LUANA ANGÉLICA JANOTA DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA LEPTINA NO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS LEPTIN REPORTERS SUBMETIDOS A ANÓXIA NEONATAL

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.

São Paulo

2018

LUANA ANGÉLICA JANOTA DE CARVALHO

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA LEPTINA NO DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS LEPTIN REPORTERS SUBMETIDOS A ANÓXIA NEONATAL

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: **Profa. Dra. Maria Inês Nogueira**

Versão Original

São Paulo

2018

ICBUSP

Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, Butantã
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone

Decl. CEUA.025/2015

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado **111/15/CEUA**, de 14/12/2015, aprovo a inclusão de mais 32 animais, da espécie *Mus musculus*, linhagem *LepR-IRES-Cre cruzados com tdTomato reporter mice*, do sexo masculino, ao Protocolo " ***Diferenças de gênero no desenvolvimento ontogenético, comportamento e metabolismo energético em ratos submetidos à anóxia neonatal: enfoque no hipocampo, hipotálamo,células da glia e leptina.***", de responsabilidade da Profa. Dra. **Maria Inês Nogueira**, do Departamento de Anatomia, dispensando assim a necessidade de realizar reações imunohistoquímicas para o Receptor de Leptina uma vez que são animais geneticamente modificados e suas células expressam o receptor para Leptina.

São Paulo, 09 de março de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador da CEUA-ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Luana Angélica Janota de Carvalho

Título da Dissertação/Tese: Avaliação do envolvimento da leptina no desenvolvimento de camundongos leptin reporters submetidos à anóxia neonatal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Nogueira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../ ...../ ....., considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( )Reprovado(a)

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador (a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Aos meus pais, Cláudio e Ana, ao meu irmão, Marcello e ao meu marido, Daniel. Todo suporte, amor, carinho e conselhos que me deram força e inspiração para ir além do que imaginaria ser capaz.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Inês Nogueira, pelo constante estímulo necessário para o meu crescimento profissional, por todo conhecimento a mim transmitido e que sempre serão lembrados.

Ao programa de pós graduação em Ciências Morfofuncionais e aos professores do departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas por todos os ensinamentos, sempre dispostos a colaborar para meu desenvolvimento.

Aos meus mais que colegas, amigos de laboratório e pesquisa Amrita Jah Kumar, Ammir Yacoub Helou, Bruna Petrucelli Arruda, Natalia Andrea Cruz Ochoa , Silvia Takada e Vitor Yonamine Lee, que sempre ficaram ao meu lado, partilhando seu tempo para discussões, colaborações e bons momentos.

À Kelly Borges, técnica de laboratório que esteve em todos os momentos pronta para auxiliar com o que fosse necessário, demonstrando carinho e atenção. Ao Prof. Dr. Francisco Rômulo, por todas as conversas que me auxiliaram nos momentos de tomada de decisão.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas, em especial a Rosana Prisco, que com todo carinho e dedicação contribuiu não só com minhas necessidades de formação, como também com discussões enriquecedoras sobre ética pessoal e profissional.

Aos funcionários das secretarias do departamento e da de pós-graduação, do departamento de Anatomia, que sempre demonstraram atenção a solicitações, assim como apoio durante todo processo de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro necessário para execução deste trabalho processos 2015/18415-8 (auxilio Pesquisa do Laboratório) e nº 2016/ 01189-8 (bolsa de mestrado) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), cujo fomento permitiu a mim e ao laboratório grande crescimento e evolução na investigação de minha pesquisa, sendo crucial para essa etapa de minha formação pessoal e acadêmica.

“All we have to decide is what to do with the time that is given us”

J. R. R. TOLKIEN

RESUMO

A anóxia neonatal considerada relevante condição clínica mundial e vem sendo estudada no laboratório de Neurociências, ICB-USP, desde 2008. Agressões em períodos críticos de maturação do organismo, em especial do sistema nervoso, devido à sua alta demanda metabólica, podem modificar ou mesmo comprometer eventos ontogenéticos com complicações persistentes na vida adulta, sendo relacionada a retardo cognitivo e comportamental, tais como: epilepsia, déficit de atenção, hiperatividade, problemas de aprendizado, entre outros. Em ratos adultos ocorreu morte neuronal por apoptose e necrose, decréscimo da neurogênese e do volume no hipocampo após anóxia neonatal. Experimentos comportamentais evidenciaram alterações também na capacidade de aprendizagem, navegação espacial e ansiedade. Foi observado, que esse estímulo provoca retardo no desenvolvimento sensório-motor, além de ganho de peso em relação ao controle, e aumento do diâmetro rostro-caudal e naso-anal. A fim de avaliar as causas de alterações somáticas e de desenvolvimento, decidiu-se aprofundar, neste estudo, a análise da relação do hipotálamo e da leptina com as mesmas, e com o metabolismo energético assim como, com o crescimento do organismo. Para tanto, foram utilizados camundongos *leptin reporters*, os quais apresentam os receptores para leptina naturalmente fluorescentes. Foi adaptado modelo para indução de anóxia em camundongos machos por meio de testes de avaliação da ontogenia de reflexos; da pressão de oxigênio no sangue; da frequência cardíaca e dos níveis na Escala de Apgar. Tais testes evidenciaram prejuízos dos animais anoxiados no aparecimento dos reflexos de aceleração, geotaxia negativa, recuperação de decúbito e resposta ao susto; diminuições significativas de pressão de oxigênio e batimentos cardíacos durante período de exposição ao ambiente anóxico, além de níveis indicativos de ausência de oxigênio quando avaliados os fatores que compõe a escala de Apgar, em relação aos animais controle, validando o modelo para este estudo. Em seguida, foram analisados grupos anóxia macho e fêmea e controle macho e fêmea com relação a parâmetros corpóreos durante 60 dias de vida dos animais. Foi evidenciado que a anóxia neonatal afeta os parâmetros de maneiras distintas, porém em todas as análises, o grupo anóxia macho apresentou dimensões aumentadas em relação aos outros grupos. Quando comparada a co-localilzação de fos com receptores de leptina fluorescentes ativados, os resultados obtidos sugerem que apesar de não ter sido detectado diferença de valores de leptina circulante no sangue, houve alteração de peso corpóreo nos animais anóxia, em relação ao seu controle, o que se atribui a possível resistência dos receptores de leptina dos núcleos arqueado e dorsomedial, hipótese que deve ser explorada em experimentos futuros. .

Palavras-chave: anóxia neonatal, desenvolvimento somático, metabolismo energético, leptina, hipotálamo

ABSTRACT

Neonatal anoxia is considered a relevant clinical condition and has been studied in the Neuroscience Laboratory, ICB-USP, since 2008. Damage caused to an organism during its maturation, particularly the damage that affects the high-metabolic nervous system, can modify or even compromise ontogenetic events with persistant complications in adulthood. Such complications are related to cognitive and behavioral retardation, and some known examples are: epilepsy, attention deficit, hyperactivity and learning problems. In adult rats, neuronal death occurs due to apoptosis, necrosis, decreased neurogenesis and decreased volume in the hippocampus after neonatal anoxia. Behavioral experiments also revealed changes in learning ability, spatial navigation and anxiety. It was also observed that neonatal anoxia causes delay in sensorimotor development, besides weight gain in relation to the control, and increase in the rostrocaudal and naso-anal diameter. In order to evaluate the causes of such somatic and developmental changes, this study analyzed the relationship between the hypothalamus and leptin, as well as their relationship with energy metabolism and the growth of the organism. Leptin reporter mice were used, which present naturally fluorescent leptin receptors. The anoxia model was adapted for male mice by means of the following tests: evaluation of the ontogeny of reflexes, the oxygen pressure in the blood, the heart rate and the levels on the Apgar Scale. These tests revealed damages to the anoxic animals by the appearance of different reflexes: acceleration, negative geotaxis, recovery of decubitus and response to scare; there was significant decrease in oxygen pressure and heart rate during exposure to the anoxic environment, in addition to levels in the Apgar scale which are indicative of oxygen absence when contrasted with control. Male and female anoxic groups and control were analyzed with respect to body parameters for a period of 60 days, and evaluated of leptin levels, Nissl staining and c-fos cell count by stereology performed. It was verified that neonatal anoxia affected the parameters in different ways, but overall the male anoxic group presented increased dimensions in relation to the other groups. Results obtained from the co-localization of fos and activated fluorescent leptin receptors suggest that, although it is not possible to observe differences in leptin values in the blood, the change in body weight of anoxic animals was due to a lack of activation of leptin receptors in arched and dorsomedial nuclei, suggesting a resistance to the effects of this hormone, hypothesis that should be explored in future experiments.

Key words: neonatal anoxia, somatic development, energy metabolism, leptin, hypothalamus

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição dos neurônios responsivos a leptina nos núcleos VMH e Arc, visualizados por fosforilação de STAT3 imunorreativa induzida por leptina.....22
Figura 2. Circuito da leptina.....24
Figura 3. Estruturas envolvidas na interrelação da Leptina, insulina e obesidade 27
Figura 4. Sistema para anóxia neonatal.....32
Figura 5. Camundongos leptin reporters com 3 dias de vida pós-natal.....33
Figura 6. Cilindro de gás nitrogênio 100%.....33
Figura 7. Compartimento desenvolvido para melhor captação de PO_2 e frequência cardíaca 34
Figura 8. Aparecimento do reflexo de recuperação de decúbito em rato 35
Figura 9. Aparecimento do reflexo de colocação pelas vibrissas em rato 35
Figura 10. Aparecimento do reflexo de aversão ao precipício em rato.....36
Figura 11. Aparecimento do reflexo de geotaxia negativa em rato 37
Figura 12. Aparecimento do reflexo de resposta ao susto em rato 37
Figura 13. Demonstração da medição do ELLC em ratos.....39
Figura 14. Demonstração da medição do EAPC em ratos 39
Figura 15. Demonstração da medição do ELC em ratos.....40
Figura 16. Demonstração do processo para avaliação do ciclo estral.....41
Figura 17. Parâmetros utilizados para contagem por estereologia. 43
Figura 18. Avaliação da frequência cardíaca 46
Figura 19. Avaliação da pressão de oxigênio circulante.....46
Figura 20. Avaliação dos valores apresentados pela escala de Apgar 47
Figura 21. Aparecimento de reflexos ontogenéticos em camundongos machos e fêmeas.....49
Figura 22. Parâmetros de desenvolvimento somático (A, B, C e D) e índice de Lee (E) 52
Figura 23. Dosagem (A) e variação de glicemia (B e C, em camundongos machos e fêmeas.....55
Figura 24. Avaliação de dosagem de leptina circulante 56
Figura 25. Imagem para comparação entre os grupos controle macho e anóxia macho com animais em P60, com coloração de Nissl. 58

Figura 26. Imagem para comparação entre os grupos controle macho e anóxia fêmea com animais em P60, com coloração de Nissl. 59
Figura 27. Densidade (n/área) de Fos-Ir. (A) (C) (D) 60
Figura 28. Prancha de cortes com 40 µm de encéfalos de animais CM, CF, AM e AF, em região do hipotálamo. 61
Figura 29. Corte de animais AM e AF, com 40µ, observados no microscópio de fluorescência, evidenciando neurônios com receptores de leptina no núcleo VMH .. 63
Figura 30. Imagem para comparação entre os grupos controle macho e anóxia macho com animais em P60, evidenciando receptores para leptina tdTomato, fos-IR e imagens sobrepostas. 64
Figura 31. Imagem para comparação entre os grupos controle fêmea e anóxia fêmea com animais em P60, evidenciando receptores para leptina tdTomato, fos-IR e imagens sobrepostas..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sumário de alguns Modelos de anóxia e suas características conforme revisão descrita 19

Tabela 2 - Expressão de tdTomato e Fos-Ir nos núcleos arqueado (ARC), dorsomedial (DM) e ventromedial (VMH) do hipotálamo (n=5). 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3v	Terceiro ventrículo
AF	Anóxia Fêmea
AgRP	Agouti-related protein
AHA/SPVZ	Área hipotalâmica anterior/zona subparaventricular
AM	Anóxia Macho
a-MSH	Hormônio Estimulante de a-Melanócitos
Arc	Núcleo arqueado
BAT	Tecido adipose marrom
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
CA1, 2 e 3	Regiões “Corno de Amon” 1, 2 e 3 do hipocampo
CART	Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina
CF	Controle Fêmea
CM	Controle Macho
COX 2	Ciclo-oxigenase-2
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DAB	Diaminobenzidina
DG	Giro dentado do hipocampo
DH_2O	Água destilada
DMH	Núcleo dorsomedial do hipotálamo
DP	Desvio padrão
DPX	Distrene Plasticiser Xylene
EAPC	Eixo ântero-posterior do crânio
EGFP	Green fluorescent protein
ELC	Eixo longitudinal do corpo
ELLC	Eixo látero-lateral do crânio
FJB	Fluorojade B
FOS-IR	Fos-imunorreatividade
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IL-2	Interleucina-2
IMC	Índice de massa corpórea
kPa	Kilospascal
LH	Área hipotalâmica lateral
MCH	Hormônio concentrador de melanina
N_2	Nitrogênio
NGS	Normal goat serum
NPY	Neuropeptídeo Y
OBRs	Receptores de leptina
PBS	Tampão fosfato, salina
PO_2	Pressão parcial de oxigênio
POMC	Pró-opiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
SOCS-3	Supressor de sinalização de citocinas 3
STAT3	Proteína pertencente à família das STATs (signal transducers and activators of transcription)
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nich and labeling assay
VMH	Núcleo ventromedial do hipotálamo
VMHvm	Subdivisão dorsomedial do núcleo ventro-medial do hipotálamo
VTA	Área Ventral Tegmentar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....16
1.2 REVISÃO HISTÓRICA - MODELOS DE ANÓXIA NEONATAL.....17
1.3 EFEITOS DA ANÓXIA NEONATAL 20
1.4 HIPOTÁLAMO E LEPTINA.....21

2. OBJETIVOS.....29
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....30

4. MATERIAL E MÉTODOS 31
4.1 MODELO DE ANÓXIA NEONATAL PARA CAMUNDONGOS 31
4.1.1 AVALIAÇÃO DE PO_2 E FREQUÊNCIA CARDÍACA.....33
4.1.2 ESCALA DE APGAR 34
4.1.3 ONTOGÊNESE DOS REFLEXOS.....34
4.2 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO 38
4.2.1 EIXO LÁTERO-LATERAL DO CRÂNIO (ELLC) 38
4.2.2 EIXO ÂNTERO-POSTERIOR DO CRÂNIO (EAPC).....39
4.2.3 EIXO LONGITUDINAL DO CORPO (ELC).....40
4.2.4 PESO CORPORAL.....40
4.3 ESTÍMULO DE JEJUM E DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA 40
4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....41
4.4.1 IMUNOHISTOQUIMICA 42
4.4.2 COLORAÇÃO DE NISSL – TIONINA.....42
4.5 ESTEREOLOGIA 43
4.6 LEPTINA 43
4.7 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....43

5. RESULTADOS 45
5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÓXIA NEONATAL EM CAMUNDONGOS.....45
5.1.1 FREQUÊNCIA CARDÍACA.....45
5.1.2 PRESSÃO DE OXIGÊNIO CIRCULANTE.....46
5.1.3 ESCALA DE APGAR.....47

5.1.4 MATURAÇÃO DE REFLEXOS.....47
5.2 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO.....51
5.3 AVALIAÇÃO METABÓLICA.....54
5.3.1 GLICEMIA 54
5.3.2 LEPTINA CIRCULANTE.....56
5.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....57
5.4.1 COLORAÇÃO DE NISSL 57
5.4.2 FOS-IR 60
5.4.3 RECEPTORES PARA LEPTINA 62

6. DISCUSSÃO.....66

7. CONCLUSÕES.....70

8. CONSIDERAÇÕES EXPERIMENTAIS 71

9. REFERÊNCIAS 72

1. INTRODUÇÃO

O oxigênio é essencial para vida aeróbica (PERRONE et al., 2017) e seu déficit no período perinatal pode causar lesões neurológicas, convulsões, alterações comportamentais e, em casos extremos, levar a óbito (GRAHAM et al. 2008). O desenvolvimento cerebral é influenciado por diversos eventos, sendo eles pré-natais, intraparto ou pós-natais, podendo afetar os sistemas neurais e psicofisiológicos relacionados às emoções, funções cognitivas específicas (como atenção, memória) e habilidades de linguagem (GIANNOPOULOU et al., 2018).

Existem diversas terminologias utilizadas para descrição do déficit de oxigênio, sendo elas pouco distinguíveis na prática clínica, porém de importância técnica. A hipóxia refere-se a baixo teor de oxigênio no sangue, enquanto a isquemia representa redução do fluxo sanguíneo tecidual. A isquemia, por sua vez, pode ser parcial ou completa em extensão e pode ser focal ou global na distribuição. Em contraste, a asfixia indica um comprometimento das trocas gasosas e é caracterizada por anóxia e extremos de hipercarpnia (LAPTOOK, 2016). Nesse projeto adotamos o termo anóxia neonatal, como privação severa do fornecimento de oxigênio no momento do nascimento, sendo uma causa prevalente de mortalidade e morbidade, constituindo importante problema público frente as sequelas neurológicas comumente observadas.

O processo do nascimento já pode ser associado a leve asfixia, onde ocorre diminuição da pressão de oxigênio circulante, porém, não causa danos ao neonato. Quando alterados fatores, como por exemplo quando o cordão umbilical se enrola na criança durante o parto, quando a placenta se separa prematuramente, interrompendo o fluxo de oxigênio ao bebê, quando sedativos dados a mãe atravessam a placenta e interferem na respiração ou se o muco ingerido durante o parto ficar preso à garganta do recém-nascido, há um aumento da predisposição do neonato a lesões decorrentes dessa privação excessiva e patológica (GLUCKMAN et al., 2001; JOHNSTON et al., 2002).

É sabido que o recém-nascido tolera mais a falta de oxigênio que adolescentes e adultos, porém quando a respiração é interrompida por mais de 3 ou 4 minutos é possível o aparecimento de danos cerebrais permanentes no indivíduo (SHAFFER e KIPP, 2012).

A anóxia neonatal, considerada condição clínica mundial e relevante no Brasil, vem sendo estudada no laboratório de Neurociências, ICB-USP, desde 2008. Tal condição afeta cerca de 0,2% das crianças nascidas a termo, chegando a 60% em bebês prematuros com baixo peso corporal (VANNUCCI; VANNUCCI, 1997). Esses dados configuram a importância do desenvolvimento de modelos animais para estudo dos fatores e mecanismos envolvidos nessa injúria, assim como possibilita a busca por técnicas ou procedimentos que possam contribuir para amenizar ou diminuir as complicações daí advindas.

1.2 REVISÃO HISTÓRICA - MODELOS DE ANÓXIA NEONATAL

Para entendimento mais amplo do tema foi avaliada a evolução temporal dos modelos relacionados à anóxia neonatal a partir da descoberta do oxigênio e de sua relevância orgânica, bem como as avaliações sobre causas e efeitos de sua privação para a vida.

A importância do oxigênio para a vida é condição crucial descrita por Aristóteles (384-322 a.C.), quando observou que o ar no alto das montanhas não era ideal para a vida (COURVILLE, 1947). A descoberta desse gás ocorreu entre 1772 e 1774 por Carl Wilhelm Scheele (1742-1786) e Joseph Priestley (1733-1804), sendo denominado oxigênio por Antoine Lavoisier (1743-1794). Os romanos, destacando Marcos Vitruvio (COURVILLE, 1947), foram talvez os primeiros a observar sua relação com a chama da vela para identificar condição adequada à respiração em minas longas e profundas; caso a chama continuasse acesa era evidência de que o ambiente continha suficiente oxigênio para manutenção da vida.

A partir de então, diversos pesquisadores observaram as características do quadro de ‘sulfocatione’ (John Chenk, 1644); Thomas Platter (1574-1628); Jean Riolan (1577-1657); Thomas Bartholin (1616-1680); Richard Lower (1631-1691); Johann Jakob Wepfer (1620-1695) e Charles Bonnet (1720-1793); O fisiologista britânico Sir Joseph Barcrof (1920) foi provavelmente um dos primeiros a definir algumas propriedades para o fenômeno da anóxia, previamente denominada como sufocação do recém-nascido por (Roederer, 1760, *asphyxia neophytorum* por Ehrhart entre 1785/1789, *asphyxia neonatorum* por Regnier em 1789 e morte aparente do recém-nascido por Lofler em 1792). O tema passou a ser abordado com modelos de

experimentação animal no decorrer do século XX, em diferentes espécies: Windle (1942/43) com cobaias, Morrison (1946) com cachorros e macacos, Campbell et al. (1968) com coelhos, e então, Rice et al. (1981), Levine (1960), Hershkowitz et al. (1983), Nyakas et al. (1991), Takada et al. (2011) e outros com estudos em ratos.

Tabela 1. Sumário de alguns Modelos de anóxia e suas características conforme revisão descrita

Pesquisador	Ano	Título	Animal	Idade (PN)	Método
Windle,	1942	Effects of anoxia at birth on the central nervous system of the guinea pig	Guinea Pig	Prévio ao nascimento	Clampeamento do vaso uterino ou pequenas incisões no útero em tempos variados de anóxia.
Morrison	1946	Histopathologic effects of anoxia on central nervous system	Cachorros e macacos	Não descrito	Câmara de aço e vidro com nitrogênio 50% ou gás introduzido através de máscara acoplada ao focinho do animal. Animal exposto a anóxia por dias consecutivos.
Levine	1960	Anoxic-Ischemic Encephalopathy in Rats	Ratos	Fêmeas de 100 a 300 gr	Ligação da carótica, onde a direita era isolada e a esquerda, cortada; a exposição ao óxido nítrico e ao nitrogênio.
Campbell et al.	1968	The effect of pretreatment with pentobarbital, meperidine, or hyperbaric oxygen on the response to anoxia and resuscitation in newborn rabbits	Coelhos	Menos de 48h pós natal	Câmara semi-hermética mantida entre 36 e 39ºC, inflada com ambiente em nitrogênio a 35L/min por 2 minutos e 1,5 l/min por mais 8 minutos.
Hershkowitz et al.	1983	The effects of postnatal anoxia on behaviour and on the muscarinic and beta-adrenergic receptors in the hippocampus of the developing rat	Ratos	PN1	No primeiro dia pós natal, o animal era colocado em uma câmara de vidro com entrada e saída de gás e exposto a gás nitrogênio 100% por 25 minutos
Nyakas et al.	1991	Impaired Learning and Abnormal Open-field Behaviours of Rats After Early Postnatal Anoxia and the Beneficial Effect of the Calcium Antagonist Nimodipine	Ratos	PN 2 a 4	O animal, entre 2 e 4 dias pós-natal, era colocado em câmara com entrada e saída de gás nitrogênio 100% por 20 minutos e a temperatura ambiente a 28 ºC.
Vannucci et al.	1997	A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage	Ratos	PN 7	Ligadura da artéria carótida unilateral, seguida de hipóxia sistêmica produzida pela inalação de Nitrogênio com equilíbrio de oxigênio a 8%.
Takada et al.	.2011	A modified rat model of neonatal anoxia: Development and evaluation by pulseoximetry, arterial gasometry and Fos-IR	Ratos	PN2	Câmara semi-hermética aquecida a 37ºC por 25 minutos em ambiente a 100% de nitrogênio gasoso, fluxo de 3L/minuto a pressão de 101,7 kPa.

Desde 2008 foi desenvolvido e adaptado um modelo animal de anóxia em ratos Wistar neonatos no Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências Biomédicas – USP (TAKADA et al., 2011), por ser global e não invasivo, com o qual se tem buscado caracterizar o modelo em diferentes aspectos.

1.3 EFEITOS DA ANÓXIA NEONATAL

Agressões em períodos críticos de maturação do organismo, em especial do sistema nervoso, devido à sua alta demanda metabólica (OLIVERIA-ALONSO et al., 2007) podem modificar e mesmo comprometer eventos ontogenéticos com complicações persistentes na vida adulta (MORGANE et al., 1993). A anóxia neonatal, clinicamente, tem sido relacionada a retardos cognitivos e comportamentais, tais como: epilepsia, déficit de atenção, hiperatividade e problemas de aprendizado.

Estudos prévios deste laboratório com o modelo proposto para ratos encontraram prejuízos decorrentes desse estímulo em populações gliais (ALLEMANDI, 2011) e neuronais dessa região em animais com 7 dias de vida pós-natal, morte neuronal por apoptose e necrose através de Transmission eléctron microcopy (TEM ANALYSIS) (TAKADA et al., 2011, 2015) e decréscimo da neurogênese e do volume no hipocampo após anóxia neonatal demonstrada pelas técnicas de Fluoro-Jade B (FJB) em CA2-3 e Terminal Deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nich and labeling assay (TUNEL) em CA1 e DG em regiões do hipocampo com o animal de 2 dias de vida (TAKADA et al., 2015).

Experimentos comportamentais evidenciaram que a anóxia neonatal altera também a capacidade de aprendizagem e memória (DELL'ANNA et al., 1997; CANNON et al., 2002; CAPUTA et al., 2005; ROGALSK et al., 2006; BUWALDA et al., 1995; ITO, 2010; TAKADA et al., 2015).

As consequências da privação de oxigênio estão relacionadas a alterações no metabolismo energético, desequilíbrio ácido-base, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e de aminoácidos excitatórios no espaço extracelular, perda do equilíbrio de água celular, processos inflamatórios e início de apoptose (LOIDL et al., 2000).

Foi observado, também, que esse estímulo provoca retardo na ontogênese da instalação de reflexos neonatais e no desenvolvimento sensório-motor, além de ganho de peso em relação ao controle e aumento dos diâmetros rostro-caudal e naso-anal,

evidentes já nas primeiras semanas de amamentação e que persistiram até a vida adulta (VASCONCELOS, 2013; KUMAR, 2017).

Portanto, a fim de avaliar as possíveis causas de alterações somáticas e de desenvolvimento, decidiu-se aprofundar neste estudo a análise da relação do hipotálamo com as mesmas, estrutura diretamente relacionada com o desenvolvimento do animal e o metabolismo energético, sendo utilizados camundongos *leptin reporters*, nos quais os receptores para leptina apresentam fluorescência sem necessidade de técnicas específicas. Para tal se fez necessário a validação do método de anóxia neonatal nesses animais.

1.4 HIPOTÁLAMO E LEPTINA

O hipotálamo, além de constituir região integradora dos sistemas nervoso, autonômico, endócrino e imunológico, possui íntima relação com o metabolismo energético. Este é evidenciado pelas vias eferentes do complexo nuclear hipotalâmico (núcleos paraventricular e supra-óptico) à neurohipófise e pelos fatores de liberação que controlam a produção hormonal da adeno-hipófise (LUNDY–EKMAN, 2004, p. 353 a 477).

Possui participação na manutenção da homeostase; expressão emocional de prazer, raiva, medo e aversão; regulação dos ritmos circadianos; regulação endocrinológica do crescimento, metabolismo e dos órgãos reprodutivos assim como do comportamento alimentar, assunto de interesse neste projeto, (LUNDY–EKMAN, 2004, p. 353 a 477).

Ambas as porções hipofisárias desempenham relevância metabólica exercem influência emocional e de desenvolvimento somático, assim como atuam nas respostas comportamentais, tais como: fome, saciedade, sede e comportamentos reprodutivos e defensivos (MORRISON; MADDEN, 2014; WEE ET AL., 2015), Os peptídeos de vasopressina e oxitocina, por exemplo, mamíferos podem atuar como mediadores do sistema nervoso central de comportamentos sociais, incluindo cuidado parental, pareamento, cognição social e agressão (YOUNG; WANG, 2004; MEYER-LINDENBERG ET AL., 2011). A região hipotalâmica compreende a porção ventral desde a lâmina terminal até o plano vertical posterior aos corpos mamilares e abaixo do sulco hipotalâmico até a superfície pial do assoalho do terceiro ventrículo, em ratos.

(PAXINOS, 2004). A relação do hipotálamo com o peso corpóreo foi inicialmente observada em experimentos com lesões bilaterais e efeitos antagônicos dependendo da região envolvida: na região lateral causaram anorexia em ratos, enquanto lesões na porção ventromedial induziram aumento na ingesta alimentar, tornando o animal obeso (HETHERINGTON; RASON, 1940).

A área de interesse que abrange o comportamento alimentar é composta, principalmente, pelos núcleos paraventricular, dorso e ventro-medial e arqueado, esses dois últimos, como demonstrado na Figura 1, apresentam neurônios responsivos à leptina.

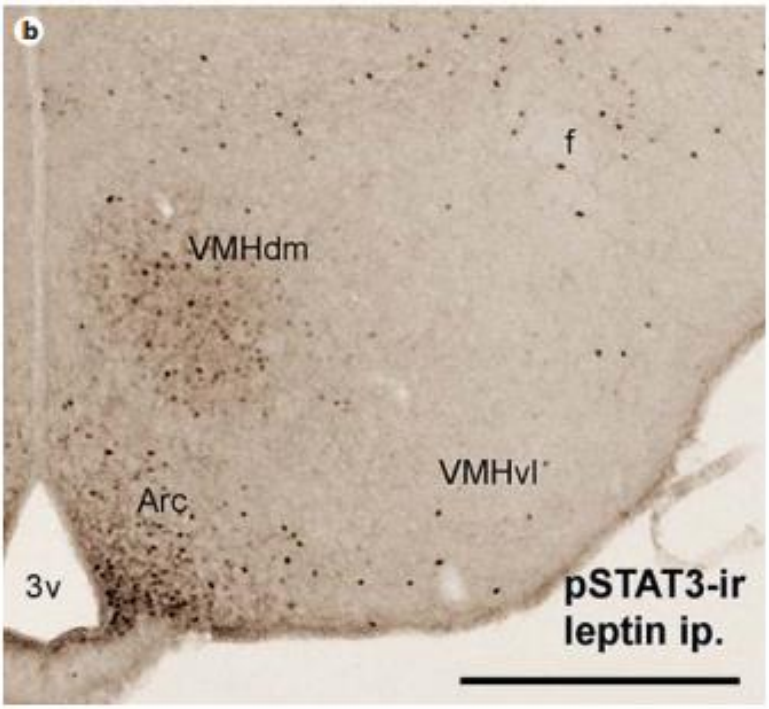


Figura 1. Distribuição dos neurônios responsivos a leptina nos núcleos VMH e Arc, visualizados por fosforilação de STAT3 imunorreativa induzida por leptina. 3V= Terceiro ventrículo; Arc= núcleo arqueado; VMHdm= subdivisão dorsomedial do VMH. Escala: 400 µm. (DONATO JR. et al., 2011).

O aumento da adiposidade tem sido associado aos elevados níveis de leptina circulante em relação ao normal, hormônio chave na regulação do peso corporal, pois sua presença diminui a ingestão de alimentos e aumenta o gasto energético (BALLAND; COWLEY, 2015).

A leptina, proteína composta por 167 aminoácidos, possui estrutura semelhante às citocinas, do tipo interleucina 2 (IL-2) (ROMERO; ZANESCO, 2006), sendo produzida primordialmente pele tecido adiposo (LEME, 2010; BADO et al., 1997; MUNZBERG; MORRISON, 2015). Entre suas funções, está o controle da ingestão alimentar por atuação em células do hipotálamo, onde inibe a formação dos neuropeptídios orexígenos como o neuropeptídio Y (NPY) e a proteína relacionada a agouti (AgRP ou agouti-related protein). Ela circula em níveis proporcionais à gordura corporal e atua como um sinal para o cérebro da quantidade de energia armazenada (PARK; AHIMA, 2015).

A leptina não é apenas crucial para a regulação da ingestão de alimentos e manutenção da homeostase energética, mas funciona como imunomodulador, interage com o circuito sono-vigílio e regula o comportamento sexual junto com a função reprodutiva. Alguns pesquisadores acreditam que também desempenha papel na cognição, memória e humor (JOHNSTON et al., 2011; LU et al., 2006). Este ritmo diário está sob influência hormonal e é dependente do sexo e da disponibilidade energética (RIBEIRO et al., 2007).

Os receptores de leptina são codificados pelo gene diabetes (db) e pertencem à superfamília de receptores de citocinas classe I (LEE et al., 1996; TARTAGLIA et al., 1995). Splicing alternativo do gene db gera 6 isoformas do receptor da leptina, Ob-Ra - Ob-Rf. Ob-Re sendo a forma de receptor solúvel, ligando a leptina circulante e afetando sua estabilidade e disponibilidade (GAVRILOVA et al., 1997; YANG et al., 2004). As isoformas curtas são consideradas principalmente envolvidas endocitose e transporte de leptina através do sangue-cérebro barreira (BANKS et al., 1996; TU et al., 2007).

O receptor OB-Rb, de forma longa, pode ser abundantemente encontrado principalmente no hipotálamo, nos núcleos arqueado, paraventricular e ventromedial, além da área hipotalâmica lateral (FUNAHASHI et al., 2000), conforme demonstra figura 2. O núcleo arqueado apresenta maior concentração dos receptores de leptina, também detectados no núcleo ventromedial e dorsomedial do hipotálamo (SCHWARTZ et al., 1996a).

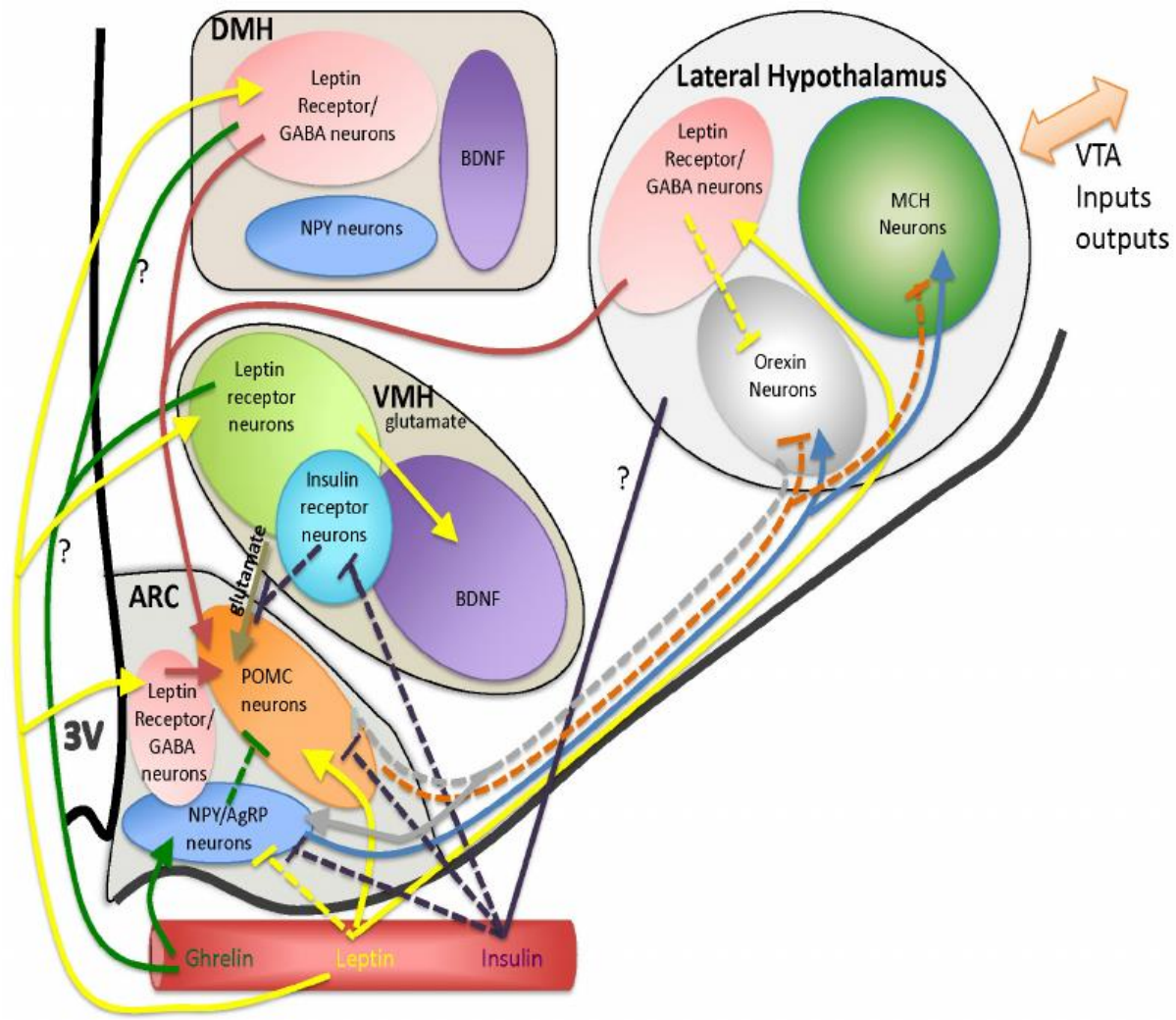


Figura 2. Circuito da leptina. Regulação neuroendócrina dos circuitos hipotalâmicos relacionados ao apetite (REICHENBACH et al., 2012).

O ARC abriga os neurônios AgRP e POMC, que por sua vez integram informações hormonais. A grelina aumenta o apetite pela ativação dos neurônios AgRP que subsequente inibe os neurônios POMC através de elementos GABAérgicos inibitórios. Tanto a leptina quanto a insulina inibem os neurônios AgPR. Os receptores de grelina estão presentes no VMH e no DMH, mas a função dos recptores é desconhecida até o momento. Os neurônios POMC no ARC suprimem o apetite e são ativados pela leptina e inibidos pela insulina. Os neurônios GABAérgicos que respondem à leptina são encontrados no DMH, LH e ARC e desempenham um papel mais importante na obesidade do que os receptores de leptina nos neurônios POMC. Os neurônios do POMC recebem um forte impulso glutamatérgico do VMH, que aumenta a atividade do POMC e suprime o apetite, mecanismo pelo qual o VMH pode

induzir a saciedade e quando lesionado resultar em obesidade. A leptina também ativa os neurônios VMH para suprimir o apetite, aumentando o estímulo glutamatérgico excitatório para os neurônios POMC ou aumentando a sinalização do BDNF no VMH, embora o mecanismo pelo qual o BDNF previne a obesidade permanece desconhecido. A insulina reduz o disparo neuronal do receptor de insulina VMH, que por sua vez reduz o estímulo excitatório nos neurônios POMC e restringe à saciedade. Há uma população transitória de NPY no DMH que aparece durante períodos de balanço energético negativo, como jejum prolongado, restrição calórica ou lactação e aumenta o apetite. O DMH contém uma população de neurônios GABA do receptor da leptina, que inibem o disparo neuronal POMC no ARC e suprime o apetite. No hipotálamo lateral, os neurônios da orexina estimulam a ingestão de alimentos, influenciando o sistema de melanocortina no ARC e também aumentando as propriedades recompensadoras dos alimentos no VTA. (REICHENBACH et al., 2012).

Em suma, a leptina, quando circulante, inibe neurônios NPY do núcleo Arc que inervam o núcleo PVN. Simultaneamente, ela ativa neurônios no núcleo DMH que também convergem ao núcleo PVN em neurônios que ativam projeções eferentes ao sistema neurovegetativo e a glândula hipófise, e também ativa neurônios no núcleo VMH que convergem nas áreas AHA/SPVZ, com densa aferência do núcleo supraquiasmático e projeção para o núcleo DMH (ELMQUIST et al., 1998).

A ligação da leptina ao seu receptor estimula a síntese de neuropeptídios anorexigênicos como POMC, a-MSH, CRH e CART que provocam a sensação de saciedade. Quedas na concentração de leptina aumentam a produção de NPY e MCH, que estimulam o comportamento alimentar, diminuindo o metabolismo (GERBASI et al., 2012). O hipotálamo regula a ingesta alimentar, a homeostase da glicose e o metabolismo energético. A falta de leptina circulante, aumenta os riscos de aterosclerose, obesidade, diabetes tipo 2 e o surgimento de doenças neurodegenerativas. No hipocampo, o aumento de leptina promove neurogênese e sinaptogênese, facilitando o aprendizado e a memória. A ativação das vias PI3K/Akt, JAK, TAT e mk/sirt, promovem sobrevivência neuronal e redução do clearance de Aβ e da fosforilação de Tau. Observa-se que a Leptina também exerce influência na sobrevivência neuronal, além da neurogênese e sinaptogenese (MARWARHA; GHRIBI, 2012).

Estudos recentes indicam que a leptina pode circular na forma livre, ou ainda ligada a receptores solúveis (Ob-Re), que parecem postergar a ação desse hormônio pelo aumento de sua meia-vida, sendo a forma livre mais ativa (RIBEIRO et al., 2007). Hickey et al. (1997), afirmam que as mulheres necessitam de maior liberação de leptina por pulso, para manterem o seu peso corporal, apresentando concentração de duas a três vezes maiores que os homens, observando-se que a gordura subcutânea (maior nas mulheres que nos homens) secreta mais esse hormônio do que a gordura visceral. (PARK et al., 2015). Tem sido observada relação direta do aumento de leptina com gordura total, independentemente de sua localização na topografia corporal (PISABARRO et al., 1998).

Indivíduos obesos, em geral, apresentam concentração elevada de leptina, sugerindo resistência a esse hormônio (figura 3). A obesidade devido à deficiência de leptina é rara (IOFFE et al., 1998). Comumente, a hiperleptinemia é uma característica da obesidade, sugerindo a existência de resistência ao o hormônio nos níveis central e periférico (FREDERICH et al., 1995). Os mecanismos que levam ao desenvolvimento da resistência à leptina não são claros, mas várias possibilidades foram postuladas, como uma falha do hormônio para atravessar a barreira-hemato-encefálica e atuar sobre seus neurônios-alvo (RIBEIRO et al., 2007) e redução na expressão de receptores de leptina. Alguns autores acreditam que a expressão aumentada de SOCS-3 (supressor de sinalização de citocinas) ao manter a ligação da leptina ao seu receptor, simula mecanismo de retroalimentação, causando resistência à leptina (MÜNZBERG; MYERS, 2005).

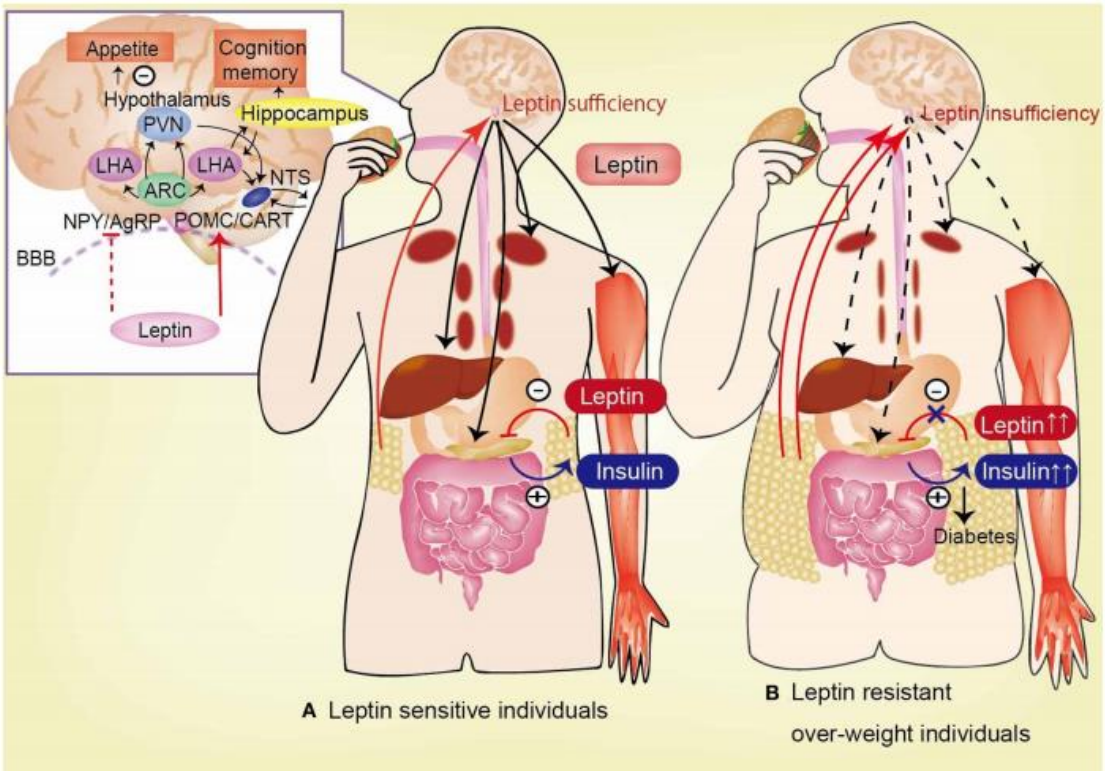


Figura 3. Estruturas envolvidas na interrelação da Leptina, insulina e obesidade. No hipotálamo, a leptina ativa neurônios POMC e CART e inibe NPY e AgRP, induzindo saciedade. Em indivíduos sensíveis a leptina, ocorre inibição da síntese e secreção de insulina pelas células β do pâncreas, o que estimula a secreção de leptina pelo tecido adiposo. AgRP, *agouti-related protein*; ARC, núcleo arqueado; CART Transcrito Regulado por Cocaína e Anfetamina; LH, área hipotalâmica lateral; NPY, neuropeptídeo Y; POMC, Proopiomelanocortina. (AMITANI et al., 2013).

A relevância do presente estudo encontra justificativa nas alterações decorrentes da anóxia neonatal que demonstram prejuízos às células da glia e neurônios do hipocampo e alteração de parâmetros somáticos e do desenvolvimento. Esses resultados sugerem a hipótese de envolvimento da leptina e dos núcleos hipotalâmicos onde atua, bem como de seus níveis circulantes. Camundongos $LepRb^{EGF}$, animais geneticamente modificados cujos neurônios que expressam o receptor de leptina são naturalmente fluorescentes, representam ferramenta valiosa em estudos que buscam avaliar a ativação neuronal das áreas relacionadas com o comportamento alimentar e leptina, pela sua co-localização com a proteína FOS.

Torna-se importante ressaltar que a concentração de leptina plasmática em mulheres (pós-puberal) é maior que a dos homens, decorrente da maior porcentagem de gordura corpórea e da influência dos hormônios sexuais (FRUHBECK et al., 2001), salientando a utilização de machos e fêmeas nesse estudo.

Aliada à vantagem desse modelo animal, está o modelo experimental de anóxia proposto que, por constituir estímulo global e não invasivo em roedores neonatos, cuja fase de desenvolvimento é similar à de humanos com 6 meses de idade gestacional, simula a condição clínica dos prematuros humanos, (SEMPLE et al., 2013) e pode fornecer dados importantes para melhor compreender a dinâmica subjacente ao processo de anóxia, assim como propiciar o desenvolvimento de estratégias e procedimentos para minimizar ou prevenir os efeitos desse estimulo no desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

Este estudo objetiva avaliar a hipótese do envolvimento da leptina na alteração dos parâmetros corpóreos e do desenvolvimento observados previamente, e identificar as possíveis áreas hipotalâmicas relacionadas, por análise da co-localização de FOS-IR com neurônios fluorescentes que expressam o receptor de leptina em camundongos *leptin reporters* adultos, submetidos à anóxia neonatal. Assim como, correlacionar esses dados com os níveis glicêmicos e de leptina circulante, a fim de contribuir para o desenvolvimento de estratégias e procedimentos minimizadores ou preventivos dos efeitos desse estímulo no desenvolvimento, considerando diferenças de sexo.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Padronizar o modelo de anóxia neonatal em camundongos pela avaliação dos teores de oxigênio circulante, batimentos cardíacos e escala de apgar em animais anoxiados em P2 em relação aos respectivos controles, em ambos os sexos;

2. Avaliar diferenças na ontogenia de reflexos entre animais dos grupos anóxia neonatal e dos grupos controle, em comparação com estudos prévios realizados em ratos para correlação com a padronização do modelo, considerando diferenças de sexo;

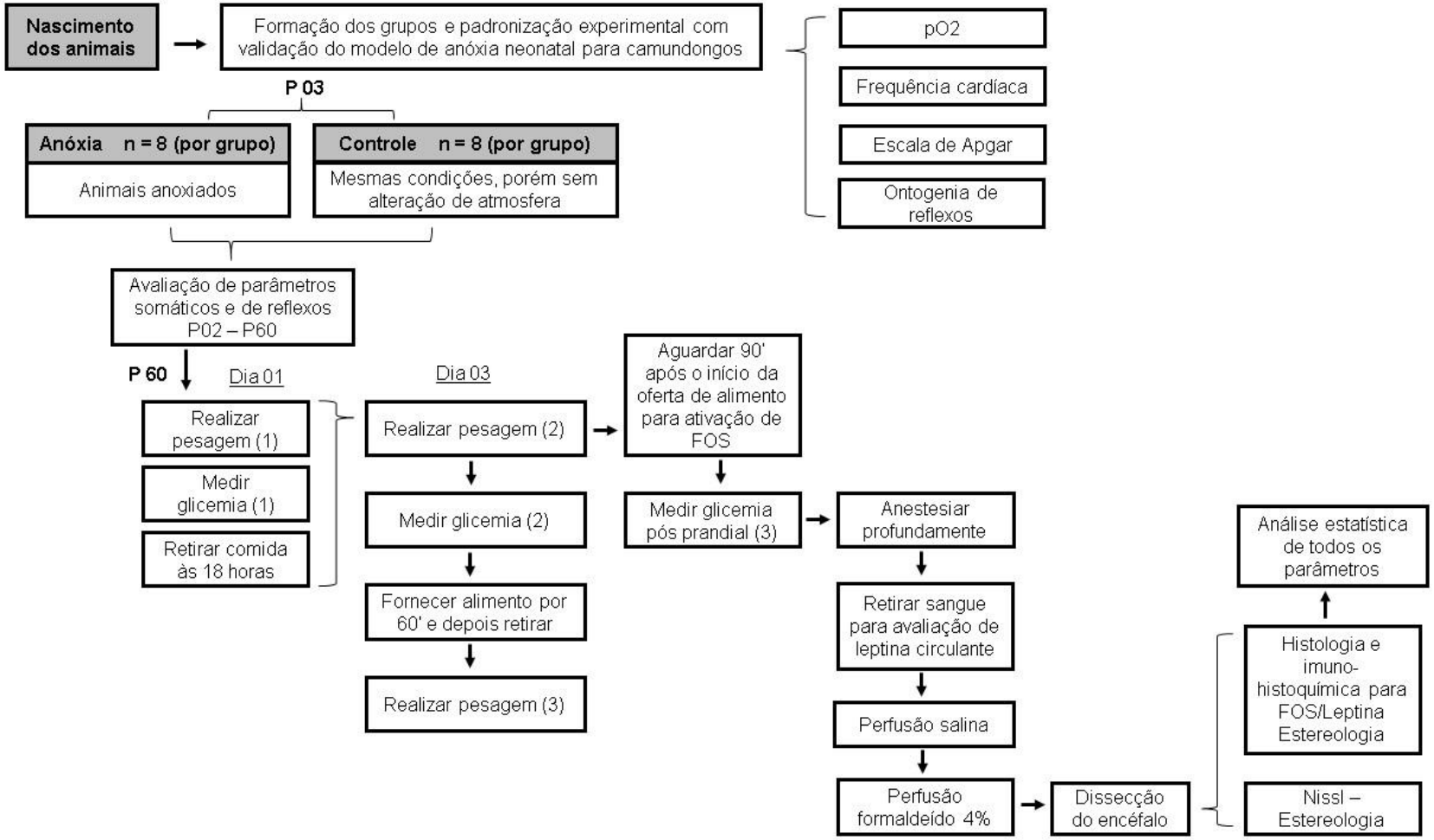
3. Avaliar a ocorrência e o padrão de alterações somáticas em camundongos submetidos à anóxia neonatal, considerando diferenças de sexo;

4. Avaliar possíveis relações dos níveis de leptina circulante com as alterações nas dimensões morfométricas encontradas em animais submetidos à anóxia neonatal em comparação a seus controles, tanto em machos quanto em fêmeas;

5. Avaliar possíveis relações da co-localização da expressão de FOS, com receptores de leptina de núcleos hipotalâmicos no PVN, DMH, VMH e Arc, com técnicas de imunohistoquímica e estereologia em camundongos modificados geneticamente que expressam esses receptores em fluorescência;

6. Comparar os níveis glicêmicos entre grupos anóxia e controle de amostras pré e pós-jejum alimentar, considerando diferenças de sexo.

3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



4. MATERIAL E MÉTODOS

Os animais utilizados no trabalho são camundongos *leptin reporters* machos e fêmeas, cedidos pelo professor Dr. José Donato Jr., Laboratório de Neuroanatomia Funcional, Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, com os quais estão sendo formados os grupos anóxia e controle.

Esses camundongos são gerados a partir do cruzamento do camundongo $Lepr_{cre}$ com $Gt(ROSA)26Sor^{tm2Sho}$, onde a recombinação mediada por CRE promove maior expressão da proteína verde fluorescente (EGFP) (LEINNINGER et al., 2009). Esse camundongo já foi previamente validado (SCOTT et al., 2009; NAGAISHI et al., 2014).

Todos os procedimentos estão em acordo com as normas internacionais de cuidados e manuseio de animais de laboratório (protocolo da Comissão de Ética em Experimentação Animal, Protocolo nº 134, folha 38 do livro 2 de 11/2014).

4.1 MODELO DE ANÓXIA NEONATAL PARA CAMUNDONGOS

Para validação do método, os neonatos machos, com três dias de vida pós-natal (P03) e entre 1,7 e 2,1 gramas foram divididos em 2 grupos: anóxia e controle. Os animais submetidos a anóxia neonatal foram colocados em uma câmara semi-hermética de policarbonato (31,0 X 14,0 X 19,5 cm) (Figura 4) aquecida a ± 37ºC por 19 minutos em ambiente a 100% de nitrogênio gasoso (figura 6), fluxo de 1,5 L/minuto a pressão de 101,7 kPa, tempo suficiente para causar danos no encéfalo sem ocasionar a morte do neonato (Figura 5). No grupo controle, os animais foram submetidos às mesmas condições, porém sem alteração na composição do ar ambiente.

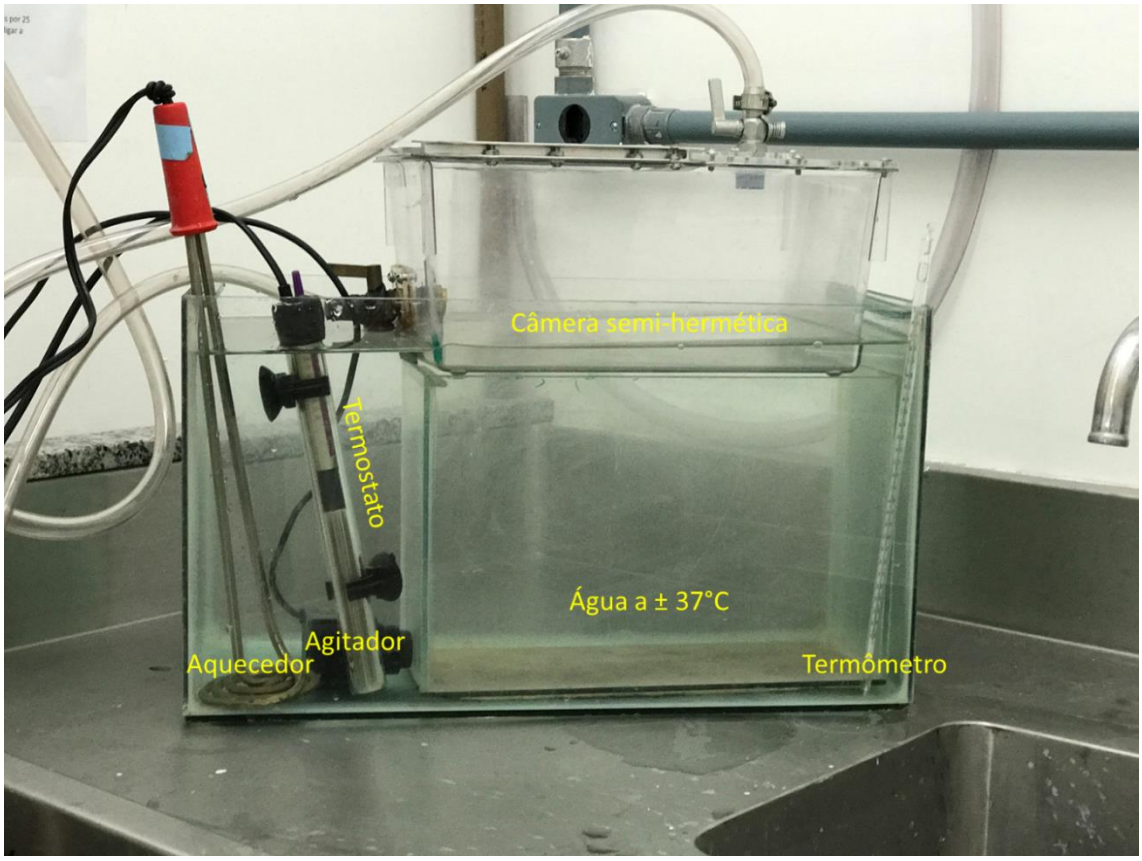


Figura 4. Sistema para anóxia neonatal, constituído de câmera semi-hermética com entrada e saída para gás nitrogênio, termostato, agitador, aquecedor, termômetro, aquário e água.

Figura 6. Cilindro de gás nitrogênio 100%.

Figura 5. Camundongos leptin reporters com 3 dias de vida pós-natal, pesando entre 1,7 e 2,1 gramas.

Foram realizadas as seguintes avaliações:

4.1.1 Avaliação de PO_2 e frequência cardíaca

Durante o período em que o animal permaneceu no sistema para indução da anóxia neonatal foi utilizado o aparelho Mediana - M20 Vet para avaliação da saturação de oxigênio e dos batimentos cardíacos, anotados de minuto a minuto e registrados em tabelas para avaliação.

Em função da dimensão do animal, foi necessário desenvolver dispositivo e metodologia para melhor captação tanto da PO_2 como da frequência cardíaca. O animal foi colocado no compartimento (Figura 7) sendo, então, posicionado o sensor nas extremidades abertas da caixa. PO_2= pressão parcial de oxigênio

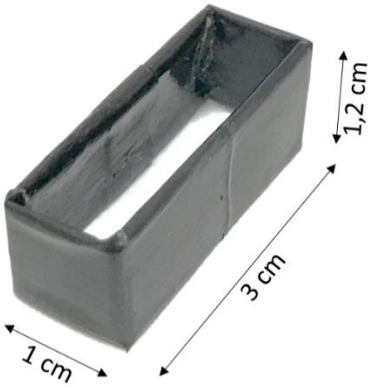


Figura 7. Compartimento desenvolvido para melhor captação de PO_2 e frequência cardíaca, sendo o animal colocado no seu interior e os sensores posicionados nas extremidades livres da estrutura.

4.1.2 Escala de Apgar

Após os animais serem retirados do sistema de anóxia foram observados cinco fatores, que constituem a escala de Apgar: frequência cardíaca, frequência respiratória, tônus muscular, cor da pele e irritabilidade reflexa; juntos determinam o valor na escala de Apgar (APGAR, 1953). As avaliações ocorreram no minuto 1, 5 e 10 após a retirada do animal do sistema.

4.1.3 Ontogênese dos reflexos

Foi avaliada a maturação de reflexos, segundo parâmetros descritos por Vasconcelos (2013) em ratos, cujos procedimentos foram utilizados para os camundongos.

4.1.3.1 Recuperação do decúbito

Quando avaliada a recuperação de decúbito, o animal foi colocado em decúbito dorsal sobre uma superfície plana sendo considerada resposta positiva quando o

animal girou o corpo e assumiu o decúbito ventral, apoiando as quatro patas em até 10 segundos (Figura 5).

Figura 8. Aparecimento do reflexo de recuperação de decúbito em rato (fonte: Vasconcelos, 2013).

4.1.3.2 Colocação pelas vibrissas

A colocação pelas vibrissas, foi avaliada com o animal suspenso pela cauda de forma que suas vibrissas tocassem levemente a borda de uma superfície. Foi considerada resposta positiva quando o animal colocou as patas anteriores sobre a superfície, tentando caminhar (dentro de um período de 10 segundos) (Figura 9).

Figura 9. Aparecimento do reflexo de colocação pelas vibrissas em rato (fonte: Vasconcelos, 2013).

4.1.3.3 Aversão ao precipício

O animal foi colocado com as patas dianteiras sobre a borda de uma superfície plana e alta de maneira a detectar o precipício, sendo considerada resposta positiva quando o animal se deslocava pelo menos a 45° para um dos lados em 10 segundos (Figura 10).

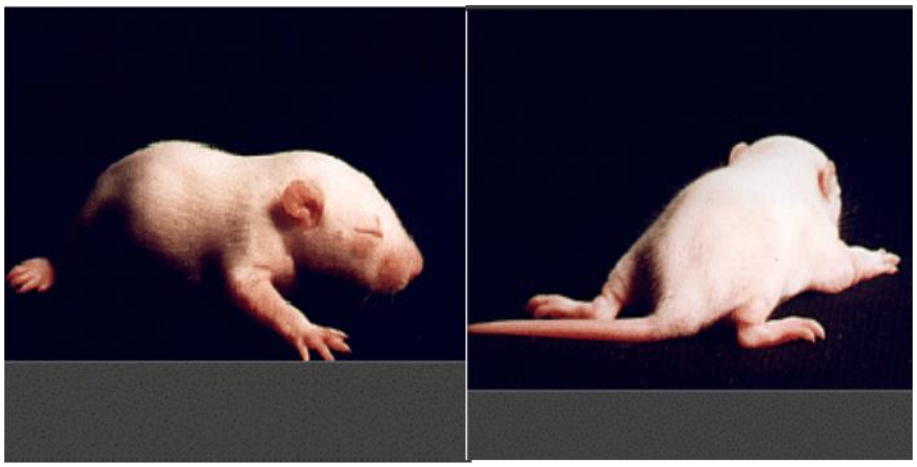


Figura 10. Aparecimento do reflexo de aversão ao precipício em rato (fonte: Vasconcelos, 2013).

4.1.3.4 Geotaxia negativa

O animal foi colocado no centro de uma rampa com 45° de inclinação, com a cabeça no sentido descendente, sendo considerada resposta positiva quando o animal foi capaz de girar e posicionar a cabeça no sentido ascendente (em até 10 segundos) (Figura 11).

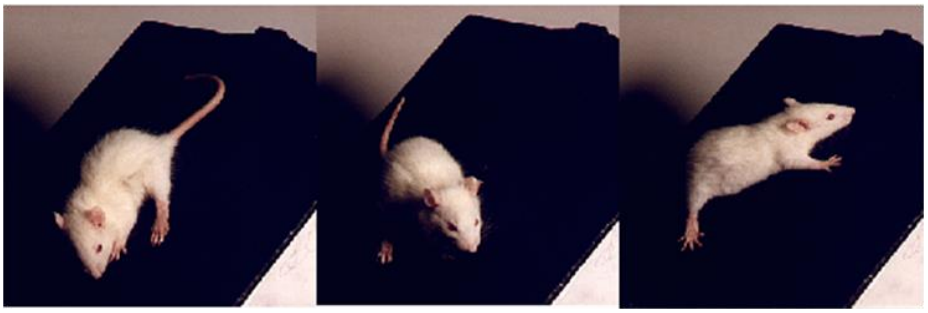


Figura 11. Aparecimento do reflexo de geotaxia negativa em rato (fonte: Vasconcelos, 2013).

4.1.3.5 Resposta ao susto

O animal foi exposto a um estampido agudo produzido a uma distância aproximada de 10 cm, sendo considerada resposta positiva quando ocorreu uma retração simultânea com imobilização rápida e involuntária do corpo do animal (Figura 12).

Figura 12. Aparecimento do reflexo de resposta ao susto em rato (fonte: Vasconcelos, 2013).

4.1.3.6 Aceleração

O animal foi segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para baixo a uma distância de 30 cm de um leito de espuma sintética (30 x 12 cm) e então foi solto e foi observada a sua queda livre, sendo considerada resposta positiva quando, durante a

queda, o animal girou completamente o corpo, apoiando-se sobre as quatro patas na espuma.

4.1.3.7 Preensão palmar

Foi colocada uma haste fina em contato com a palma das patas anteriores do animal, sendo considerada resposta positiva quando ele realizou um movimento de preensão na haste.

4.2 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO

Foi avaliado o desenvolvimento somático desses animais, diariamente entre P03 a P21 e três vezes por semana até que completassem 60 dias (avaliações realizadas sempre após as 7 h e antes das 10 h), sendo considerados:

4.2.1 Eixo látero-lateral do crânio (ELLC)

Com o auxílio de um paquímetro foi medida a distância entre as duas orelhas do animal diariamente até que completassem 21 dias. Após desmame, foram realizadas medições três dias na semana, até a realização da perfusão transcardiaca por fixador histológico.

Figura 13. Demonstração da medição do ELLC em ratos (fonte: Vasconcelos, 2013).

4.2.2 Eixo ântero-posterior do crânio (EAPC)

Com o auxílio de um paquímetro foi medida a distância entre o focinho e a articulação atlantoccipital entre as duas orelhas do animal diariamente até que completassem 21 dias. Após desmame, foram realizadas medições três dias na semana até perfusão.

Figura 14. Demonstração da medição do EAPC em ratos (fonte: Vasconcelos, 2013).

4.2.3 Eixo longitudinal do corpo (ELC)

Com o auxílio de um paquímetro foi medido o eixo longitudinal, alinhando-o em uma superfície plana e medindo do início do focinho até o início da calda do animal diariamente até que completassem 21 dias. Após desmame, foram realizadas medições três dias na semana até perfusão.

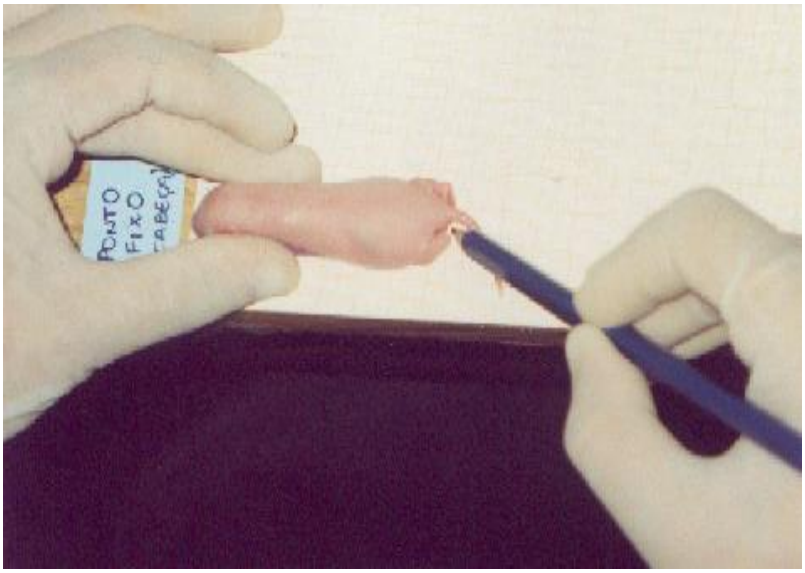


Figura 15. Demonstração da medição do ELC em ratos (fonte: Vasconcelos, 2013).

4.2.4 Peso corporal

Foram realizadas avaliações do peso corporal dos animais em balança de precisão (Marte, modelo AS2000, menor divisão 0,01g) até que completassem 60 dias.

4.3 ESTÍMULO DE JEJUM E DETERMINAÇÃO DA GLICEMIA

Quando completaram 60 dias, a fim de ativar a expressão de FOS, foi utilizado o estímulo de jejum alimentar por 18 horas, iniciando às 12 h e terminando às 6 h do segundo dia subsequente.

O ciclo estral das fêmeas (Figura 16) foi acompanhado diariamente (entre 10-12 h) de maneira em que no dia da coleta dos dados, todas estavam na mesma fase do ciclo (diestro)

Figura 16. Demonstração do processo para avaliação do ciclo estral do animal.

Foi coletada uma gotícula de sangue da cauda antes do jejum, uma pós-jejum e outra após a oferta de alimento por 60 minutos a fim de avaliar a glicemia dos animais utilizando glicosímetro OneTouch-Select Simple.

4.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Após período de jejum e re-alimentação o animal foi anestesiado com ketamina e xylazina para realização de perfusão. Após incisão no tórax do animal e seu coração exposto, com auxílio de seringa de 01 ml, foi coletado sangue para análise de leptina circulante. Foi retirado aproximadamente 0,3 ml de sangue atrial e centrifugado (Eppendorf-MiniSpin) para obtenção do soro.

Foi efetuada a perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% 50 ml (pH 7,4, a temperatura ambiente, fluxo de 2 ml/min), seguida de 200 ml solução fixadora de

formaldeído 4% em tampão fosfato (pH 7.4, a 4 °C, fluxo de 2 ml/min). O encéfalo foi dissecado, fixado por 2 h em formol 10%, transferido para sacarose 30% (pH 7 a 4ºC), crioprotegidos e, com o auxílio de micrótomo Leica SM2000R, processado em cortes coronais de 40 µm, em 6 séries de 5 compartimentos.

4.4.1 Imunohistoquimica

A reação de imunohistoquímica para FOS com os animais com 60 dias pós-natal é semelhante à descrita no tópico 4.1.4 (com os animais em 3 dias pós-natal), sendo a única diferença que os cortes estavam em *free-floating*, dispostos em NETs.

Após as etapas descritas no tópico acima mencionado, as lâminas foram montadas com 8 cortes em cada e observadas em microscópio para avaliação da expressão de FOS nas células imunorreativas nos núcleos PVN, DMH, VMH e ARC, assim como para posterior avaliação da co-localização com os neurônios fluorescentes do camundongo e realização da técnica de contagem por estereologia.

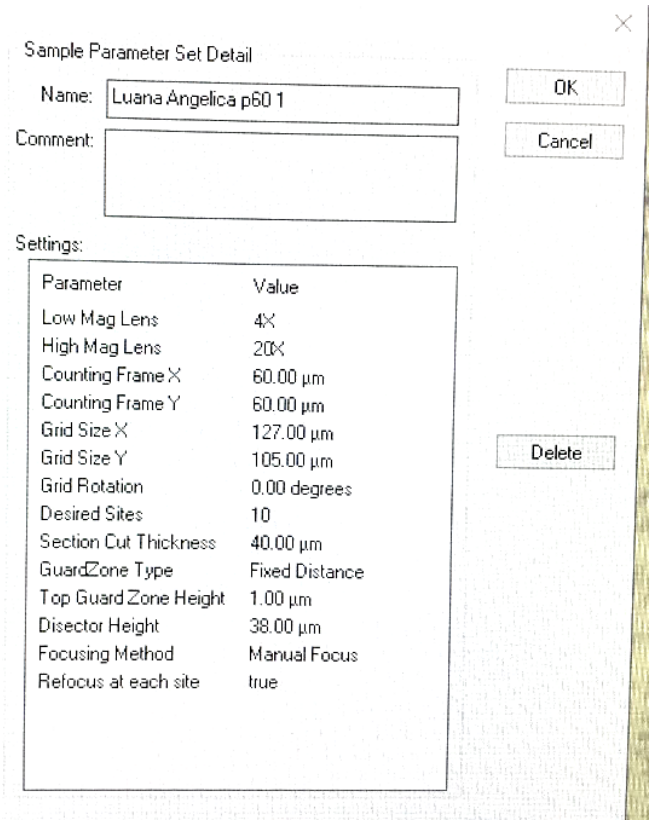
4.4.2 Coloração de Nissl – Tionina

Foi realizada coloração em Nissl, a fim de utilizar como referência citoarquitetonica. Neste material é possível observar as diferentes regiões do encéfalo em complemento a imunohistoquímica. Para realização da coloração em Nissl, com os cortes já dispostos em lâminas, é realizada a bateria de álcool e xilol, seguindo o protocolo de 3 minutos em álcool 50%, 3 minutos em álcool 70%, 3 minutos em álcool 95% I, 3 minutos em álcool 95% II, 3 minutos em álcool 100% I, 3 minutos em álcool 100% II, 3 minutos em álcool 100% III, 5 minutos em Xilol-I, 10 minutos em Xilol-II, 5 minutos em Xilol-I, 2 minutos em álcool 100% III, 2 minutos em álcool 100% II, 2 minutos em álcool 100% I, 2 minutos em álcool 95% II, 2 minutos em álcool 95% I, 2 minutos em álcool 70%, 2 minutos em álcool 50%, 10 mergulhos em água destilada (DH_2O), 30 segundos em solução tionina, 10 mergulhos em DH_2O, 02 minutos em cada álcool e xilol de concentração crescente até o Xilol II.

No final do processo as lâminas foram cobertas com lamínulas, utilizando DPX como meio de montagem.

4.5 ESTEREOLOGIA

Foi realizado procedimento para contagem celular por esteorologia, com a utilização do programa Stereo Investigator, segundo parâmetros estabelecidos com testes preliminares (figura 17).



Parameter	Value
Low Mag Lens	4X
High Mag Lens	20X
Counting Frame X	60.00 µm
Counting Frame Y	60.00 µm
Grid Size X	127.00 µm
Grid Size Y	105.00 µm
Grid Rotation	0.00 degrees
Desired Sites	10
Section Cut Thickness	40.00 µm
GuardZone Type	Fixed Distance
Top Guard Zone Height	1.00 µm
Disector Height	38.00 µm
Focusing Method	Manual Focus
Refocus at each site	true

Figura 17. Parâmetros utilizados para contagem por estereologia.

4.6 LEPTINA

Para avaliação de leptina circulante foi utilizado kit Milliplex® MAP lote 2848845, com procedimento experimental de acordo com as indicações do fabricante.

4.7 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

As avaliações estatísticas foram realizadas de acordo com o parâmetro observado, com os programas *GraphPad Prism Software, Inc* e *Statistical Analysis Software.*

Foram aplicados os testes de normalidade, para todos os parâmetros avaliados. Os testes específicos foram descritos em cada tópico, respeitando suas especificações metodológicas e o valor de p sendo menor ou igual a 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÓXIA NEONATAL EM CAMUNDONGOS

Para validação do método foram utilizados neonatos machos, com três dias de vida pós-natal (P03) e entre 1,7 e 2,1 gramas. Os animais submetidos à anóxia neonatal foram colocados em uma câmara semi-hermética de policarbonato (31,0 X 14,0 X 19,5 cm) (Figura 4) aquecida a ± 37ºC por 19 minutos em ambiente a 100% de nitrogênio gasoso (figura 6), fluxo de 1,5 L/minuto a pressão de 101,7 kPa, tempo suficiente para causar danos no encéfalo sem ocasionar a morte do neonato. No grupo controle, os animais foram sujeitos às mesmas condições, porém sem alteração na composição do ar ambiente.

A taxa de mortalidade dos animais foi de 10,34%, similar ao padrão adotado por Takada (2011), quando validou modelo para anóxia neonatal de ratos Wistar.

5.1.1 Frequência cardíaca

A frequência cardíaca, conforme demonstra figura 18, apresentou diferença significativa do grupo anóxia com relação ao grupo controle e, quando consideramos o valor de partida (valor inicial) do grupo anóxia, a diferença aparece a partir do minuto 7. Ocorreu diminuição de aproximadamente 75% nos batimentos cardíacos quando comparados os minutos 0 e 19 (período em que o animal permaneceu sem oxigênio).

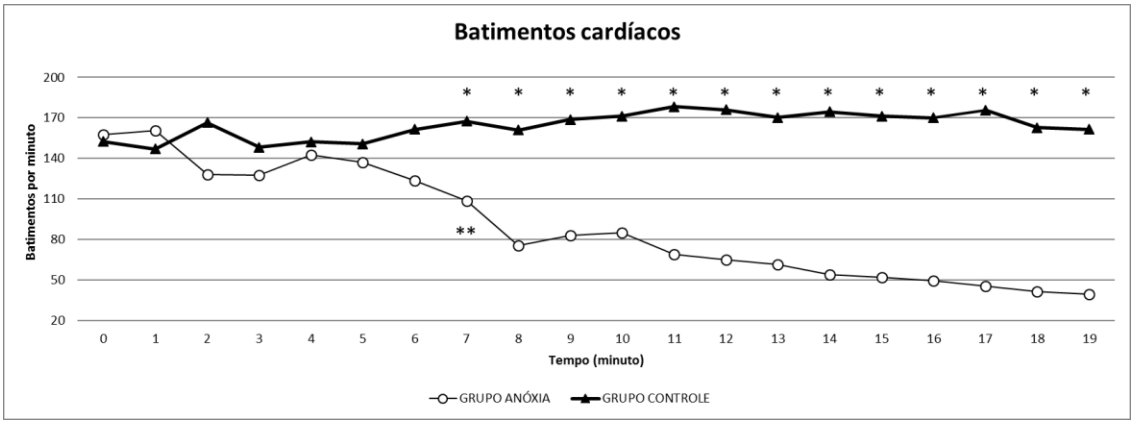


Figura 18. Avaliação da frequência cardíaca durante estímulo de anóxia neonatal. ANOVA de medidas repetidas: Grupo x Tempo, p<0,001 (Bonferroni: Anóxia≠Controle (n=5) a partir de 7 min*; no grupo Anóxia, 7 min≠0min**, p<0,05). Dados apresentados em média ± DP.

5.1.2 Pressão de oxigênio circulante

A pressão de oxigênio (figura 19) apresentou diferença significante entre os grupos anóxia e controle a partir do 15º minuto, sendo que a partir do 10º minuto a porcentagem de PO_2 apresentou diferença significante em relação aos valores no momento da colocação do animal no sistema.

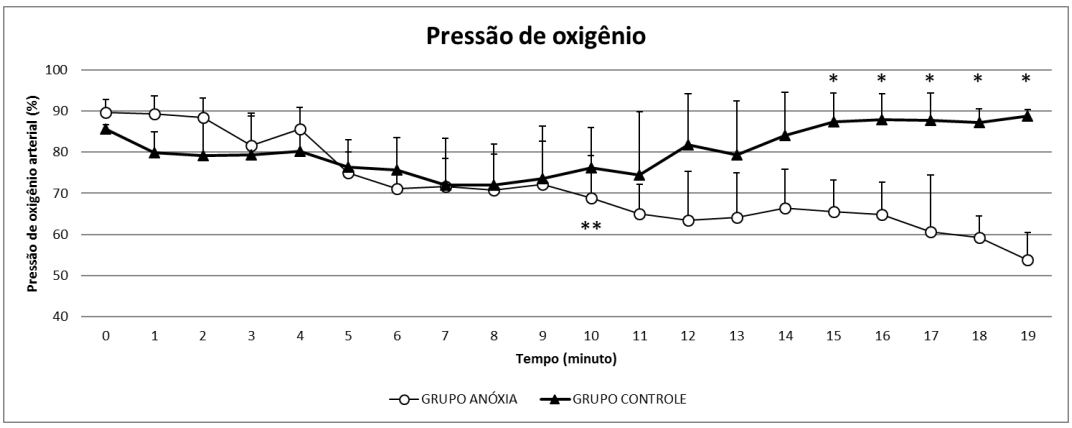


Figura 19. Avaliação da pressão de oxigênio circulante durante estímulo de anóxia neonatal. ANOVA de medidas repetidas: Grupo x Tempo, p<0,001 (Bonferroni: Anóxia≠Controle (n=5), a partir de 15 min*. No grupo Anóxia, somente a partir de 10 min a diminuição de O_2 é significante em relação ao tempo inicial**, p<0,05. Dados apresentados em média ± DP.

5.1.3 Escala de Apgar

Após os animais serem retirados do sistema de anóxia foram observados cinco fatores, que constituem a escala de Apgar: frequência cardíaca, frequência respiratória, tônus muscular, cor da pele e irritabilidade reflexa; o quais juntos determinam o valor na escala de Apgar (APGAR, 1953). As avaliações ocorreram no minuto 1, 5 e 10 após a retirada do animal do sistema de experimentação (figura 20).

Os animais do grupo controle, como esperado, somaram 10 em todos os períodos da avaliação (minutos 1, 5 e 10 após saírem do sistema). O grupo anóxia apresentou resultados significantemente diferentes em todos os tempos de avaliação. No minuto seguinte à retirada do animal do sistema o valor de Apgar foi de 1,4 ± 0,55, indicando graves alterações em todos os parâmetros avaliados. O valor de Apgar no minuto 5 foi de 3 ± 1 e no minuto 10 de 6.

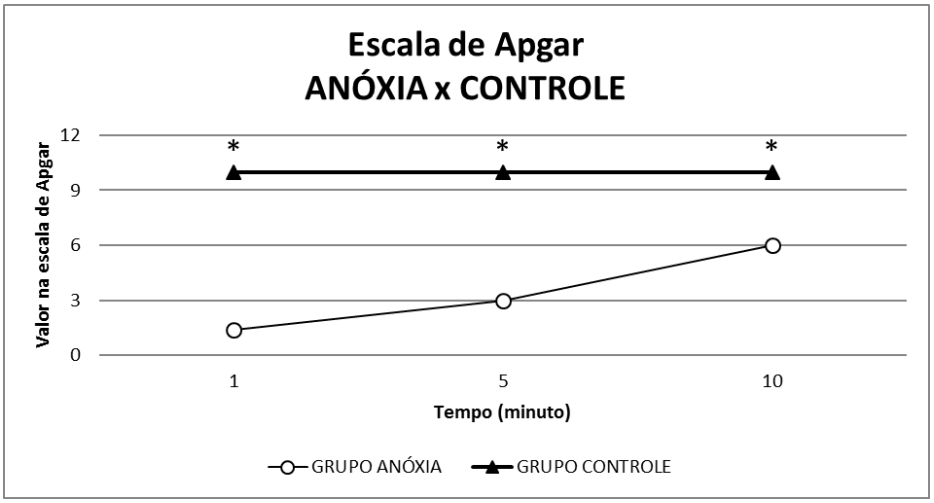


Figura 20. Avaliação dos valores apresentados pela escala de Apgar. ANOVA: Grupo x Tempo, $p<0,001$ (Bonferroni: Anóxia≠Controle* (n=5 em ambos os grupos) $p<0,05$). Dados apresentados em média ± DP.

5.1.4 Maturação de reflexos

Na avaliação da maturação dos reflexos durante o aleitamento (figura 21), pudemos observar que os animais anóxia apresentaram retardo significante no surgimento da aceleração, geotaxia negativa e resposta ao susto, condizentes com experimentos realizados em ratos Wistar (KUMAR, 2017).

Na Aceleração (figura 21 A), os animais anoxiados apresentaram o reflexo no dia 11 e os controles, dia 10. Na geotaxia negativa (figura 21 B), os anoxiados apresentaram o reflexo dia 16, um dia após os controles (dia 15). Na resposta ao susto (figura 21 G) os controles apresentaram resposta no dia 16, 3 dias de adiantamento com relação aos anoxiados (dia 19).

As fêmeas anóxia apresentaram os reflexos de colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício e preensão palmar previamente aos machos, $p<0,5$, porém não houve diferença significante entre os anoxiados e os controles.

Na colocação pelas vibrissas (figura 21 E) e na preensão palmar (figura 21 D) as fêmeas adiantaram em um dia o aparecimento dos reflexos quando comparadas com os machos.

Figura 21. Aparecimento de reflexos ontogenéticos em camundongos machos e fêmeas, submetidos à anóxia neonatal em P03 (CM n=12, AM n=11, CF n=8, AF n=10). Média ± DP.

A. Aceleração: ANOVA: Grupo x Gênero, $F_{(1,40)}$=0,11, p=0,741; Grupo, $F_{(1,40)}$=6,97, p=0,012 (Anóxia≠Controle, independente do Gênero, p=0,012); Gênero, $F_{(1,40)}$=0,13, p=0,718.

B. Geotaxia Negativa: ANOVA: Grupo x Gênero, $F_{(1,40)}$=1,20, p=0,279; Grupo, $F_{(1,40)}$=19,40, p<0,001 (Anóxia≠Controle, independente do Gênero, p<0,001); Gênero, $F_{(1,40)}$=0,12, p=0,732.

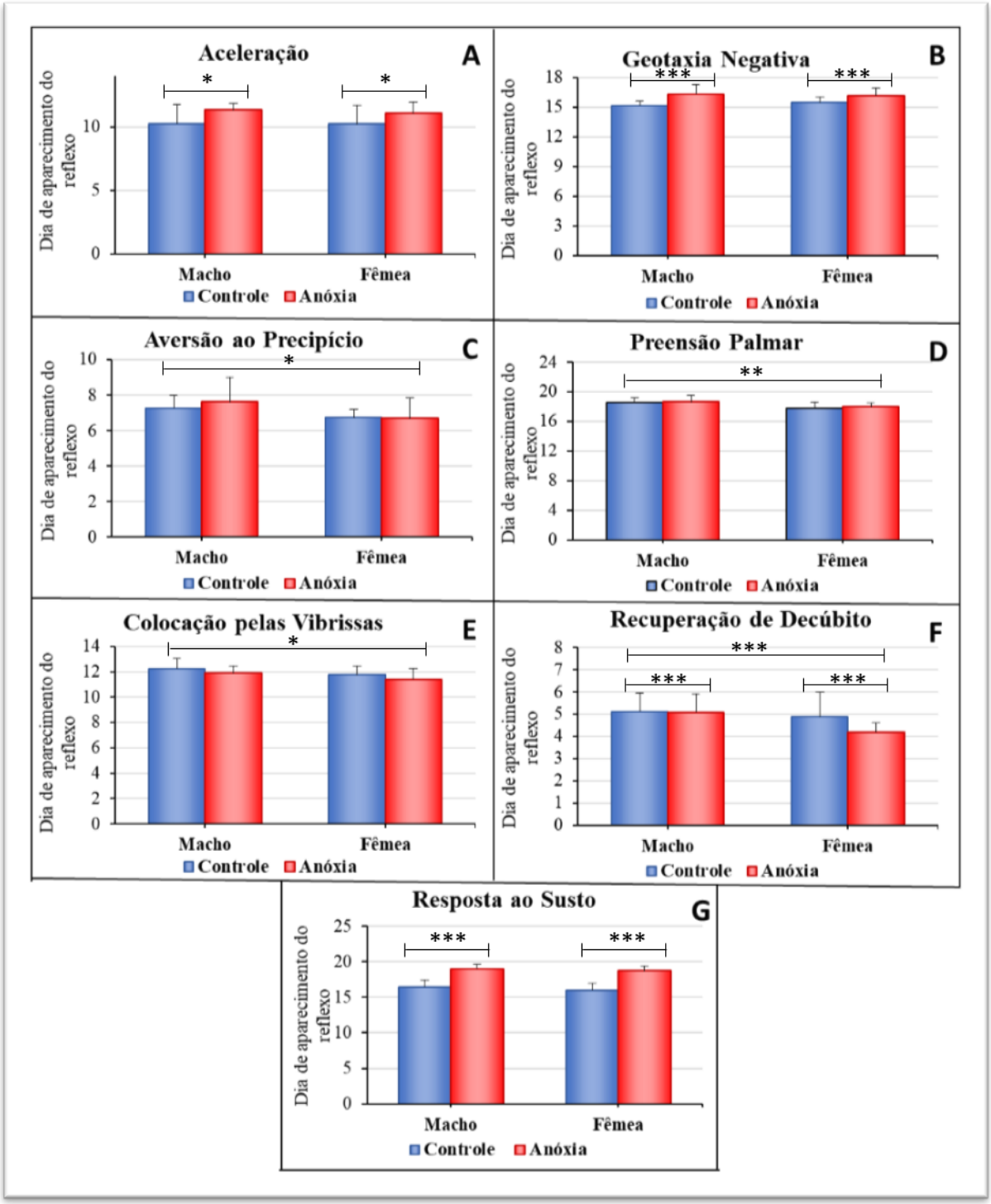
C. Aversão ao Precipício: ANOVA: Grupo x Gênero, $F_{(1,40)}$=0,46, p=0,503; Grupo, $F_{(1,40)}$=0,14, p=0,709; Gênero, $F_{(1,40)}$=5,49, p=0,024 (Fêmea≠Macho, indpendente do Grupo, p=0,024).

D. Preensão Palmar: ANOVA: Grupo x Gênero, $F_{(1,40)}$=0,26, p=0,616; Grupo, $F_{(1,40)}$=0,41, p=0,524; Gênero, $F_{(1,40)}$=10,81, p=0,002 (Fêmea≠Macho, independente do Grupo, p=0,002).

E. Colocação pelas Vibrissas: ANOVA: Grupo x Gênero, $F_{(1,40)}$=0,0006, p=0,980; Grupo, $F_{(1,40)}$=2,42, p=0,128; Gênero, $F_{(1,40)}$=5,17, p=0,028 (Fêmea≠Macho, independente do Grupo, p=0,028).

F. Recuperação de Decúbito: ANOVA: Grupo x Gênero, $F_{(1,40)}$=0,15, p=0,701; Grupo, $F_{(1,40)}$=108,48, p<0,001 (Anóxia≠Controle, independente do Gênero, p<0,001); Gênero, $F_{(1,40)}$=2,36, p=0,132.

G. Resposta ao Susto: ANOVA: Grupo x Gênero, $F_{(1,40)}$=0,15, p=0,701; Grupo, $F_{(1,40)}$=108,48, p<0,001 (Anóxia≠Controle, independente do Gênero, p<0,001); Gênero, $F_{(1,40)}$=2,36, p=0,132.


Aceleração
A
Geotaxia Negativa
B
Aversão ao Precipício
C
Preensão Palmar
D
Colocação pelas Vibrissas
E
Recuperação de Decúbito
F
Resposta ao Susto
G
Dia de aparecimento do reflexo
Macho
Fêmea
Controle
Anóxia

5.2 DESENVOLVIMENTO SOMÁTICO

Foi avaliado o desenvolvimento somático dos animais submetidos a anóxia neonatal e dos animais controle, tanto machos como fêmeas, diariamente entre P03 a P21 e três vezes por semana P21 e P60, demonstrados em figura 22 (avaliações realizadas sempre após as 7 h e antes das 10 h).

A anóxia neonatal afetou os parâmetros avaliados de maneiras distintas, porém em todas as análises, o grupo anóxia macho possui dimensões aumentadas em relação aos outros grupos, segundo figura 22 A, indicando o eixo látero-lateral do crânio, 22 B indicando eixo ântero-posterior do crânio, 22 C o eixo longitudinal do corpo e 22 D indicando o peso corpóreo dos animais.

Como indicativo para obesidade em seres humanos pode ser utilizada avaliação como IMC = peso (kg)/ altura ² (m) (YAO et al, 2002). A fim de avaliar a massa corporal do animal e possível indicação de sobrepeso (MOURA et al, 2008), foi determinado o índice de Lee (BERNARDIS; PATTERSON, 1968), que consiste na razão da raiz cúbica do peso corporal (g) sobre o comprimento naso-anal (ELC) do animal, em centímetros.

$$\text{ÍNDICE DE LEE} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso (g)}}}{\text{ELC (cm)}}$$

Os animais, em P21 e P60, tiveram seu peso e seu comprimento naso-anal (ELC) medidos e usados para o cálculo do Índice de Lee por meio da fórmula: [raiz cúbica do peso corporal (g)/comprimento naso-anal (mm) x 10].

Os animais anóxia, especialmente machos, possuem índice de Lee (figura 22) maior com relação ao controle, indicando obesidade decorrente da anóxia neonatal.

Figura 22. Parâmetros de desenvolvimento somático (A, B, C e D) e índice de Lee (E) em camundongos machos e fêmeas, submetidos à anóxia neonatal em P03, e avaliados diariamente P-3 a P21, seguida de avaliação em dias alternados até P60 (CM n=12, AM n=11, CF n=8, AF n=10) (Média ± DP)

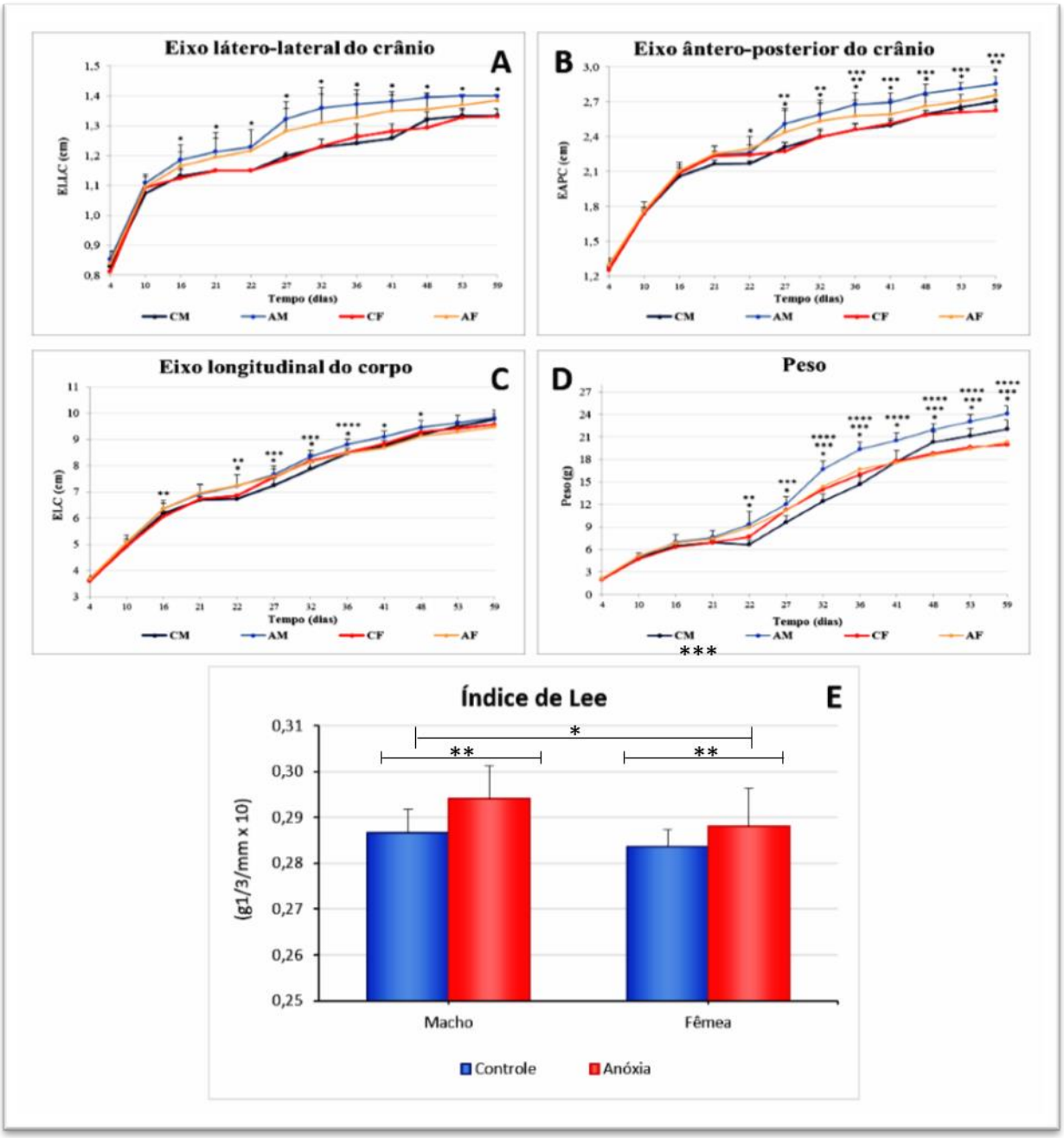
A. Avaliação do desenvolvimento do ELLC. ANOVA: Grupo x Gênero x Tempo, $F(11,407)=1,270$ $p=0,239$; Gênero x Tempo, $F(11,407)=1,264$ $p=0,243$; Grupo x Tempo, $F(11,407)=10,124$, $p<0,001$ (Bonferroni: Anóxia≠Controle a partir do 16° dia)*.

B. Avaliação do desenvolvimento do EAPC. ANOVA: Grupo x Gênero x Tempo, $F(11,407)=1,913$, $p=0,036$ (Bonferroni: Anóxia-Macho≠Controle-Macho a partir do 22° dia*, Anóxia-Fêmea≠Controle-Fêmea do 27° até 36° dia e no 59° dia**, Controle-Fêmea não apresentou diferença significante entre Controle-Macho em nenhum dia, Anóxia-Fêmea≠Anóxia-Macho a partir do 36° dia***, $p<0,05$.

C. Avaliação do desenvolvimento do ELC. ANOVA: Grupo x Gênero x Tempo, $F(11,407)=4,973$, $p<0,001$ (Bonferroni: Anóxia-Macho≠Controle-Macho do 22° dia até 48° dia*, Anóxia-Fêmea≠Controle-Fêmea no 16° e 22° dia**, Controle-Fêmea≠Controle-Macho no 27° e 32° dia*** e Anóxia-Fêmea≠Anóxia-Macho a partir do 36° dia****, $p<0,05$.

D. Avaliação do desenvolvimento do peso. ANOVA: Grupo x Gênero x Tempo, $F(11,407)=12,465$, $p<0,001$ (Bonferroni: Anóxia-Macho≠Controle-Macho a partir do 22° dia*, Anóxia-Fêmea≠Controle-Fêmea apenas no 22° dia**, Controle-Fêmea≠Controle-Macho a partir do 27° dia, exceto no 41° dia***, Anóxia-Fêmea≠Anóxia-Macho a partir do 32° dia****, $p<0,05$.

E. Indice de Lee. ANOVA: Grupo x Gênero, $F_{(1,37)}=0,57$, $p=0,454$; Grupo, $F_{(1,37)}=8,59$, $p=0,006$ (Anóxia≠Controle, independente do Gênero, $p=0,006$); Gênero, $F_{(1,37)}=5,15$, $p=0,029$ (Fêmea≠Macho, independente do Grupo, $p=0,029$).


Eixo látero-lateral do crânio
A
ELLC (cm)
Tempo (dias)
CM
AM
CF
AF
B
Eixo ântero-posterior do crânio
EAPC (cm)
Tempo (dias)
CM
AM
CF
AF
Eixo longitudinal do corpo
C
ELC (cm)
Tempo (dias)
CM
AM
CF
AF
D
Peso
Peso (g)
Tempo (dias)
CM
AM
CF
AF
***
Índice de Lee
E
(g1/3/mm x 10)
Macho
Fêmea
Controle
Anóxia

5.3 AVALIAÇÃO METABÓLICA

5.3.1 Glicemia

A comparação dos valores absolutos com os valores de glicemia, não indicou diferença entre grupos, porém os tempos de avaliação apresentaram diferenças significativas, sendo que a glicemia pós-prandial apresentou-se elevada em comparação com a pré-prandial (230 mg/dl) e em jejum (170 mg/dl) (figura 23 A).

A variação de glicemia nos estágios pré-jejum e pós alimentação não apresentou diferenças significantes (figura 23 B). Quanto a comparação Grupo x Gênero, não foram detectadas diferenças significantes nem quanto ao gênero, nem quanto ao estímulo (figura 23 C).

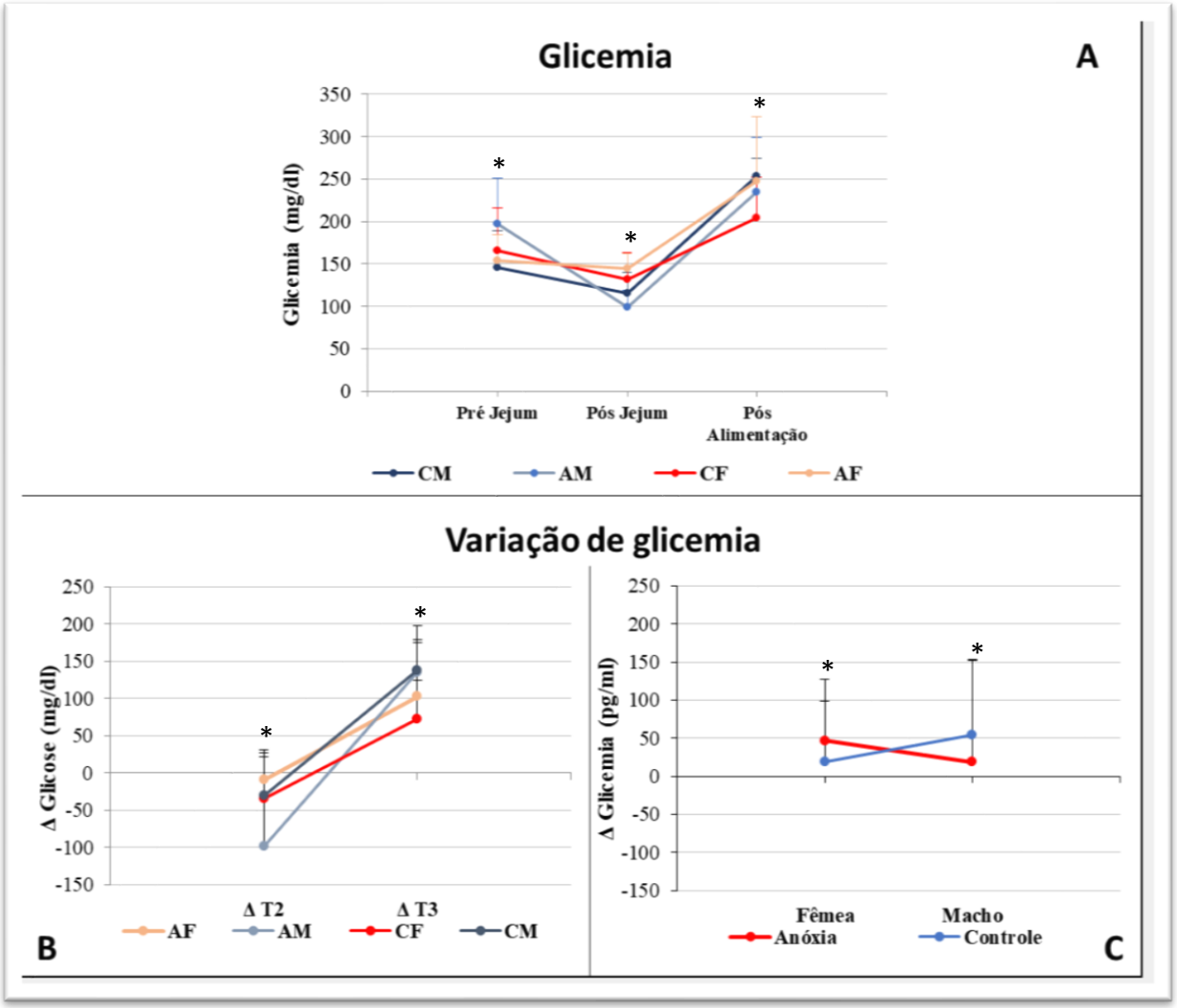


Figura 23. Dosagem (A) e variação de glicemia (B e C), em camundongos machos e fêmeas, submetidos à anóxia neonatal (n=8) Média ± DP.

A. Glicemia nos estágios pré-jejum, jejum de 18h e pós alimentação 60 min. ANOVA: Grupo x Gênero x Tempo, $F_{(2,56)}$=4,568, p=0,015 (Bonferroni: Anóxia-Macho, T2≠T1 e T3≠T2, p<0,05; Controle Macho, T3≠T1 e T2, p<0,05; Anóxia-Fêmea, T3≠T1 e T2, p<0,05; Controle-Fêmea, T3≠T2, p<0,05. B. Variação de glicemia nos estágios pré-jejum e pós alimentação. ANOVA: Grupo x Gênero x Tempo, F(1,28)=0,862, p=0,361; Gênero x Período, F(1,28)=7,720, p=0,010 (Bonferroni: tanto na Fêmea como no Macho, ΔT3≠ΔT2, independente do Grupo, p<0,05); Grupo x Período, F(1,28)=1,113, p=0,300; Grupo x Gênero, F(1,28)=6,826, p=0,0,014 (Bonferroni não detectou diferenças significantes). C. Comparação Grupo x Gênero, F(1,28)=6,826, p=0,014 (Bonferroni não detectou diferenças significantes nem quanto ao gênero, nem quanto ao estímulo anóxico x controle).

O jejum causou, como esperado, hipoglicemia ao organismo pela falta de glucose proveniente da dieta (NIRMALAN; NIRMALAN, 2017). Este dado foi revertido após alimentação como consequência da digestão que aumenta a liberação de glicose no sangue.

Tanto na fêmea como no macho foi detectada diferença na variação (delta) de glicemia, independente do grupo, entre delta T2 e delta T3. A variação aumenta significativamente na avaliação do delta entre o pós-jejum e a pós-alimentação, sendo a hiperglicemia pós-prandial o resultado da produção excessiva de glicose, associada à sua captação periférica reduzida (GELONEZE et al., 2006).

5.3.2 Leptina circulante

Quando avaliado a nível de leptina circulante, não foi observada diferença significativa entres grupos e gêneros (figura 24).

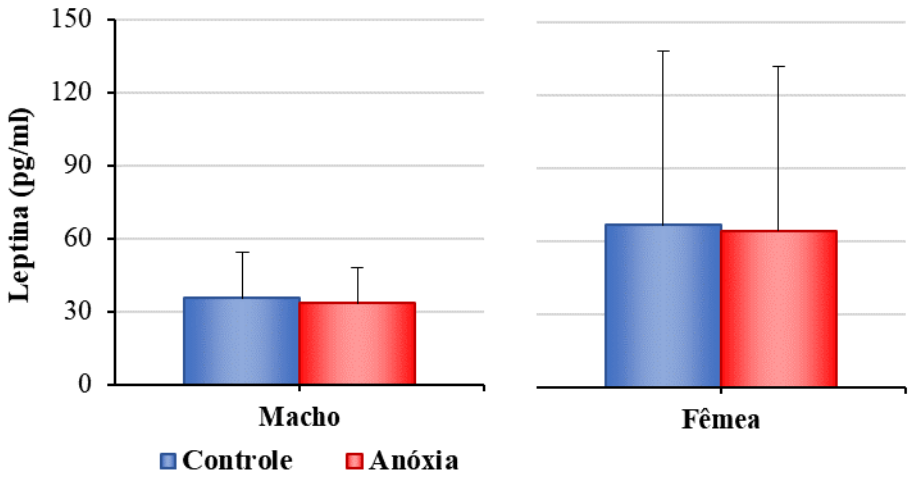


Figura 24. Avaliação de dosagem de leptina circulante. (A) Mann-Whitney: U=27,5, p=1,000, (B) Mann-Whitney: U=32,0, p=0,95. N=8, P60. Média ± DV.

5.4 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

5.4.1 Coloração de Nissl

Foi realizada coloração em Nissl, a fim de utilizar como referência cito arquitetônica e para estudos de estereologia, com a utilização do programa StereoInvestigator em cortes corados com tionina.

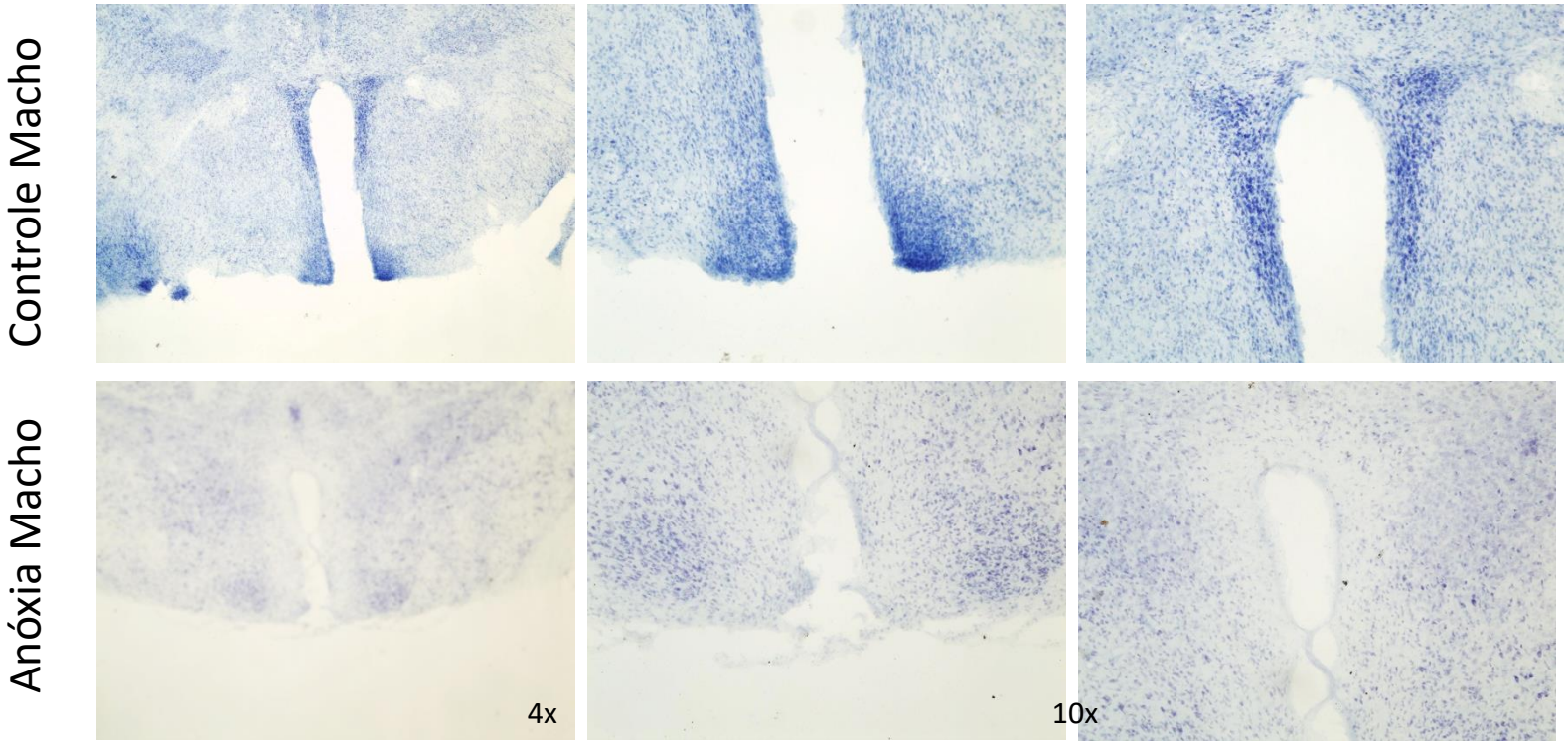


Figura 25. Imagem para comparação entre os grupos controle macho e anóxia macho com animais em P60, com coloração de Nissl.

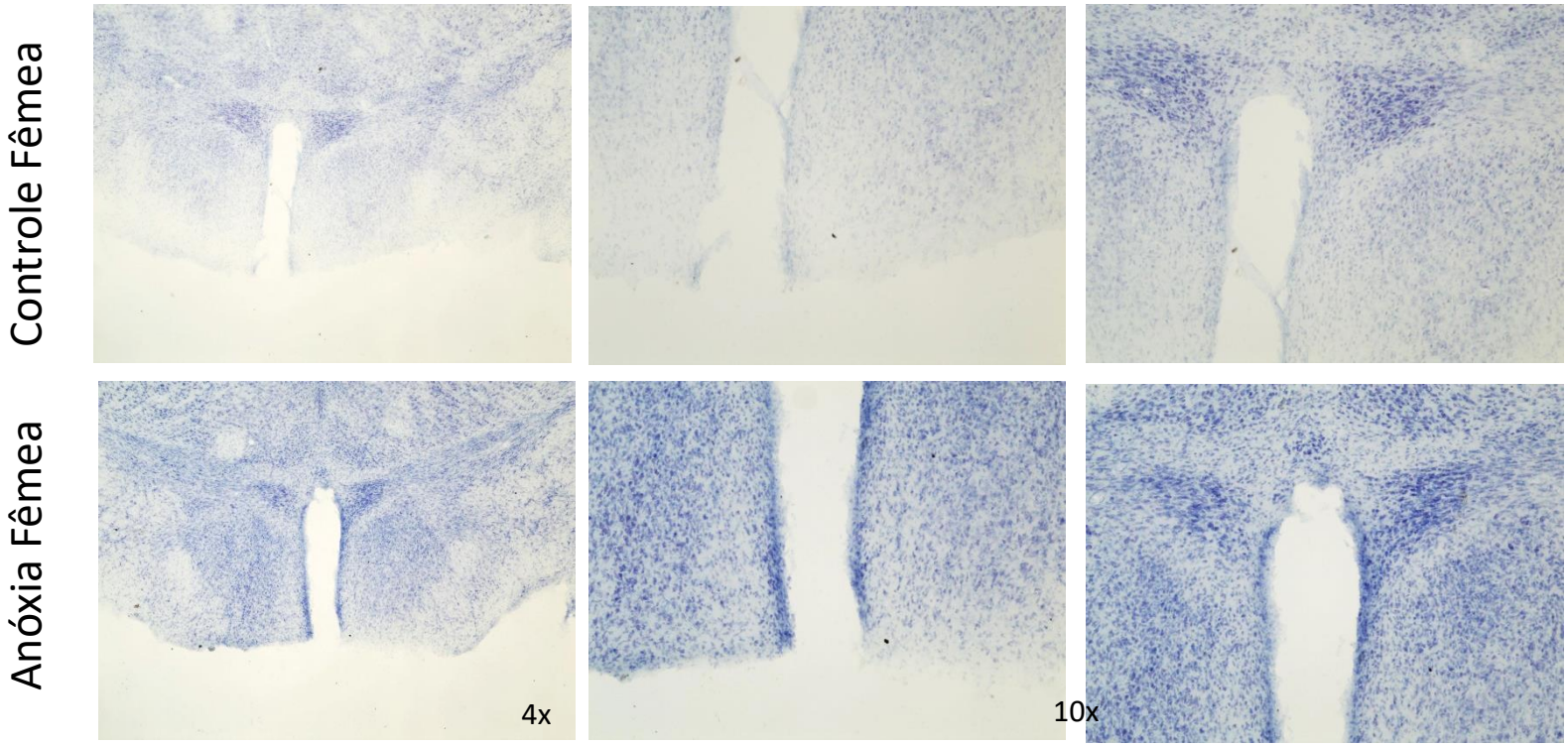


Figura 26. Imagem para comparação entre os grupos controle macho e anóxia fêmea com animais em P60, com coloração de Nissl.

Não foi detectada diferença significativa na densidade de marcações no núcleo arqueado, dorsomedial, ventromedial e paraventricular do animal quando realizada comparação entre animais machos, fêmeas, anóxia e controle.

5.4.2 Fos-IR

As reações de imunohistoquímica para FOS com os animais de 60 dias pós-natal foi realizada com os cortes em *free-floating*. Foi seguido protocolo já estabelecido e utilizado no laboratório. Foram realizadas contagens de estereologia nos núcleos hipotalâmicos ventromedial, dorsomedial, arqueado e paraventricular.

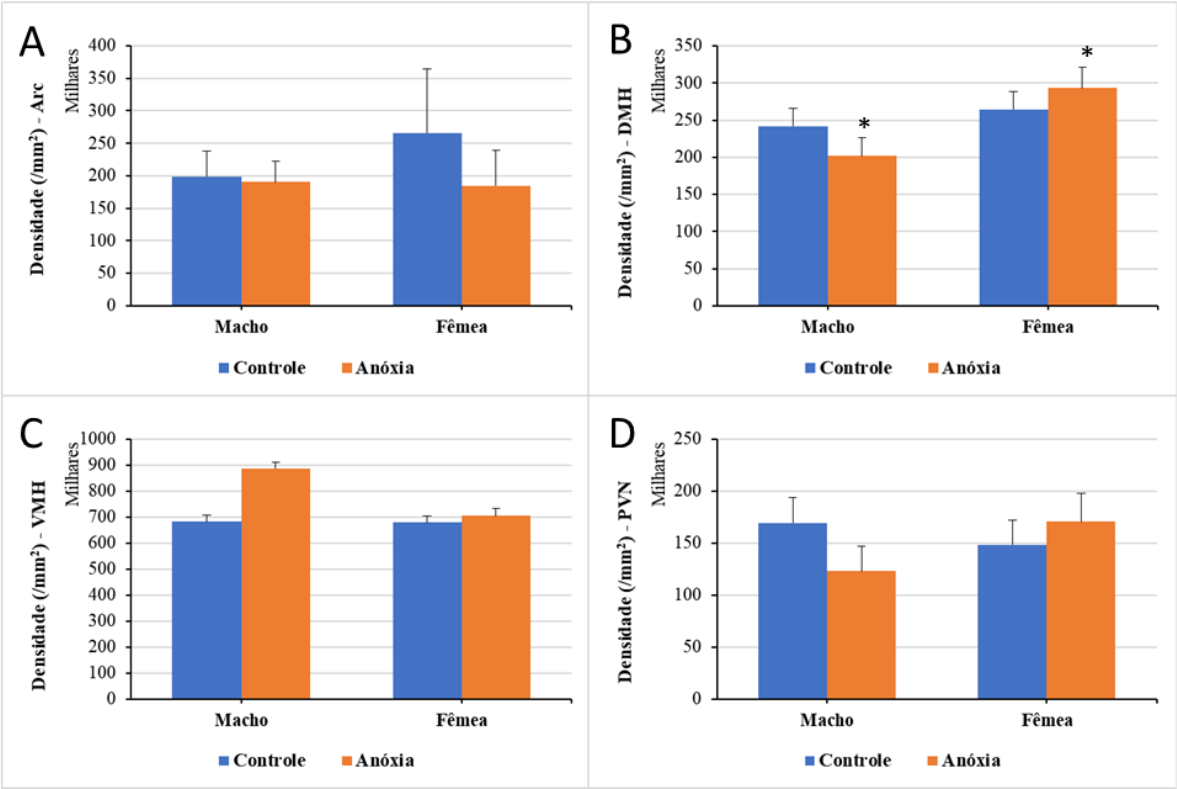


Figura 27. Densidade (n/área) de Fos-Ir. (A) (C) (D) Não foi detectada diferença significativa. (B) Foi detectado efeito de interação significante entre Grupo e Gênero*, p=0,007 e entre Anóxia_Fêmea ≠ Anóxia_Macho, p<0,05. n=5 P.60. Média ± DP.

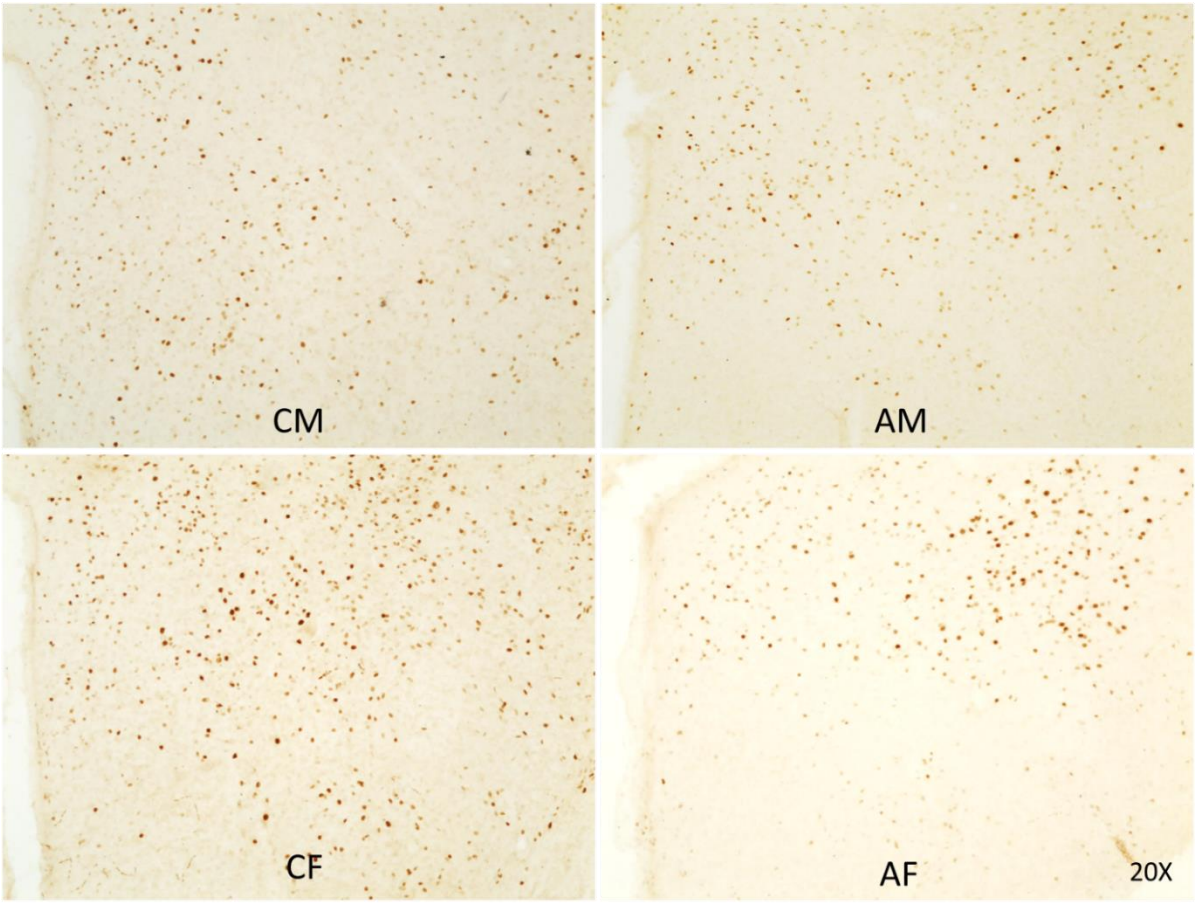


Figura 28. Prancha de cortes com 40 µm de encéfalos de animais CM, CF, AM e AF, em região do hipotálamo. Imunohistoquímica para c-fos. 20x.

Em conformidade com dados da literatura, foi possível observar receptores de leptina ativos nos núcleos dorsomedial, que seriam visualizados pela coloração fluorescente, arqueado e ventromedial do hipotálamo (CARON, 2010; SCHWARTZ et al., 1996).

5.4.3 Receptores para leptina

Tabela 2 - Expressão de tdTomato e Fos-Ir nos núcleos arqueado (ARC), dorsomedial (DM) e ventromedial (VMH) do hipotálamo (n=5).

Núcleo Hipotalâmico	tdTomato	Fos-IR
ARC	++	++
DM	+	+++
VMH	+++	O

Conforme demonstra tabela 2, podemos observar a presença de neurônios com receptores de leptina tdTomato nos núcleos ventromedial, arqueado e dorsomedial do hipotálamo, com maior concentração no ventromedial (figura 29) e Fos-IR nos núcleos arqueado e dorsomedial.

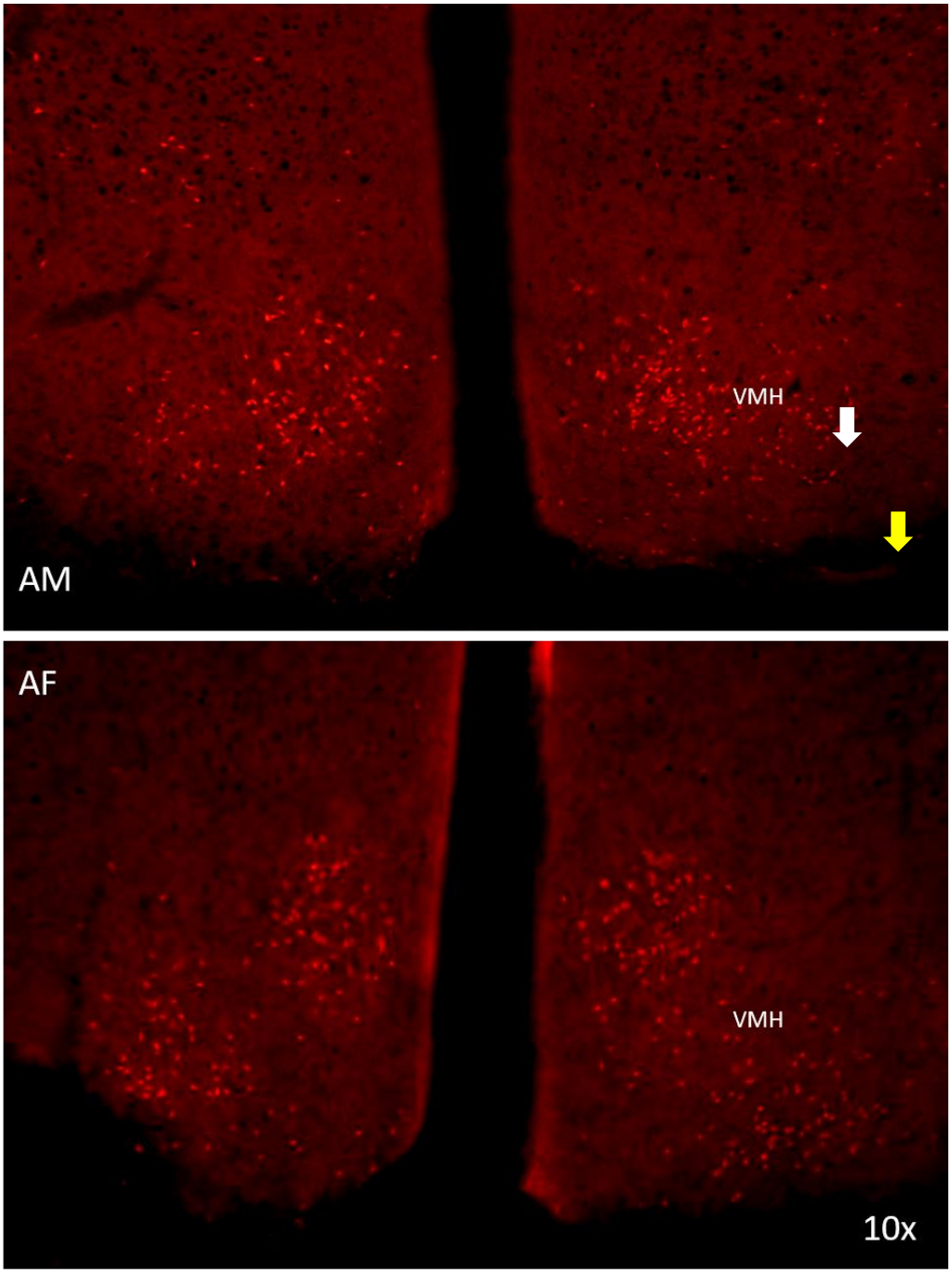


Figura 29. Corte de animais AM e AF, com 40µ, observados no microscópio de fluorescência, evidenciando neurônios com receptores de leptina no núcleo VMH. Seta branca como indicativo de neurônio com receptor de leptina e seta amarela com marcação de c-fos. Aumento de 10x

Figura 30. Imagem para comparação entre os grupos controle macho e anóxia macho com animais em P60, evidenciando receptores para leptina tdTomato, fos-IR e imagens sobrepostas. Ampliação de 20x.

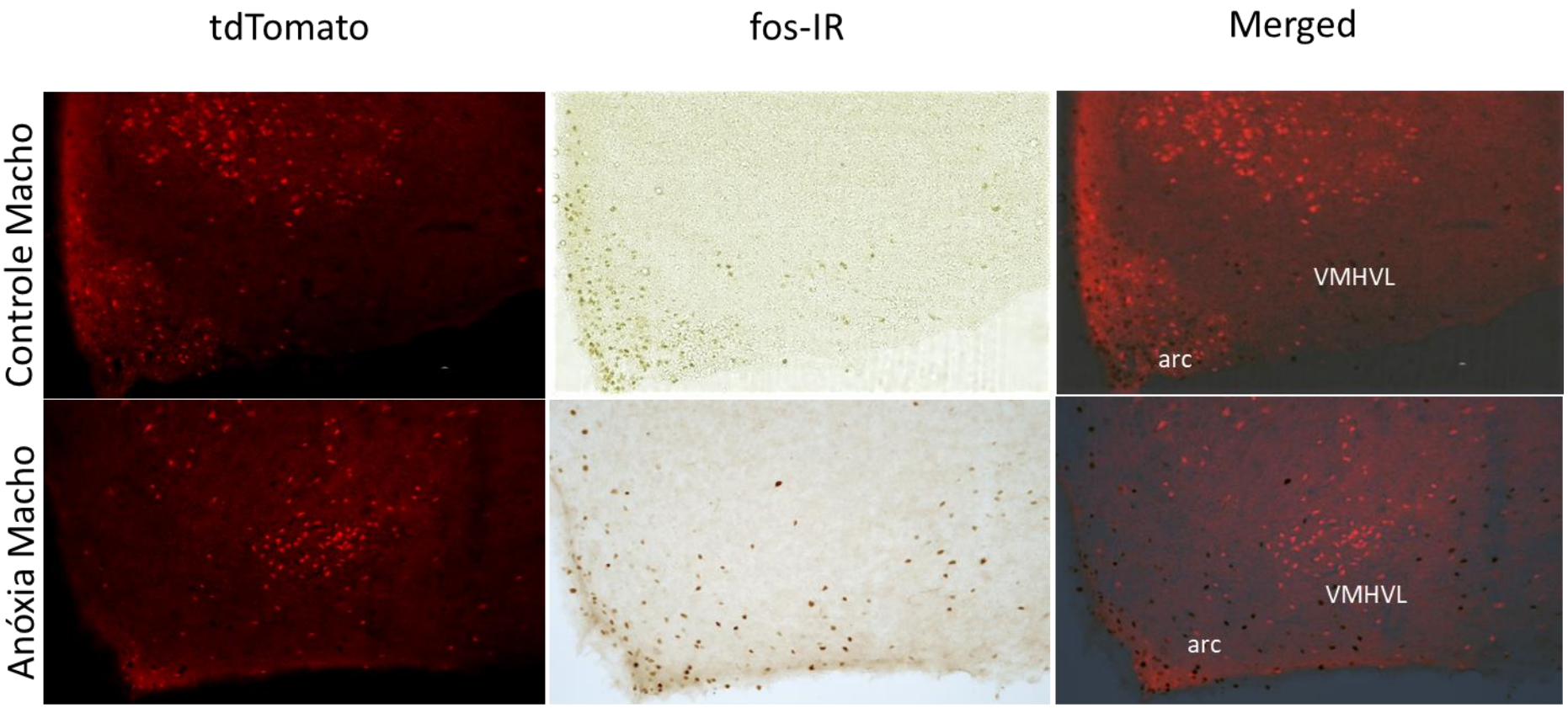
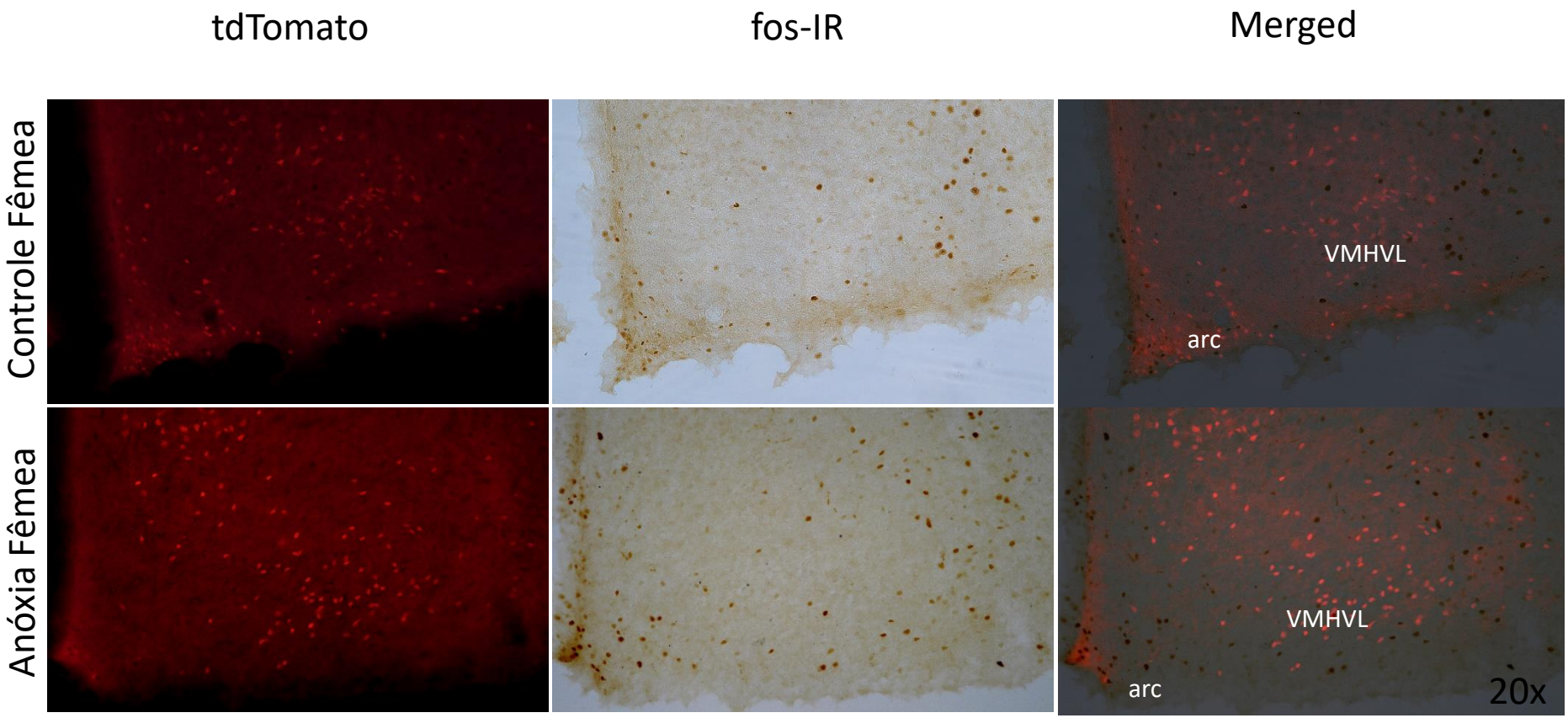


Figura 31. Imagem para comparação entre os grupos controle fêmea e anóxia fêmea com animais em P60, evidenciando receptores para leptina tdTomato, fos-IR e imagens sobrepostas. Ampliação de 20x.



6. DISCUSSÃO

Variações na frequência cardíaca têm sido associadas a maior risco de mortalidade e prognóstico precoce de doenças cardíacas (FERREIRA; ZANESCO, 2016) sendo alterada após hipóxia aguda (KANAI et al., 2001; LIU et al., 2001; HUANG et al., 2009) e anóxia, como demonstrado nesse estudo, com decréscimo de 75% do seu valor durante privação de oxigênio.

A medida da pressão parcial de oxigênio no tecido cerebral contribui para a prevenção de dano cerebral tardio (NORTJE; GUPTA, 2006), onde a introdução de gás N_2 é capaz de diminuir essa mediação de 100 mmHg para aproximadamente 0 mmHg (REJMSTAD et al., 2016). No presente estudo, houve significante diminuição na PO_2 nos grupos anoxiados, indicando alteração atmosférica do ambiente assim como possíveis aparecimentos de danos tardios nos animais afetados.

O sistema desenvolvido por Virginia Apgar em 1952 para avaliar a condição de neonatos é aplicada a praticamente todo bebê nascido em um hospital e descreve a condição do recém-nascido imediatamente após o nascimento como uma ferramenta para avaliação padronizada (PAPILE, 2001), sendo, entretanto, inapropriado seu uso sozinho para diagnóstico de asfixia (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS, 2015). Foi observado que os animais que passaram pelo estímulo anóxico apresentaram Apgar de 1,4 ± 0,55, indicando graves alterações em todos os cinco parâmetros avaliados nessa escala. Crianças que sofrem asfixia neonatal apresentam valores da Escala de Apgar semelhantemente baixos (BJORK et al, 2013).

Da mesma maneira que para neonatos humanos, a apresentação de um conjunto de reflexos de sobrevivência como o da respiração, de piscar os olhos, reflexo pupilar, reflexo de procura da mamadeira, reflexo de sucção, reflexo de deglutição, preensão palmar, de nadar e de caminhar que indicam sua viabilidade como organismo; para os camundongos os mesmos apresentam sentido similar e assim foram avaliados os reflexos de Aceleração, Geotaxia Negativa, Aversão ao Precipício, Preensão Palmar, Colocação pelas Vibrissas, Recuperação de Decúbito e Resposta ao Susto para identificação de eventuais alterações neurológicas.

Quando avaliamos a diferença de sexo, as fêmeas anóxia apresentaram os reflexos de recuperação de decúbito, colocação pelas vibrissas, aversão ao precipício

e preensão palmar previamente aos machos, p<0,5, porém não houve diferença significante entre os anoxiados e os controles.

Os animais anóxia apresentaram retardo significante no surgimento da aceleração, geotaxia negativa e resposta ao susto, condizentes com experimentos realizados em ratos Wistar (KUMAR, 2017). A Geotaxia Negativa reflete o grau de maturação do sistema vestibular, seu atraso sugerindo uma alteração nesse desenvolvimento (BOLLES; WOODS, 1964). A resposta ao susto condiz com estudo com asfixia perinatal, que por sua vez, estimula a apoptose de várias células do ouvido interno (SCHMUTZHARD et al., 2009).

Observa-se, então, que o estímulo de anóxia, segundo os parâmetros utlizados, é capaz de causar alterações tanto momentâneas (no período da injúria) avaliadas pela escala de Apgar, como persistentes (ontogenia dos reflexos) em camundongos leptin reporters gerados a partir do cruzamento do camundongo Leprcre com Gt(ROSA) 26Sortm2Sho.

Quando avaliado o desenvolvimento somático dos camundongos, observou-se que os machos anoxiados possuem maior comprimento do ELLC, EAPC, ELC e peso corpóreo em comparação com as fêmeas anoxiadas, o que evidências efeito de sexo como consequência da privação de oxigênio durante período crítico da maturação do sistema nervoso central (período pós-natal).

Estudos anteriores demonstraram maior suscetibilidade de animais machos a privação de oxigênio (GRIFFIN et al., 2000; XU et al., 2017), com possível relação da COX-2, isoforma da enzima ciclooxigenase, expressa predominantemente durante o processo inflamatório. Estudo com lesão hipóxica observou aumento da expressão de COX-2, como resposta ao processo inflamatório relativo a privação de oxigênio (BONAZZI et al., 2000). Xu et al. (2017) sugeriu que a atividade da COX-2 é sexo-dependente. Esses achados definem a importância de estudar sujeitos de ambos os sexos em modelos de roedores e desenvolvimento de tratamento seletivamente ao gênero.

O índice de Lee, assim como o IMC (índice de massa corpórea) em humano é um determinante de massa corporal em roedores e atua como preditor do excesso de peso (NERY et al., 2011). Os animais anóxia, especialmente machos, possuem índice de Lee maior com relação ao controle, indicando obesidade decorrente da anóxia neonatal.

A comparação dos valores absolutos com os valores de glicemia, não indicou diferença entre grupos, porém os tempos de avaliação apresentaram diferenças significativas.

O jejum causou, como esperado, hipoglicemia ao organismo pela falta de glucose proveniente da dieta (NIRMALAN; NIRMALAN, 2017). Este dado foi revertido após alimentação como consequência da digestão que aumenta a liberação de glicose no sangue.

Tanto na fêmea como no macho foi detectada diferença na variação (delta) de glicemia, independente do grupo, entre delta T2 e delta T3. A variação aumenta significativamente na avaliação do delta entre o pós-jejum e a pós-alimentação, sendo a hiperglicemia pós-prandial o resultado da produção excessiva de glicose, associada à sua captação periférica reduzida (GELONEZE et al., 2006).

O momento da coleta do material biológico do animal tem influência direta tanto sobre os valores de leptina circulantes como as marcações hipotalâmicas aqui descritas. O animal passou por 1 h de alimentação após jejum de 18 h. A expressão de c-fos relaciona-se diretamente com a re-alimentação, onde hormônios de resposta rápida anorexígenos e orexígenos atuam nos núcleos hipotalâmicos em questão.

A grelina, por exemplo, é um peptídeo produzido nas células do estômago, com direto envolvimento na regulação do balanço energético a curto prazo (ROMERO et. Al., 2006). Quando em jejum e em períodos que antecedem as refeições, a concentração plasmática da grelina se mantém alta, reduzindo-se nas situações pós-prandiais (após a alimentação). Em estudo onde houve injeção de grelina e marcação de c-fos para estabelecer populações neuronais ativadas pela grelina. No núcleo arqueado houve ativação, assim como no núcleo dorsomedial e paraventricular do hipotálamo, de maneira semelhante ao que se apresenta nesse estudo (NAKAZATU et al., 2001).

A ativação de c-fos no núcleo dorsomedial se deu de maneira expressiva, tendo relação também com o gasto energético do animal e a termogênese que ocorre em situação prandial (REZAI-ZADEH et al. 2014; SWIETEN et al. 2014, MAYER et al., 1953).

A leptina, hormônio foco do estudo, é produzida principalmente pelo tecido adiposo branco (PARK; AHIMA, 2015) e suas principais funções são suprimir a alimentação, através da indução de saciedade e diminuição do prazer pela ingestão;

induzir o gasto energético, através do aumento da termogênese e da locomoção, e promover o crescimento ósseo.

No hipotálamo a leptina age inicialmente no ARC, onde ativa neurônios que coexpressam neuropeptídeos anorexígenos como pro-opiomelanocortin (POMC), e hormônio estimulante de melanócitos (MSH), e CART (transcrito regulado por cocaína e Anfetamina). Simultaneamente inibe os que coexpressam orexigenos neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína r-agouti (AgRP) (UPADHYAY ET AL. 2015; PARK; AHIMA, 2015). Os neurônios do ARC projetam a neurônios no LH e no VMH, que se relacionam com o circuito de fome e saciedade. (STIEG et al. 2015) (tabela 03) O DMH-é importante na regulação da termogênese da BAT em resposta à leptina (ZHANG et al., 2011).

A comparação dos resultados obtidos, sugere que apesar de não ser possível observar diferenças de valores de leptina circulante no sangue, a alteração de peso corpóreo dos animais anóxia em relação ao seu controle justifica-se não pela ativação dos receptores de leptina dos núcleos arqueado e dorsomedial, sugerindo-se uma resistência aos efeitos desse hormônio (CARO et al., 1996; BERBARI et al., 2013).

Em suma, a anóxia neonatal é capaz de causar alterações em regiões do hipotálamo responsivas a leptina, não alterando diretamente seus níveis plasmáticos.

7. CONCLUSÕES

1. O modelo de anóxia neonatal foi efetivamente padronizado para camundongos. Tal estímulo foi capaz de causar diminuição nos batimentos cardíacos, nível de oxigênio circulante e no valor na escala de Apgar significantes.

2. A anóxia neonatal causou alterações na ontogênese dos reflexos dos animais anóxia que apresentaram retardo significante no surgimento da aceleração, geotaxia negativa e resposta ao susto e recuperação de decúbito, sendo que as fêmeas apresentaram primeiro o desenvolvimento do reflexo.

3. A anóxia neonatal afetou os parâmetros de desenvolvimento somático avaliados de maneiras distintas, porém, o grupo anóxia macho apresentou dimensões aumentadas em relação aos outros grupos.

4. Não foi possível observar diferenças significantes nas dosagens de leptina circulante quando comparados animais anoxiados e seus respectivos controles

5. Foi possível observar receptores de leptina ativos nos núcleos ventromedial, visualizados pela coloração fluorescente, arqueado e dorsomedial do hipotálamo, observando co-localização de c-fos nos núcleos ARC e DM.

6. A comparação dos valores absolutos com os valores de glicemia, não indicou diferença entre grupos, porém os tempos de avaliação apresentaram diferenças significativas, indicando padrão funcional típico.

8. CONSIDERAÇÕES EXPERIMENTAIS

É importante ressaltar que para algumas avaliações acima mencionadas, técnicas metodológicas específicas foram empregadas.

Devido às dimensões do animal neonato, a captação da frequência cardíaca de PO_2 não era contínua quando apenas era fixado o sensor disponível para animais pequenos. Foi necessário o desenvolvimento de dispositivo (apresentado anteriormente) que torna essa avaliação possível.

Ocorreram atrasos devido a dificuldade de acasalamento dos animais LeptinReporters.

O sangue coletado para avaliação de leptina circulante foi extraído do átrio direito, somando cerca de 0,3 ml por animal. Quando centrifugado, a quantidade de soro obtida era pequena, o que nos fez optar pela dosagem com kit multiplex, não só pela sua excelente sensibilidade, mas também pela pouca quantidade de material necessário para leitura, porém a pouca quantidade de sangue coletado pode ter influenciado no resultado do teste.

9. REFERÊNCIAS

ALLEMANDI, W. Estudo da imunorreatividade da proteína S100β no Hipocampo e Núcleo do Trato Solitário de ratos neonatos submetidos à anóxia. 2011. 119 f. **Tese (Doutorado em Ciências)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS. The apgar score. **The American College of Obstetricians and Gynecologists**, n. 644, 2015.

AMITANI, M.; ASAKAWA A.; AMITANI H.; INUI A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 7, n. 51, p. 1–12, 2013.

APGAR, V. A proposal for a new method of evaluation of the newborn infant. **Anesthesia and Analgesia**, v. 120, p. 1056–1059, 2015.

BADO A. et al. The stomach is a source of leptin. **Nature**, v. 394, p. 790–793, 1997.

BALLAND, E.; COWLEY, M. A. New insights in leptin resistance mechanisms in mice. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 39, p. 59–65, 2015.

BANKS, W. A. et al. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. **Peptides**, v. 17, p. 327–334, 1996.

BERBARI. N. F. et al. Leptin resistance is a secondary consequence of the obesity in ciliopathy mutant mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 19, p. 7796–801, 2013.

BERNARDIS, L. L. PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal Endocrinology**, v. 40, p. 527–528, 1968.

BJORK, R. A.; DUNLOSKY, J.; KORNELL, N. Self-regulated learning: Beliefs, techniques, and illusions. **Annual Review of Psychology**, v. 64, p. 417–444, 2013.

BOLLES RC, WOODS PJ. The ontogeny of behaviour in the albino rat. **Anim Behav**. 12: 427-41, 1964.

BONAZZI, A. et al. Regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia and peroxisome proliferators in the corneal epithelium. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 4, p. 2837–2844, 2000.

BUWALDA, B.; NYAKAS, C.; VOSSELMAN, H.J.; LUITEN, P.G.M. Effects of early postnatal anoxia on adult learning and emotion in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 67, p. 85–90, 1995.

CAMPBELL, A. G.; MILLIGAN, J. E.; TALNER, N. S. The effect of pretreatment with pentobarbital, meperidine, orhyperbaricoxygen on the response to anoxia and resuscitation in new born rabbits. **The Journal of Pediatrics**, v. 72, n. 4, p. 518–527, 1968.

CANNON, M.; JONES, P.B.; MURRAY, R.M. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analyric review. **American Journal of Psychiatry**, v. 159, p. 1080–1092, 2002.

CAPUTA, M.; ROGALSKA, J.; WENTOWSKA, K.; NOWAKOWSKA, A. Perinatal asphyxia, hyperthermia and hyperferremia as factors inducing behavioural disturbances in adulthood: a rat model. **Behavioral Brain Research**, v. 163, n. 2, p. 246–256, 2005.

CARO, J. F. et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **The Lancet**, v. 348, n. 9021, p. 159–161, 1996.

CARON, E. Distribution of Leptin-Sensitive Cells in the Postnatal and Adult Mouse Brain. **The Journal of Comparative Neurology, Research in Systems Neuroscience**, v. 518, p. 459–476, 2010.

COURVILLE, C. B.: Asphyxia Following Nitrous Oxide Anesthesia. **Medicine**, v. 15, n. 129, 1936.

COURVILLE, C. B.: Cerebral anoxia and its residuals. **Medical Arts and Sciences**, p. 16-27, 35-44, 68-78, 1947.

DELL'ANNA E.; IUVONE L.; CALZOLARI S.; GELOSO, M.C. Effect of acetyl-L-carnitine on hyperactivity and spatial memory deficits of rats exposed to neonatal anoxia. **Neuroscience Letters**, v. 223, p. 201-205, 1997.

DONATO, J. et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. **The Journal of Clinical Investigation's**, v. 121, n. 1, 2011.

ELMQUIST, J. K. et al. Leptin activates distinct projections from the dorsomedial and ventromedial hypothalamic nuclei. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 2, p. 741–746, 1998.

FERREIRA, M. J.; ZANESCO, A. Heart rate variability as important approach for assessment autonomic modulation. **Motriz: Revista de Educação Física**, v. 22, n. 2, 2016.

FREDERICH, R. C. et al. Leptin levels reflect body lipid contend in mice: evidence for dietinduced resistance to leptin action. **Nature Medicine**, v. 1, n. 12, p. 1311–1314, 1995.

FRÜHBECK, G. et al. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 280, p. E827–E847, 2001.

FUNAHASHI, H, et al. Ultrastructural localization of the receptor for leptin in the rat hypothalamus. **Hormones and Behavior**, v. 37, p. 327–334, 2000.

GAVRILOVA, O. et al. Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating form of the leptin receptor. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 272, p. 30546–30551, 1997.

GELONEZE, B.; LAMOUNIER, R. N. COELHO, O. R. Postprandial hyperglycemia: treating its atherogenic potential. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 87, p. 604–613, 2006.

GERBASI, A. B.; LAVRINI, P. L.; TRENTIN, Â. DE C. Leptina e grelina: O papel na

patogênese da obesidade. **Saudi Medical Journal**, v. 33, p. 28, 2012.

GIANNOPOULOU, I.; PAGIDA, M. A.; BRIANA, D. D.; PANAYOTACOPOULOU, M. T. Perinatal hypoxia as a risk factor for psychopathology later in life: the role of dopamine and neurotrophins. **Hormones**, v 17, p. 25-32, 2018.

GLUCKMAN, E. Hematopoietic stem-cell transplants using umbilical-cord blood. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 1860-1861, 2001.

GRAHAM, E.M. et al. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199(6), p.587–595, 2008.

GRIFFIN, M. Gender-related differences in proliferative response of cardiac fibroblasts to hypoxia: Effects of estrogen. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 215, p. 2 – 30, 2000.

HERSHKOWITZ, M.; GRIMM, V. E.; SPEISER, Z. The effects of postnatal anoxia on behavior and on the muscarinic and beta-adrenergic receptors in the hippocampus of the developing rat. **Developmental Brain Research**. v. 7, p.147–155, 1983.

HETHERINGTON, A. W.; RASON, S. W. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. **The Anatomical Record**, p. 149–172, 1940.

HICKEY, M. S. et al. Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 272, n. 4, p. E562–E566, 1997.

HUANG, S. C.; WONG, M. K.; WANG, J. S. Systemic hypoxia affects cardiac autonomic activity and vascular hemodynamic control modulated by physical stimulation. **European Journal of Applied Physiology**, v. 106, p. 31–40, 2009

IOFFE, E. et al. Abnormal regulation of the leptin gene in the pathogenesis of obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 20, p. 11852–11857, 1998.

ITO, P. H. Avaliação comportamental de ratos submetidos à anóxia neonatal. 2010. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 107 f, 2010.

JOHNSTON, J. M. et al. Repositioning leptin as a therapy for Alzheimer's disease. **Therapy**, v. 8, n. 5, p. 481–490, 2011.

JOHNSTON, L. B.; ARENDS, N.; DAHLGREN, J.; LEGER, J.; CZERNICHOW, P.; ALBERTSSON-WIKLAND, K.; VAN DUIJN, C.; HOKKEN-KOELEGA, A.; SAVAGE, M. O.; CLARK, A. J. Gene association studies in small for gestational age infants. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 15, 2002.

KANAI, M. et al. Alterations in autonomic nervous control of heart rate among tourists at 2700 and 3700 m above sea level. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 12, p. 8–12, 2001.

KUMAR, A. J. et al. Sex differences in somatic and sensory motor development after neonatal anoxia in Wistar rats. **Behavioural Brain Research**, v. 333, p.242–250, 2017.

KUMAR, A. J. Influência de gênero no desenvolvimento somático e sensório motor de ratos Wistar submetidos à anóxia neonatal. 2017. **Dissertação (Mestrado em Ciências)**. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 76 f, 2017.

LAPTOOK, A. R. Birth Asphyxia and Hypoxic-Ischemic Brain Injury in the Preterm Infant. **Clinics in Perinatology**, v 43, Issue 3, p. 529-545, 2016.

LEE, G. H. et al. Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. **Nature**, v. 379, p. 632–635, 1996.

LEINNINGER, G. M.; JO, Y. H.; LESHAN, R. L; et al. 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.

LEME, J. A. C. DE A. Efeitos do treinamento físico moderado nas concentrações de grelina, leptina e no eixo GH-IGF em ratos diabéticos. 2010. **Tese (Doutorado em**

Ciências da Motricidade), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, 96 f, 2010.

LEVINE S. Anoxic–ischemic encephalopathy in rats. **American Journal of Pathology**, v. 36, p. 1–37, 1960.

LIU, X. X. et al. Analysis of heart rate variability during acute exposure to hypoxia. **Space Medicine & Medical Engineering**, v. 14, p. 328–331, 2001.

LOIDL, C. F. et al. Effects of hypothermia and gender on survival and behavior after perinatal asphyxia in rats. **Physiology & Behavior**, v. 68, n. 3, p. 263–269, 2000.

LU, X. Y. et al. Leptin: A potential novel antidepressant. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1593–1598, 2006.

LUNDY-EKMAN, L. Neurociência: fundamentos para a reabilitação. 2a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 353-477, 2004.

MARWARHA, G.; GHRIBI, O. Leptin signaling and Alzheimer's disease. **American Journal of Neurodegenerative Disease**, v. 1, n. 3, p. 245–65, 2012.

MAYER, J. BARRNETT, R. J. Sensitivity to cold in the hereditary obese-hyperglycemic syndrome of mice. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 26, n.1, p. 38–45, 1953.

MEYER-LINDENBERG, A. et al. Oxytocin and vasopressin in the human brain: Social neuropeptides for translational medicine. **Nature Neuroscience**, v. 12, p. 524, 2011.

MORGANE, P. J. et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 17, n. 1, p. 91–128, 1993.

MORRISON, L. R. Histopathologic effects of anoxia on the central nervous system. **Archives of Neurology & Psychiatry**, v. 55, p. 1–34, 1946.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J. Central nervous system regulation of brown adipose tissue. **Comprehensive Physiology**, v. 4, n. 4, p. 1677–713, 2014.

MOURA, R. F. et al. Capacidade aeróbia de ratos alimentados com dieta rica em frutose. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 14, n. 5, p. 422– 426, 2008.

MÜNZBERG, H.; MORRISON, C. D. Structure, production and signaling of leptin. **Metabolism**, v. 64, n. 1, p. 13–23, 2015.

MÜNZBERG, H.; MYERS, M. G. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 5, p. 566–570, 2005.

NAGAISHI, V. S.; CARDINALI, et al. Possible crosstalk between leptin and prolactin during pregnancy. **Neuroscience**, v. 259, n. 0, p. 71–83, 2014.

NAKAZATO, M. et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. **Nature**, v. 409, 2001.

NERY, C. S. et al. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, 2011.

NIRMALAN, N.; NIRMALAN, M. Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 11, n. 7, p. 279–283, 2017.

NORTJE, J.; GUPTA, A. K. The role of tissue oxygen monitoring in patients with acute brain injury. **British Journal of Anesthesia**, v. 97, n. 1, p. 95–106, 2006.

NYAKAS C.; MARKEL E.; SCHURMAN T.; LUITEN P. G. Impaired learning and abnormal open-field behaviours of rats after early postnatal anoxia and the beneficial effect of the calcium antagonist nimodipine. **European Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 168–174, 1991.

OLIVEIRA-ALONSO, G. S.; SILVEIRA, V. C.; FERNANDES, A. C.; et al. Lesões encefálicas infantis adquiridas. AACD medicina e reabilitação: Princípios e Prática. **Manole**, 3 ed., p. 161–172, 2007.

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.

PAPILE, M. D. The apgar score in the 21st century. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 519-520, 2001.

PAXINOS, G. The rat nervous system. **Elsevier INC**, 3a ed, 2004.

PERRONE, S.; BRACCIALI C.; VIRGILIO, N.; BUONOCORE, G.; Oxygen Use in Neonatal Care: A Two-edged Sword. **Frontiers in Pediatrics,** v. 4, p. 1-7, 2017.

PISABARRO R. et al. Leptina: ¿un marcador de riesgo metabólico? **International Archives of Medicine**, v. 20, n. 3, p. 113–115, 1998.

REICHENBACH, A.; STARK, R.; ANDREWS, Z. B. Hypothalamic control of appetite and energy metabolism. **Research Gate**, p. 1–35, 2012.

REJMSTAD, P. et al. A method for monitoring of oxygen saturation changes in brain tissue using diffuse reflectance spectroscopy. **Journal Biophotonics**, p. 1–10, 2016.

REZAI-ZADEH, K. et al. Leptin receptor neurons in the dorsomedial hypothalamus are key regulators of energy expenditure and body weight, but not food intake. **Molecular Metabolism**, v. 3, p. 681–693, 2014.

RIBEIRO, S. M. L. et al. Leptina: aspectos sobre o balanço energético, exercício físico e amenorréia do esforço. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 1, p. 11–24, 2007.

RICE J. E.; VANNUCCI R. C.; BRIERLEY J. B. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in therat. **Annals of Neurology**, v. 9, p. 131–141, 1981.

ROGALSKA, J.; CAPUTA, M.; WENTOWSKA, K.; NOWAKOWSKA, A. Stress-induced behaviour in adult and old rats: effects of neonatal asphyxia, body temperature and chelation of iron. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 57, n. 8, p. 17-34, 2006.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 85–91, 2006.

SCHMUTZHARD, J.; GLUECKERT, R.; SERGI, C.; SCHWENTNER, I.; ABRAHAM, I.; SCHROTT-FISCHER, A. Does perinatal asphyxia induce apoptosis in the inner ear?, **Hearing Research**, v. 250, p. 1-9, 2009.

SCHWARTZ M. W. et al. Specificity of leptin action on elevated blood glucose levels and hypothalamic neuropeptide Y gene expression in ob/ob mice. **Diabetes**, v. 45, p. 531–535, 1996.

SCHWARTZ MW, SEELEY RJ, CAMPFIELD LA, et al. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 98, n. 5, p.1101–1106, 1996.

SCOTT, M. M. et al. Leptin targets in the mouse brain. **Journal of Comparative Neurology**, v. 514, n. 5, p. 518–532, 2009.

SEMPLE B. D. et al. Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury acrossspecies. **Progress in Neurobiology**, p. 1–16, 2013.

SHAFFER, D. R.; KIPP, K. Psicologia do desenvolvimento: Infância e adolescência. 8. ed. São Paulo: **Cengage Learning**. 879 p, 2012.

STIEG, M. R. et al. Leptin: A hormone linking activation of neuroendocrine axes with neuropathology. **Psychoneuroendocrinology**, v. 51, p.47–57. 2015.

SWIETEN, M. M. H. et al. The neuroanatomical function of leptin in the hypothalamus. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 61, p. 207–220. 2014.

TAKADA, S. H. et al. 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.

TAKADA, S. H. et al. Neonatal anoxia in rats: Hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. **Neuroscience**, v. 284, p. 247–259, 2015.

TARTAGLIA, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. **Cell**, v. 83, p. 1263–1271, 1995.

TU, H. et al. Convergent trafficking patterm of leptin after endocytosis mediated by ObRa-Ob-Rd. **Journal of Cellular Physiology**, v. 212, p. 215–222, 2007.

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.

VANNUCCI, R. C.; VANNUCCI, S. J. A model of Perinatal Hypoxic-Ischemic **Brain Damagea. Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 835, p. 234–249, 1997.

VASCONCELOS, R. G. Efeito da influência da anóxia neonatal no comportamento maternal e o desenvolvimento somático e sensório-motor de ratos wistar. 2013. **Tese (Doutorado em Ciências)**. Instituto de Ciência Biomédicas, Universidade de São Paulo, 97 f, 2013.

WEE, N. K. Y. et al. The brain in bone and fuel metabolism. **Bone**, v. 82, p. 23, 2015.

WINDLE, W. F.; BECKER, R. F. Asphyxia neonatorum. An experimental study in the guinea pig. American Journal of Obstetrics & Gynecology, v. 45, p. 183-200, 1943.

WINDLE, W. F.; BECKER, R. F. Effects of anoxia at birth on the central nervous system of the guinea pig, **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 51, p. 213-215, 1942.

XU, K. Gender differences in hypoxic acclimatization in cyclooxygenase-2-deficient mice. **Physiological Reports**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2017.

YANG, G. et al. Modulation of direct leptin signaling by solube leptin receptor. **Molecular Endocrinology**, v. 18, p. 1354–1362, 2004.

YAO, M. et al. Field methods for body composition assessment are valid in healthy Chinese adults. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 310–317, 2002.

YOUNG, L. J; WANG, Z. The neurobiology of pair bonding. **Nature Neuroscience**, v. 7, p. 1048, 2004.

ZHANG, Y. et al. Leptin-receptor-expressing neurons in the dorsomedial hypothalamus and median preoptic area regulate sympathetic brown adipose tissue circuits. **Journal of Neuroscience**, v. 21, p. 1873–1884, 2011.