UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

NATALIA ANDREA CRUZ OCHOA

**EFEITOS DA ANÓXIA NEONATAL EM RATOS WISTAR, NO
DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, METABOLISMO ENERGÉTICO E CIRCUITOS
HIPOTALÂMICOS RELACIONADOS**

São Paulo
2018

NATALIA ANDREA CRUZ OCHOA

**EFEITOS DA ANÓXIA NEONATAL EM RATOS WISTAR, NO
DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, METABOLISMO ENERGÉTICO E CIRCUITOS
HIPOTALÂMICOS RELACIONADOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: **Prof. Dr. Maria Inês Nogueira**

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Cruz Ochoa, Natalia Andrea

EFEITOS DA ANÓXIA NEONATAL EM RATOS WISTAR, NO
DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO, METABOLISMO ENERGÉTICO E
CIRCUITOS HIPOTALÂMICOS RELACIONADOS / Natalia
Andrea Cruz Ochoa; orientadora Maria Inês Nogueira.
-- São Paulo, 2018.

76 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hipotálamo. 2. Ingestão alimentar. 3.
Crescimento. 4. Insulina. 5. Leptina. I. Nogueira,
Maria Inês, orientador. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar muito mais do que eu mereço.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Inês Nogueira, por me acolher carinhosamente em seu laboratório e me mostrar o quão valioso e enriquecedor é o trabalho de um pesquisador. Obrigada por acreditar nas minhas capacidades e pela constante ajuda no meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Aos professores Dra. Luciane Valeria Sita, Dra. Marcela Bermudez Echeverry e ao Dr. Newton Sabino Canteras, por suas críticas construtivas durante o exame de qualificação, as quais ajudaram a direcionar meu trabalho.

À Kelly Borges, técnica do laboratório, quem esteve sempre disposta a me ajudar desde o primeiro dia, sem importar a data tampouco a hora. Obrigada pelo apoio incondicional no desenvolvimento dos experimentos e por me ensinar todas as técnicas e procedimentos realizados neste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação Amrita Jah Kumar, Ammir Yacoub Helou, Bruna Petrucelli Arruda, Luana Janota de Carvalho, Livia Clemente, Silvia Takada, Victor Vasquez Matsuda e Vitor Yonamine Lee, pelas ideias, colaborações e discussões constantes.

Ao laboratório de Neurociências e Comportamento, especialmente ao Prof. Dr. Gilberto Fernando Xavier, por disponibilizar as instalações e os equipamentos do laboratório, os quais foram essenciais para a realização dos experimentos. Ao técnico Manoel Brito, pelo cuidado dos animais, disposição e ajuda.

Ao Departamento de Anatomia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), aos funcionários da secretaria de pós-graduação e do biotério. Especialmente à Patrícia Rocha, pela paciência, auxílio com todos os tramites acadêmicos e à estatística Rosana Prisco, pelo apoio fundamental na análise dos dados e na interpretação dos resultados.

À Sandy Lorena Pulecio pelas microfotografias e medições dos ilhotes dos pâncreas e Sandra Lorena Navas, técnica do laboratório de histopatologia da *Universidad de los Llanos*, pelo processamento dos pâncreas.

À Renata Wandroski Peris pela amizade, apoio e caronas.

Aos professores do departamento de patologia veterinária, Luciano Freitas Felicio, Cristina Massoco e a técnica Nicolle Queiroz, pelas dosagens hormonais e pela amizade.

Aos ratinhos de experimentação, por nos permitir descobrir com suas vidas um mundo de conhecimento.

A meus pais Julieta Esperanza e Pablo Emilio, e meus irmãos Ana Maria e Pablo Felipe por serem meu exemplo a seguir. Obrigada por todo o apoio durante o mestrado e na elaboração da dissertação, obrigada por acreditar em mim e me motivar constantemente a conquistar muito mais do que eu imaginava.

A meu namorado, João Gabriel, por estar sempre do meu lado me apoiando e motivando. Obrigada pela paciência e por ser minha mão direita nesses últimos meses. A seus pais Gorete e Marcio e sua família, por terem cuidado de mim e me fazerem sentir em casa.

Obrigada a todos meus professores, familiares, funcionários, colegas e amigos que em algum momento de uma ou de outra forma tem contribuído na minha formação acadêmica e pessoal. Meus sinceros agradecimentos para todos vocês, pois sem sua ajuda não teria sido possível realizar esta dissertação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. E com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Obrigada pelo apoio financeiro aos experimentos do laboratório de Neurociências e a minha manutenção no Brasil durante o mestrado.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder com classe
e vencer com ousadia, pois o triunfo pertence
a quem se atreve... A vida é muito bela para
ser insignificante.”*

(Charles Chaplin)

RESUMO

CRUZ-OCHOA, NA. **Efeitos da anóxia neonatal em ratos Wistar, no desenvolvimento somático, metabolismo energético e circuitos hipotalâmicos relacionados**. 2018. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O déficit de oxigênio no neonato recém-nascido é denominado anóxia, asfixia, hipóxia, ou hipóxia-isquemia neonatal. Esta condição atinge a 0,24% dos neonatos a termo, 0,51% dos prematuros e aproximadamente 60% dos prematuros de baixo peso. A anóxia neonatal pode ocasionar consequências a longo prazo, como déficits cognitivos e comportamentais, epilepsia e inclusive paralisia cerebral (14,5%). No entanto, pouco se tem estudado acerca das alterações metabólicas e de longo prazo ocasionadas por este estímulo. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar os efeitos da anóxia neonatal no crescimento somático, metabolismo energético e núcleos hipotalâmicos relacionados. Para tal fim, foi induzida anóxia neonatal em ratos Wistar (P2), avaliado o crescimento somático e a ingestão alimentar até P90. Além disso, foi estudada a resposta ao estímulo de jejum agudo e de realimentação, quanto aos parâmetros de: perda e ganho de peso, ingestão alimentar, níveis de leptina, insulina e glicemia, áreas das ilhotas de Langerhans e expressão da proteína Fos nos núcleos hipotalâmicos ARC, VMH, DMH e PVN. Como resultado, a anóxia neonatal modificou o peso corporal na idade adulta, sem afetar a ingestão alimentar diária, sugerindo que a diferença de peso é consequência de um desequilíbrio energético. Ademais, alterou a resposta ao estímulo de jejum e de realimentação, modificando a secreção de leptina e insulina, a perda de peso, a ingestão alimentar pós-jejum, o tamanho das ilhotas de Langerhans e a expressão de Fos no ARC. Estes resultados em conjunto, sugerem que a anóxia neonatal foi capaz de alterar o metabolismo energético dos ratos Wistar, repercutindo no desenvolvimento somático.

Palavras-chave: Hipotálamo. Ingestão Alimentar. Crescimento. Insulina. Leptina.

ABSTRACT

CRUZ-OCHOA, NA. **Effects of neonatal anoxia in Wistar rats, somatic development, energy metabolism and related hypothalamic circuits**. 2018. 76 p. Master Thesis (Master Degree in Morphofunctional Sciences) - Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo – ICB/USP, Sao Paulo, 2018.

Oxygen deficiency in the newborn is named anoxia, asphyxia, hypoxia, or neonatal hypoxia-ischemia. This condition reaches 0.24% of full-term infants, 0.51% of premature infants and approximately 60% of low birth weight preterm infants. Neonatal anoxia can have long-term consequences, such as cognitive and behavioral deficits, epilepsy and even cerebral palsy (14.5%). However, little has been studied about the metabolic and long-term changes caused by this stimulus. Thus, the objective of this work is to evaluate the effects of neonatal anoxia on somatic growth, energetic metabolism and related hypothalamic nuclei. For this purpose, neonatal anoxia was induced in Wistar rats (P2), and somatic growth and food intake were evaluated up to P90. In addition, we studied the response to acute fasting and feedback, as well as the parameters of loss and weight gain, food intake, leptin, insulin and glycemia levels, areas of the islets of Langerhans and expression of the Fos protein in ARC, VMH, DMH and PVN. As result, neonatal anoxia changed body weight in adulthood, without affecting daily dietary intake, suggesting that the difference in weight is a consequence of an energy imbalance. In addition, it altered the response to fasting and feedback stimuli, modifying leptin and insulin secretion, weight loss and post-fasting food intake, size of the islets of Langerhans, and expression of Fos in the ARC. These results together suggest that neonatal anoxia was able to alter the energy metabolism of Wistar rats, thus affecting somatic development.

Keywords: Hypothalamus. Food intake. Growth. Leptin. Insulin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Circuito hipotalâmico regulador da ingestão alimentar e do equilíbrio energético.	14
Figura 2 - Sistema de Anóxia Neonatal.....	21
Figura 3 - Parâmetros de desenvolvimento somático.....	22
Figura 4 - Ciclo Estral.	23
Figura 5 - Avaliação de glicemia.	24
Figura 6 - Coleta dos cortes do encéfalo.....	25
Figura 7 - Contagem no programa Stereo investigator.....	28
Figura 8 - Peso corporal.	29
Figura 9 - Eixos de crescimento corporal.	30
Figura 10 - Ingestão Alimentar.....	32
Figura 11 - Perda de peso pós-jejum e ganho de peso pós-prandial.	33
Figura 12 - Ingestão alimentar pós-jejum em P35 e P95.....	34
Figura 13 - Níveis de glicemia.....	34
Figura 14 - Dosagem de insulina.	35
Figura 15 - Dosagem de Leptina.....	36
Figura 16 - Área das ilhotas de Langerhans.	37
Figura 17 - Ilhotas de Langerhans P35.....	37
Figura 18 - Ilhotas de Langerhans P95.....	38
Figura 19 - Peso Corporal.....	39
Figura 20 - Ingestão Alimentar.....	40
Figura 21 - Perda de peso pós-jejum e ganho de peso pós-prandial.	42
Figura 22 - Ingestão Alimentar pós-jejum.....	43
Figura 23 - Níveis de Glicemia dos animais alocados em grupo e isoladamente.	44
Figura 24 - Dosagem de Insulina.	45
Figura 25 - Dosagem de Leptina.....	45
Figura 26 - Contagem c-Fos no Hipotálamo.	46
Figura 27 - Marcação para c-Fos no Núcleo Arqueado.....	47
Figura 28 - Contagem NeuN no ARC.....	48
Figura 29 - Campo Aberto em P28.	68
Figura 30 - Campo Aberto em P88.	69
Figura 31 - Labirinto em cruz elevado em P30.....	70
Figura 32 - Labirinto em cruz elevado em P90.....	72
Figura 33 - Dosagem de Corticosterona P30 e P90.....	74
Figura 34 - Dosagem de Corticosterona P90.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação em P35.....	31
Tabela 2 - Parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação em P95.....	31
Tabela 3 - Matriz de Correlações.....	38
Tabela 4 - Parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação em P35.....	40
Tabela 5 - Parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação em P95.....	41
Tabela 6 - Efeitos do déficit de oxigênio neonatal no peso corporal.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3v	-Terceiro ventrículo
α -MSH	-Hormônio estimulante de alfa-melanócitos
AgRP	-Proteína r-Agouti
Af	-Anóxia fêmea
Am	-Anóxia macho
ANOVA	-Análise de variância
ARC	-Núcleo arqueado
BAT	-Tecido adiposo marrom
CART	-Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina
Cf	-Controle fêmea
Cm	-Controle macho
CRH	-Hormônio Liberador de Corticotrofina
DAB	-Diaminobenzidina
DH ₂ O	-Água destilada
DMH	-Núcleo dorsomedial do hipotálamo
DPX	-Meio de montagem
ELLC	-Eixo látero-lateral do crânio
EAPC	-Eixo ântero-posterior do crânio
ELC	-Eixo longitudinal do corpo
FFAs	-Ácidos graxos livres
GD	-Dia gestacional
GH	-Hormônio do crescimento
GLP-1	-Péptido-1 semelhante a glucagon
H ₂ O ₂	-Peróxido de hidrogênio
HI	-Hipóxia-isquemia
HIE	-Encefalopatia hipóxico-isquêmica
ICB	-Instituto de Ciências Biomédicas
IRs	-Receptores de insulina
LHA	-Área hipotalâmica lateral
ME	-Eminência mediana
MSH	-Hormônio Estimulante de Melanócitos

MCH	-Hormônio concentrador de melanina
MCR	-Receptores de melanocortina
n	-Número da amostragem
NGS	-Normal goat sérum
NLET	-Núcleo leito da estria terminal
N ₂	-Nitrogênio
NPY	-Neuropeptídeo Y
ObRb	-Isoforma longa do receptor de leptina
P	-Dia pós-natal
PBS	-Tampão fosfato-salino
POMC	-Pró-opiomelanocortina
PVN	-Núcleo paraventricular
TRH	-Hormônio liberador de tireotrofina
DMH	-Núcleo dorsomedial do hipotálamo
VMH	-Núcleo ventromedial do hipotálamo
VTA	-Área tegmental ventral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. EMBASAMENTO TEÓRICO	12
2.1 CIRCUITOS HIPOTALÂMICOS REGULADORES DO EQUILÍBRIO ENERGÉTICO E DA ALIMENTAÇÃO.....	12
2.2 HORMÔNIOS REGULADORES DO EQUILÍBRIO ENERGÉTICO E DA ALIMENTAÇÃO	15
3. OBJETIVO GERAL	18
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 ANIMAIS E FORMAÇÃO DE GRUPOS.....	19
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL	20
4.3 ANÓXIA NEONATAL.....	21
4.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO	22
4.5 INGESTÃO ALIMENTAR.....	22
4.6 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL	23
4.7 ESTÍMULO DE JEJUM, PERFUSÃO E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	24
4.8 DOSAGEM HORMONAL.....	25
4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PROTEÍNA FOS E NEUN	26
4.11 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA	27
4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	28
5. RESULTADOS EXPERIMENTO 1- ANIMAIS ALOCADOS EM GRUPO	28
5.1 PESO CORPORAL.....	28
5.2 EIXOS DE CRESCIMENTO CORPORAL.....	29
5.3 ESTÍMULO DE JEJUM E REALIMENTAÇÃO	31
5.3.1 Ingestão Alimentar	32
5.3.2 Perda De Peso Pós-Jejum E Ganho De Peso Pós-Prandial	32
5.3.3 Ingestão Alimentar Pós-Jejum	33
5.3.4 Glicemia Em P35 E P95	34
5.3.5 Insulina	35
5.3.6 Leptina.....	36
5.3.7 Ilhotas De Langerhans P35 E P95.....	37
5.3.8 Correlação Glicemia-Insulina-Ilhotas De Langerhans	38
6. RESULTADOS EXPERIMENTO 2 – ISOLADOS	39
6.1 PESO CORPORAL.....	39
6.2 INGESTÃO ALIMENTAR.....	40

6.3	ESTIMULO DE JEJUM E REALIMENTAÇÃO	40
6.3.1	Perda De Peso Pós-Jejum E Ganho De Peso Pós-Prandial	41
6.3.2	Ingestão Alimentar Pós-Jejum	42
6.3.3	Glicemia	43
6.3.4	Insulina	45
6.3.5	Leptina.....	45
6.3.6	Imunohistoquímica C-Fos	46
6.3.7	Imunohistoquímica Neun	48
7.	DISCUSSÃO	49
7.1	EXPERIMENTO 1- ANIMAIS MANTIDOS AGRUPADOS.....	49
7.1.1	Efeitos Da Anóxia Neonatal No Metabolismo Energético.....	49
7.2	EXPERIMENTO 2- ANIMAIS ISOLADOS.....	54
7.2.1	Efeitos Da Anóxia Neonatal E Do Isolamento No Metabolismo Energético.....	54
8.	CONCLUSÃO	58
9.	LIMITAÇÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
10.	REFERÊNCIAS	60
11.	APÊNDICE	68
11.1	EXPERIMENTOS ADICIONAIS.....	68
11.1.1	Campo Aberto	68
11.1.2	Labirinto Em Cruz Elevado P30.....	69
11.1.3	Labirinto Em Cruz Elevado P90	71
11.1.4	Níveis De Corticosterona Em P30 E P90.....	73
12.	ANEXO I	75

1. INTRODUÇÃO

O déficit de oxigênio no período perinatal pode causar lesões neurológicas, convulsões, alterações comportamentais e inclusive levar a óbito (GRAHAM et al., 2008). Na prática clínica, mesmo com as ferramentas atuais, não é possível distinguir entre asfixia e hipóxia-isquemia neonatal, sendo os termos geralmente utilizados como sinônimos. Nos neonatos prematuros o diagnóstico se torna ainda mais difícil, pois neles outros potenciais indicadores de prejuízo no intercâmbio gasoso são usualmente observados (LAPTOOK, 2016).

Nos neonatos a termo, a incidência de encefalopatia hipóxico-isquêmica (HIE) é de 2,4/1000 nascidos vivos, sendo que 23,1% apresentam afetação neurológica (GRAHAM et al., 2008). Entretanto, nos prematuros a incidência aumenta a 5,13/1000 nascidos vivos, essencialmente devido a imaturidade do sistema respiratório (LAPTOOK, 2016). Neste grupo etário, a incidência se torna ainda maior naqueles que apresentam baixo peso gestacional no momento do nascimento, atingindo aproximadamente 60% dos nascidos vivos (VANNUCCI; VANNUCCI, 2005).

A asfixia ou hipóxia-isquemia perinatal, pode ser ocasionada por fatores maternos (diabetes mellitus, hipertensão, pré-eclâmpsia, choque hipotensivo, ruptura uterina, anemia severa e infecção), neonatais (anomalias das vias aéreas, déficits neurológicos, infecção e doenças cardiovasculares severas), e placentários ou do cordão umbilical (desprendimento placentário, hemorragia feto maternal, e compressão ou prolapso do cordão umbilical) (LAPTOOK, 2016; RAINALDI; PERLMAN, 2016).

As consequências neurológicas a longo prazo da HIE, variam de acordo com a intensidade do insulto. Na asfixia leve ou moderada, a função neurocognitiva pode não ser alterada. Enquanto que nos casos mais severos, pode ocorrer déficits cognitivos e comportamentais, epilepsia e inclusive paralisia cerebral (14,5%) (GRAHAM et al., 2008; BARKHUIZEN et al., 2017).

Para o estudo desta condição clínica, foram desenvolvidos vários modelos animais que promovem o déficit de oxigênio nos neonatos. Os principais são: o modelo de hipóxia-isquemia neonatal (LEVINE, 1960), com suas adaptações (VANNUCCI; VANNUCCI, 2005), o modelo de asfixia perinatal (BARKHUIZEN et al., 2017) e o modelo de anóxia neonatal (TAKADA et al., 2011).

No laboratório de Neurociências do ICB-USP, é utilizado o modelo de anóxia neonatal, cuja vantagem é promover anóxia global de forma não invasiva (TAKADA et al., 2011). O procedimento procura simular as condições clínicas dos prematuros, grupo no qual a incidência de anóxia neonatal é maior. Para isto, são utilizados ratos no segundo dia pós-natal (P2), considerando que seu desenvolvimento neurológico corresponde a de um prematuro humano de 6 a 7 meses de gestação (SEMPLE et al., 2013).

Nos estudos prévios do laboratório, foram observados prejuízos da anóxia neonatal em populações neuronais e gliais de várias áreas encefálicas (VASCONCELOS, 2013; LEE, 2015; TAKADA et al., 2015, 2016; KUMAR et al., 2017). No hipocampo foi detectada morte celular por apoptose e necrose, alterações em organelas celulares condizentes com processos degenerativos, diminuição da neurogênese e alterações de volume (TAKADA et al., 2015, 2016). No córtex motor e sensorial primário, foi identificada diminuição da densidade celular nas regiões dos membros superiores e inferiores (KUMAR et al., 2017). Além disso, foram observados déficits cognitivos e comportamentais (LEE, 2015; TAKADA et al., 2015, 2016), retardo no desenvolvimento sensório-motor e alterações do crescimento somático (VASCONCELOS, 2013; LEE, 2015; KUMAR et al., 2017).

As alterações somáticas tendem a evidenciar que a anóxia neonatal produz um aumento de peso e das dimensões corporais do animal, evidentes desde as primeiras semanas de amamentação, e persistentes na fase adulta (VASCONCELOS, 2013; LEE, 2015; KUMAR et al., 2017). Tais alterações, sugerem um possível efeito da anóxia no comportamento alimentar, metabolismo energético, e/ou taxa de crescimento somático. Portanto, o estudo do hipotálamo é importante, por ser uma estrutura de integração e regulação desses processos fisiológicos.

2. EMBASAMENTO TEÓRICO

2.1 CIRCUITOS HIPOTALÂMICOS REGULADORES DO EQUILÍBRIO ENERGÉTICO E DA ALIMENTAÇÃO

O hipotálamo está composto por núcleos e áreas que recebem e integram informações, para promover mudanças fisiológicas e manter a homeostase (COLL; YEO, 2013). Nesta estrutura são regulados diversos processos fisiológicos, como a termorregulação, o crescimento, a reprodução, a alimentação, o ciclo sono/vigília, a adaptação ao estresse e o comportamento defensivo (BERTHOUD, 2002; VAN SWIETEN et al., 2014).

Na regulação da ingestão alimentar e do equilíbrio energético, o hipotálamo recebe informação do estado interno por meio de vias neurais aferentes, receptores hormonais e sensores de metabolitos (figura 1). Essas informações são processadas nos circuitos hipotalâmicos, e em seguida são geradas respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais (BERTHOUD, 2002).

O circuito hipotalâmico que controla o equilíbrio energético e a alimentação, está composto principalmente pelo núcleo arqueado (ARC), o núcleo ventromedial (VMH), o núcleo dorsomedial (DMH), o núcleo paraventricular (PVN) e a área hipotalâmica lateral (LHA) (FUNAHASHI et al., 2003; KÖNNER; KLÖCKENER; BRÜNING, 2009).

O núcleo arqueado (ARC) regula a alimentação e o equilíbrio energético por meio de duas populações de neurônios, funcionalmente opostos. A primeira população é composta pelos que expressam o precursor pró-opiomelanocortin (POMC) e o transcrito regulado pela cocaína e anfetamina (CART). Já a segunda, pelos que expressam a proteína r-Agouti (AgRP) e o neuropeptídeo Y (NPY). Os neurônios POMC/CART são anorexígenos e aumentam o gasto energético; os neurônios AgRP/NPY são orexígenos e diminuem o gasto energético (KÖNNER; KLÖCKENER; BRÜNING, 2009; JOLY-AMADO et al., 2014).

As duas populações de neurônios agem no sistema melanocortina para controlar a ingestão e o gasto de energia. Os neurônios POMC/CART liberam o hormônio estimulante de alfa-melanócitos (α -MSH), o qual ativa os receptores de melanocortina (MCR). Por sua vez, os neurônios que expressam AgRP/NPY inibem a

ação do α -MSH no nível pós-sináptico e a taxa de disparo do POMC (BERTILE; RACLOT, 2006; KÖNNER; KLÖCKENER; BRÜNING, 2009; JOLY-AMADO et al., 2014).

O núcleo arqueado apresenta conexões com diversas áreas hipotalâmicas e extrahipotalâmicas. Suas aferências provêm da área periventricular, do PVN e do núcleo pré-óptico, mas também do LHA e de diversas áreas extrahipotalâmicas como a amígdala, o núcleo leito da estria terminal (NLET), diversas regiões do tronco cerebral e do córtex (BERTHOUD, 2002).

Suas eferências projetam para o DMH, núcleos talâmicos mediais, o núcleo da rafe, a substância cinzenta periaquedutal e o núcleo parabraquial lateral (BERTHOUD, 2002). Além disso, os neurônios POMC/CART e AgRp/NPY projetam para o PVN, e para neurônios no LH que expressam o hormônio concentrador de melanina (MCH) e orexinas (ELIAS et al., 1998; BERTHOUD, 2002).

O hipotálamo lateral (LHA) ao regular diversas funções, desde autonômicas até cognitivas, desempenha papel importante no comportamento alimentar e no equilíbrio energético (BERTHOUD, 2002). Nesta regulação, participam neurônios que expressam MCH e orexinas, os quais promovem a ingestão alimentar (QU et al., 1996) e recebem aferências (NPY/AgRp e α -MSH) do ARC (ELIAS et al., 1998; SCHWARTZ et al., 2000).

Estudos evidenciaram que a estimulação do LHA aumenta a ingestão, enquanto que uma lesão nessa região a inibe (ANAND; BROBECK, 1951). No entanto, o efeito é causado pela destruição de conexões que atravessam esse núcleo, e não por lesões de neurônios residentes (ELIAS et al., 1998).

O LH é a área mais interconectada do hipotálamo, apresentando conexões eferentes para o sistema endócrino, o telencéfalo, o rombencéfalo e a medula espinhal. Dentro do hipotálamo, o LH se conecta reciprocamente com o ARC e o PVN, ademais envia projeções para o DMH, VMH e o núcleo hipotalâmico anterior (BERTHOUD, 2002).

O núcleo paraventricular (PVN) não regula de maneira direta a ingestão alimentar, mas interfere indiretamente, pois age nos processos digestivos e metabólicos (BERTHOUD, 2002). De maneira contrária ao LH, a estimulação do PVN inibe a ingestão, enquanto que uma lesão a promove, indicando que moléculas anorexígenas devem ser sintetizadas nesta área (SCHWARTZ et al., 2000).

Esta estrutura recebe aferências de outras áreas do hipotálamo, do tronco encefálico, do córtex e do sistema límbico. Dentro do hipotálamo recebe do núcleo pré-optico, periventricular, ARC, DMH e LH (BERTHOUD, 2002). As aferências provenientes do ARC chegam a importantes neurônios neuroendócrinos, como os sintetizadores de oxitocina, vasopressina, hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e hormônio liberador de tireotrofina (TRH) (SCHWARTZ et al., 2000). Além disso, o PVN envia projeções para a pituitária, o mesencéfalo, o rombencéfalo, a medula espinhal, o DMH, o VMH, o ARC e o LH (BERTHOUD, 2002).

Figura 1 - Circuito hipotalâmico regulador da ingestão alimentar e do equilíbrio energético.

Abreviaturas: AH, hipotálamo anterior; ARC, núcleo arqueado; DMN, núcleo dorsomedial; LHA, hipotálamo lateral; MPOA, área preoptica medial; NTSmc, núcleo solitário medial caudal; NTSmr, núcleo solitário medial rostral; Pam, Papl e Papm, núcleo paraventricular magnocelular, parvocelular lateral, e parvocelular medial; Pe, núcleo periventricular; PBN-l, PB-m, núcleo parabraquial lateral e medial; SCH, núcleo supraquiasmático; SON, núcleo supraoptico; VLM, medula ventrolateral; VMN, núcleo ventromedial. Fonte: (BERTHOUD, 2002)

O núcleo dorsomedial (DMH) regula o gasto energético estimulando a termogênese no tecido adiposo marrom. Assim como em outros núcleos deste circuito, o DMH apresenta neurônios que expressam NPY e CRH (ZHANG; BI, 2018). Esta estrutura recebe conexões do ARC, VMH, PVN e LH, e envia projeções para o PVN, VMH e hipotálamo anterior (BERTHOUD, 2002).

O núcleo ventromedial (VMH) historicamente, tem sido relacionado com o comportamento alimentar, pois lesões nesta área causam aumento de peso e da ingestão (HETHERINGTON; RANSON, 1940). No entanto, atualmente sabe-se que não apenas estas lesões modificam o equilíbrio energético, também lesões no ARC, PVN, LH e nas suas conexões podem aumentar ou diminuir a ingestão alimentar (KING, 2006).

O VMH recebe aferências da amígdala, do LH, do DMH (BERTHOUD, 2002), e do ARC. Neste último, a conexão existe entre neurônios POMC do ARC e neurônios BDNF no VMH (KING, 2006). Esta estrutura envia projeções para núcleos pré-ganglionares autonômicos, substância cinzenta periaquedutal e reciprocamente ao DMH (BERTHOUD, 2002).

2.2 HORMÔNIOS REGULADORES DO EQUILÍBRIO ENERGÉTICO E DA ALIMENTAÇÃO

Além das conexões neurais, o hipotálamo recebe informação do estado energético através de hormônios e metabolitos. Os principais reguladores da ingestão alimentar e do equilíbrio energético são a leptina, a insulina, a grelina, o hormônio do crescimento (GH), esteroides sexuais e a glucose. Estas substâncias chegam no hipotálamo pela corrente sanguínea e se unem a receptores específicos (figura 1) (BERTHOUD, 2002).

Por sua posição anatômica, o ARC é um dos principais alvos dos hormônios circulantes. Esta estrutura se localiza na parte inferior do terceiro ventrículo, próximo a eminência mediana (ME), a qual possui uma barreira hematoencefálica fenestrada, que permite a entrada de substâncias presentes no sangue ao hipotálamo (JOLY-AMADO et al., 2014).

A leptina, hormônio produto do gene ob (ZHANG et al., 1994), deriva dos adipócitos. Devido a que seus níveis circulantes são proporcionais à quantidade de tecido adiposo, sua principal função é informar ao hipotálamo sobre as reservas energéticas disponíveis (FREDERICH et al., 1995; SAWCHENKO, 1998).

Este hormônio inibe a alimentação (SCHWARTZ et al., 1996), induz o gasto energético, a termogênese, a locomoção e o crescimento ósseo (REZAI-ZADEH et

al., 2014; VAN SWIETEN et al., 2014). Além disso, regula o equilíbrio da glucose (FERNÁNDEZ-FORMOSO et al., 2015).

O receptor de leptina (Ob-Rb) é amplamente expresso no hipotálamo (TARTAGLIA et al., 1995), encontrando-se principalmente no ARC (MERCER et al., 1996; SCHWARTZ et al., 1996), bem como no VMH, DMH (SCHWARTZ et al., 1996) e LH (FEI et al., 1997).

A leptina age inicialmente no ARC, ativando neurônios que coexpressam POMC e CART, inibindo os que coexpressam NPY e AgRP. Estes neurônios fazem conexão com neurônios efetores no PVN e no LH, os quais geram respostas endócrinas, autonômicas e comportamentais (SAWCHENKO, 1998).

No LH, a leptina suprime o hormônio concentrador de melanina (MCH) e orexinas, levando a uma diminuição da ingestão de alimento. Além disso, outros neurônios no LH, inervam a área tegmental ventral (VTA), que sob o efeito da leptina exercem controle hedônico da alimentação, pelo sistema mesolímbico dopaminérgico (LEINNINGER et al., 2009; PARK; AHIMA, 2015).

A leptina no DMH promove o metabolismo energético, ao aumentar a termogênese no tecido adiposo marrom (BAT) e a atividade locomotora. Desta forma, diminui o peso corporal de maneira independente da ingestão de alimento (REZAI-ZADEH et al., 2014; VAN SWIETEN et al., 2014).

De maneira indireta, a leptina age no VMH promovendo o crescimento ósseo através da interação com outros hormônios: [1] Inibe a síntese de serotonina e a seus receptores (neurotransmissor inibidor do crescimento ósseo); [2] aumenta os níveis de estrógeno (favorece o crescimento de osteoblastos); [3] inibe a corticosterona, evitando diminuição do GH e de marcadores de crescimento ósseo como a osteocalcina (UPADHYAY; FARR; MANTZOROS, 2015) [4] aumenta o hormônio da tireoide (T4), o qual promove o anabolismo ósseo (PARK; AHIMA, 2015).

Além de sua ação anabólica no tecido ósseo, a leptina regula o metabolismo lipídico e da glicose. Diminui os níveis de glicemia ao aumentar sua captação periférica, através da redução da produção de glucagon. Este processo é realizado por mecanismos independentes da insulina (ativação dos neurônios que expressam POMC e CART no ARC), assim como, pelo aumento da sensibilidade da mesma (HARRIS, 2014; PARK; AHIMA, 2015).

A insulina é outro hormônio importante na regulação do metabolismo energético. É secretada nas células β do pâncreas (GALE; CASTRACANE; MANTZOROS, 2004; NIRMALAN; NIRMALAN, 2017), e de maneira semelhante a leptina, atravessa a barreira hematoencefálica para interagir com seus receptores específicos (IRs) no ARC (GALE; CASTRACANE; MANTZOROS, 2004; LOH et al., 2017).

Este hormônio exerce efeitos de curto e longo prazo na homeostase da glucose, atuando por mecanismos periféricos e centrais (LOH et al., 2017; NIRMALAN; NIRMALAN, 2017). Além disso, influencia o equilíbrio energético e a alimentação de maneira semelhante à leptina (LOH et al., 2017).

A insulina diminuiu as concentrações plasmáticas de glucose, promovendo sua captação pelos tecidos periféricos (músculo esquelético, fígado e tecido adiposo) e em consequência a sua conversão em glicogênio. Na homeostase da glucose ocorre a interação de outros hormônios, além da leptina e da insulina, tais quais: o glucagon, o GH e o peptídeo-1 semelhante a glucagon (GLP-1). Também ocorre a regulação por parte das catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e somatostatina) e de outras fontes de energia (ácidos graxos livres (FFAs) e corpos cetônicos) (NIRMALAN; NIRMALAN, 2017).

Assim como a leptina, a insulina regula a ingestão agindo no hipotálamo, especificamente nos neurônios que expressam peptídeos anorexígenos e orexígenos. O aumento agudo de insulina reduz os níveis de NPY no núcleo arqueado. No entanto, o aumento crônico, observado na obesidade ou na resistência à insulina, eleva o teor de NPY no ARC, causando o aumento da ingestão alimentar e diminuindo a termogênese do BAT (LOH et al., 2017).

Em suma, este trabalho pretende estudar o metabolismo energético de ratos Wistar submetidos a anóxia neonatal, a fim de explicar as mudanças no crescimento corporal observadas em estudos anteriores. Para tanto, foi avaliado o circuito hipotalâmico regulador da alimentação e do gasto energético. De igual forma, os principais hormônios envolvidos nesses processos, o pâncreas, os parâmetros de crescimento corporal e a ingestão alimentar.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da anóxia neonatal no desenvolvimento somático, metabolismo energético e circuitos hipotalâmicos relacionados.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o desenvolvimento somático (P2-P90) dos grupos (Cm, Cf, Am, Af) mediante medição dos parâmetros de crescimento;
2. Avaliar a ingestão alimentar (P30-P90) entre os grupos e em relação ao ganho de peso corporal;
3. Avaliar os efeitos do jejum agudo (18 h) e da alimentação pós jejum no peso corporal, níveis de glicemia, leptina e insulina circulante;
4. Avaliar o tamanho das áreas das ilhotas de Langerhans no pâncreas, em correlação com os níveis de insulina e glicemia;
5. Avaliar a expressão de c-Fos no PVN, DMH, VMH e ARC após estímulo alimentar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E FORMAÇÃO DE GRUPOS

Foram utilizados 160 neonatos machos (n=80) e fêmeas (n=80) *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, divididos em 2 experimentos não simultâneos. Os animais foram obtidos por acasalamento de diferentes casais (10 fêmeas e 4 machos), que originaram 22 ninhadas: 11 controle e 11 anóxia. A fim de evitar efeitos de ninhagem, cada um dos animais progenitores teve filhotes pertencentes aos grupos anóxia e controle.

A aquisição dos casais foi realizada do Biotério de Produção de Ratos (ICB, Rede USP de Biotérios), foram mantidos com seus filhotes no Biotério de Experimentação do ICB (Departamento de Anatomia) e foram utilizados de acordo com certificado aprovado pela CEUA ICB (111/2015) e normas estabelecidas pelo CONCEA.

Os animais foram divididos em 8 grupos, de acordo com o estímulo (controle/anóxia), sexo (macho/ fêmea) e a idade de perfusão (P35/P95), conforme abaixo.

Cm P35	Grupo controle macho P35	Cm P95	Grupo controle macho P95
Cf P35	Grupo controle fêmea P35	Cf P95	Grupo controle fêmea P95
Am P35	Grupo anóxia macho P35	Am P95	Grupo anóxia macho P35
Af P35	Grupo anóxia fêmea P35	Af P95	Grupo anóxia fêmea P35

No experimento 1, os animais foram alocados depois do desmame (P21) em grupos de 2 ou 3 animais do mesmo sexo por caixa. No experimento 2, todos os animais foram isolados a partir de P27, sendo alocados em caixas moradia padrão de maneira permanente. Em ambos experimentos comida e água foram fornecidos *ad libitum* até o dia anterior a perfusão (P34 ou P94).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

* Experimento 1: Os animais foram alocados em caixas moradias padrão contendo 2 ou 3 animais do mesmo sexo, até a idade da perfusão.
Experimento 2: Os animais foram isolados permanentemente a partir de P27, em caixas moradia padrão.

4.3 ANÓXIA NEONATAL

Foi utilizado um sistema adaptado e validado no laboratório de Neurociências do ICB-USP (TAKADA et al., 2011), constituído por uma câmara semi-hermética de policarbonato (31,0x14,0x19,5cm), com entrada e saída de gás, acoplada a um manômetro, fluxômetro e cilindro de nitrogênio gasoso [figura 3]. Com o objetivo de evitar a hipotermia e potencializar os efeitos da anóxia, a temperatura da câmara foi mantida entre 35 e 37°C, pela imersão parcial da mesma em água aquecida por resistência elétrica. Os animais dos grupos Am e Af foram submetidos a anóxia neonatal entre 24 e 36 horas após o nascimento (peso entre 6 e 8 g, P1-P2). Para induzir a anóxia a câmara foi saturada com N₂ 100%, fluxo 3 L/min, durante 25 min, tempo máximo para evitar a morte massiva dos animais. Os grupos de animais controle passaram pelas mesmas condições, porém sem alteração na composição do ar (21% O₂ e 79% N₂).

Figura 2 - Sistema de Anóxia Neonatal.

A. Câmara semi-hermética, parcialmente submergida em água aquecida a 37°C. **B.** Cilindro de N₂. **C.** Fluxômetro. **D.** Entrada de N₂. **E.** Saída de N₂. **F.** Resistência elétrica.

Fonte: Foto, CRUZ-OCHOA, 2018. Sistema adaptado por TAKADA et al., 2011.

4.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO

Durante a lactação (P3-P21), os animais foram pesados e medidos diariamente [figura 4] no período da manhã, entre às 7h e às 11h. De P22 a P90, os ratos foram somente pesados cada terceiro dia no experimento 1, e diariamente no experimento 2.

Figura 3 - Parâmetros de desenvolvimento somático.

A. Peso Corporal. **B.** Eixo ântero-posterior do crânio (EAPC). **C.** Eixo látero-lateral do crânio (ELLC). **D.** Eixo longitudinal do corpo (ELC).

Fonte: CRUZ-OCHOA, 2018.

- A. **Peso corporal:** Avaliado em balança digital.
- B. **Eixo Ântero-Posterior do Crânio (EAPC):** Distância entre o osso occipital e a ponta do focinho do animal, aferida com paquímetro de Vernier.
- C. **Eixo Látero-Lateral do Crânio (ELLC):** Distância interauricular, aferida com paquímetro de Vernier.
- D. **Eixo Longitudinal do Corpo (ELC):** Distância entre a ponta do focinho e o início da cauda.

4.5 INGESTÃO ALIMENTAR

No experimento 2, foi avaliada diariamente a ingestão de alimento de P30 até P90. Para tanto, foi disposta uma quantidade estipulada de ração em cada caixa moradia, e 24 h depois foi pesado o alimento remanescente na gaiola. O procedimento foi repetido todos os dias no mesmo horário (12 h). No experimento 1 a ingestão foi mensurada cada terceiro dia.

4.6 AVALIAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Foi avaliado o ciclo estral das ratas fêmeas adultas, no período da manhã. Para garantir que no dia da perfusão todas as ratas estivessem em diestro.

Figura 4 - Ciclo Estral.

Microfotografias de esfregaço vaginal não corado de ratas Wistar adultas em proestro (a,b), estro (c,d), metaestro (e,f) e diestro (g,h). Objetivas de 10x (direita) e 20x (esquerda).
Fonte: CRUZ-OCHOA, 2018.

4.7 ESTÍMULO DE JEJUM, PERFUSÃO E COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Em P34 ou P94, segundo o grupo etário, os animais foram submetidos a jejum de 18 h, com início às 13 h e finalização às 7 h do dia seguinte (P35 e 95). Após tal período, receberam uma quantidade predefinida de alimento por 1 h para a avaliação da ingestão alimentar pós-jejum. Esses animais também foram avaliados quanto a glicemia pré-jejum, pós-jejum e pós-prandial, pela coleta de sangue da cauda e análise da mesma com o medidor de glicemia (*One Touch Select Simple*, figura 6).

Figura 5 - Avaliação de glicemia.

Punção da veia caudal lateral para avaliação de glicemia.
Fonte: CRUZ-OCHOA, 2018.

Após alimentação (1 hora) e respeitado o tempo para expressão máxima da proteína Fos (90 min), os animais foram profundamente anestesiados com xilazina (10 mg/kg) e ketamina (60 mg/kg). Quando atingida a profundidade da anestesia (10-15 min aprox.), avaliada pela ausência dos reflexos patelar e corneal, foi iniciada a cirurgia de perfusão. Após realizar a toracotomia, foi coletado sangue do átrio direito para análise hormonal. No experimento 1, alguns dos animais adultos (P95, n=5 em cada grupo) foram perfundidos em jejum para realizar também a avaliação hormonal.

Após serem os animais foram perfundidos com solução salina para limpeza do leito vascular, foi efetuada a perfusão com formol (4%, 4°C, pH 7,5). Posteriormente, foram coletados o encéfalo e o pâncreas de cada animal. O encéfalo foi pós-fixado durante 24 horas na mesma solução da perfusão, e em seguida crioprotégido com sacarose 30% em PBS 0,1 M, até serem cortados.

Os encéfalos foram seccionados com micrótomo, em cortes frontais de 40 μm de espessura. Os quais foram conservados em solução anticongelante e coletados em 5 séries de 6 compartimentos. Deste modo, a distância entre cada corte no mesmo compartimento é de 200 μm [figura 6].

Figura 6 - Coleta dos cortes do encéfalo.

A. 5 séries de cortes (a-e), distribuídos em 6 compartimentos (1-6). O retângulo vermelho indica uma série. **B.** Uma série de cortes coronais do encéfalo de rato antes da montagem em lâminas.
Fonte: CRUZ-OCHOA, 2018.

Por sua vez, as amostras de pâncreas foram mantidas em formol a 10%, até serem embebidas em blocos de parafina. Para tanto, os tecidos foram posicionados em um cassete e em seguida realizados banhos de formol (2), álcool 70% (4), xilol (3) e parafina líquida (2), utilizando o equipamento de processamento de tecidos (autotecnico). Uma vez formado o bloco de parafina, os tecidos foram seccionados em micrótomo à espessura de 3 a 5 μm .

4.8 DOSAGEM HORMONAL

As dosagens de leptina e insulina foram realizadas com dois kits Milliplex® MAP RMHMAG-84K.

4.8 HEMATOXILINA-EOSINA NO PÂNCREAS

O processamento do pâncreas foi executado em parceria com o Laboratório de Histopatologia da *Universidad de los Llanos*, localizado na cidade de Villavicencio (Meta), Colômbia. O processo de coloração de hematoxilina-eosina foi realizado seguindo o protocolo usual desse laboratório.

O procedimento foi iniciado com a desparafinação dos cortes do pâncreas, já montados em lâminas, por meio de 3 banhos de xilol (30 minutos cada). Depois, os tecidos foram hidratados com álcool 70% (3 banhos de 30 minutos cada). Em seguida, lavados com água destilada (DH₂O), coloridos com hematoxilina (1 hora) e novamente lavados com DH₂O. Posteriormente, foram descoloridos com álcool ácido (2 vezes), banhados com DH₂O, água amoniacal e outra vez com DH₂O. Por fim, os tecidos foram coloridos com eosina (30 minutos), desidratados com álcool 70% (3 banhos de 30 min cada) e diafanizados com xilol (3 banhos de 30 minutos cada).

4.9 MEDIÇÃO DAS ÁREAS DAS ILHOTAS DE LANGERHANS

As microfotografias (10 x) das amostras de pâncreas foram obtidas utilizando o software *Las Ez 3.4* e processadas, para determinação da área das ilhotas, com o software *ImageJ 1.52b*. As áreas foram mensuradas de acordo com a quantidade disponível de ilhotas encontradas nas amostras de tecidos, limitando assim o número de ilhotas por indivíduo a 12.

4.10 IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PROTEÍNA FOS E NEUN

Uma das séries do encéfalo de cada animal foi utilizada para reação de imuno-histoquímica, conforme protocolo usual do laboratório e descrito a seguir.

A princípio, os cortes foram lavados 6 vezes por 5 minutos com PBS 0,1 M, incubados com água oxigenada (H₂O₂) e triton X-100 (0,3%) por 5 minutos, a fim de remover a peroxidase endógena e abrir os poros da membrana celular. Posteriormente, as lavagens com PBS foram repetidas e os cortes incubados por 1 hora em solução contendo PBS, triton e soro biotinilado de cabra. Em seguida, prosseguiu-se com a incubação em anticorpo primário anti-Fos (1:3000, ABE457, lote: 2987437) e anti-NeuN (1:1000, MAB377, lote: 1991263) por 48 horas.

Após este período, as lâminas foram lavadas com PBS 0,1 M e incubadas em anticorpo secundário biotinilado (1:200, Biotilynated Anti-Rabbit IgG, lote: Y0515 e 1:200, Biotilynated Anti-Mouse), por 90 minutos. A seguir, foram novamente lavadas com PBS 0,1 M e incubadas em solução avidina-biotina por 90 minutos.

O complexo antígeno-anticorpo foi revelado pela incubação das lâminas com DAB (0,5%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) durante 3 minutos e posterior adição de H₂O₂, até apresentar coloração acastanhada em poucos minutos, sendo que o tempo é controlado visualmente. Por fim, os cortes foram lavados novamente em PBS, montados em lâminas gelatinizadas, desidratados e cobertos com lamínulas usando DPX (Sigma-Aldrich Inc., UK) como meio de montagem.

4.11 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

A quantidade de células marcadas positivamente para Fos ou NeuN foram avaliadas por estereologia, utilizando o programa *Stereo Investigator* (MBF-MicroBrightfield) no laboratório Multiusuário, projeto FAPESP #2010/52068-0, outorgado ao Prof. Dr Jackson C. Bittencourt. A quantificação foi feita nos núcleos hipotalâmicos VMH, DMH, ARC e PVN, conforme atlas (PAXINOS; WATSON, 1988), em 5 animais por grupo, provenientes de 5 ninhadas diferentes.

No programa foram definidos os valores dos parâmetros a serem utilizados na amostragem, os quais são: largura e área do quadro de contagem; largura, altura e área do retículo (eixos Y, XY); altura e volume do dissector (eixo Y, X y Z) e distâncias de segurança. O programa dispõe de quadros de contagem posicionados aleatoriamente dentro de retículos nas regiões escolhidas pelo experimentador. O dissector óptico do microscópio foi ajustado para analisar um espaço variável de profundidade em cada quadro de contagem, conforme espessura do tecido, com zonas de segurança de 1 µm no topo e na base da secção. As células contabilizadas foram aquelas identificadas dentro do quadro de contagem, ou que sejam tangenciadas pelas bordas superior e direita do quadro (bordas permitidas), exceto aquelas tangenciadas pelas bordas inferior e esquerda (bordas proibidas) [figura 7, A].

Figura 7 - Contagem no programa Stereo investigator.

A. Quadro de contagem composto por duas bordas proibidas (vermelhas) e duas bordas permitidas (verdes) (20x). **B.** Núcleo arqueado (traço rosa) após a contagem (4x).

Fonte: CRUZ-OCHOA, 2018.

4.12 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas com ANOVA de duas vias, de medidas repetidas e pós-teste de Bonferroni para comparação entre grupos. As diferenças foram consideradas significantes para $p \leq 0.05$ e o programa utilizado foi *GraphPad Prism Software, Inc, versión 7*. Ademais, foi realizado o teste de correlação de Pearson, para avaliar a relação entre alguns parâmetros, utilizando o programa R (*The R Foundation for Statistical*).

5. RESULTADOS EXPERIMENTO 1- ANIMAIS ALOCADOS EM GRUPO

Nesta seção serão apresentados os resultados do experimento 1, dos animais que foram alocados em grupo (2-3 animais por caixa) até a idade da perfusão. Os resultados são divididos em peso corporal, eixos de crescimento corporal, ingestão alimentar e nos parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação.

5.1 PESO CORPORAL

A partir da adolescência os machos foram significativamente ($p < 0,05$) mais pesados que as fêmeas. A diferença foi detectada a partir de P33 entre os grupos controle, e desde P36 entre os anóxia. Igualmente, a partir da adolescência os grupos anóxia tanto machos como fêmeas apresentaram menor peso em relação a seus

controles. A anóxia diminui significativamente o peso dos machos a partir de P45 e nas fêmeas desde P57 ($p < 0,05$. $F_{(3, 50)} = 164,4$), em relação a seus controles.

Figura 8 - Peso corporal.

Avaliado desde P1 até P90 nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Foi detectada diferença significativa entre estímulos (anóxia vs controles) e sexos (machos vs fêmeas). Convenções: ^, Cm > Cf a diferença é mantida até P90. +, Am > Af a diferença é mantida até P90. *, Cm > Am. #, Cf > Af. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas, pós-teste de Bonferroni. $p < 0,05$. Cm n=14, Am n=16, Cf n=13, Af=11.

5.2 EIXOS DE CRESCIMENTO CORPORAL

A anóxia neonatal não causou efeito significativo em nenhum dos eixos de crescimento avaliados até P30 ($p > 0,05$). Por sua vez, foi detectada diferença de sexo. Sendo que os animais machos controle foram maiores do que as fêmeas controle de P24 até P30 ($p < 0,05$). E os machos anóxia apresentaram um crânio de maior tamanho que as fêmeas anóxia a partir de P4 ($p < 0,05$).

Figura 9 - Eixos de crescimento corporal.

Avaliado desde P3 até P30, nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de medidas repetidas, pós-teste de Bonferroni. $n=20$ em cada grupo.

- A. **Eixo longitudinal do corpo:** Foi detectada diferença significativa entre os grupos controle a partir de P24 (Cm > Cf, * $p < 0,05$. $F_{(11,3)} = 28,91$).
- B. **Eixo látero-lateral do crânio:** Foi detectada diferença significativa entre sexos nos grupos anóxia a partir de P4 se mantendo até P30 (Am > Af, * $p < 0,05$. $F_{(0,8082)} = 11,63$).
- C. **Eixo ântero-posterior do crânio:** Foi detectada diferença significativa entre sexos nos grupos anóxia (Am > Af, * $p < 0,05$. $F_{(0,6952)} = 5,644$).

5.3 ESTIMULO DE JEJUM E REALIMENTAÇÃO

Tabela 1 - Parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação em P35.

PARÂMETROS	Cm	Am	Cf	Af
Perda de Peso Pós-Jejum (%)	6.86 ± 1.03	6.10 ± 0.69	8.85 ± 0.46	10.38 ± 0.53
Ganho de Peso Pós-Prandial (%)	4.94 ± 0.45	5.76 ± 0.43	6.74 ± 0.34	6.73 ± 0.43
Ingestão Alimentar Pós-Jejum (g)	3.45 ± 0.07	3.79 ± 0.32*	3.15 ± 0.14	3.62 ± 0.10*
Glicemia Pré-Jejum (mg/dl)	109.57 ± 0.89	112.50 ± 2.11	111.44 ± 3.38	109.80 ± 2.66
Glicemia Pós-Jejum (mg/dl)	71.57 ± 1.85	79.50 ± 6.27	64.88 ± 2.31	66.90 ± 3.98
Glicemia Pós-Prandial (mg/dl)	133.71 ± 3.02	122.00 ± 3.84*	133.77 ± 1.98	135.50 ± 6.57
Insulina Pós-Prandial (pg/ml)	281.58 ± 124.29	1026.91 ± 119.65***	318.13 ± 93.85	962.57 ± 183.38***
Leptina Pós-Prandial (pg/ml)	922.57 ± 116.79	1431.71 ± 228.17	864.00 ± 148.55	1098.00 ± 216.48
Áreas das Ilhotas de Langerhans (µm)	648280.70 ± 157305.07	541167.80 ± 76761.26	493592.12 ± 64747.20	511941.76 ± 156640.42

Dados expressados em média ± SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Tabela 2 - Parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação em P95.

PARÂMETROS	Cm	Am	Cf	Af
Perda de Peso Pós-Jejum (%)	4.58 ± 0.39	5.76 ± 0.25*	5.12 ± 0.41	5.35 ± 0.30
Ganho de Peso Pós-Prandial (%)	3.50 ± 0.18	3.15 ± 0.28	3.09 ± 0.38	3.97 ± 0.24
Ingestão Alimentar Pós-Jejum (g)	5.97 ± 0.19	6.33 ± 0.43	3.60 ± 0.09	6.18 ± 0.57
Glicemia Pré-Jejum (mg/dl)	99.61 ± 2.13	101.53 ± 2.25	111.61 ± 2.84	103.75 ± 1.78
Glicemia Pós-Jejum (mg/dl)	80.84 ± 2.32	73.80 ± 1.80	84.76 ± 3.04	90.50 ± 3.87
Glicemia Pós-Prandial (mg/dl)	104.12 ± 5.65	107.20 ± 4.00	114.00 ± 2.51	114.33 ± 3.20
Insulina Pós-Jejum (pg/ml)	48.55 ± 24.10	57.74 ± 35.62	48.34 ± 11.93	43.94 ± 11.76
Insulina Pós-Prandial (pg/ml)	317.09 ± 39.26	135.86 ± 38.26*	228.53 ± 64.30	171.57 ± 51.88*
Leptina Pós-Jejum (pg/ml)	2323.80 ± 265.89	1565.40 ± 162.18**	1741.80 ± 259.50	994.00 ± 201.58**
Leptina Pós-Prandial (pg/ml)	3537.44 ± 567.01	2554.77 ± 320.54	1756.41 ± 279.19	2067.33 ± 168.18
Área das Ilhotas de Langerhans (µm)	480719.78 ± 92668.90	778492.05 ± 102081.92*	646297.05 ± 96785.02	899733.83 ± 98588.78*

Dados expressados em média ± SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

5.3.1 Ingestão Alimentar

Não foram encontradas diferenças significantes entre anóxia e controle em nenhum dos dias avaliados ($p > 0,05$. $F_{(3, 432)} = 858$). Por sua vez, as fêmeas controle e anóxia ingeriram menor quantidade de alimento que os machos, a partir de P36 e P33 respectivamente ($p < 0,05$. $F_{(20, 432)} = 45,29$).

Figura 10 - Ingestão Alimentar.

Avaliada desde P30 até P90 cada 3 dias, nos grupos Cm, Am, Cm e Cf. Foi detectado efeito significativo entre sexos nos grupos controles e anóxia a partir de P36 (* Cm>Cf), e P33 (+ Am>Af). Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste de ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni. $n=6$ em Cm e Am, $n=5$ em Cf e Af.

5.3.2 Perda de peso pós-jejum e ganho de peso pós-prandial

Em P35 a anóxia neonatal não modificou a perda de peso pós-jejum nem o ganho pós-prandial ($p > 0,05$). Por sua vez, em P95 a anóxia aumentou a perda de peso pós-jejum em machos ($p = 0,0479$), sem modificar o ganho de peso pós alimentação ($p > 0,05$).

Além disso, foi detectada diferença de sexo em P35, sendo que as fêmeas perderam mais peso que os machos após jejum ($p < 0,0001$), e ganharam mais na fase pós-prandial ($p = 0,0034$), de forma independente ao estímulo.

Figura 11 - Perda de peso pós-jejum e ganho de peso pós-prandial.

Avaliado em P35 e P95, nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. Dados apresentados em média $\pm$ SEM.

- A. **Perda de peso pós-jejum P35:** Foi detectada diferença significativa entre sexos independente ao estímulo ($p < 0,0001$. $F_{(1, 30)} = 21,37$).
- B. **Ganho de peso pós-prandial P35:** Foi detectada diferença significativa entre sexos independente ao estímulo ($p < 0,01$. $F_{(1, 30)} = 10,1$).
- C. **Perda de peso pós-jejum P95:** Foi detectada diferença significativa entre estímulos nos grupos dos machos ($p < 0,05$. $F_{(1, 49)} = 4,118$).
- D. **Ganho de peso pós-prandial em P95:** não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$. $F_{(1, 29)} = 4,158$).

5.3.3 Ingestão alimentar pós-jejum

Em P35 os animais anóxia de maneira independente ao sexo ingeriram mais alimento após jejum que os controles ($p=0,0156$). Em P95, só as fêmeas anóxia ingeriram mais alimento que as controle ($p=0,0002$).

Figura 12 - Ingestão alimentar pós-jejum em P35 e P95.

Avaliado em P35 e P95, nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. Dados apresentados em média $\pm$ SEM.

- A. Ingestão alimentar pós-jejum P35:** Foram detectadas diferenças significantes entre os grupos anóxia e controle independente do sexo (Anóxia > Controle, * $p < 0,05$, $F_{(1, 27)} = 6,664$).
- B. Ingestão alimentar pós-jejum P95:** As fêmeas anóxia foram significativamente diferentes as controle (** $p < 0,001$, $F_{(1, 32)} = 17,44$).

5.3.4 Glicemia em P35 e P95

Como esperado, a glicemia diminuiu depois do jejum e aumentou depois da alimentação, nas duas idades avaliadas e em todos os grupos ($p < 0,001$). Em P35, na fase pós-prandial, os machos anóxia apresentaram menor glicemia que os machos controles ($p=0,0335$). Enquanto que em P95, os níveis glicêmicos dos machos anóxia foram inferiores em pós-jejum ($p=0,022$), em relação aos controles. Além disso, em P95 as fêmeas anóxia e controle apresentaram níveis glicêmicos maiores que os machos, independente do momento avaliado ($p < 0,001$).

Figura 13 - Níveis de glicemia.

Nos grupos Cm, Am, Cf, e Af, realizada pré e pós-jejum, e pós-alimentação. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni.

- A. **Glicemia em P35:** A glicemia diminuiu depois do jejum e aumentou depois da alimentação em todos os grupos ($p < 0,001$. $F_{(2, 56)} = 232,2$). Foi detectada diferença significativa entre os grupos de machos em pós-prandial (* Am < Cm, $p < 0,05$. $F_{(3, 28)} = 0,1185$).
- B. **Glicemia em P95:** A glicemia diminuiu depois do jejum e aumentou depois da alimentação em todos os grupos ($p < 0,001$. $F_{(2, 126)} = 96,91$). Foi detectada diferença significativa entre os grupos de machos em pós-jejum (+ Am < Cm, $p < 0,05$. $F_{(3, 126)} = 8,374$). Foi detectada diferença de sexo, independente ao momento avaliado (**, $p < 0,01$ Fêmeas > Machos. $F_{(6, 126)} = 1,775$).

5.3.5 Insulina

Em P35, pós-prandial os machos e fêmeas anóxia, apresentaram maiores níveis de insulina, em relação a seus controles ($p=0,0002$). Por sua vez, não foi identificada diferença de sexo.

Em P95, os níveis da insulina foram avaliados depois de jejum de 18 horas, e após alimentação. No momento pós-jejum, não houve diferença entre os grupos ($p > 0,05$), enquanto que em pós-prandial os animais anóxia, independente do sexo, apresentaram níveis menores que os controle ($p=0,023$).

Figura 14 - Dosagem de insulina.

Avaliado nos grupos Cm, Am, Cf e Af. *, $p < 0,05$. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. $n=7$. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni.

- A. **Níveis de insulina pós-prandial em P35:** Foi detectada diferença significativa entre os grupos anóxia e controles (Anóxia > Controle, *** $p < 0,001$. $F_{(1, 21)} = 19,46$).
- B. **Níveis de insulina pós-jejum em P95:** Não foi detectado efeito significativo ($p > 0,05$).
- C. **Níveis de insulina pós-prandial em P95:** Foi detectada diferença significativa entre os grupos anóxia e controle (Controle > Anóxia, $p < 0,05$. $F_{(1, 27)} = 5,757$).

5.3.6 Leptina

Em P35 não se identificou diferença significativa entre estímulo (anóxia vs controle, $p=0,0517$), nem entre sexos (fêmeas vs machos, $p > 0,05$).

Em P95, os níveis de leptina foram avaliados depois de jejum de 18 horas, e após alimentação. No momento pós-jejum, os animais anóxia apresentaram menor quantidade de leptina que os controles ($p=0,0043$), de maneira independente do sexo. Também foi detectada diferença de sexo independente do estímulo nesta idade nos dois momentos avaliados. De modo que os machos apresentaram menor leptina que as fêmeas após jejum ($p=0,0215$) e após alimentação ($p=0,0092$).

Figura 15 - Dosagem de Leptina.

Avaliado nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. $n=7$

- A. **Níveis de leptina pós-prandial em P35:** Não houve diferença significativa ($p > 0,05$).
- B. **Níveis de leptina pós-jejum em P95:** Foi detectada diferença significativa entre anóxia e controle (Controle > Anóxia, $** p < 0,01$. $F_{(1, 16)} = 11,07$), e entre machos e fêmeas (Machos > Fêmeas, $* p < 0,05$. $F_{(1, 16)} = 6,49$).
- C. **Níveis de leptina pós-prandial em P95:** Pós-prandial, foi detectada diferença significativa entre machos e fêmeas (Machos > Fêmeas, $** p < 0,01$. $F_{(1, 28)} = 7,841$).

5.3.7 Ilhotas De Langerhans P35 E P95

Em P35 não foi detectada diferença entre os grupos anóxia e controle, nem entre machos e fêmeas ($p > 0,05$). Por sua vez em P95, a anóxia aumentou a área das ilhotas de Langerhans de maneira independente ao sexo ($p=0,0092$).

Figura 16 - Área das ilhotas de Langerhans.

Avaliado nos grupos Cm, Am, Cf e Af, nas idades de P35 e P95. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. A. $n=5$. B. $n=7$ Cm, $n=8$ Am, $n=9$ Af e Cf.

- A. **Área das Ilhotas de Langerhans em P35:** Não houve diferença significativa ($p > 0,05$).
- B. **Área das Ilhotas de Langerhans em P95:** Foi detectada diferença significativa entre estímulo (*, $p = 0,0480$. $F_{(1, 214)} = 6,91$) de maneira independente ao sexo.

Figura 17 - Ilhotas de Langerhans P35.

Microfotografias de pâncreas, em indivíduos de P35. A. Cm, B. Cf, C. Am e D. Af. As setas mostram as ilhotas de Langerhans em todas as imagens. H&E. 10X.

Fonte: CRUZ-OCHOA, 2018.

Figura 18 - Ilhotas de Langerhans P95.

Microfotografias de pâncreas em indivíduos de P95 dias de idade. A. Cm, B. Cf, C. Am e D. Af. As setas mostram as ilhotas de Langerhans em todas as imagens. H&E. 10X.

Fonte: CRUZ-OCHOA, 2018.

5.3.8 Correlação Glicemia-Insulina-Ilhotas De Langerhans

Não houve correlação entre as áreas das ilhotas de Langerhans, e os níveis de glicemia e de insulina no momento pós-prandial, na idade de P95 dias.

Tabela 3 - Matriz de Correlações.

Correlações de Pearson			
	Área das Ilhotas de Langerhans	Glicemia pós-prandial	Insulina pós-prandial
Área das Ilhotas	1.0000	-0.0140	0.0097
Glicemia pós-prandial	-0.0140	1.0000	0.2903
Insulina pós-prandial	0.0097	0.2903	1.0000
Valores p			
	Área das Ilhotas de Langerhans	Glicemia pós-prandial	Insulina pós-prandial
Área das Ilhotas	---	0.9675	0.9775
Glicemia pós-prandial	0.9675	---	0.3865
Insulina pós-prandial	0.9775	0.3865	---

6. RESULTADOS EXPERIMENTO 2 – ISOLADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados do experimento 2, dos animais que foram isolados a partir de P27 e até a idade da perfusão. Os resultados são divididos em peso corporal, ingestão alimentar e nos parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação.

6.1 PESO CORPORAL

A partir da adolescência (P39) os machos foram significativamente ($p < 0,05$, $F_{(43, 1364)} = 2104$) mais pesados que as fêmeas. Por sua vez, a anóxia demonstrou aumentar o peso dos machos na idade adulta (a partir de P72), em relação aos controles ($p < 0,05$, $F_{(3, 1364)} = 1195$).

Figura 19 - Peso Corporal.

Avaliado desde P1 até P90 nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Foi detectada diferença significativa entre estímulos (anóxia vs controles) nos grupos de machos, e de sexo (machos vs fêmeas). Convenções: ^, Cm > Cf a diferença é mantida até P90. +, Am > Af a diferença é mantida até P90. *, Cm > Am. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni. $p < 0,05$. Cm n=11, Am n=8, Cf n=8, Af n=8.

6.2 INGESTÃO ALIMENTAR

Os machos, dos grupos controle e anóxia, ingeriram maior quantidade de alimento que as fêmeas, a partir de P36 e P39 respectivamente ($p < 0,05$. $F_{(20, 678)} = 20,03$). Por sua vez, entre estímulos não foi detectada diferença significativa ($p > 0,05$).

Figura 20 - Ingestão Alimentar.

Avaliado desde P30 até P90 nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Foi detectada diferença significativa entre sexo (machos > fêmeas). Convenções: *, Cm > Cf a diferença é mantida até P90. +, Am > Af a diferença é mantida até P90. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni. $p < 0,05$. Cm $n=11$, Am $n=8$, Cf $n=8$, Af $n=8$.

6.3 ESTIMULO DE JEJUM E REALIMENTAÇÃO

Tabela 4 - Parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação em P35.

PARÂMETRO	Cm	Am	Cf	Af
Perda de Peso Pós-Jejum (%)	1.33 $\pm$ 0.34	4.83 $\pm$ 1.22*	2.40 $\pm$ 1.02	3.66 $\pm$ 1.37*
Ganho de Peso Pós-Prandial (%)	3.33 $\pm$ 0.45	4.88 $\pm$ 0.54*	3.70 $\pm$ 0.79	4.17 $\pm$ 0.50
Ingestão Alimentar Pós-Jejum (g)	2.52 $\pm$ 0.16	3.95 $\pm$ 0.43**	2.19 $\pm$ 0.34	2.38 $\pm$ 0.18
Glicemia Pré-Jejum (mg/dl)	138.90 $\pm$ 6.49	132.77 $\pm$ 3.62	131 $\pm$ 6.75	128 $\pm$ 4.37
Glicemia Pós-Jejum (mg/dl)	90.20 $\pm$ 4.70	88.33 $\pm$ 4.45	87.37 $\pm$ 5.21	85.60 $\pm$ 4.46
Glicemia Pós-Prandial (mg/dl)	132.60 $\pm$ 5.37	133.44 $\pm$ 4.48	130.12 $\pm$ 9.41	148.70 $\pm$ 8.94
Insulina Pós-Prandial (pg/ml)	1176 $\pm$ 277	1566.21 $\pm$ 312.63	1243.20 $\pm$ 323.53	1255.86 $\pm$ 172.85
Leptina Pós-Prandial (pg/ml)	1263.16 $\pm$ 327.63	1371.78 $\pm$ 248.67	1180.62 $\pm$ 210.03	1672.35 $\pm$ 271.23

Dados expressados em média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tabela 5 - Parâmetros avaliados durante o estímulo de jejum e realimentação em P95.

PARÂMETRO	Cm	Am	Cf	Af
Perda de Peso Pós-Jejum (%)	2.58 ± 0.33	3.89 ± 0.45*	4.09 ± 0.50	4.47 ± 0.50
Ganho de Peso Pós-Prandial (%)	1.66 ± 0.17	1.77 ± 0.35	1.84 ± 0.53	2.45 ± 0.46
Ingestão Alimentar Pós-Jejum (g)	4.59 ± 0.39	5.44 ± 0.32*	3.44 ± 0.30	4.54 ± 0.55*
Glicemia Pré-Jejum (mg/dl)	116 ± 4.09	125.40 ± 6.64	120.87 ± 4.84	114.20 ± 4.20
Glicemia Pós-Jejum (mg/dl)	88.90 ± 3.42	94.50 ± 4.92	87.50 ± 0.98	94.80 ± 3.25
Glicemia Pós-Prandial (mg/dl)	118.27 ± 2.88	114.40 ± 3.31	129.75 ± 4.40	138.50 ± 4.78
Insulina Pós-Prandial (pg/ml)	198.42 ± 53.20	285.73 ± 63.56*	152.62 ± 66.03	398.48 ± 77.20*
Leptina Pós-Prandial (pg/ml)	3125 ± 547.67	4073.66 ± 310.58*	2377.15 ± 395.29	3044.88 ± 130.14*
C-Fos ARC	6390.12 ± 743.85	4104.95 ± 603.19*	6330 ± 243.30	4675.96 ± 933.65*
C-Fos VMH	14522.96 ± 1591.78	10120.49 ± 1818.97	9311.53 ± 1496.81	8667.40 ± 1613.98
c-Fos DMH	19880.02 ± 3446.84	23029.74 ± 2148.82	17998.18 ± 2043.33	17817.68 ± 4107.48
c-Fos PVN	5526.73 ± 776.42	4639.62 ± 988.41	6283.59 ± 576.82	7263.84 ± 2233.34
NeuN ARC	6565.58 ± 536.25	6382.25 ± 530.02	6373.85 ± 684.61	7201.33 ± 631.84

Dados expressados em média ± SEM. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

6.3.1 Perda De Peso Pós-Jejum e Ganho De Peso Pós-Prandial

Em P35 a anóxia neonatal aumentou a perda de peso pós-jejum de maneira independente ao sexo (p=0,0451). Na mesma idade, aumentou também o ganho pós-prandial (p=0,0418) só nos machos. Por sua vez, em P95 a anóxia aumentou a perda de peso pós-jejum em machos (p = 0,0280), e não modificou o ganho de peso pós alimentação (p > 0,05). Além disso, nesta idade as fêmeas, independente do estímulo, perderam mais peso que os machos (p = 0,0253).

Figura 21 - Perda de peso pós-jejum e ganho de peso pós-prandial.

Avaliado em P35 e P95, nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. Dados apresentados em média $\pm$ SEM.

- A. **Perda de peso pós-jejum P35:** Foi detectada diferença significativa entre anóxia e controle independente do sexo ($A > C$, * $p < 0,05$. $F(1, 33) = 4,339$).
- B. **Ganho de peso pós-prandial P35:** Foi detectada diferença significativa entre os machos anóxia e controle ($Am > Cm$, * $p < 0,05$. $F(1, 33) = 3,138$).
- C. **Perda de peso pós-jejum P95:** Foi detectada diferença significativa entre os machos anóxia e controle ($Am > Cm$, * $p < 0,05$. $F(1, 36) = 3,536$), e entre machos e fêmeas independente do estímulo ($Fêmeas > Machos$, * $p < 0,05$. $F(1, 36) = 5,443$).
- D. **Ganho de peso pós-prandial P95:** Não houve diferença significativa ($p > 0,05$. $F(1, 36) = 0,9133$).

6.3.2 Ingestão Alimentar Pós-Jejum

Em P35 os animais anóxia de maneira independente ao sexo ingeriram mais alimento após jejum que os controles (ANOVA $p=0,0064$), efeito detectado somente nos grupos de machos no pós-teste estatístico (Bonferroni $p=0,0051$). De igual forma, em P95 os anóxia comeram mais que os controles ($p=0,0260$), independente do sexo. Além disso, foi detectada diferença de sexo independente do estímulo em P35 ($p=0,0017$) e em P95 ($p=0,0194$).

Figura 22 - Ingestão Alimentar pós-jejum.

Avaliado em P35 e P95, nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. Dados apresentados em média $\pm$ SEM.

- A. Ingestão alimentar pós-jejum P35:** Foram detectadas diferenças significantes entre o grupo controle macho e anóxia macho ($Am > Cm$, $** p < 0,01$. $F_{(1, 33)} = 8,472$). Além disso, foi detectada diferença significante do sexo (Machos $>$ Fêmeas, $** p < 0,01$. $F_{(1, 33)} = 11,64$).
- B. Ingestão alimentar pós-jejum P95:** Foi detectado efeito significante de estímulo independente do sexo (Anóxia $>$ Controle, $* p < 0,05$. $F_{(1, 32)} = 5,45$), e do sexo independente do estímulo (Machos $>$ Fêmeas, $* p < 0,05$. $F_{(1, 32)} = 6,064$).

6.3.3 Glicemia

Como esperado, a glicemia diminuiu depois do jejum e aumentou depois da alimentação, nas duas idades e em todos os grupos ($p < 0,001$). No entanto, em nenhuma das idades nem momentos avaliados foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

Ao comparar o experimento 1 (animais agrupados) com o experimento 2 (animais isolados), foi observado aumento na glicemia nos animais isolados em todos os grupos e momentos avaliados ($p < 0,01$).

Figura 23 - Níveis de Glicemia dos animais alocados em grupo e isoladamente.

Glicemia avaliada nos grupos Cm, Am, Cf, e Af, realizada pré e pós-jejum, e pós-alimentação. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós-teste de Bonferroni.

- A. Glicemia em P35:** A glicemia diminuiu depois do jejum e aumentou depois da alimentação em todos os grupos ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).
- B. Glicemia em P95:** A glicemia diminuiu depois do jejum e aumentou depois da alimentação em todos os grupos ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).
- C. Glicemia controle machos P95:** Houve diferença significativa entre os animais Cm isolados e agrupados (Isolados > Agrupados, **** $p < 0,0001$).
- D. Glicemia anóxia machos P95:** Houve diferença significativa entre os animais Am isolados e agrupados (Isolados > Agrupados, **** $p < 0,0001$).
- E. Glicemia controle fêmeas P95:** Houve diferença significativa entre os animais Cf isolados e agrupados (Isolados > Agrupados, ** $p < 0,01$).
- F. Glicemia anóxia fêmeas P95:** Houve diferença significativa entre os animais Af isolados e agrupados (Isolados > Agrupados, *** $p < 0,001$).

6.3.4 Insulina

Não foi detectada diferença significativa entre os grupos em P35 ($p > 0,05$). No entanto, em P95 a anóxia neonatal aumentou a secreção de insulina após alimentação, de maneira independente ao sexo ($p=0,0176$).

Figura 24 - Dosagem de Insulina.

Avaliado nos grupos Cm, Am, Cf e Af. *, $p < 0,05$. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. $n=9$. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni.

- A. **Níveis de insulina pós-prandial em P35:** Não houve diferença significativa ($p > 0,05$).
- B. **Níveis de insulina pós-prandial em P95:** Foi detectada diferença significativa entre os grupos anóxia e controle (Controle < Anóxia, $p < 0,05$, $F_{(1, 30)} = 6,317$).

6.3.5 Leptina

Não foi detectada diferença significativa entre os grupos em P35 ($p > 0,05$). No entanto, em P95 a anóxia neonatal aumentou a secreção de leptina após alimentação, de maneira independente ao sexo ($p=0,0401$). Além disso, na mesma idade os machos apresentaram maior leptina que as fêmeas ($p=0,0251$), independente ao estímulo.

Figura 25 - Dosagem de Leptina.

Avaliado nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. $n=9$

- A. **Níveis de leptina pós-prandial em P35:** Não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

- B. **Níveis de leptina pós-prandial em P95:** Foi detectada diferença significativa entre os grupos controle anóxia e controle (Anóxia > Controle *, $p < 0,05$. $F_{(1, 31)} = 4,589$), assim como diferença de sexo (Machos > Fêmeas *, $p < 0,05$. $F_{(1, 31)} = 5,543$).

6.3.6 Imunohistoquímica C-Fos

A anóxia neonatal diminuiu o número de neurônios ativados na fase pós-prandial no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC, $p=0,0152$), de maneira independente ao sexo. Nos outros núcleos avaliados (ventromedial (VMH), dorsomedial (DMH) e paraventricular (PVN)), não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos ($p > 0,05$).

Figura 26 - Contagem c-Fos no Hipotálamo.

Avaliado nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. $n=5$.

- A. **Núcleo Arqueado (ARC):** Foi detectada diferença significativa entre os grupos anóxia e controle de maneira independente ao sexo ($p < 0,05$. $F_{(1, 15)} = 7,505$).
- B. **Núcleo Ventromedial (VMH):** Não houve diferença significativa ($p > 0,05$. $F_{(1, 15)} = 2,297$).
- C. **Núcleo Dorsomedial (DMH):** Não houve diferença significativa ($p > 0,05$. $F_{(1, 15)} = 0,2168$).
- D. **Núcleo Paraventricular (PVN):** Não houve diferença significativa ($p > 0,05$. $F_{(1, 15)} = 0,001131$).

Figura 27 - Marcação para c-Fos no Núcleo Arqueado.

Microfotografias de cortes frontais do núcleo arqueado, em animais de P95. Imunohistoquímica para c-Fos. A. Cm, B. Am, C. Cf e D. Af. Bregma:-2.12 e -3.14. Objetivas 20x.
Fonte: CRUZ-OCHOA, 2018.

6.3.7 Imunohistoquímica NeuN

Não foram encontradas diferenças significantes no número de neurônios do núcleo ARC entre os grupos ($p > 0,05$. $F_{(1, 14)} = 0,2963$).

Figura 28 - Contagem NeuN no ARC.

Avaliado nos grupos Cm, Am, Cf e Af. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. $n=5$.

7. DISCUSSÃO

7.1 EXPERIMENTO 1- ANIMAIS MANTIDOS AGRUPADOS

7.1.1 Efeitos da Anóxia Neonatal no Metabolismo Energético

Neste experimento, a anóxia neonatal diminuiu o peso de ratos machos e fêmeas em relação a seus controles, a partir de P45 e P57 respectivamente [figura 8]. Enquanto que na fase de aleitamento, não houve diferença no peso, tampouco nos parâmetros de crescimento [figura 9]. Estes resultados diferem dos obtidos em estudos prévios do laboratório, nos quais a anóxia aumentou o peso e o tamanho dos machos mantidos nas mesmas condições (VASCONCELOS, 2013; LEE, 2015; KUMAR et al., 2017).

No entanto, a literatura tem apresentado resultados contraditórios. Outros grupos de pesquisa, utilizando modelos de anóxia neonatal semelhantes, observaram diminuição de peso (SHIMOMURA; OHTA, 1988; TANG; NAKAZAWA, 2005; MENSHANOV; BANNOVA; DYGALO, 2017), nenhuma diferença (KANEKO, 1985; YAMAMOTO; KATO, 1986; DELL'ANNA et al., 1991), ou como evidenciado neste trabalho, diminuição somente a partir de P40 (GROJEAN et al., 2003; YAN et al., 2016) [ANEXO I, tabela 6].

Em outros modelos, como na hipóxia-isquemia neonatal (HI) (ANDINÉ et al., 1990; GRAFE, 1994; WAGNER; NEDELCU; MARTIN, 2002; LUBICS et al., 2005; MATCHETT et al., 2009; HILL; THRELKELD; FITCH, 2011; REINBOTH et al., 2016; REN et al., 2017), asfixia perinatal (FLEISS et al., 2011), hipóxia intermitente neonatal (MAYER et al., 2013), hipóxia pré-natal (NAGANO et al., 2017), e hipóxia materna seguido de HI neonatal (GONZALEZ-RODRIGUEZ et al., 2014) há também diminuição, ou ausência de diferença no peso corporal [ANEXO]. Além disso, em humanos o déficit de oxigênio nos neonatos retarda seu crescimento (ANDINÉ et al., 1990).

Na regulação do peso corporal participam fatores genéticos, fisiológicos e comportamentais. Para mantê-lo estável é necessário que o ingresso energético (ingestão alimentar) seja equiparável a seu gasto. Portanto, qualquer desequilíbrio na entrada ou saída de energia modificará o peso (JÉQUIER; TAPPY, 1999).

A ingestão alimentar foi avaliada de P30 a P90 [figura 10], sendo que não foram identificadas diferenças significantes entre os grupos anóxia e controle, em nenhum dos momentos avaliados. Desta forma, o menor peso corporal dos animais anóxia adultos, pode ser consequência de um maior gasto energético basal em relação aos controles.

Para identificar possíveis alterações metabólicas de longo prazo, decorrentes da anóxia neonatal, que pudessem explicar as diferenças de peso encontradas, os animais foram submetidos a jejum agudo (18 horas) seguido de realimentação (1 hora). Os parâmetros avaliados foram: perda e ganho de peso corporal [figura 11], ingestão alimentar pós-jejum [figura 12], níveis de glicemia [figura 13], insulina [figura 14] e leptina [figura 15], assim como, foi mensurado o tamanho das ilhotas de Langerhans [figura 16-18].

Na idade de P35, em comparação com os controles, os animais anóxia apresentaram maior ingestão alimentar no período pós-jejum, menor nível de glicemia no período pós-prandial (somente observado em machos), níveis maiores de insulina, e uma tendência ($p=0,0517$) ao nível de leptina ser maior. Não houve diferença nos demais parâmetros avaliados.

A hiperfagia observada nos animais submetidos a anóxia, pode ter sido ocasionada por uma ação diminuída ou mais lenta da insulina e da leptina no hipotálamo. Sabe-se que o nível destes hormônios aumenta durante a alimentação (DAVIS, 2008; PARK; AHIMA, 2015). Desta forma, pressupõe-se que no início da ingestão alimentar, a secreção de hormônios tenha aumentado progressivamente. No entanto, por algum motivo não ocorreu a inibição eficiente da ingestão, causando assim hiperfagia e consequente aumento dos níveis hormonais no período pós-prandial.

Caso esta hipótese seja verdadeira, a ação periférica da insulina manteve os níveis de glicemia estáveis nas fêmeas e os diminuiu nos machos anóxia. Uma vez que, este hormônio regula o metabolismo da glicose agindo principalmente por vias periféricas, favorecendo sua captação e inibindo a glicogenólises e a gliconeogêneses (DAVIS, 2008). Além disso, a ação central da insulina não é necessária para a rápida supressão da produção hepática de glicose (RAMNANAN; EDGERTON; CHERRINGTON, 2012).

Além disso, tem sido descrito resistência à insulina durante a hipóxia, sendo associada ao aumento dos glucocorticoides (RAFF et al., 2001). Assim, é possível

também que os animais anóxia apresentaram maior secreção de corticosterona durante o jejum e realimentação, aumentando a secreção de insulina com o intuito de manter estável a glicemia.

Na idade de P95, os animais submetidos a anóxia neonatal foram mais leves, e responderam de maneira diferente ao estímulo de jejum e realimentação que os controles.

O jejum ocasionou perda de peso em todos os grupos, provavelmente por diminuição do tecido adiposo, ao ser requerido como fonte de energia (BERTILE; RACLOT, 2006). A resposta inicial ao jejum é mediada pelo glucagon, que para combater a hipoglicemia, promove no fígado a glicogenólise e a gliconeogênese. No entanto, no jejum prolongado as reservas de glicogênio são esgotadas, causando a metabolização de ácidos graxos e corpos cetônicos, a fim de suprir as demandas energéticas (DAVIS, 2008; NIRMALAN; NIRMALAN, 2017; ROMANO et al., 2017).

Embora, todos os grupos tenham perdido peso após o jejum, os anóxia apresentaram maior perda, provavelmente por terem gasto mais energia durante este período. Em situações de restrição calórica, como o jejum, há hipotermia e hipometabolismo (diminuição do consumo de oxigênio (VO_2)) (NAGASHIMA et al., 2003) com o intuito de poupar energia e atenuar a perda de peso (BERTILE; RACLOT, 2006). Paradoxalmente, também ocorre hiperatividade, que é interpretada como um comportamento de escape (OVERTON; WILLIAMS, 2004) e de procura de alimento. Ademais, a hiperatividade está relacionada com aumento dos glucocorticoides (CHALLET et al., 1995).

É possível então, que os animais anóxia tenham esgotado as reservas energéticas mais rapidamente, ao não diminuir o VO_2 ou sua temperatura corporal como esperado. É possível também, que o jejum tenha estressado mais os animais anóxia do que aos controles, deixando-os mais hiperativos e/ou aumentando a termogênese, e em consequência o gasto energético. No entanto, neste trabalho não é possível confirmar estas hipóteses, pois esses parâmetros não foram avaliados.

Durante o jejum é observado aumento dos glucocorticoides, catecolaminas, grelina e glucagon, junto com a diminuição da insulina, leptina, hormônio do crescimento, gonadotropinas e hormônios tiroideanos (BERTILE; RACLOT, 2006).

Após o jejum, observou-se que os níveis de glicemia (somente em machos) e de leptina foram menores nos animais anóxia do que nos controles. Uma possível

explicação está relacionada com a diminuição mais acentuada das reservas energéticas (glicose, glicogênio e tecido adiposo), causada pela maior perda de peso neste grupo. Além disso, é possível que os baixos níveis de leptina estejam relacionados com o baixo peso preexistente. Um vez que, a secreção deste hormônio é proporcional a quantidade de tecido adiposo (PARK; AHIMA, 2015) e visto que possivelmente os animais anóxia possuíam menor quantidade de gordura.

Contudo, os níveis basais de leptina não foram avaliados neste trabalho, tampouco a quantidade de tecido adiposo, impossibilitando saber se os níveis de leptina já estavam diminuídos no período de pré-jejum. Apesar disso, com modelo de hipóxia neonatal foi observada diminuição do ganho de peso até a idade de P45, sendo associado com menor leptina circulante basal e menor quantidade de tecido adiposo que os controles (RAFF et al., 2001).

Uma vez finalizada a restrição alimentar, os animais comeram à vontade durante 1 hora e logo após foram avaliados seus níveis hormonais. Neste momento pós-prandial, o nível de insulina apresentou-se diminuído nos grupos anóxia [figura 14], enquanto que as ilhotas de Langerhans foram maiores em relação aos controles [figura 16-18]. Não houve diferença nos outros parâmetros avaliados.

Em ratos Wistar machos, o tamanho das ilhotas de Langerhans diminui com a idade, assim como a funcionalidade das células β e a secreção de insulina. Em paralelo, há aumento da massa de células α , secretoras de glucagon (GU et al., 2012). Essas mudanças morfofuncionais, podem explicar a diminuição da insulina observada em todos grupos em P95, quando comparados com os mesmos em P35 [figura 14]. Assim como, a diminuição das áreas das ilhotas de Langerhans nos machos controles, quando comparados com o mesmo grupo na idade de P35.

O aumento de tamanho das ilhotas, como o observado nos grupos anóxia, tem sido interpretado como um mecanismo de compensação em situações de resistência a insulina. Este mecanismo acompanha o aumento da secreção de insulina para manter a normoglicemia (DAVIS, 2008). No entanto, a secreção de insulina nos animais anóxia em P95 foi menor e a glicemia não apresentou diferença, indicando uma maior sensibilidade deste hormônio, em vez de uma resistência.

Assim, neste trabalho o aumento das áreas das ilhotas não se associa com maior secreção de insulina (tabela 3). O aumento da área é possivelmente relacionado a maior quantidade de células alfa (α), ou delta (δ), secretoras de glucagon e

somatostatina respectivamente. Contudo, para confirmar esta hipótese, seria necessário realizar outras dosagens hormonais e marcações específicas para as populações celulares.

Na idade de P35 no período pós-prandial, a insulina se apresentou aumentada nos grupos anóxia, enquanto que em P95 no mesmo período se mostrou diminuída em relação aos controles. Essa inversão do fenômeno também foi observada utilizando outro modelo de hipóxia neonatal, no qual se evidenciou aumento da insulina em P7 seguida da sua diminuição em P14 e P21 sendo avaliada em condições basais (RAFF et al., 2001).

Alguns trabalhos têm estudado o efeito a curto prazo do déficit de oxigênio no metabolismo energético, mas poucos os efeitos a longo prazo, como os avaliados neste trabalho. Estudos *in vitro*, utilizando adipócitos PAZ6, demonstraram que a hipóxia (8% O₂) durante 48 horas aumenta a secreção de leptina (GROSFELD et al., 2002). De igual forma *in vivo*, em camundongos e ratos adultos, a hipóxia aguda (8% O₂, 2 horas) (SHERRY et al., 2009) e a hipóxia intermitente (8 horas) aumentaram a secreção de leptina. No modelo de hipóxia intermitente, o aumento deste hormônio foi associado com a perda de peso durante o estímulo (MOREAU; CIRIELLO, 2013; CIRIELLO et al., 2016).

Além da leptina, houve diminuição na secreção de GH em modelos de hipóxia nos adultos, sendo avaliados seus níveis logo após o estímulo. Esta diminuição é causada pelo aumento da liberação de somatostatina (SS), a qual inibe a secreção do GH, por meio da sua ação na pituitária anterior e no PVN, onde é ativado o eixo HPA (CHEN; DU, 2002; CHEN; DU; WANG, 2004).

Neste experimento, a anóxia neonatal diminuiu o peso de ratos Wistar adultos, machos e fêmeas, sem modificar sua ingestão diária de alimento. Estes resultados sugerem que a anóxia neonatal provavelmente alterou o equilíbrio energético dos animais, aumentando o gasto energético e diminuindo seu peso.

Além disto, a anóxia neonatal foi capaz de modificar a resposta ao jejum agudo e de realimentação de maneira diferente segundo a idade avaliada. Em P35 a anóxia aumentou a ingestão alimentar após o jejum, e também a secreção de leptina e de insulina pós-prandial. Em P95, com esse estímulo houve aumento da perda de peso após o jejum e diminuição da secreção de leptina (pós-jejum), de insulina e de glicemia (pós-prandial).

Por fim, foi demonstrado nesta pesquisa que o modelo utilizado de déficit de oxigênio neonatal afeta de igual forma, além do encéfalo, a morfofuncionalidade dos tecidos periféricos, como o pâncreas. Sendo este resultado esperado ao ser a anóxia um estímulo global. No entanto, o aumento da área das ilhotas de Langerhans não parece estar relacionado com a secreção de insulina, mas as explicações dependem de avaliações celulares e bioquímicas mais específicas.

7.2 EXPERIMENTO 2- ANIMAIS ISOLADOS

7.2.1 Efeitos da anóxia neonatal e do isolamento no metabolismo energético

Muitos dos resultados obtidos neste segundo experimento foram opostos aos do primeiro, sendo o alojamento dos animais a principal diferença metodológica. No experimento 1, os ratos permaneceram em grupo até a idade da perfusão, já no segundo, foram isolados permanentemente a partir de P27.

O isolamento é um fator estressor que tem demonstrado causar modificações anatômicas, fisiológicas e comportamentais nos ratos Wistar (MUMTAZ et al., 2018). Algumas dessas alterações estão relacionadas com o comportamento alimentar e o metabolismo energético, como: aumento da secreção de corticosterona, do consumo de sacarose (MUMTAZ et al., 2018), e de glicemia. Assim como, diminuição da ingestão alimentar e do peso corporal, quando os animais são isolados em caixas metabólicas (ZYMANTIENE et al., 2016).

Neste trabalho, o isolamento resultou no aumento dos níveis de glicemia de todos os grupos, nos três momentos avaliados [figura 23]. O aumento da glicemia é considerado um indicador de estresse, sendo causado por maior secreção de corticosterona (CAIXETA et al., 2018). Além do aumento da glicemia, os animais do segundo experimento apresentaram um comportamento mais agressivo durante a manipulação. Portanto, o isolamento pode ser considerado um estímulo influenciador dos resultados obtidos.

Neste experimento, a anóxia neonatal associada ao isolamento, aumentou o peso dos ratos machos na idade adulta (a partir de P72) [figura 18]. Este resultado foi oposto ao do experimento 1, no qual a anóxia o diminuiu. Na comparação entre os dois experimentos, os animais controles não apresentaram mudança de peso quando

isolados, enquanto que os do grupo anóxia apresentaram aumento do mesmo. Estes resultados indicam que o isolamento crônico alterou o peso corporal somente dos grupos anóxia.

Na avaliação diária da ingestão alimentar [figura 20] não houve diferença entre os dois experimentos, tampouco entre os grupos anóxia e controle. Assim, todos os animais, tanto os alocados em grupo como os isolados, ingeriram a mesma quantidade de alimento. Estes resultados sugerem novamente, que a diferença de peso encontrada nos dois experimentos é resultado de um desequilíbrio no metabolismo energético, ao invés de um aumento da ingestão alimentar.

Na busca de compreender essa questão, os animais de ambos grupos foram submetidos a jejum agudo [18 horas] seguido de realimentação [1 hora], nas idades de 35 e 95 dias, a fim de detectar possíveis alterações metabólicas que pudessem explicar a diferença de peso observada.

Na idade de P35 foram detectadas diferenças significantes entre anóxia e controle no peso perdido em pós-jejum, ganhado em pós-prandial (somente em machos) [figura 20] e na ingestão alimentar em pós-jejum (somente em machos) [figura 22]. Enquanto que não houve diferença nos outros parâmetros avaliados.

Provavelmente, em comparação aos animais controle, os anóxia perderam mais peso após o jejum pelo esgotamento de suas reservas energéticas de gordura, como consequência de um elevado gasto energético ocasionado pela condição experimental. Assim, como discutido no experimento 1, é possível que nestes animais não houve diminuição da termogênese ou do VO_2 como estratégia para poupar energia, causando um aumento do seu consumo e a necessidade de utilização das reservas de tecido adiposo.

Seguindo esta ordem de ideias, o maior consumo das reservas energéticas teria promovido a maior ingestão alimentar no pós-jejum nos machos anóxia, no intuito de suprir o déficit energético. Por sua vez, esta ingestão seria proporcional ao ganho de peso observado nestes animais. Desta forma, a porcentagem de peso perdido durante o jejum foi recuperada pelo aumento da ingestão alimentar.

Na idade de P95, no período de pós-jejum, os animais anóxia (machos) evidenciaram maior perda de peso [figura 21] do que os controles. No momento pós-prandial, os grupos anóxia apresentaram maior ingestão alimentar [figura 22], maior taxa de insulina [figura 24] e de leptina [figura 25], assim como menor marcação de Fos

no ARC [figura 26]. Por sua vez, não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos nas outras variáveis avaliadas.

Nesta idade, assim como observado em P35 e no experimento 1 em P95, os ratos anóxia machos perderam mais peso após o jejum. Este fenômeno observado repetidamente, sugere que os animais anóxia respondem de maneira diferente a restrição calórica do que os controles. Possivelmente, ao não diminuírem o seu gasto energético, ocasionaram a redução das reservas de tecido adiposo e em consequência acentuaram a redução do peso corporal.

Além disto, como observado na idade de P35 nos dois experimentos, foi identificada também uma maior ingestão alimentar pós-jejum. Os níveis aumentados de leptina e insulina, junto a menor expressão da proteína Fos no ARC, sugerem que o aumento da alimentação é resultado de uma ação diminuída desses hormônios neste núcleo hipotalâmico.

O gene c-Fos codifica a proteína Fos, sendo considerada sua expressão como um marcador de atividade neuronal (MORGAN et al., 1987; BULLITT, 1990). Sabe-se que a leptina induz a expressão de Fos em áreas ao redor da eminência mediana, incluindo o núcleo arqueado lateral, a parte dorsomedial do VMH, a parte caudal do DMH e a parte parvocelular ventral do PVN (ELIAS et al., 1999; ELMQUIST; ELIAS; SAPER, 1999). Por sua vez, a insulina apesar de agir no núcleo arqueado, não demonstrou aumento da expressão de Fos no hipotálamo, sendo avaliada 90 min depois de ser injetada por via intravenosa e intraventricular (PORTER; BOKIL, 1997).

Por causa do maior nível de leptina nos grupos anóxia, esperava-se encontrar maior ativação do ARC nestes animais. No entanto, a ativação deste núcleo foi menor nos anóxia do que nos controles. Sugerindo que ocorreu ação diminuída da leptina no ARC nestes indivíduos, reduzindo assim o efeito anorexigênico e causando a hiperfagia observada. No entanto, é necessário lembrar que outros hormônios, além da leptina, podem interferir na ativação do ARC.

Tem sido demonstrado que camundongos obesos apresentam menor expressão de Fos no ARC, quando avaliados durante restrição alimentar, pouco tempo antes da alimentação. Neste artigo, a menor ativação foi associada com a diminuição da atividade antecipatória à alimentação (LUNA-ILLADES; MORALES; MIRANDA-ANAYA, 2017).

A anóxia neonatal tem demonstrado diminuir a neurogênese no hipocampo e a densidade celular no córtex (TAKADA et al., 2016; KUMAR et al., 2017). Portanto, seria possível que este estímulo também modifique a quantidade celular no ARC, causando a menor ativação neuronal durante a alimentação. Contudo, na contagem de neurônios revelados por imunoreatividade a NeuN não se encontraram diferenças significativas entre anóxia e controle, indicando que os grupos apresentam a mesma quantidade de neurônios. Outro estudo também não encontrou diferenças na quantidade de neurônios no hipotálamo de ratos, 3 meses após anóxia neonatal (KOHLHAUSER et al., 1999).

Desta forma, é possível que a menor ativação do ARC no período pós-prandial seja ocasionada por uma resistência à leptina. Nos obesos, dois mecanismos causam esta resistência. O primeiro está relacionado com a incapacidade da leptina de atravessar a barreira hematoencefálica, limitando o acesso a seus alvos neuronais no hipotálamo. O segundo, ocorre devido a inibição das vias de sinalização intracelular da leptina, causadas pela desensibilização e/ou regulação negativa do receptor ou também das proteínas de sinalização (CRUJEIRAS et al., 2015). No entanto, estas hipóteses não podem ser comprovadas neste trabalho.

Neste segundo experimento, foi identificado que o isolamento em ratos Wistar submetidos a anóxia neonatal ocasiona aumento de peso nos machos adultos. O qual pode estar relacionado a um desequilíbrio no metabolismo energético, por não apresentar aumento da ingestão alimentar em condições *ad libitum*.

Na idade de P35, a anóxia neonatal e o isolamento provocaram a perda de peso nos animais durante o período pós-jejum, provavelmente devido ao aumento do gasto energético na restrição alimentar. Este alto gasto pode explicar a hiperfagia durante a realimentação, que causou maior ganho de peso nos grupos anóxia do que nos controles.

Na idade de P95, a anóxia e o isolamento, novamente causaram a perda de peso no período de pós-jejum e aumento da ingestão alimentar durante a realimentação. A hiperfagia foi associada a uma possível resistência à leptina e insulina, suspeita pelos níveis circulantes elevados destes hormônios e a pouca ativação do ARC.

Em suma, neste trabalho a anóxia neonatal modificou o desenvolvimento somático e o metabolismo energético de ratos Wistar machos e fêmeas adultos. Contudo, divergências com a literatura e mesmo entre os grupos experimentais, entre

os resultados esperados e os obtidos, indicam a necessidade de prosseguir os estudos com outras abordagens.

8. CONCLUSÃO

- A anóxia neonatal em ratos Wistar modificou o desenvolvimento somático na idade adulta dos ratos Wistar machos e fêmeas. Quando alocados em grupo causou diminuição de peso, e quando isolados o aumentou.

- Não foram detectadas diferenças significantes causadas pela anóxia neonatal ou pelo isolamento na ingestão alimentar, sugerindo que as diferenças de peso encontradas são consequência de um desequilíbrio metabólico.

- A anóxia neonatal modificou a resposta ao jejum de forma diferente segundo a idade avaliada ou somada ao isolamento. Este estímulo foi capaz de aumentar a perda de peso, a ingestão alimentar pós-jejum, modificar a secreção de leptina e insulina, aumentar a área das ilhotas de Langerhans e a expressão da proteína Fos no ARC.

9. LIMITAÇÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

- 1 Padronização de ninhadas: Neste trabalho buscou-se padronizar o número de filhotes em todas as ninhadas. Assim, todas as ninhadas foram conformadas por 8 ou no mínimo 7 animais. Em uma das ninhadas anóxia só 5 animais sobreviveram ao estímulo, portanto, 3 filhotes remanescentes do grupo controle foram submetidos a anóxia neonatal e dados em adoção.
- 2 Para evitar que possíveis alterações ambientais e técnicas afetassem os resultados de algum dos grupos, uma ninhada anóxia e uma controle foram analisadas no mesmo período de tempo.
- 3 A avaliação dos parâmetros de crescimento poderia ter sido realizada cada 3 dias, para evitar a manipulação excessiva dos animais na fase de aleitamento.
- 4 Não foi possível continuar com a avaliação da medição dos eixos ELLC, EAPC depois do desmame, já que por causa do tamanho do animal se dificulta sua manipulação.

- 5 A avaliação da ingestão alimentar teria sido mais confiável se tivessem sido utilizadas caixas metabólicas. No entanto, tendo em consideração o potencial efeito estressor gerado nos animais (GIL et al., 1999; WHITTAKER; LYMN; HOWARTH, 2016), foi decidido não as utilizar.
- 6 Não foi possível avaliar a locomoção nem a termogênese durante o jejum e no período de atividade na caixa. Esses dados teriam proporcionado informação importante sobre o gasto energético.
- 7 Por causa do ciclo estral das fêmeas, não foi possível realizar as perfusões exatamente na data estabelecida quando adultas, sendo realizadas no dia de diestro mais próximo.

10. REFERÊNCIAS

- ANAND, B. K.; BROBECK, J. R. Localization of a “Feeding Center” in the hypothalamus of the Rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 55, n. 19, p. 6–7, 1951.
- ANDINÉ, P.; THORDSTEIN, M.; KJELLMER, I.; NORDBORG, C.; THIRINGER, K.; WENNERBERG, E.; HAGBERG, H. Evaluation of brain damage in a rat model of neonatal hypoxic-ischemia. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 35, n. 3, p. 253–260, 1990.
- BARKHUIZEN, M.; VAN DEN HOVE, D. L. A.; VLES, J. S. H.; STEINBUSCH, H. W. M.; KRAMER, B. W.; GAVILANES, A. W. D. 25 Years of Research on Global Asphyxia in the Immature Rat Brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 75, p. 166–182, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.01.042>>.
- BERTHOUD, H.-R. Multiple neural systems controlling food intake and body weight. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 26, n. 1, p. 393–428, 2002.
- BERTILE, F.; RACLOT, T. The melanocortin system during fasting. **Peptides**, v. 27, n. 2, p. 291–300, 2006.
- BULLITT, E. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. **Journal of Comparative Neurology**, v. 296, n. 4, p. 517–530, 1990.
- CAIXETA, D. C.; TEIXEIRA, R. R.; PEIXOTO, L. G.; MACHADO, L.; BAPTISTA, N. B.; SOUZA, A. V. De; VILELA, D. D.; FRANCI, C. R.; ESPINDOLA, F. S. Adaptogenic potential of royal jelly in liver of rats exposed to chronic stress. **PLoS ONE**, p. 1–13, 2018.
- CHALLET, E.; LE MAHO, Y.; ROBIN, J. P.; MALAN, A.; CHEREL, Y. Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 50, n. 3, p. 405–412, 1995.
- CHEN, X. Q.; DU, J. Z. Increased somatostatin mRNA expression in periventricular nucleus of rat hypothalamus during hypoxia. **Regulatory Peptides**, v. 105, n. 3, p. 197–201, 2002.
- CHEN, X. Q.; DU, J. Z.; WANG, Y. S. Regulation of hypoxia-induced release of corticotropin-releasing factor in the rat hypothalamus by norepinephrine. **Regulatory Peptides**, v. 119, n. 3, p. 221–228, 2004.
- CIRIELLO, J.; MOREAU, J. M.; MCCOY, A.; JONES, D. L. Effect of intermittent hypoxia on arcuate nucleus in the leptin-deficient rat. **Neuroscience Letters**, v. 626, p. 112–118, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2016.05.029>>.
- COLL, A. P.; YEO, G. S. H. The hypothalamus and metabolism: Integrating signals to control energy and glucose homeostasis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 13, n. 6, p. 970–976, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coph.2013.09.010>>.
- CRUJEIRAS, A. B.; CARREIRA, M. C.; CABIA, B.; ANDRADE, S.; AMIL, M.; CASANUEVA, F. F. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. **Life Sciences**, v. 140, p. 57–63, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.05.003>>.

DAVIS, S. N. Postprandial physiology and the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Insulin**, v. 3, n. 2, p. 132–140, 2008.

DELL'ANNA, M. E.; CALZOLARI, S.; MOLINARI, M.; IUVONE, L.; CALIMICI, R. Neonatal anoxia induces transitory hyperactivity, permanent spatial memory deficits and CA1 cell density reduction in developing rats. **Behavioural Brain Research**, v. 45, n. 2, p. 125–134, 1991.

ELIAS, C. F.; ASCHKENASI, C.; LEE, C.; KELLY, J.; AHIMA, R. S.; BJORBAEK, C.; FLIER, J. S.; SAPER, C. B.; ELMQUIST, J. K. Leptin Differentially Regulates NPY and POMC Neurons Projecting to the Lateral Hypothalamic Area. **Neuron**, v. 23, p. 775–786, 1999.

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.; ELMQUIST, J. K. Chemically Defined Projections Linking the Mediobasal Hypothalamus and the Lateral Hypothalamic Area. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 402, p. 442–459, 1998.

ELMQUIST, J. K.; ELIAS, C. F.; SAPER, C. B. From Lesions to Leptin : Hypothalamic Control of Food Intake and Body Weight. v. 22, p. 221–232, 1999.

FEI, H.; OKANO, H.; LI, C.; LEE, G.-H.; ZHAO, C.; DARNELL, R.; FRIEDMAN, J. Anatomic localization of alternatively spliced leptin receptors (Ob-R) in mouse brain and other tissues. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 94, n. June, p. 7001–7005, 1997.

FERNÁNDEZ-FORMOSO, G.; PÉREZ-SIEIRA, S.; GONZÁLEZ-TOUCEDA, D.; DIEGUEZ, C.; TOVAR, S. Leptin , 20 years of searching for glucose homeostasis. **Life Sciences**, v. 140, p. 4–9, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.02.008>>.

FLEISS, B.; COLEMAN, H. A.; CASTILLO-MELENDEZ, M.; IRELAND, Z.; WALKER, D. W.; PARKINGTON, H. C. Effects of birth asphyxia on neonatal hippocampal structure and function in the spiny mouse. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 7, p. 757–766, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.05.006>>.

FREDERICH, R. C.; LOWELL, B. B.; FLIER, J. S.; LOWELL, B. B.; FLIER, J. S. Expression of ob mRNA and its encoded protein in rodents . Impact of nutrition and obesity . Find the latest version : Expression of ob mRNA and its Encoded Protein in Rodents. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 3, p. 1658–1663, 1995.

FUNAHASHI, H.; TAKENOYA, F.; GUAN, J.-L.; KAGEYAMA, H.; YADA, T.; SHIODA, S. Hypothalamic neuronal networks and feeding-related peptides involved in the regulation of feeding. **Anatomical Science International**, v. 78, n. 3, p. 123–138, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1046/j.0022-7722.2003.00055.x>>.

GALE, S. M.; CASTRACANE, V. D.; MANTZOROS, C. S. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. **The Journal of nutrition**, v. 134, n. 2, p. 295–298, 2004.

GIL, M.; AGUIRRE, J.; LEMOINE, A.; SEGURA, E.; BARONTINI, M.; ARMANDO, I. Influence of age on stress responses to metabolic cage housing in rats. **Cell Mol Neurobiol.**, v. 19, n. 5, p. 625–33, 1999.

GONZALEZ-RODRIGUEZ, P. J.; XIONG, F.; LI, Y.; ZHOU, J.; ZHANG, L. Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: Role of glucocorticoid receptors. **Neurobiology of Disease**, v. 65, p. 172–179, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2014.01.020>>.

GRAFE, M. R. Developmental changes in the sensitivity of the neonatal rat brain to hypoxic/ischemic injury. **Brain Res**, v. 653, n. 1–2, p. 161–166, 1994. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7982049>.

GRAHAM, E. M.; RUIS, K. A.; HARTMAN, A. L.; NORTHINGTON, F. J.; FOX, H. E. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199, n. 6, p. 587–595, 2008.

GROJEAN, S.; SCHROEDER, H.; POURIÉ, G.; CHARRIAUT-MARLANGUE, C.; KOZIEL, V.; DESOR, D.; VERT, P.; DAVAL, J. L. Histopathological alterations and functional brain deficits after transient hypoxia in the newborn rat pup: A long term follow-up. **Neurobiology of Disease**, v. 14, n. 2, p. 265–278, 2003.

GROSFELD, A.; ZILBERFARB, V.; TURBAN, S.; ANDRÉ, J.; GUERRE-MILLO, M.; ISSAD, T. Hypoxia increases leptin expression in human PAZ6 adipose cells. **Diabetologia**, v. 45, n. 4, p. 527–530, 2002.

GU, Z.; DU, Y.; LIU, Y.; MA, L. Effect of aging on islet beta-cell function and its mechanisms in Wistar rats. p. 1393–1403, 2012.

HARRIS, R. B. S. Direct and indirect effects of leptin on adipocyte metabolism. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1842, n. 3, p. 414–23, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685313>><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3838442>>.

HETHERINGTON, A. W.; RANSON, S. W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **The Anatomical Record**, v. 78, n. 2, p. 149–172, 1940. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1090780203>>.

HILL, C. A.; THRELKELD, S. W.; FITCH, R. H. Reprint of “Early testosterone modulated sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia in rats”. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 29, n. 6, p. 621–628, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.07.009>>.

JÉQUIER, E.; TAPPY, L. Regulation of Body Weight in Humans. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 451–480, 1999. Disponível em: <<http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.1999.79.2.451>>.

JOLY-AMADO, A.; CANSELL, C.; DENIS, R. G. P.; DELBES, A. S.; CASTEL, J.; MARTINEZ, S.; LUQUET, S. The hypothalamic arcuate nucleus and the control of peripheral substrates. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 725–737, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2014.03.003>>.

KANEKO, K. The effect of perinatal anoxia on amino acid metabolism in the developing brain. Part II: The effect of perinatal anoxia on the free amino acid patterns in CSF of infants and children. **Brain Dev**, v. 7, n. 4, p. 400–407, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation>>.

tion&list_uids=4061776>.

KING, B. M. The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. **Physiology and Behavior**, v. 87, n. 2, p. 221–244, 2006.

KOHLHAUSER, C.; KAEHLER, S.; MOSGOELLER, W.; SINGEWALD, N.; KOUVELAS, D.; PRAST, H.; HOEGER, H.; LUBEC, B. Histological Changes and Neurotransmitter Levels Three Months Following Perinatal Asphyxia in the Rat. **Life Science**, v. 64, n. 23, p. 2109–2124, 1999.

KÖNNER, A. C.; KLÖCKENER, T.; BRÜNING, J. C. Control of energy homeostasis by insulin and leptin: Targeting the arcuate nucleus and beyond. **Physiology and Behavior**, v. 97, n. 5, p. 632–638, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.027>>.

KUMAR, A. J.; TAKADA, S. H.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; LEE, V. Y.; XAVIER, G. F.; NOGUEIRA, M. I. Sex differences in somatic and sensory motor development after neonatal anoxia in Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, v. 333, n. April, p. 242–250, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432817306101>>.

LAPTOOK, A. R. Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. **Clinics in Perinatology**, v. 43, n. 3, p. 529–545, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2016.04.010>>.

LEE, V. Y. **Influência do exercício materno espontâneo e da anóxia neonatal no desenvolvimento, na memória espacial e no hipocampo de ratos**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

LEINNINGER, G. M.; JO, Y. H.; LESHAN, R. L.; LOUIS, G. W.; YANG, H.; BARRERA, J. G.; WILSON, H.; OPLAND, D. M.; FAOUZI, M. A.; GONG, Y.; JONES, J. C.; RHODES, C. J.; CHUA, S.; DIANO, S.; HORVATH, T. L.; SEELEY, R. J.; BECKER, J. B.; MÜNZBERG, H.; MYERS, M. G. Leptin Acts via Leptin Receptor-Expressing Lateral Hypothalamic Neurons to Modulate the Mesolimbic Dopamine System and Suppress Feeding. **Cell Metabolism**, v. 10, n. 2, p. 89–98, 2009.

LEVINE, S. Anoxic-Ischemic Encephalopathy in Rats. **The American journal of pathology**, v. 36, n. 1, p. 1–17, 1960.

LOH, K.; ZHANG, L.; BRANDON, A.; WANG, Q.; BEGG, D.; QI, Y.; FU, M.; KULKARNI, R.; TEO, J.; BALDOCK, P.; BRÜNING, J. C.; COONEY, G.; NEELY, G.; HERZOG, H. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. **Molecular Metabolism**, v. 6, n. 6, p. 574–584, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2017.03.013>>.

LUBICS, A.; REGLODI, D.; TAMÁS, A.; KISS, P.; SZALAI, M.; SZALONTAY, L.; LENGVÁRI, I. Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. **Behavioural Brain Research**, v. 157, n. 1, p. 157–165, 2005.

LUNA-ILLADES, C.; MORALES, T.; MIRANDA-ANAYA, M. Decreased food anticipatory activity of obese mice relates to hypothalamic c-Fos expression. **Physiology & Behavior**, v. 179, n. May, p. 9–15, 2017.

- MATCHETT, G. A.; FATHALI, N.; HASEGAWA, Y.; JADHAV, V.; OSTROWSKI, R. P.; MARTIN, R. D.; DOROTTA, I. R.; SUN, X.; ZHANG, J. H. Hydrogen gas is ineffective in moderate and severe neonatal hypoxia-ischemia rat models. **Brain Research**, v. 1259, p. 90–97, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.12.066>>.
- MAYER, C. a; AO, J.; DI FIORE, J. M.; MARTIN, R. J.; MACFARLANE, P. M. Impaired hypoxic ventilatory response following neonatal sustained and subsequent chronic intermittent hypoxia in rats. **Respiratory physiology & neurobiology**, v. 187, p. 167–75, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562917>>.
- MENSHANOV, P. N.; BANNOVA, A. V.; DYGALO, N. N. Anoxia ameliorates the dexamethasone-induced neurobehavioral alterations in the neonatal male rat pups. **Hormones and Behavior**, v. 87, p. 122–128, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.11.013>>.
- MERCER, J. G.; HOGGARD, N.; WILLIAMS, L. M.; LAWRENCE, C. B.; HANNAH, L. T.; MORGAN, P. J.; TRAYHURN, P. Coexpression of Leptin Receptor and Preproneuropeptide Y mRNA in Arcuate Nucleus of Mouse Hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 8, p. 733–735, 1996.
- MOREAU, J. M.; CIRIELLO, J. Effects of acute intermittent hypoxia on energy balance and hypothalamic feeding pathways. **Neuroscience**, v. 253, p. 350–360, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.09.007>>.
- MORGAN, J. I.; COHEN, D. R.; HEMPSTEAD, J. L.; CURRAN, T. O. M. Mapping Patterns of c-fos Expression in the Central Nervous System after Seizure. **Science**, v. 237, n. 4811, p. 192–197, 1987.
- MUMTAZ, F.; KHAN, M. I.; ZUBAIR, M.; DEHPOUR, A. R. Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 105, n. May, p. 1205–1222, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.086>>.
- NAGANO, R.; NAGANO, M.; NAKAI, A.; TAKESHITA, T.; SUZUKI, H. Differential effects of neonatal SSRI treatments on hypoxia-induced behavioral changes in male and female offspring. **Neuroscience**, n. August, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306452217305286>>.
- NAGASHIMA, K.; NAKAI, S.; MATSUE, K.; KONISHI, M.; TANAKA, M.; KANOSUE, K. Effects of fasting on thermoregulatory processes and the daily oscillations in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 284, n. 6, p. R1486–R1493, 2003. Disponível em: <<http://ajpregu.physiology.org/lookup/doi/10.1152/ajpregu.00515.2002>>.
- NIRMALAN, N.; NIRMALAN, M. Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 11, n. 7, p. 279–283, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2017.06.019>>.
- OVERTON, J. M.; WILLIAMS, T. D. Behavioral and physiologic responses to caloric restriction in mice. **Physiology and Behavior**, v. 81, n. 5, p. 749–754, 2004.
- PARK, H. K.; AHIMA, R. S. Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 64, n. 1, p. 24–34, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.08.004>>.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **THE RAT BRAIN IN STEREOTAXIC COORDINATES, FOURTH EDITION CD-ROM**. 4. ed. [s.l: s.n.]v. 4

PORTER, J. P.; BOKIL, H. S. Effect of intracerebroventricular and intravenous insulin on Fos- immunoreactivity in the rat brain. **Neuroscience Letters**, v. 224, p. 161–164, 1997.

QU, D.; LUDWING, D.; GAMMENLTOFT, S.; PIPER, M.; PELLEYMOUNTER, M. A.; CULLEN, M. J.; MATHES, W.; PRZYPEK, J.; KANAREK, R.; MARATOS-FLIER, E. A role for melanin-concentrating hormone in the central regulation of feeding behavior.pdf. **Nature**, v. 380, p. 243–247, 1996.

RAFF, H.; BRUDER, E. D.; JANKOWSKI, B. M.; COLMAN, R. J. Effect of neonatal hypoxia on leptin, insulin, growth hormone and body composition in the rat. **Hormone and Metabolic Research**, v. 33, n. 3, p. 151–155, 2001.

RAINALDI, M. A.; PERLMAN, J. M. Pathophysiology of Birth Asphyxia. **Clinics in Perinatology**, v. 43, n. 3, p. 409–422, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2016.04.002>>.

RAMNANAN, C. J.; EDGERTON, D. S.; CHERRINGTON, A. D. Evidence against a Physiologic Role for Acute Changes in CNS Insulin Action in the Rapid Regulation of Hepatic Glucose Production. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 5, p. 656–664, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.006>>.

REINBOTH, B. S.; KÖSTER, C.; ABBERGER, H.; PRAGER, S.; BENDIX, I.; FELDERHOFF-MÜSER, U.; HERZ, J. Endogenous hypothermic response to hypoxia reduces brain injury: Implications for modeling hypoxic-ischemic encephalopathy and therapeutic hypothermia in neonatal mice. **Experimental Neurology**, v. 283, p. 264–275, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.06.024>>.

REN, Q.; JIANG, Z.; ZHANG, X.; YANG, Q. Effects of erythropoietin on neonatal hypoxia–ischemia brain injury in rat model. **Physiology & Behavior**, v. 169, p. 74–81, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031938416304206>>.

REZAI-ZADEH, K.; YU, S.; JIANG, Y.; LAQUE, A.; SCHWARTZENBURG, C.; MORRISON, C. D.; DERBENEV, A. V.; ZSOMBOK, A.; MÜNZBERG, H. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. **Molecular Metabolism**, v. 3, n. 7, p. 681–693, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmet.2014.07.008>>.

ROMANO, A.; KOCZWARA, J. B.; GALLELLI, C. A.; VERGARA, D.; MICIONI DI BONAVENTURA, M. V.; GAETANI, S.; GIUDETTI, A. M. Fats for thoughts: An update on brain fatty acid metabolism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 84, p. 40–45, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2016.12.015>>.

SAWCHENKO, P. E. Toward a New Neurobiology of Energy Balance , Appetite , and Obesity : **The Journal of Comparative Neurology**, v. 442, p. 435–441, 1998.

SCHWARTZ, M. W.; SEELEY, R. J.; CAMPFIELD, L. A.; BURN, P.; BASKIN, D. G. Identification of Targets of Leptin Action in Rat Hypothalamus. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 5, p. 1101–1106, 1996.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; JR, D. P.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, p. 661–671, 2000.

SEMPLE, B. D.; BLOMGREN, K.; GIMLIN, K.; FERRIERO, D. M.; NOBLE-HAEUSSLEIN, L. J. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Progress in Neurobiology**, v. 106–107, p. 1–16, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>>.

SHERRY, C. L.; KRAMER, J. M.; YORK, J. M.; FREUND, G. G. Behavioral recovery from acute hypoxia is reliant on leptin. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, n. 2, p. 169–175, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2008.09.011>>.

SHIMOMURA, C.; OHTA, H. Behavioral abnormalities and seizure susceptibility in rat after neonatal anoxia. **Brain & development**, v. 10, n. 3, p. 160–163, 1988. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med3&NEWS=N&AN=3407852>>.

TAKADA, S. H.; DOS SANTOS HAEMMERLE, C. A.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; MACHADO-NILS, A. V.; LEE, V. Y.; TAKASE, L. F.; CRUZ-RIZZOLO, R. J.; KIHARA, A. H.; XAVIER, G. F.; WATANABE, I. S.; NOGUEIRA, M. I. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**, v. 284, p. 247–259, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.08.054>>.

TAKADA, S. H.; MOTTA-TEIXEIRA, L. C.; MACHADO-NILS, A. V.; LEE, V. Y.; SAMPAIO, C. A.; POLLI, R. S.; MALHEIROS, J. M.; TAKASE, L. F.; KIHARA, A. H.; COVOLAN, L.; XAVIER, G. F.; NOGUEIRA, M. I. Impact of neonatal anoxia on adult rat hippocampal volume, neurogenesis and behavior. **Behavioural Brain Research**, v. 296, p. 331–338, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2015.08.039>>.

TAKADA, S. H.; SAMPAIO, C. A. G.; ALLEMANDI, W.; ITO, P. H.; TAKASE, L. F.; NOGUEIRA, M. I. A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos immunoreactivity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 198, n. 1, p. 62–69, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneumeth.2011.03.009>>.

TANG, A. C.; NAKAZAWA, M. Neonatal novelty exposure ameliorates anoxia-induced hyperactivity in the open field. **Behavioural Brain Research**, v. 163, n. 1, p. 1–9, 2005.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G.; CAMPFIELD, A.; CLARK, F.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K.; SMUTKO, J.; MAYS, G. G.; WOOLF, E. A.; MONROE, C.; TEPPER, R. Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, p. 1263–1271, 1995.

UPADHYAY, J.; FARR, O. M.; MANTZOROS, C. S. The role of leptin in regulating bone metabolism. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 1, p. 105–113, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.021>>.

VAN SWIETEN, M. M. H.; PANDIT, R.; ADAN, R. A. H.; VAN DER PLASSE, G. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 61, p. 207–220, 2014. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2014.05.004>>.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI, S. J. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: Evolution of an animal model. **Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 2–4, p. 81–86, 2005.

VASCONCELOS, R. **Efeito da influencia da anóxia neonatal no comportamento maternal e no desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos Wistar**. 2013. Universidade de São Paulo, 2013.

WAGNER, B. P.; NEDELCU, J.; MARTIN, E. Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. **Pediatric research**, v. 51, n. 3, p. 354–60, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861942>>.

WHITTAKER, A. L.; LYMN, K. A.; HOWARTH, G. S. Effects of Metabolic Cage Housing on Rat Behavior and Performance in the Social Interaction Test. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 19, n. 4, p. 363–374, 2016. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84964063160&doi=10.1080%2F10888705.2016.1164048&partnerID=40&md5=56fab2d61d0666e0a8db0be9d80a9227>>.

YAMAMOTO, H.; KATO, T. The effect of neonatal anoxia on brain cholecystokinin-8-like immunoreactivity and monoamine levels of mature rats. **Health (San Francisco)**, v. 26, n. 1, p. 285–288, 1986.

YAN, F.; ZHANG, M.; MENG, Y.; LI, H.; YU, L.; FU, X.; TANG, Y.; JIANG, C. Erythropoietin improves hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats after short-term anoxia by enhancing angiogenesis. **Brain Research**, v. 1651, p. 104–113, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2016.09.024>>.

ZHANG, N.; BI, S. Effects of physical exercise on food intake and body weight: Role of dorsomedial hypothalamic signaling. **Physiology and Behavior**, v. 192, n. March, p. 59–63, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.03.018>>.

ZHANG, Y.; PROENCA, R.; MAFFEI, M.; BARONE, M.; LEOPOLD, L.; FRIEDMAN, J. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p. 425–432, 1994.

ZYMANTIENE, J.; ZELVYTE, R.; OBERAUSKAS, V.; SPANCERNIENE, U. INFLUENCE OF METABOLIC CAGE ON WISTAR RAT. **Macedonian Veterinary Review**, v. 39, n. 1, p. 33–38, 2016.

11. APÊNDICE

11.1 EXPERIMENTOS ADICIONAIS

Paralelamente aos resultados, previamente apresentados, também foram realizados testes comportamentais nos animais do experimento 1. Devido a que os dados obtidos não se correlacionam com o estudo do metabolismo energético, estes serão apresentados na forma de adendos. No entanto, serão utilizados em uma futura publicação.

11.1.1 Campo Aberto

Os animais de todos os grupos em P28 e P88 apresentaram o mesmo comportamento no teste de campo aberto ($p > 0,05$). Não foram identificadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados.

Figura 29 - Campo Aberto em P28.

A. Locomoção. **B.** Tempo na periferia. **C.** Tempo no centro. **D.** Visitas ao centro. Não foi detectado efeito significativo da anóxia nem diferença significativa entre sexos em nenhum dos parâmetros avaliados ($p > 0,05$). Teste ANOVA de uma via, pós teste de Bonferroni. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. $n=23$ Cm, Cf e Af, e $n=25$ Am.

Figura 30 - Campo Aberto em P88.

A. Locomoção, B. Tempo na periferia, C. Tempo no centro, D. Visitas ao centro. Não foi detectado efeito significativo da anóxia nem diferença entre sexos em nenhum dos parâmetros avaliados ($p > 0,05$). Teste ANOVA de duas vias, pós teste de Bonferroni. Dados apresentados em média $\pm$ SEM. $n = 14$ Cm, $n = 16$ Am, $n = 13$ Cf, $n = 12$ Af.

11.1.2 Labirinto em Cruz Elevado P30

Todos os grupos apresentaram diminuição na porcentagem de tempo nos braços abertos durante o reteste em relação ao teste, $F_{(1,79)}=27,684$ $p<0,001$. Os animais do grupo anóxia, tanto machos quanto fêmeas, permaneceram menor porcentagem de tempo nos braços abertos em relação aos controles $F_{(1,79)}=14,559$ $p<0,001$, assim como maior porcentagem de tempo nos braços fechados do que os controle independente do teste e do sexo $F_{(1,79)}=0,295$ $p=0,002$.

Todos os grupos apresentaram diminuição no número de entradas nos braços abertos no reteste em relação ao teste $F_{(1,79)}=19,558$ $p<0,001$, enquanto que aumentaram as entradas nos fechados $F_{(1,79)}=31,304$, $p<0,001$. Os animais dos grupos anóxia tanto machos quanto fêmeas entraram menos vezes nos braços abertos do que os controles, independente do teste $F_{(1,79)}=8,366$ $p=0,005$. Por sua vez, as fêmeas entram mais vezes que os machos tanto nos braços abertos ($p<0,001$) como nos fechados ($p=0,001$) de maneira independente ao sexo e teste.

As fêmeas tanto do grupo anóxia como do controle percorreram maior distância no labirinto que os machos, de forma independente ao teste e reteste $p<0,001$.

Figura 31 - Labirinto em cruz elevado em P30.

A. Tempo no Braço Aberto (TBA): ANOVA de 3 vias- Foi detectada a diferença significativa entre Teste e Re-Teste, independente do Grupo e do Gênero, $F_{(1,79)}=27,684$ $p<0,001$. Foi detectada a diferença significativa entre Anóxia e Controle, independente do Gênero e do Teste, $F_{(1,79)}=14,559$ $p<0,001$.

Tempo no Braço Fechado (TBF): ANOVA de 3 vias- Foi detectada a diferença significativa entre Teste e Re-Teste, independente do Grupo e do Gênero, $p < 0,001$. Foi detectada a diferença significativa entre Anóxia e Controle, independente do Gênero e do Teste, $F_{(1,79)} = 0,295$ $p = 0,002$.

Tempo no Centro (TC): Não foi detectada diferença significativa nem efeito de interação significativa.

- B. Entradas nos braços abertos (EBA):** ANOVA de 3 vias- Foi detectada a diferença significativa entre Teste e Reteste, $F_{(1,79)} = 19,558$ $p < 0,001$ independente do sexo e do estímulo. Foi detectada diferença significativa entre Anóxia e Controle, $F_{(1,79)} = 8,366$ $p = 0,005$ independente do sexo e do teste. Foi detectada diferença significativa entre Fêmea e Macho, $p < 0,001$ independente do estímulo e do teste.

Entradas nos braços fechados (EBF): ANOVA de 3 vias- Foi detectada a diferença significativa entre Teste e Reteste, $F_{(1,79)} = 31,304$ $p < 0,001$. Foi detectada diferença significativa entre Fêmea e Macho, $p = 0,001$.

- C. Distância:** ANOVA de 3 vias: Foi detectada diferença significativa entre Fêmea e Macho, independente do Grupo e do Teste, $p < 0,001$.

11.1.3 Labirinto em Cruz Elevado P90

Os machos anóxia permaneceram maior porcentagem de tempo nos braços abertos do que os machos controle independente do teste e reteste $F_{(1, 50)} = 5,105$, $p = 0,0282$. Os animais anóxia independente do teste e do gênero, entram mais vezes nos braços abertos que os controle $F_{(1,45)} = 6,104$, $p = 0,017$. Por sua vez, as fêmeas realizam mais entradas nos braços abertos que os machos $F_{(1,45)} = 8,300$, $p = 0,006$.

Todos os grupos diminuem a distância percorrida no labirinto no reteste em comparação ao teste $F_{(1,45)} = 9,019$, $p = 0,004$. Em relação aos controle, os animais anóxia percorrem menor distância no teste e reteste $F_{(1,45)} = 7,967$, $p = 0,007$. Enquanto que as fêmeas percorrem maior distância que os machos independente a serem anóxia ou controle e ao teste $F_{(1,45)} = 5,549$, $p = 0,023$.

Figura 32 - Labirinto em cruz elevado em P90.

- A. Tempo nos braços abertos (TBA):** ANOVA de 3 vias- Não foi detectada diferença significativa entre Anóxia e Controle, $F_{(1,45)}=3,222$, $p=0,079$. Não foi detectada diferença de interação significativa entre Fêmea e Macho, $F_{(1,45)}=3,610$, $p=0,064$. ANOVA de 2 vias (machos)- Foi detectada diferença significativa entre Anóxia e Controle machos independente do teste, $F_{(1,50)}=5,105$, $p=0,0282$.

Tempo nos braços fechados (TBF): ANOVA de 3 vias: Não foi detectada a diferença significativa entre Anóxia e Controle, $F_{(1,45)}=2,685$, $p=0,108$. Não foi detectada diferença interação significativa entre Fêmea e Macho, $F_{(1,45)}=3,969$, $p=0,052$

Tempo no centro (TC): Não foi detectada nenhuma diferença significativa nem efeito de interação.

- B. **Entradas nos braços abertos (EBA):** ANOVA de 3 vias- Foi detectada diferença significativa entre Anóxia e Controle, independente do teste e do gênero, $F_{(1,45)}=6,104$, $p=0,017$. Foi detectada diferença significativa entre Fêmea e Macho, independente do teste e do grupo, $F_{(1,45)}=8,300$, $p=0,006$.

Entradas nos braços fechados (EBF): ANOVA de 3 vias- Não foi detectada diferença significativa nem efeito de interação significativa.

- C. **Distância percorrida:** ANOVA de 3 vias: Foi detectada a diferença significativa entre Teste e Reteste, independente do Grupo e Gênero, $F_{(1,45)}=9,019$, $p=0,004$. Foi detectada a diferença significativa entre Anóxia e Controle, independente do Gênero e Teste, $F_{(1,45)}=7,967$, $p=0,007$. Foi detectada diferença significativa entre Fêmea e Macho, independente do Grupo e do Teste, $F_{(1,45)}=5,549$, $p=0,023$.

11.1.4 Níveis De Corticosterona Em P30 E P90

Em P30 e em condições basais, os machos anóxia apresentam níveis mais baixos de corticosterona que seus controles $p=0,0180$, enquanto que as fêmeas anóxia apresentam níveis maiores que as controle fêmeas $p=0,0063$, e que os machos anóxia $p=0,0033$. Por sua vez os machos controle tem níveis maiores que as fêmeas controle $p=0,0415$. Após teste (LCE reteste), todos os grupos aumentaram significativamente o nível de corticosterona, no entanto entre grupos não foi detectada nenhuma diferença significativa.

Em P90 tanto em condições basais ($F_{(1,12)}=19,29$ $p=0,0009$) como após teste ($F_{(1,14)}=84,08$ $p<0,0001$) as fêmeas apresentaram maior nível de corticosterona que os machos independente do grupo

Figura 33 - Dosagem de Corticosterona P30 e P90.

- A. Corticosterona Basal P30:** Foi detectado efeito de interação entre sexo e estímulo $F_{(1,10)} = 35,03$ $p = 0,0001$. Foi detectada diferença significativa entre controle macho e controle fêmeas $p = 0,0415$, entre anóxia macho e controle macho $p = 0,0180$, controle fêmea e anóxia fêmea $p = 0,0063$, e anóxia macho e anóxia fêmea $p = 0,0033$.
- B. Corticosterona Teste P30:** Não foi detectada diferença significativa nem efeito de interação.

Figura 34 - Dosagem de Corticosterona P90.

- A. Corticosterona Basal:** Foi detectado efeito do sexo independente do grupo $F_{(1,12)} = 19,29$ $p = 0,0009$. No pós-hoc foi detectada diferença entre controle machos e controle fêmeas $p = 0,0425$, e anóxia machos e anóxia fêmeas $p = 0,0367$.
- B. Corticosterona Teste:** Foi detectado efeito do sexo independente do grupo $F_{(1,14)} = 84,08$ $p < 0,0001$. No pós-hoc foi detectada diferença entre controles machos e controles fêmeas $p = 0,0002$ e anóxia machos com anóxia fêmeas $p < 0,0001$.

12. ANEXO I

Tabela 6 - Efeitos do déficit de oxigênio neonatal no peso corporal.

ANÓXIA NEONATAL			
Autor e ano	Animal	Método	Resultado no peso corporal
Kaneko et al., 1985	Ratos Wistar, machos	Anóxia: P1, 97% N ₂ , 30 min	Não houve diferença até P15
Yomamoto e Kato., 1986	Ratos Sprague Dawley, machos e fêmeas	Anóxia: P1, 100% N ₂ , 25 min	Não houve diferença até P70
Shimomura et al., 1988	Ratos Wistar, machos e fêmeas.	Anóxia: P4, 100% N ₂ , 3 L/min, 10 min, 36-38°C	Anóxia mais leves de P7 até P21, não houve diferença desde P28 até P56
Dell'Anna et al., 1991	Ratos Wistar, machos e fêmeas	Anóxia: P2, 100% N ₂ , 9 L/min, 25 min, 35°C	Não houve diferença desde P2 até P60
Grojean et al., 2003	Ratos Sprague-Dawley, machos	Anóxia: P1, 100% N ₂ , 3 L/min, 20 min, 36°C	Não houve diferença até P28, em P40 e P60 os anóxia são mais leves
Tang et al., 2005	Ratos Long-Evans, machos	Anóxia: P1, 100% N ₂ , 3 L/min, 25 min, 31°C	Anóxia mais leves em P21
Yan et al., 2016	Ratos Sprague-Dawley, machos	Anóxia: P7, 100% N ₂ , 3 L/min, 10 min, 37°C	Não houve diferença até P28, em P40 os anóxia são mais leves
Mensagnov et al., 2017	Ratos Wistar, machos	Anóxia: P2, 100% N ₂ , 6 L/min, 10 min, 36°C	Anóxia mais leves em P3
Kumar et al., 2017	Ratos Wistar, machos e fêmeas	Anóxia: P2, 100% N ₂ , 3 L/min, 25 min, 35-37°C	Anóxia machos mais pesados de P7 até P21 que os controle, anóxia fêmeas mais leves que as controle.
HIPOXIA-ISQUEMIA NEONATAL (HI)			
Autor e ano	Animal	Método	Resultado no peso corporal
Andiné et al., 1990	Ratos Sprague-Dawley, machos	HI: P7, oclusão carótida + 7.7% O ₂ , 120 min, 36°C	Os animais HI foram mais leves em P21
Grafe. 1994	Ratos Sprague-Dawley, machos e fêmeas	HI: P7, oclusão carótida + 8% O ₂ , 60-210 min, 37°C	Não houve diferença em P9
Wagner et al., 2002	Ratos Sprague-Dawley, machos	HI: P7, oclusão carótida + 8% O ₂ 90 min, 37°C	Em P12 os HI são mais leves
Lubics et al., 2005	Ratos Wistar, machos	HI: P7, oclusão carótida + 8% O ₂ , 120 min, 37°C	Desde P8 até P20 os HI são mais leves
Matchett et al., 2009	Ratos Sprague Dawley, machos e fêmeas	HI: P10, oclusão carótida + 8% O ₂ 120-150 min, 37°C	Menor ganho de peso nos HI de P10-P11
Hill et al., 2011	Ratos Wistar, machos e fêmeas	HI: P7, oclusão carótida + 8% O ₂ 120 min, 37°C	Em P110 os machos HI mais leves que seus controles, as HI = controles
Infante et al., 2013	Ratos Wistar machos e fêmeas	HI: P7, oclusão carótida + 8% O ₂ 90 min, 37°C	Os filhotes da segunda geração (pais HIxHI) apresentaram menor peso, tanto como machos em P21
Reinboth et al., 2016	Camundongos C57BL/6	HI: P9, oclusão carótida + 8-10% O ₂ , 60 min, 31-32°C	Não houve diferença até P44
Ren et al., 2017	Ratos Sprague-Dawley, machos e fêmeas	HI: P2, oclusão permanente da carótida	Ganho de peso foi menor nos animais HI até P9

HIPOXIA-PRENATAL			
Autor e ano	Animal	Método	Resultado no peso corporal
Nagano et al., 2017	Camundongos C57BL/6J, machos e fêmeas	GD16: oclusão da artéria uterina, 30 min GD19: cesárea, dados a mãe adotiva	Os machos hipóxia no nascimento foram mais leves que os controles. Não houve diferença nas fêmeas. As 8 semanas não houve diferença entre machos nem entre fêmeas
Amaral-Silva et al., 2017	Frangos, machos e fêmeas	Ovos de frangos fertilizados. Dia de incubação 12-18: 15 O ₂ . Dia 19: nascimento em normoxia	No dia do nascimento hipoxicos mais leves. Aos 10 dias não houve diferença
HIPOXIA MATERNA + HIPOXIA ISQUEMIA NEONATAL			
Autor e ano	Animal	Método	Resultado no peso corporal
Gonzales-Rodriguez et al., 2014	Ratos Sprague-Dawley	Hipóxia nas mães (10.5%O ₂ , GD 15-21) + HI (P10 oclusão da carótida + 8% O ₂ , 1.5 h)	Hipóxicos mais leves no nascimento. Não houve diferença em P10
HIPOXIA INTERMITENTE NEONATAL			
Autor e ano	Animal	Método	Resultado no peso corporal
Mayer et al., 2013	Ratos Lewis	Hipóxia intermitente: P6-P15, 95% N ₂ , 5 min-8h/dia	Hipóxicos mais leves em P16
ASPIXIA PERINATAL			
Autor e ano	Animal	Método	Resultado no peso corporal
Fleiss et al., 2011	Spiny Mouse, machos e fêmeas	GD 37: cessaria e submersão do útero em água (a termo= GD 39)	Não houve diferença em P5