauvillain, J.P. Dupouy, Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty, Biology of reproduction 68 (2003) 390-400.
- [9] B.E. Levin, Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis, Philosophical transactions of the Royal Society of London 361 (2006) 1107-1121.
- [10] M.D. Madeira, A.R. Lieberman, Sexual dimorphism in the mammalian limbic system, Progress in neurobiology 45 (1995) 275-333.
- [11] S.F. Pang, F. Tang, Sex differences in the serum concentrations of testosterone in mice and hamsters during their critical periods of neural sexual differentiation, The Journal of endocrinology 100 (1984) 7-11.
- [12] S.L. Petersen, E.N. Ottem, C.D. Carpenter, Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol, Biology of reproduction 69 (2003) 1771-1778.
- [13] F. Ramos Cda, A.M. da Silva, W.S. Costa, F.J. Sampaio, Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period, Urologia internationalis 76 (2006) 63-66.
- [14] G. Raven, F.H. de Jong, J.M. Kaufman, W. de Ronde, In men, peripheral estradiol levels directly reflect the action of estrogens at the hypothalamo-pituitary level to inhibit gonadotropin secretion, The Journal of clinical endocrinology and metabolism 91 (2006) 3324-3328.
- [15] P.G. Reeves, F.H. Nielsen, G.C. Fahey, Jr., AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, The Journal of nutrition 123 (1993) 1939-1951.
- [16] R.B. Simerly, Wired for reproduction: organization and development of sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain, Annual review of neuroscience 25 (2002) 507-536.
- [17] C. Teixeira, M. Passos, C. Ramos, S. Dutra, E. Moura, Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation, The Journal of nutritional biochemistry 13 (2002) 493.
- [18] C.V. Teixeira, D. Silandre, A.M. de Souza Santos, C. Delalande, F.J. Sampaio, S. Carreau, C. da Fonte Ramos, Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning, The Journal of endocrinology 192 (2007) 301-311.

[19] E. Zambrano, G.L. Rodriguez-Gonzalez, C. Guzman, R. Garcia-Becerra, L. Boeck,
L. Diaz, M. Menjivar, F. Larrea, P.W. Nathanielsz, A maternal low protein diet
during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development,
The Journal of physiology 563 (2005) 275-284.

Figure legends

Figure 1

Body weight of 21-day old rats whose dams were fed a diet with 23% of protein - control group (C), a diet with 8% of protein - protein-restricted group (PER), or a diet with 23% of protein but in restricted quantities - energy-restricted group (ER), during lactation period. Values are given as mean \pm standard deviation of 7 animals per group.

Figure 2

Serum estradiol concentration of 21-day old rats whose dams were fed a diet with 23% of protein - control group (C), a diet with 8% of protein - protein-restricted group (PER), or a diet with 23% of protein but in restricted quantities - energy-restricted group (ER), during lactation period. Values are given as mean \pm standard deviation of 7 animals per group. * p < 0.01 vs. C.

Figure 3

Photomicrographs of the hypothalamus of P21 rats' immunoreacted with an anti-GnRH antibody. In control animals (A) GnRH immunostaining are present in ARC and ME. PER animals (B) also presented immunostaining in ARC and ME but some stained process curse along the periventricular nucleus. In ER animals (C) staining is similar to the one observed in PER animals. Bars = $50\mu m$

	Control §	Protein- Restricted *
Ingredients (g/Kg)		
Total protein 🌲	230.0	80.0
Corn starch	676.0	826.0
Soybean oil	50.0	50.0
Vitamin mix †	4.0	4.0
Mineral mix †	40.0	40.0
Macronutrient composition (%)		
Protein	23.0	8.0
Carbohydrate	66.0	81.0
Fat	11.0	11.0
Total energy (KJ / Kg)	17038.7	17038.7

Table-1: Composition of control and protein-energy restricted diets.

***** The principal protein resources are soybean wheat, steak, fish and amino acids.

§ = Standard diet for rats (Nuvilab-Nuvital ltd., Paraná, Brazil).

*The protein-restricted diet was prepared in our laboratory by using the control diet, with replacement of part of its protein content with cornstarch. The amount of the latter was calculated to replace the same energy content of the control diet.

† Vitamin and mineral mixtures were formulated to meet the American Institute of Nutrition AIN-93G recommendation for rodent diets (Reeves *et al.* 1993).





