

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

ESTUDO TRANSGERACIONAL DA EXPRESSÃO
ASTROCITÁRIA DE GFAP APÓS DIETA
HIPERCALÓRICA EM RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

JÉSSICA MOLINA

SÃO PAULO
2016

UNIVERSIDADE PAULISTA – UNIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA AMBIENTAL E
EXPERIMENTAL

ESTUDO TRANSGERACIONAL DA EXPRESSÃO
ASTROCITÁRIA DE GFAP APÓS DIETA
HIPERCALÓRICA EM RATAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Paulista – UNIP para obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Martha Bernardi.

JÉSSICA MOLINA

SÃO PAULO
2016

Molina Jéssica.

Estudo transgeracional da expressão astrocitária de GFAP após dieta hipercalórica em ratas / Jéssica Molina. - 2016.

48 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

Área de Concentração: Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan.

1. Dieta materna. 2. Astrócitos. 3. Transgeracional.
I. Bondan, Eduardo Fernandes (orientador). II. Título.

JÉSSICA MOLINA

**ESTUDO TRANSGERACIONAL DA EXPRESSÃO
ASTROCITÁRIA DE GFAP APÓS DIETA
HIPERCALÓRICA EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação da Universidade Paulista
– UNIP para obtenção do título de Mestre
em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Eduardo Fernandes Bondan - Universidade Paulista – UNIP

Julgamento: _____ Assinatura: _____ / _ / _

Prof. Dr. Jorge Camilo Florio - Universidade de São Paulo – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____ / _ / _

Prof^a. Dr^a. Maria Martha Bernardi - Universidade Paulista – UNIP

Julgamento: _____ Assinatura: _____ / _ / _

AGRADECIMENTOS

A Deus por me conceder saúde e disposição para trilhar esse novo caminho do conhecimento.

À minha família, minha mãe Selma, meus irmãos Vinícius e Diogo, por jamais me abandonarem nas fases difíceis, por acreditarem em mim mais do que eu mesma em muitas ocasiões, por me encorajarem a seguir em frente diante das tantas adversidades, por me amarem e me compreenderem e por manterem a união acima de tudo.

Ao meu marido Rodrigo, que seguiu de mãos dadas comigo sem hesitar, me apoiando, ajudando e mostrando a cada dia o significado de amor, paciência, respeito e resiliência. Sem o seu amor e carinho, certamente teria sido tudo muito mais difícil, obrigada meu amor!

Aos meus tantos amigos, tão especiais, que sentiram a minha ausência neste período, mas sempre me compreenderam e torceram pelo meu sucesso e crescimento. Sei que sou afortunada por tê-los em minha vida.

À professora e amiga Andréia Joaquim por me ajudar tanto, por me iluminar e guiar desde a minha formação, me mostrando como ser uma pessoa e profissional melhor. Sem ela, nada disso teria sido possível.

Aos meus grandes e admiráveis mestres Cyntia Bedeschi e Cristiano Baldan, por me inspirarem e alimentarem em mim o desejo e a paixão pela docência, por despertarem o meu amor pela neurociência e pelos seres humanos e, fundamentalmente, por acreditarem em mim e na qualidade do meu trabalho.

Ao generoso casal Pietro e Lígia, por dividirem os seus conhecimentos sempre com muita disposição, obrigada!

Ao professor e orientador Eduardo Bondan e à professora e co-orientadora Martha Bernardi, por se dedicarem tanto a este projeto, me ajudando a alcançar voos antes nunca imaginados.

A todos os professores do programa de pós-graduação da Universidade Paulista, por acrescentarem conhecimento e agregarem experiências maravilhosas ao longo deste período, sempre com muita competência e qualidade.

Aos animais que participaram desta pesquisa, o meu profundo respeito.

RESUMO

Sabe-se que a obesidade tem tomado proporções alarmantes em todo o mundo nas últimas décadas, sendo considerada um problema grave de saúde e um fator de risco para o diabetes, a hipertensão arterial sistêmica, alguns tipos de câncer, certas desordens reprodutivas e distúrbios metabólicos. Neste estudo, objetivou-se observar a resposta astrocitária transgeracional em diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC) por meio da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP) após uma dieta hipercalórica (HD) em ratas. Observou-se que ratas alimentadas com HD altamente palatável (Ensure®) durante a puberdade (23-65 dias de idade) apresentaram aumento significativo da expressão de GFAP em todas as áreas do SNC avaliadas, quando comparadas às ratas que receberam dieta normocalórica (ND) na geração F0. Ao analisar-se a reação astrocitária após desafio com lipopolissacarídeo (LPS) na geração F1, foram observadas alterações fenotípicas adaptativas, com redução da área de processos astrocitários nas diferentes áreas do SNC analisadas após desafio com LPS nos machos nascidos das mães que receberam HD em relação àqueles originários de mães alimentadas com ND.

Palavras-chaves: Dieta materna. Astrócitos. Efeitos transgeracionais.

ABSTRACT

It is known that obesity has taken alarming proportions in the whole world for the past decades, been considered a severe health problem and a potential risk for diabetes, systemic arterial hypertension, some types of cancer and certain reproductive and metabolic disorders. In this study, the goal was to observe the astrocytic transgenerational response in different areas of the central nervous system (CNS) through the expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) after a hypercaloric diet (HD) in rats. It was observed that the rats that were fed with highly palatable HD (Ensure®) during puberty (23-65 days old) presented a significant increase of GFAP expression in all SNC evaluated areas, when compared to rats that received a normocaloric diet (ND) in generation F0. While analyzing the astrocytic reaction after the challenge with lipopolysaccharides (LPS) in generation F1, adaptive phenotypic changes were observed, with a reduction of the area of astrocytic processes in the different SNC areas analyzed after the challenge with LPS on males born from mothers that received HD in relation to those from mothers that were fed with ND.

Key words: Maternal diet. Astrocytes. Transgenerational effects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão de GFAP nos grupos F0ND e F0HD no corpo caloso, córtex frontal, córtex parietal, núcleos arqueado, periventricular, accumbens, ponte, camadas granular e molecular do cerebelo. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (F0ND, n=6; F0HD, n=6). *** $p < 0.001$ (teste U de Mann-Whitney).....23

Figura 2 – Expressão de GFAP nos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS e F1HDLPS no corpo caloso (A), córtex frontal (B), córtex parietal (C), núcleos arqueado (D), periventricular (E) e accumbens (F), ponte (G) e camadas granular (H) e molecular (I) do cerebelo. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (F1NDS, n=6; F1HDS, n=6; F1NDLPS, n=6; F1HDLPS, n=6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).....26

Figura 3 – Fotomicrografias

Figura 3A – Fotomicrografias do corpo caloso nos grupos F0ND e F0HD. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.28

Figura 3B – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD no córtex frontal. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.28

Figura 3C – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD no córtex parietal. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.28

Figura 3D – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD no núcleo arqueado. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.29

Figura 3E – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD no núcleo periventricular. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.29

Figura 3F – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD na ponte. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.29

Figura 3G – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD na camada granular do cerebelo. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.....30

Figura 3H – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD na camada molecular do cerebelo. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.....30

Figura 4A – Fotomicrografias do corpo caloso nos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.31

Figura 4B – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS no córtex frontal. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.....32

Figura 4C – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS no córtex parietal. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.....33

Figuro 4D – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS no núcleo arqueado. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.....	34
Figuro 4E – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS no núcleo periventricular. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.	35
Figuro 4F – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS na ponte. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.....	36
Figuro 4G – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS na camada granular do cerebelo. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.....	37
Figuro 4H – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS na camada molecular do cerebelo. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Interação dieta x tratamento nos grupos da geração F1 de mães que receberam dieta normo ou hipercalórica, tratados ou não com LPS.....25

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Expressão de GFAP em diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC) de ratas que foram alimentadas com dieta normocalórica (ND) e dieta hipercalórica (HD) durante a puberdade da geração F0. Dados expressos em média (pixels) \pm erro padrão da média.....24
- Tabela 2** – Expressão de GFAP em diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC) da prole de ratas que receberam dieta normocalórica (ND) e dieta hipercalórica (HD) - geração F1 - observadas com ou sem administração de LPS. Dados expressos em média (pixels) \pm erro padrão da média.27

LISTA DE ABREVIATURAS

COX-2	ciclo-oxigenase - 2
F0HD	grupo de ratas da geração F0 que recebeu dieta hipercalórica
F1HDLPS	grupo de ratos da geração F1, cujas mães receberam dieta hipercalórica, e que foi tratado com LPS
F1HDS	grupo de ratos da geração F1, cujas mães receberam dieta hipercalórica, e que foi tratado com solução salina
F0ND	grupo de ratas da geração F0 que recebeu dieta normocalórica
F1NDLPS	grupo de ratos da geração F1, cujas mães receberam dieta normocalórica, e que foi tratado com LPS
F1NDS	grupo de ratos da geração F1, cujas mães receberam dieta normocalórica, e que foi tratado com solução salina
GFAP	glial fibrillary acidic protein (proteína glial fibrilar ácida)
HD	hypercaloric diet (dieta hipercalórica)
H-E	Hematoxilina-Eosina
IL	interleucina
IL-1β	inteleucina - 1 beta
IL-6	interleucina - 6
IMC	índice de massa corpórea
LPS	lipopolissacarídeo
ND	normocaloric diet (dieta normocalórica)
PND	dia de vida pós-natal
SM	síndrome metabólica
SNC	sistema nervoso central
SOCS3	supressor da citocina sinalizadora 3
TLR	Toll-like receptor
TLR2	Toll-like receptor 2
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF-α	fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	14
3	REVISÃO DA LITERATURA	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Análise do Comitê de Ética	19
4.2	Animais	19
4.3	Desenho do experimento	20
4.4	Dieta hipercalórica	20
4.5	Marcação imuno-histoquímica da GFAP	21
4.6	Análise Estatística	22
5	RESULTADOS	23
5.1	Estudo na geração F0	23
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, a obesidade assumiu proporções alarmantes no mundo inteiro, paralelamente ao aumento do sedentarismo e ao fácil acesso a alimentos altamente palatáveis e hipercalóricos (MANNA et al., 2006).

Estima-se que, atualmente, 3 a 4 adultos em cada 10, em todo o mundo, são obesos, definidos como indivíduos com um índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 30 kg/m² (RHODES et al., 2009).

Estudos experimentais em modelos animais e humanos têm destacado a ligação entre alterações do ambiente no início da vida e o aumento do risco à obesidade e a distúrbios metabólicos na vida adulta. Essa ligação é estabelecida como uma hipótese da programação do desenvolvimento, na qual as influências ambientais durante períodos críticos da plasticidade do desenvolvimento podem provocar efeitos ao longo da vida sobre a saúde e o bem-estar dos filhos. Em particular, o meio nutritivo no qual o feto ou lactente se desenvolve influencia o risco de distúrbios metabólicos nos descendentes (VICKERS, 2014).

Os astrócitos respondem a mudanças no sistema nervoso central (SNC) passando por alterações morfológicas e funcionais que influenciam na atividade neuronal. Quando o SNC é submetido a situações de agressão, os astrócitos podem tornar-se hipertróficos ou assumir um fenótipo reativo. A astrogliose é caracterizada pela maior expressão de estruturas proteicas específicas, tal como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (JOAQUIM et al., 2015). Assim, os astrócitos podem desempenhar papel único na promoção da resposta inflamatória hipotalâmica na obesidade (GARCIA-CACERES et al., 2013; GUYENET et al., 2013; RODRIGUEZ-HERNANDEZ et al., 2013).

Muitos estudos avaliaram a resposta astrocitária após dieta hipercalórica em regiões hipotalâmicas; porém, pouco se sabe dessas respostas em outras áreas do SNC. Também é pouco conhecido o efeito de longo prazo de uma dieta hipercalórica na mãe durante a puberdade e o início de sua idade adulta sobre aspectos endócrinos e imunes de seus filhotes.

Dessa forma, o presente estudo visa estudar nas gerações F0 e F1 a expressão astrocitária de GFAP em várias áreas do SNC após uma dieta hipercalórica em ratas.

2 OBJETIVO

O objetivo principal do presente estudo foi o de avaliar os efeitos transgeracionais da dieta hipercalórica (HD) e normocalórica (ND) administrada na puberdade da geração F0 sobre o comportamento dos astrócitos das gerações F0 e F1.

O comportamento astrocitário na geração F0 após consumo de HD e ND foi observado mediante a avaliação da expressão da GFAP em diversas áreas do SNC tais como corpo caloso, córtex frontal, córtex parietal, núcleos arqueado, periventricular e accumbens, ponte e camadas granular e molecular do cerebelo. Além disso, foi observado o comportamento astrocitário na geração F1 proveniente de ratas que receberam HD e ND, com e sem ativação imunológica induzida pelo LPS.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A obesidade é um fator de risco para o diabetes, as doenças cardiovasculares, a osteoartrite, alguns tipos de câncer e certas desordens reprodutivas e distúrbios metabólicos (FERNANDEZ et al., 2011).

Sabe-se que a síndrome metabólica (SM) é um complexo distúrbio metabólico provocado pela quebra da homeostasia corporal, razão pela qual é também definida como a “síndrome da civilização”, por se tratar de um distúrbio que envolve o metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas provenientes da dieta, bem como a programação e a predisposição genética (GOTTLIEB et al., 2008).

A homeostase energética, isto é, o equilíbrio entre a ingestão de alimentos e o gasto energético, é um processo extremamente sensível e regulado pelo SNC. Mediadas por impulsos nutricionais, humorais e nervosos para o encéfalo, informações provenientes da periferia sobre o estado de energia são integradas pelos núcleos do hipotálamo e do tronco encefálico e retransmitidas para outros circuitos neurais, tais como as vias mesolímbicas dopaminérgicas (BUCKMAN; ELLACOTT, 2014).

Uma causa recentemente reconhecida da epidemia da obesidade são os efeitos da programação do desenvolvimento de crianças nascidas de mães obesas ou portadoras de diabetes gestacional. Os mecanismos que resultam em obesidade nos seus descendentes incluem a programação da via de apetite no hipotálamo e os sinais que regulam a adipogênese. Os processos incluem sensores de nutrientes, modificações epigenéticas e alterações em precursores de células-tronco dos neurônios do apetite e da saciedade e dos adipócitos, que são modulados para potencializar a obesidade nos descendentes (ROSS; DESAI, 2013).

A obesidade é também uma condição pró-inflamatória na qual adipócitos hipertrofiados e células do sistema imunológico presentes no tecido adiposo (principalmente macrófagos e linfócitos) contribuem para o aumento dos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias (MAKKI et al., 2013).

Estudos têm demonstrado que as células gliais estão intimamente envolvidas na produção da inflamação hipotalâmica, que é resultante de uma dieta rica em gordura e que está ligada ao aumento da resistência à insulina, embora, em seus achados, Buckman et al. (2013) sugiram que o aumento da imunorreatividade ao

GFAP no hipotálamo está ligado a modelos de obesidade e não somente à dieta rica em gordura por si só.

As células da glia são geralmente classificadas em micróglia e macróglia, com este último grupo incluindo astrócitos, oligodendrócitos, tanicitos e células endoteliais (ARGENTE-ARIZÓN et al., 2015). O hipotálamo mediobasal está posicionado próximo da eminência média, sendo uma das estruturas mais próximas ao terceiro ventrículo, uma das áreas mais sensíveis aos fatores sanguíneos. Sendo assim, não é surpreendente que este seja o primeiro local onde ocorre uma importante resposta reativa nos indivíduos expostos à dieta hipercalórica (KALIN et al., 2015; THALER et al., 2012).

Buckman et al. (2013) mostram, em seu estudo, uma maior imunorreatividade à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em estruturas próximas ao terceiro ventrículo, quando comparadas a outras áreas do encéfalo numa situação de dieta hipercalórica induzida em ratas.

Após a exposição à dieta rica em gordura, os neurônios do núcleo arqueado e da eminência média, assim como os astrócitos e a micróglia dessas áreas, expressam vários marcadores de dano celular, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6), o supressor de sinalização da citocina 3 (SOCS 3), dentre outros. A expressão da GFAP e do receptor do tipo Toll 4 (TLR 4) também acompanha o processo de neuroinflamação. Esses efeitos são seguidos de expansão da massa corporal, caracterizando a antecipação da neuroinflamação em relação ao sobrepeso e à obesidade (THALER et al., 2012).

Muitos estudos apontam que o nível de marcação de GFAP, que é largamente expressa em astrócitos, está aumentado em regiões específicas do encéfalo em resposta à injúria do SNC (DE KLOET et al., 2014).

Como centro de controle metabólico, o hipotálamo mediobasal rapidamente responde aos desafios das alterações metabólicas. Essa capacidade é refletida pela observação de que, mesmo após um dia de dieta hipercalórica em ratos, há imediato aumento de reatividade da micróglia no hipotálamo mediobasal, assim como aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF. Essas respostas inflamatórias persistem sob tal condição de dieta hipercalórica (KALIN et al., 2015).

Martínez et al. (2012) caracterizaram a inflamação como uma resposta biológica complexa de proteção para combater estímulos nocivos, a fim de manter a

homeostase celular, incluindo a defesa do hospedeiro, a remodelação de tecidos e alterações metabólicas. Tal resposta envolve vários mecanismos, tais como a participação de células do sistema imunológico (recrutamento e ativação de monócitos, linfócitos T e B e células dendríticas), o envolvimento de diferentes mediadores (IL, TNF- α , leptina, adipocinas etc.), a regulação das vias de sinalização e, eventualmente, a regulação epigenética da expressão de alguns genes relacionados.

Em roedores, a HD e a obesidade induzida levam a um aumento dos fatores inflamatórios e de células do sistema imune em tecidos periféricos e em regiões do encéfalo que são essenciais para a manutenção do balanço energético (THALER et al., 2012; SHOELSON et al., 2006; DE KLOET et al., 2014) e é possível que esse acúmulo de astrócitos e microglia em regiões específicas do encéfalo desempenhem um papel importante no desbalanço da homeostase energética (ZHANG et al., 2008; DE KLOET et al., 2014), assim como mostrou Holmes et al. (2016) que observaram aumento da expressão de GFAP e gliose em ratos obesos, contrastando com os efeitos gliais em ratos magros.

Ainda sobre a comparação de indivíduos magros e obesos, Guillemot-Legris et al. (2016) relataram que indivíduos obesos apresentam diferenças na densidade da substância cinzenta tanto no cerebelo quanto no córtex cerebral, quando comparados a indivíduos magros, sugerindo que a obesidade foi capaz de induzir alterações morfológicas nessas duas áreas do encéfalo.

A astrogliose reativa é caracterizada pela hipertrofia celular e pelo aumento da expressão de componentes dos filamentos intermediários, tais como a GFAP, a vimentina e a nestina (BUCKMAN; ELLACOTT, 2014).

Os astrócitos são as células mais abundantes e diversificadas do SNC. Há aproximadamente cinco vezes mais astrócitos do que neurônios, embora essa proporção varie de uma área do SNC a outra. Essas células da macróglia são originárias da ectoderme e possuem localização privilegiada por todo o SNC, fazendo parte da barreira hematoencefálica e em contato íntimo com os vasos sanguíneos e elementos sinápticos, o que as torna componentes essenciais de comunicação entre o SNC e a periferia. Uma função importante dessas células gliais é a de fornecer nutrientes e outras substâncias essenciais para os neurônios a partir do sangue, promovendo, assim, a sobrevivência neuronal e contribuindo para a manutenção da homeostase do SNC (ARGENTE-ARIZÓN et al., 2015) e, assim como as células da micróglia, os astrócitos participam das respostas imunológicas

do SNC e do desenvolvimento da resposta inflamatória no encéfalo e na medula espinhal (ASCHNER, 1998; SCHWARZ; BILBO, 2012).

Uma maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da obesidade pode ser a chave para a geração de estratégias novas e mais eficazes para o tratamento desse problema grave de saúde. Por meio de circuitos neuronais e de peptídios, o hipotálamo regula a ingestão de alimentos e o gasto de energia, de forma que um controle hipotalâmico prejudicado levará ao acúmulo de lipídios e ao ganho de peso corporal (GARCIA-CÁRCERES et al., 2013).

A organização dos circuitos metabólicos e das células da glia bem como o seu grau de plasticidade podem ser preditivos de uma possível vulnerabilidade do indivíduo que foi induzido ao consumo de HD (HORVATH et al., 2010; CHOWEN et al., 2013). Embora a genética seja, sem dúvida, uma força motriz na determinação dessa organização, fatores ambientais durante desenvolvimento também têm efeitos permanentes. Fatores nutricionais e hormonais iniciais, incluindo modificações nos níveis de leptina, alteram o desenvolvimento dos circuitos metabólicos (BOURET et al., 2008; BOURET et al., 2004; CHOWEN et al., 2013).

Uma ampla gama de fatores nutricionais durante a gravidez e a lactação, incluindo a desnutrição e a obesidade materna, pode levar a uma variedade de desordens metabólicas nos filhotes. Evidências experimentais e clínicas sugerem que a programação do desenvolvimento deve ser considerada como um fenômeno transgeracional e, portanto, é muitas vezes vista como uma forma de herança epigenética, via maternal ou por linhagens parentais (JOAQUIM et al., 2015).

A presença de um ambiente impróprio no período embrionário ou neonatal pode aumentar a susceptibilidade para algumas doenças ao longo da vida. Em condições ambientais adversas, o feto pode sofrer uma alteração de processos fisiológicos, o que pode ser benéfico inicialmente para promover a sobrevivência, mas gerando má adaptação na vida pós-natal e, assim, prejudicando a saúde no longo prazo (PEREZ-TORRENO, 2003; RAO et al., 2012).

Muitos estudos, como os de Cai (2013), Maric et al. (2014), Miller e Spencer (2014) e Gzielo et al. (2016), abordam a neuroinflamação após consumo de HD principalmente na região hipotalâmica, por ser essa a região responsável pela homeostasia energética (ou seja, o controle do balanço nutricional); porém ainda poucos estudos abordam a presença de neuroinflamação em outras áreas do encéfalo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Análise do Comitê de Ética

Foram utilizadas lâminas de encéfalo de ratos Wistar do experimento realizado por JOAQUIM et al. (2015) (protocolo nº. 130/12, CEUA/ICS/UNIP, 28/11/2012). Os experimentos foram realizados de acordo com os protocolos de boas práticas laboratoriais e todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais foram realizados.

4.2 Animais

Ratos Wistar fêmeas adultas, com 11-12 semanas de idade e pesando entre 200-250g (geração F0) e ratos machos com experiência sexual (12-14 semanas de idade) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade São Paulo (São Paulo, Brasil) foram inicialmente selecionados.

Após a chegada ao laboratório, os ratos foram instalados em gaiolas em condições controladas de temperatura (22-26°C), umidade (50-65%), com ciclo artificial de luz a cada 12 horas (luzes acesas às 7:00 horas) e alimentação livre. Dez dias após a chegada ao laboratório, as fêmeas foram cruzadas com os machos para obter a geração F0. Entre o nonagésimo e nonagésimo quinto dia de vida pós-natal (PND), os ratos fêmeas da geração F0 foram cruzados com machos experientes para obter a geração F1.

Foi permitido que todas as mães tivessem o parto de forma normal, assim como foi permitido que amamentassem a prole. Nenhum manuseio foi realizado no primeiro dia de vida para evitar o canibalismo (DESANTIS; SCHMALTZ, 1984). No 2° PND, os filhotes foram selecionados de forma aleatória. Esse procedimento foi realizado precocemente no dia 2° PND para evitar diferenças provocadas pela amamentação materna, que poderia interferir no ganho de peso da prole (MORAG et al., 1975). Nenhum procedimento de *cross-fostering* foi utilizado (CHIAVEGATTO; BERNARDI, 1991). Os oito filhotes selecionados de forma aleatória permaneceram com suas mães até o desmame no 21° PND. Após esse período, foram separados por sexo e instalados nas mesmas condições de seus progenitores.

4.3 Desenho do experimento

As fêmeas da geração F0 foram divididas em dois grupos. Metade delas recebeu dieta hipercalórica (HD) altamente palatável (Ensure®) durante a sua puberdade (dos 23 aos 65 dias de vida) (grupo F0HD, n=12) e a outra metade recebeu dieta normocalórica (ND) no mesmo período (dos 23 aos 65 dias de vida) (grupo F0ND). Metade das fêmeas da geração F0, pertencentes aos grupos F0HD e F0ND, foram eutanasiadas para análise da expressão de GFAP no córtex frontal e córtex parietal, no núcleo accumbens, no corpo caloso, nos núcleos arqueado e periventricular do hipotálamo, na ponte e nas camadas granular e molecular do cerebelo. A outra metade das fêmeas foi cruzada com machos experientes escolhidos aleatoriamente (2 machos por ninhada) para obter a geração F1. Os filhotes machos da geração F1, no 50º dia pós-natal, foram subdivididos em dois grupos que receberam 1 mL/Kg de solução salina a 0,9% por via intraperitoneal (grupos F1HDS, n=6 e F1NDS, n=6) e dois que receberam 100µg/kg de LPS por via intraperitoneal (grupos F1HDLPS, n=6 e F1NDLPS, n=6).

A geração F1 foi dividida, portanto, em 4 grupos - 2 grupos receberam 100 µg/Kg de LPS, sendo um originário de mães que receberam HD e outro, de mães que receberam ND (grupos F1HDLPS e F1NDLPS, respectivamente). O desafio com LPS foi realizado para avaliar eventuais mudanças na prole associadas à dieta hipercalórica em F0. Os outros 2 grupos de F1 receberam 1mL/Kg de solução salina a 0,9%, sendo também um de origem de mães que receberam HD e outro sendo de origem de mães que receberam ND (F1NDS e F1HDS). Após 24 horas, a geração F1 foi submetida à eutanásia e porções do encéfalo foram coletadas para mensuração da expressão de GFAP no córtex frontal e parietal, no corpo caloso, no núcleo accumbens, nos núcleos periventricular e arqueado do hipotálamo, nas camadas molecular e granular do cerebelo e na ponte.

4.4 Dieta hipercalórica

Ratos fêmeas do grupo F0HD tiveram livre acesso à dieta hipercalórica (Ensure®; Abbot Brasil, São Paulo, Brasil; total de 1kcal ml^{-1} associada com a dieta do laboratório Nuvilab; Sogorb Indústria e Comércio, São Paulo, Brasil). Ensure é uma dieta líquida muito palatável; cada garrafa possui 231 kcal, contendo 1,7g de

gordura poli-insaturada, 3,59g de gordura monossaturada e 2,2g de gordura saturada. Não contém nenhum tipo de gordura-trans. Foi oferecida em um cilindro graduado com uma tampa, com 600 mL por garrafa. Ratos dos grupos HD e ND foram mantidos em gaiolas separadas e o Ensure e a dieta padrão foram disponibilizadas nas gaiolas como um todo. O consumo de ambas as dietas foi mensurado diariamente e ambas as dietas foram trocadas diariamente.

4.5 Marcação imuno-histoquímica da GFAP

O encéfalo dos animais do experimento foi coletado após eutanásia e fixado em solução de formol a 10% em tampão fosfato por pelo menos 48 horas para desidratação, diafanização e inclusão em parafina. Cortes transversais de 5 μ m foram obtidos, montados em lâminas histológicas e corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H-E), sendo observados e fotografados em fotomicroscópio Nikon E200.

Cortes histológicos de blocos selecionados foram colhidos em lâminas tratadas com silano (Sigma) a 4% em acetona, objetivando uma melhor aderência dos mesmos. Tais cortes foram desparafinados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol absoluto, etanol a 95%, a 80%, a 70% e a 50% e, a seguir, fervidos durante 15 minutos em forno de micro-ondas convencional (potência máxima), imersos em tampão citrato 0,01 M (ácido cítrico 0,01 M e citrato de sódio 0,01 M, 1:3, pH 6,0). Depois de resfriados durante 20 minutos, a peroxidase endógena foi bloqueada incubando-se as lâminas por 30 minutos em metanol contendo 10% de peróxido de hidrogênio 30 volumes.

Para a marcação imuno-histoquímica da GFAP, o método utilizado foi o da avidina-biotina, seguindo protocolo de SANCHEZ et al. (2006), sendo cada procedimento intercalado por lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fosfato.

Os cortes foram incubados durante 16 horas a 40C em câmara úmida, com o anticorpo monoclonal primário anti-GFAP (Rabbit anti-cow GFA, code number ZO334, Dako), padronizado na diluição 1:1000, a qual, por prévia titulação, foi considerada a mais adequada. Para tal diluição foi utilizada solução contendo soro-albumina bovina a 5% em água destilada (1,25 mL), azida sódica a 5% em água destilada (2,5 mL) e solução salina tamponada (59 ml).

Posteriormente, foi realizada a incubação dos cortes por 30 minutos com o anticorpo secundário anti-imunoglobulinas de coelho (Universal LSABTM 2 Kit / HRP, Rb / Mo, K0609-1, Dako) na diluição 1:400 e, após, a aplicação por 30 minutos do conjugado estreptavidina-biotina-peroxidase, foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (Universal LSABTM 2 Kit / HRP, Rb / Mo, Dako).

A imunorreatividade foi visualizada pela aplicação sobre os cortes de diaminobenzidina (DAB, Sigma) a 0,1% como cromógeno e peróxido de hidrogênio a 0,5%. Os cortes foram contracolorados com hematoxilina, desidratados, diafanizados e montados com resina sintética sob lamínula. Todas as reações foram acompanhadas por lâminas controle negativo, submetidas a todas as etapas do procedimento; porém, suprimindo-se a aplicação do anticorpo primário.

Dez fotomicrografias do córtex frontal, do córtex parietal, do corpo caloso, do núcleo periventricular do hipotálamo, da ponte e das camadas molecular e granular do cerebelo e duas fotomicrografias do núcleo accumbens e do núcleo arqueado do hipotálamo foram feitas usando objetiva de 40x do microscópio Nikon E200. A área de astrócitos e de seus processos, marcados em marrom, foram automaticamente calculadas, em pixels, por meio do software Methamorph®, calibrado com os filtros de cores digitais regulando os bits vermelho, verde e azul. Dessa forma, apenas as células positivas foram incluídas e o fundo foi excluído da medida. Os resultados obtidos para os distintos grupos foram analisados estatisticamente para possíveis diferenças.

4.6 Análise Estatística

A homoscedasticidade foi avaliada usando o teste-F ou o teste de Bartlett. A normalidade foi verificada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste U de Mann-Whitney foi usado para comparar os dados entre os grupos da geração F0. ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni foi usada para os grupos da geração F1 na intenção de analisar resultados com dois fatores: dieta e tratamento (LPS). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Em todos os casos, os resultados foram considerados significantes se $p < 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo na geração F0

Todas as áreas do SNC analisadas apresentaram maior expressão de GFAP nos animais do grupo F0HD comparados com os do grupo F0ND ($p < 0.001$). Os resultados nas diferentes áreas são apresentados na Figura 1 e Tabela 1. As fotomicrografias de cada área analisada no presente estudo são apresentadas nas Figuras 3A (corpo caloso), 3B (córtex frontal), 3C (córtex parietal), 3D (núcleo arqueado), 3E (núcleo periventricular), 3F (ponte), 3G (camada granular do cerebelo) e 3H (camada molecular do cerebelo).

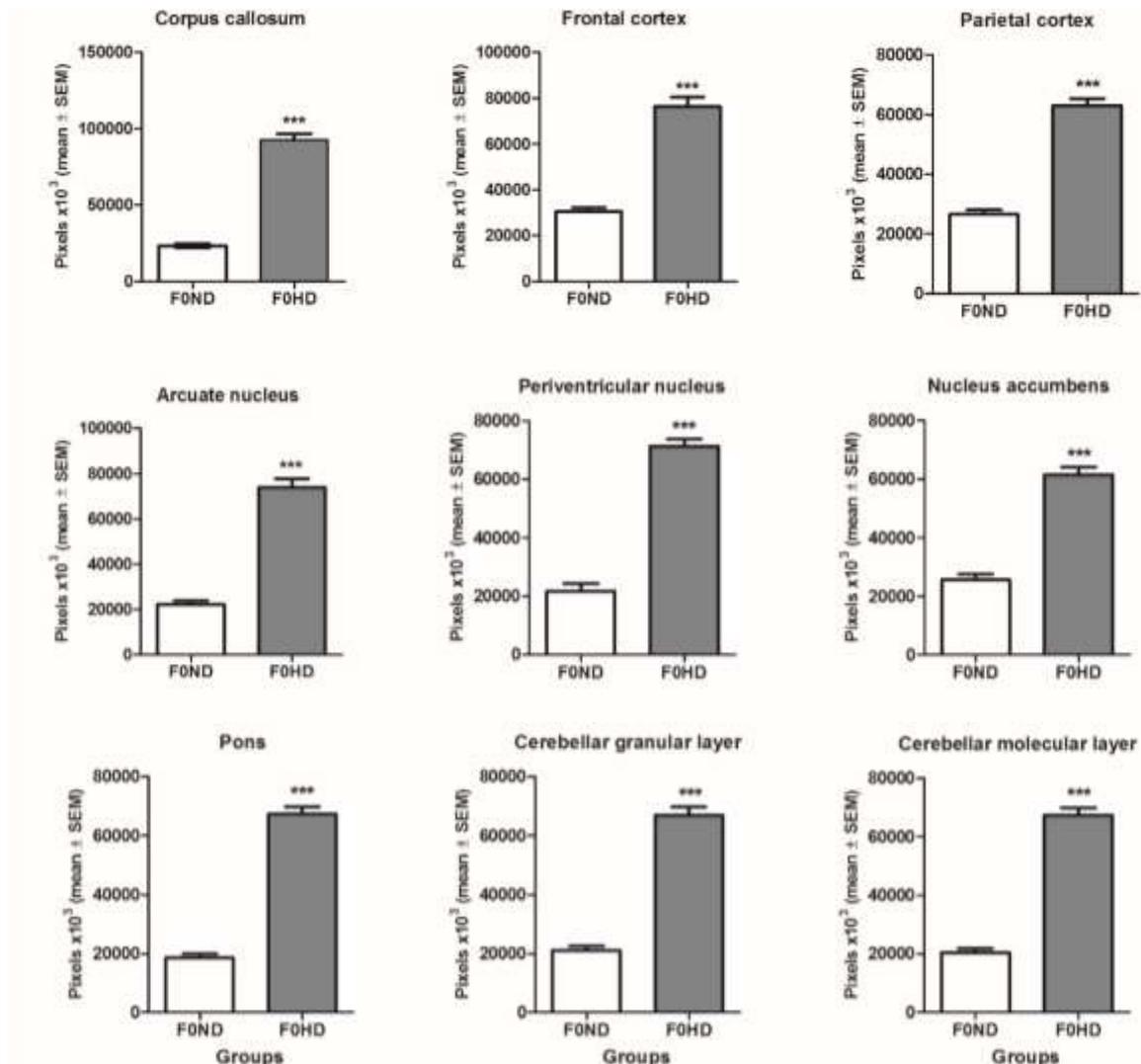


Figura 1 – Expressão de GFAP nos grupos F0ND e F0HD no corpo caloso, córtex frontal, córtex parietal, núcleos arqueado, periventricular, accumbens, ponte, camadas granular e molecular do cerebelo. Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média (F0ND, n=6; F0HD, n=6). *** $p < 0.001$ (teste U de Mann-Whitney).

Tabela 1 – Expressão de GFAP em diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC) de ratas que foram alimentadas com dieta normocalórica (ND) e dieta hipercalórica (HD) durante a puberdade da geração F0. Dados expressos em média (pixels) \pm erro padrão da média.

ÁREA	GRUPOS	
	F0ND	F0HD
CORPO CALOSO	23480 \pm 1203	92520 \pm 4316
CÓRTEX FRONTAL	30650 \pm 1643	76280 \pm 4188
CÓRTEX PARIETAL	26500 \pm 1523	63060 \pm 2286
NÚCLEO ACCUMBENS	25580 \pm 1978	61470 \pm 2500
NÚCLEO PERIVENTRICULAR	21760 \pm 2458	71330 \pm 2377
NÚCLEO ARQUEADO	22180 \pm 1836	73980 \pm 3908
PONTE	18470 \pm 1327	67230 \pm 2562
CAMADA MOLECULAR DO	20380 \pm 1505	67280 \pm 2557
CEREBELO		
CAMADA GRANULAR DO	21050 \pm 1434	66870 \pm 2844
CEREBELO		

F0ND - grupo de ratas da geração F0 que receberam dieta normocalórica;
 F0HD - grupo de ratas da geração F0 que receberam dieta hipercalórica.

Como apresentado a seguir no Quadro 1, na Figura 2 e na Tabela 2, todas as áreas do SNC analisadas apresentaram redução significativa ($p < 0.001$) na expressão de GFAP em resposta ao desafio com LPS no grupo HD quando comparado ao grupo ND, exibindo efeito da dieta e do tratamento, com interação entre os fatores.

Apesar da tendência de redução da expressão de GFAP em todas as áreas do encéfalo analisadas após injeção de solução salina no grupo originário de mães que receberam HD, só se observou diferença significativa no núcleo periventricular ($p < 0,05$), na ponte ($p < 0,01$) e na camada molecular do cerebelo ($p < 0,05$) do grupo F1HDS. As fotomicrografias de cada área analisada no presente estudo da geração F1 são apresentadas nas Figuras 4A (corpo caloso), 4B (córtex frontal), 4C (córtex parietal), 4D (núcleo arqueado), 4E (núcleo periventricular), 4F (ponte), 4G (camada granular do cerebelo) e 4H (camada molecular do cerebelo).

Quadro 1 – Interação dieta x tratamento nos grupos da geração F1 de mães que receberam dieta normo ou hipercalórica, tratados ou não com LPS.

Estrutura	ANOVA	BONFERRONI
Corpo caloso	Interação: $F_{1,92} = 4,94$, $p = 0,027$ Dieta - $F_{1,92} = 8,41$, $p = 0,0047$ Tratamento - $F_{1,92} = 13,31$, $p = 0,0004$	Grupo LPS - $p < 0,001$
Córtex frontal	Interação: $F_{1,92} = 53,15$, $p < 0,0001$ Dieta - $F_{1,92} = 108,31$, $p < 0,0001$ Tratamento - $F_{1,92} = 174,19$, $p < 0,0001$	Grupo LPS - $p < 0,001$
Córtex parietal	Interação: $F_{1,92} = 41,05$, $p < 0,0001$ Dieta - $F_{1,92} = 84,82$, $p < 0,0001$ Tratamento - $F_{248,58}$, $p < 0,0001$	Grupo LPS - $p < 0,001$
Núcleo arqueado	Interação: $F_{1,44} = 49,38$, $p < 0,0001$ Dieta - $F_{1,44} = 88,02$, $p < 0,0001$ Tratamento - $F_{1,44} = 185,88$, $p < 0,0001$	Grupo LPS - $p < 0,001$
Núcleo periventricular	Interação: $F_{1,92} = 62,23$, $p < 0,0001$ Dieta - $F_{1,92} = 136,85$, $p < 0,0001$ Tratamento - $F_{1,92} = 279,27$, $p < 0,0001$	Grupo LPS - $p < 0,001$ Grupo salina - $p < 0,05$
Núcleo accumbens	Interação: $F_{1,44} = 32,26$, $p < 0,0001$ Dieta - $F_{1,44} = 65,21$, $p < 0,0001$ Tratamento - $F_{1,44} = 254,90$, $p < 0,0001$	Grupo LPS - $p < 0,001$
Ponte	Interação: $F_{1,92} = 81,90$, $p < 0,0001$ Dieta - $F_{1,92} = 161,26$, $p < 0,0001$ Tratamento - $F_{1,92}$, $p < 0,0001$	Grupo LPS - $p < 0,001$ Grupo salina - $p < 0,01$
Camada granular	Interação: $F_{1,92} = 81,90$, $p < 0,0001$ Dieta - $F_{1,92} = 146,77$, $p < 0,0001$ Tratamento - $F_{1,92} = 400,56$, $p < 0,0001$	Grupo LPS - $p < 0,001$
Camada molecular	Interação: $F_{1,92} = 95,50$, $p < 0,0001$ Dieta - $F_{1,92} = 175,88$, $p < 0,0001$ Tratamento - $F_{1,92} = 451,06$, $p < 0,0001$	Grupo LPS - $p < 0,001$ Grupo salina - $p < 0,05$

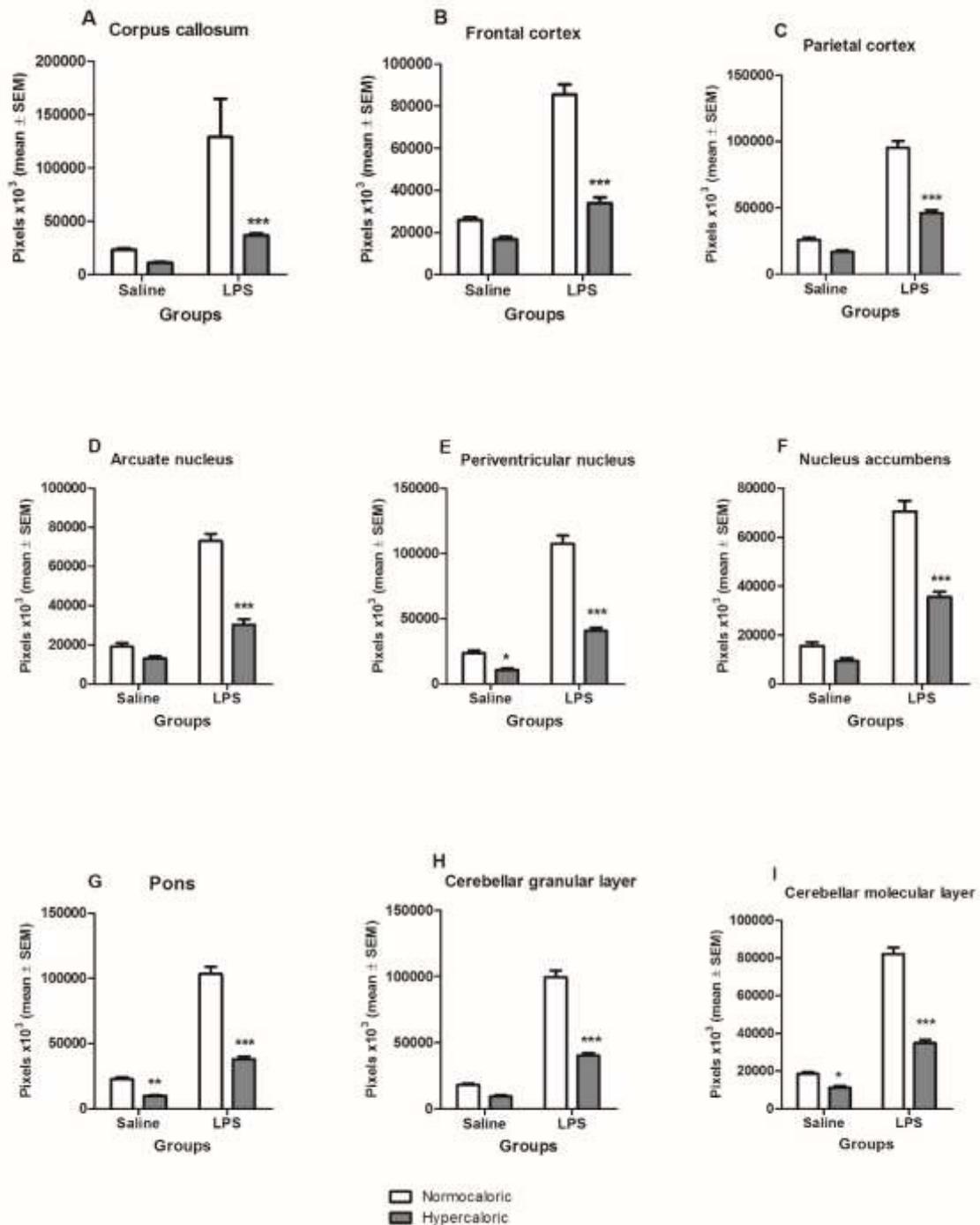


Figura 2 – Expressão de GFAP nos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS e F1HDLPS no corpo caloso (A), córtex frontal (B), córtex parietal (C), núcleos arqueado (D), periventricular (E) e accumbens (F), ponte (G) e camadas granular (H) e molecular (I) do cerebelo. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média (FNDS, n=6; F1HDS, n 6; F1NDLPS, n=6; F1HDLPS, n=6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni).

Tabela 2 – Expressão de GFAP em diferentes áreas do sistema nervoso central (SNC) da prole de ratas que receberam dieta normocalórica (ND) e dieta hipercalórica (HD) - geração F1 - observadas com ou sem administração de LPS. Dados expressos em média (pixels) \pm erro padrão da média.

Área	Grupos			
	F1NDS	F1NDLPS	F1HDS	F1HDLPS
Corpo caloso	23380 \pm 1734	129000 \pm 35880	11180 \pm 775	36850 \pm 2093
Córtex frontal	25840 \pm 1444	85440 \pm 4787	16780 \pm 1209	33960 \pm 1727
Córtex parietal	25640 \pm 2031	95060 \pm 5420	16860 \pm 1034	46170 \pm 2154
Núcleo arqueado	19110 \pm 1828	73000 \pm 3780	12980 \pm 1343	30280 \pm 2771
Núcleo periventricular	23870 \pm 2019	107700 \pm 6007	10890 \pm 1268	40960 \pm 2170
Núcleo accumbens	15540 \pm 1515	70610 \pm 4203	9440 \pm 1111	35610 \pm 2168
Ponte	22830 \pm 1557	103400 \pm 5486	9953 \pm 952	38010 \pm 2137
Camada granular	18250 \pm 942	99420 \pm 5062	9688 \pm 1074	40310 \pm 1881
Camada molecular	18510 \pm 1053	82230 \pm 3435	11340 \pm 882	34900 \pm 1790

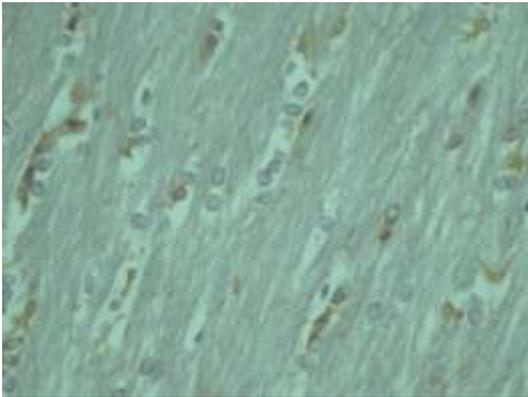
F1NDS - grupo de ratos da geração F1, cujas mães receberam dieta normocalórica, e que foi tratado com solução salina.

F1NDLPS - grupo de ratos da geração F1, cujas mães receberam dieta normocalórica, e que foi tratado com LPS.

F1HDS - grupo de ratos da geração F1, cujas mães receberam dieta hipercalórica, e que foi tratado com solução salina.

F1HDLPS - grupo de ratos da geração F1, cujas mães receberam dieta hipercalórica, e que foi tratado com LPS.

F0ND



F0HD

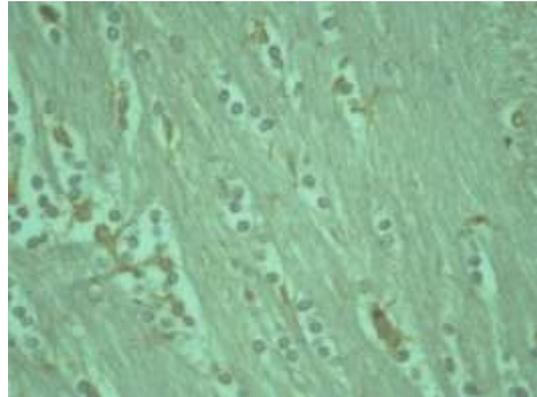
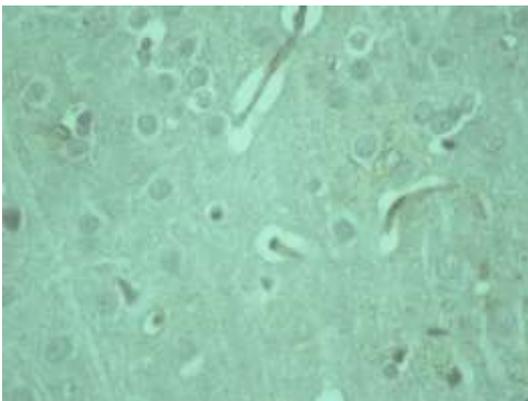


Figura 3A – Fotomicrografias do corpo caloso nos grupos F0ND e F0HD. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

F0ND



F0HD

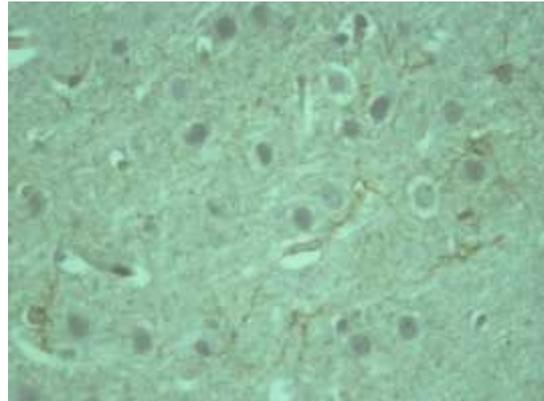
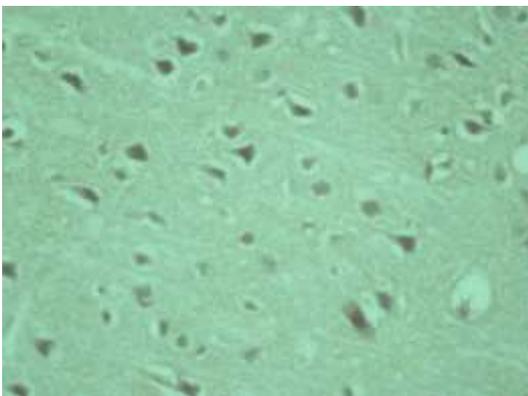


Figura 3B – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD no córtex frontal. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

F0ND



F0HD

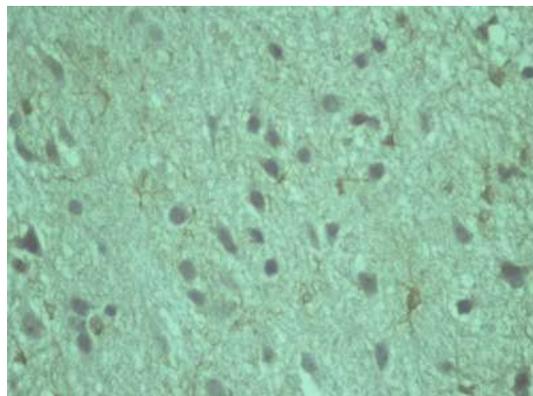
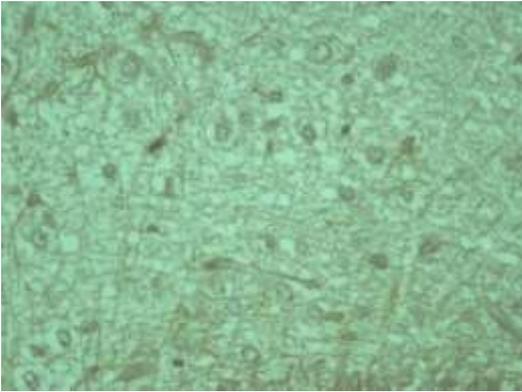


Figura 3C – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD no córtex parietal. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

F0ND



F0HD

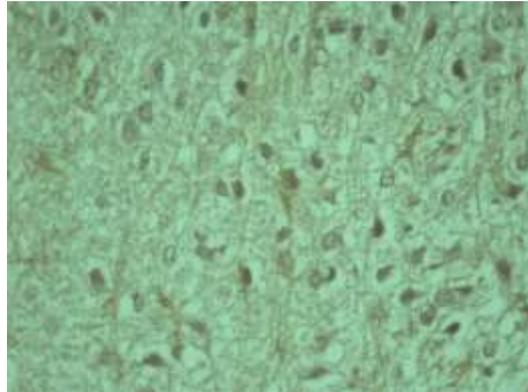
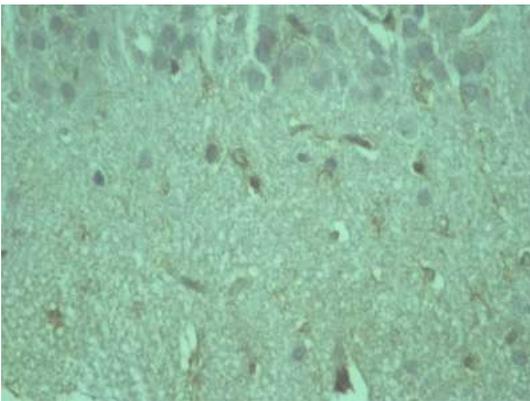


Figura 3D – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD no núcleo arqueado. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

F0ND



F0HD

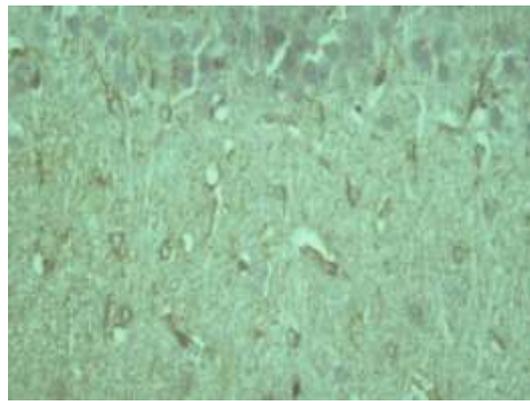
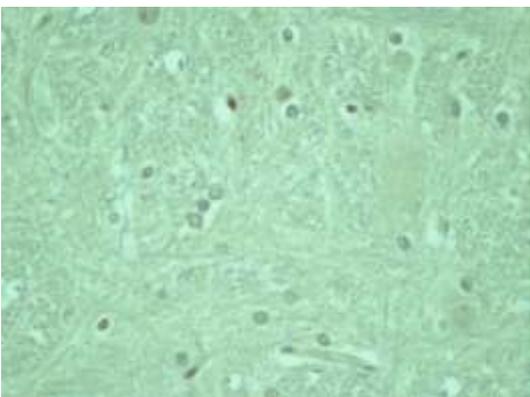


Figura 3E – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD no núcleo periventricular. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

F0ND



F0HD

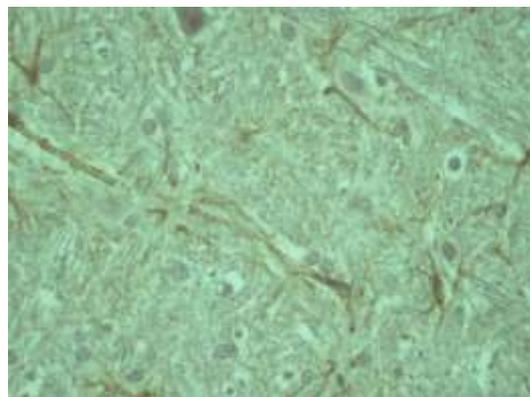
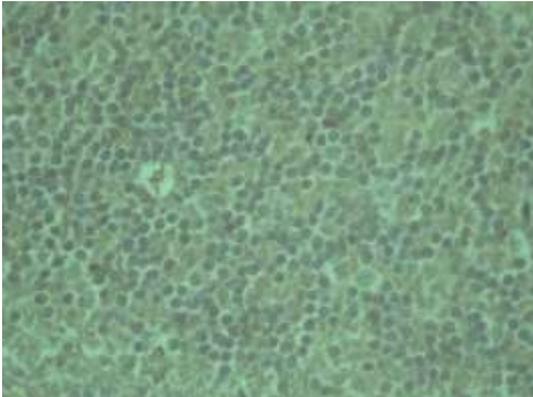


Figura 3F – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD na ponte. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

F0ND



F0HD

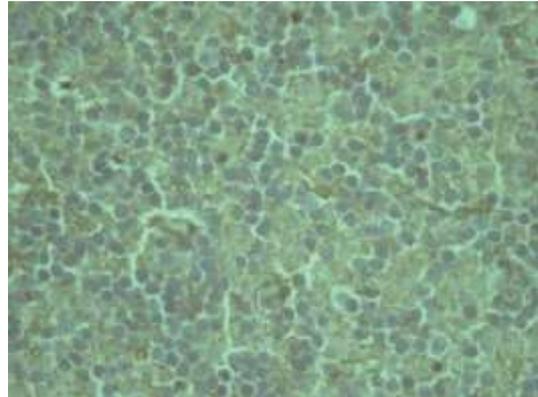
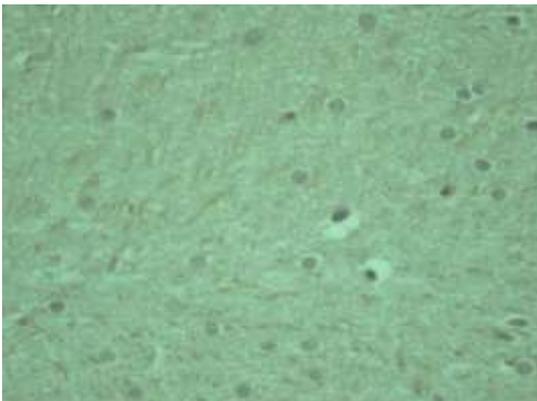


Figura 3G – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD na camada granular do cerebello. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

F0ND



F0HD

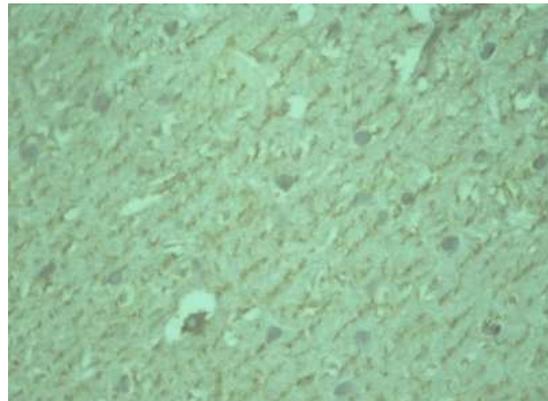
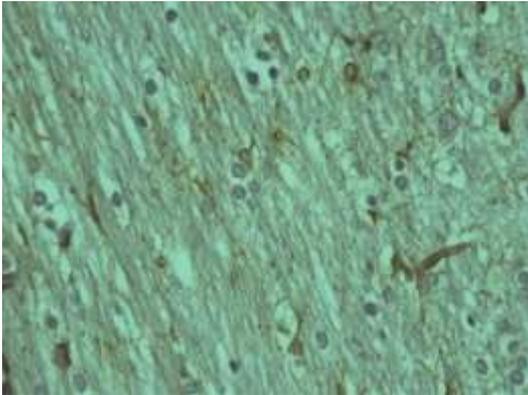
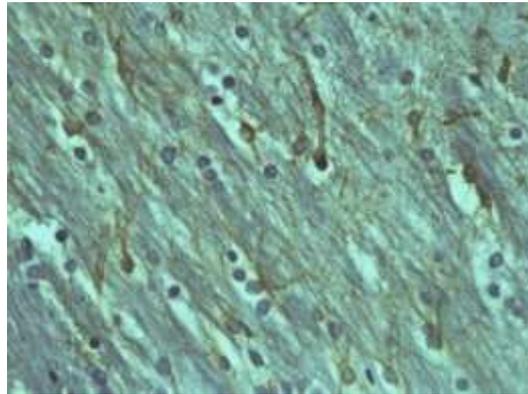


Figura 3H – Fotomicrografias dos grupos F0ND e F0HD na camada molecular do cerebello. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

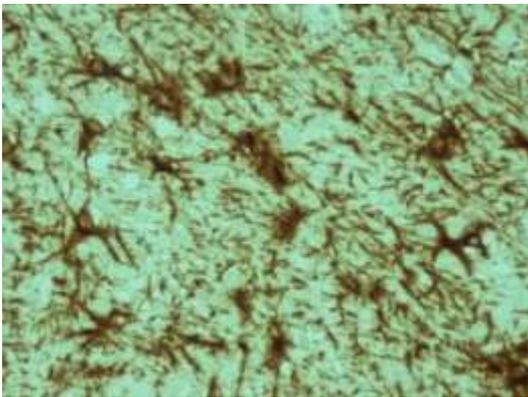
F1NDS



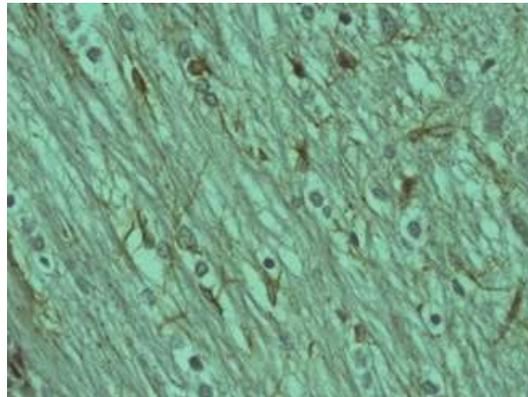
F1HDS



F1NDLPS

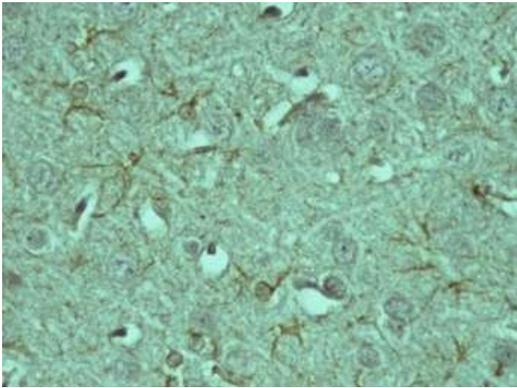


F1HDLPS

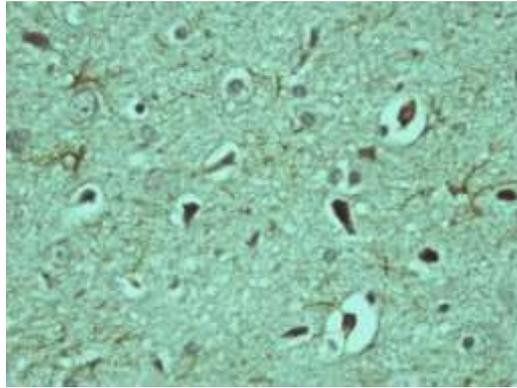


Figuro 4A – Fotomicrografias do corpo caloso nos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

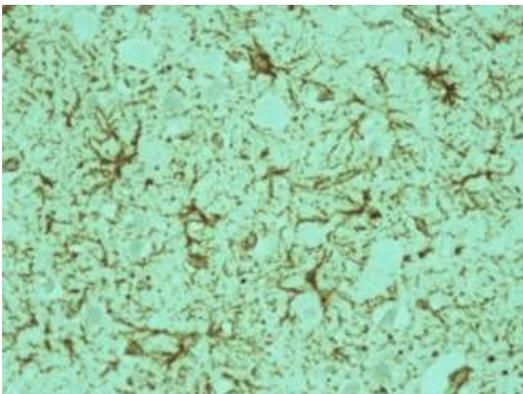
F1NDS



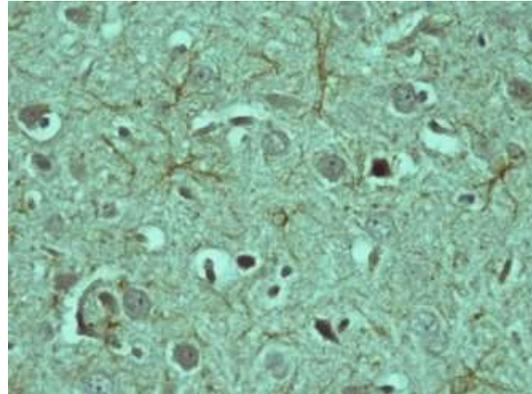
F1HDS



F1NDLPS

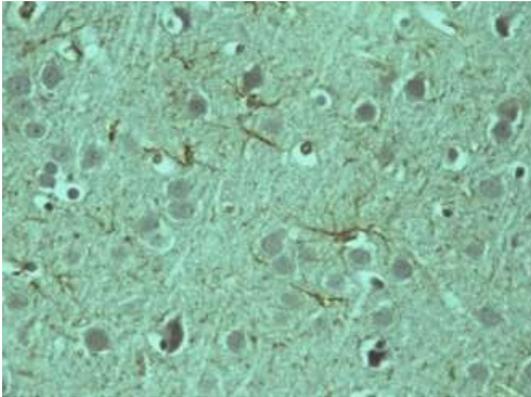


F1HDLPS

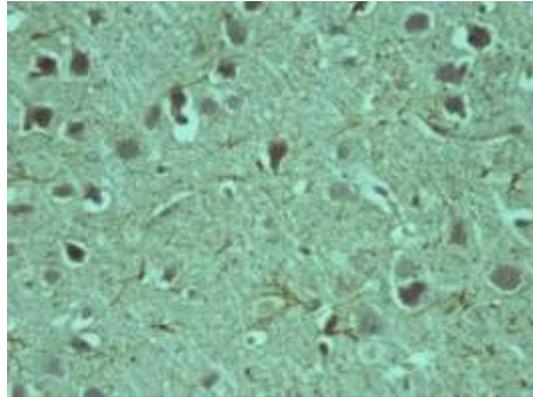


Figuro 4B – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS no córtex frontal. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

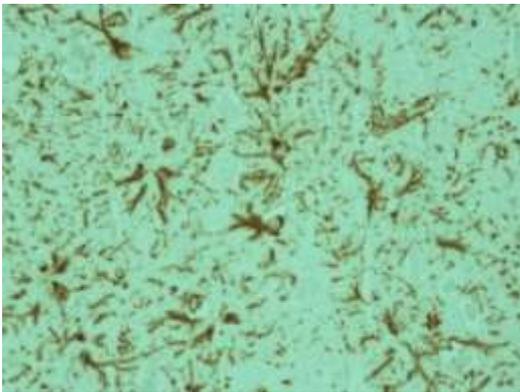
F1NDS



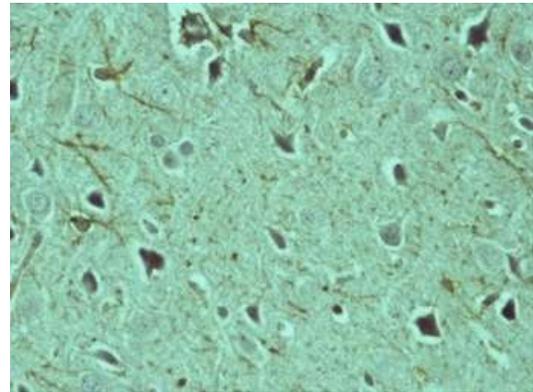
F1HDS



F1NDLPS

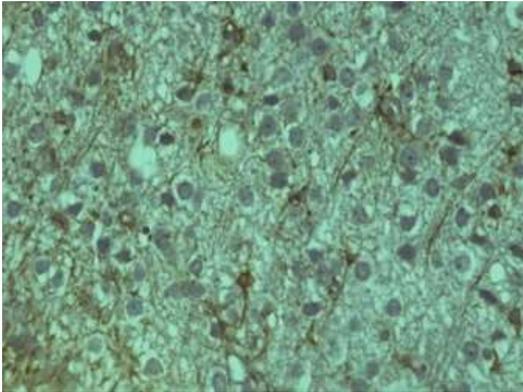


F1HDLPS

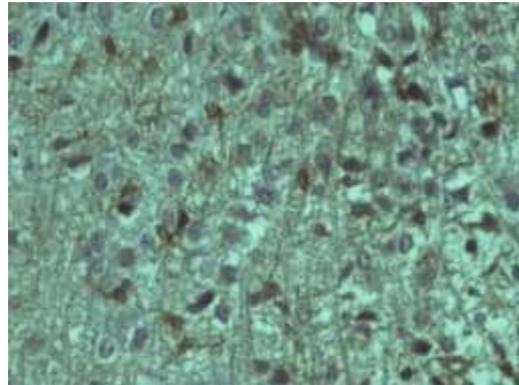


Figuro 4C – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS no córtex parietal. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

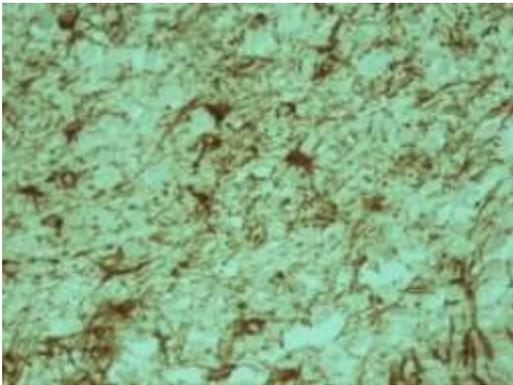
F1NDS



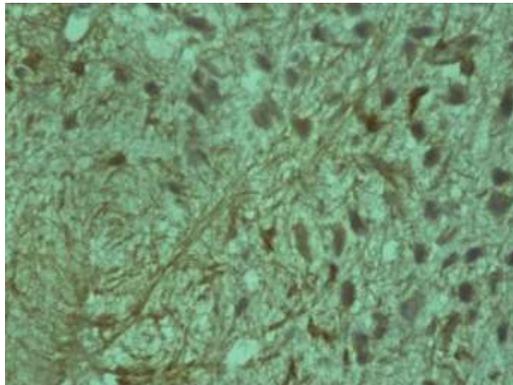
F1HDS



F1NDLPS

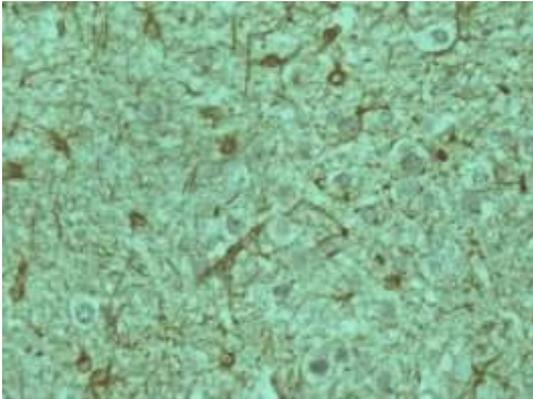


F1HDLPS

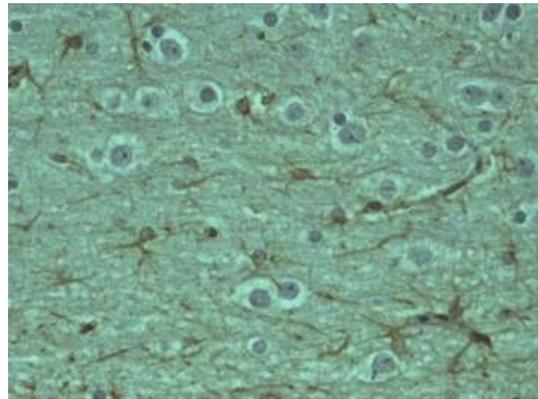


Figuro 4D – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS no núcleo arqueado. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

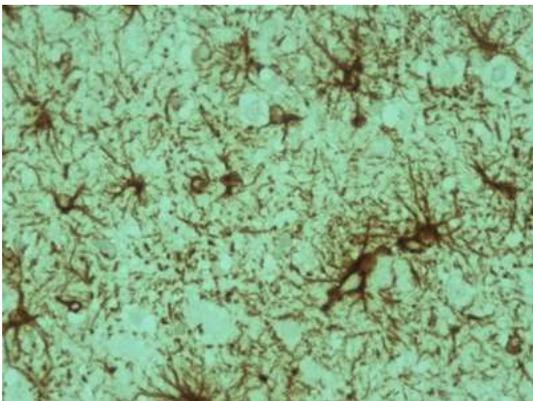
F1NDS



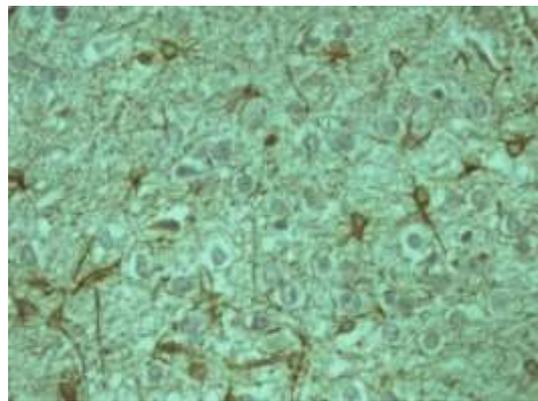
F1HDS



F1NDLPS

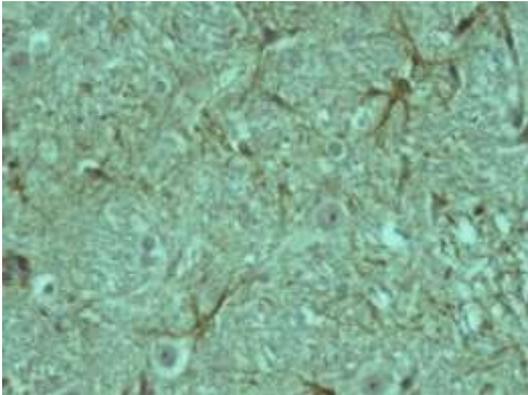


F1HDLPS

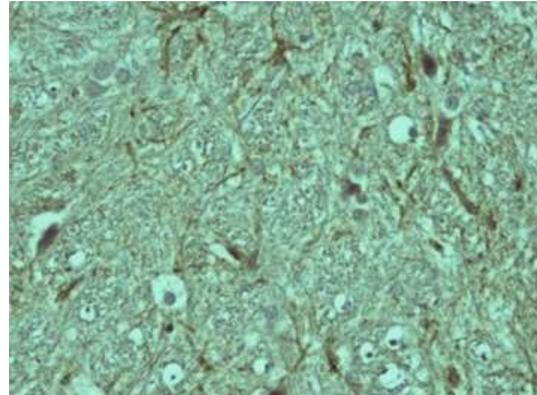


Figuro 4E – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS no núcleo periventricular. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

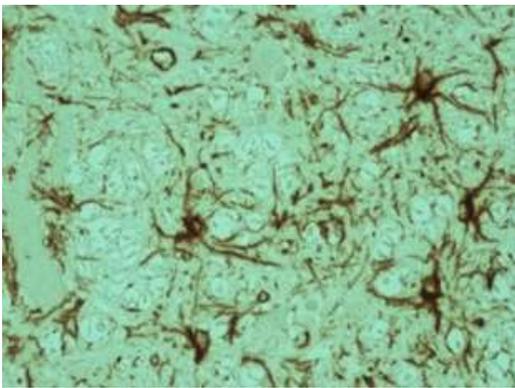
F1NDS



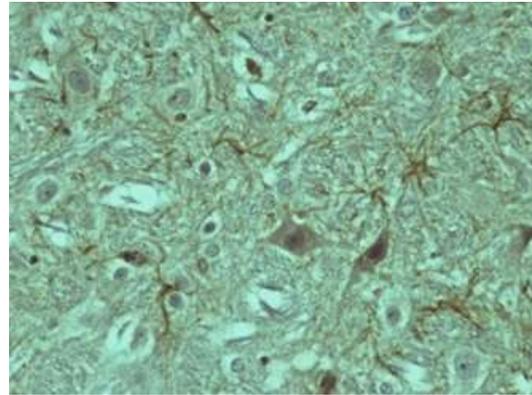
F1HDS



F1NDLPS

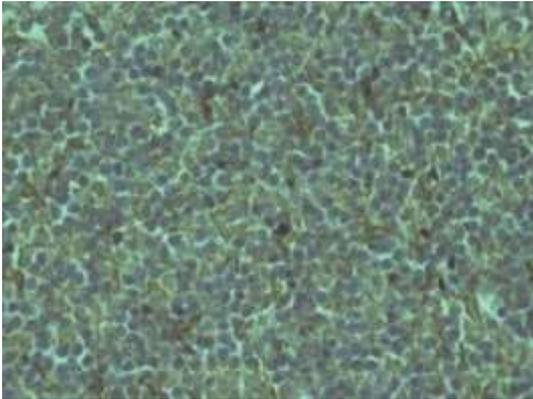


F1HDLPS

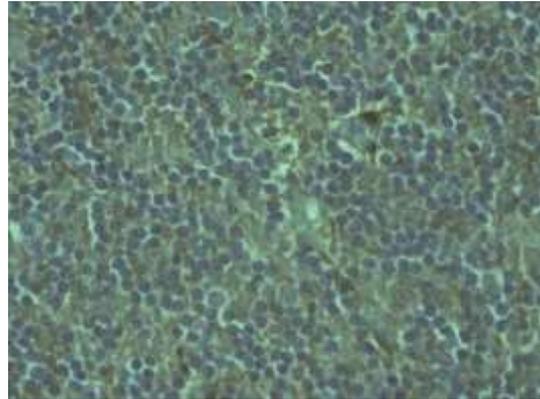


Figuro 4F – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS na ponte. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

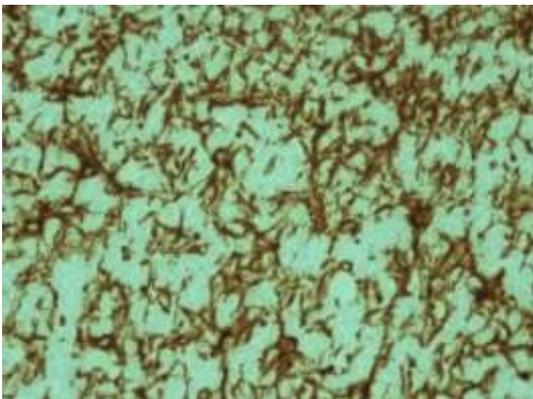
F1NDS



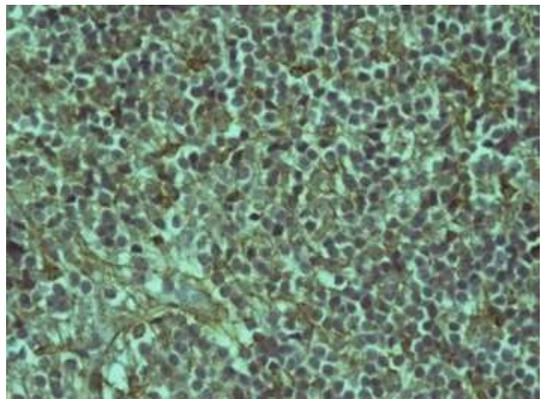
F1HDS



F1NDLPS

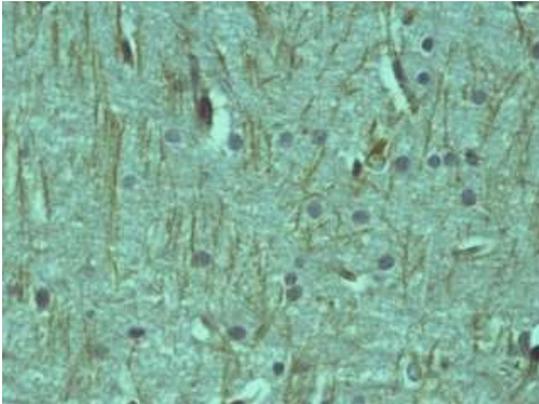


F1HDLPS

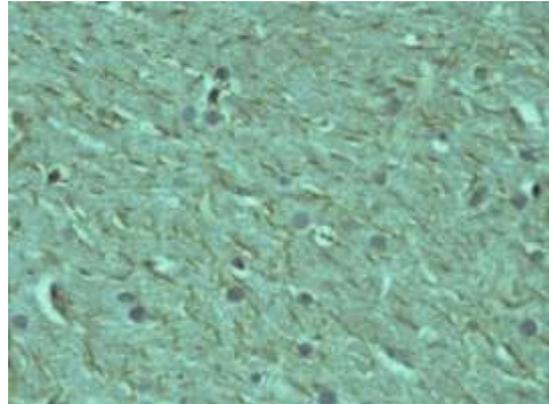


Figuro 4G – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS na camada granular do cerebelo. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

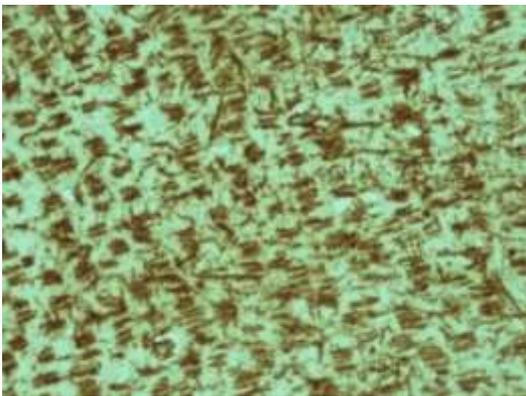
F1NDS



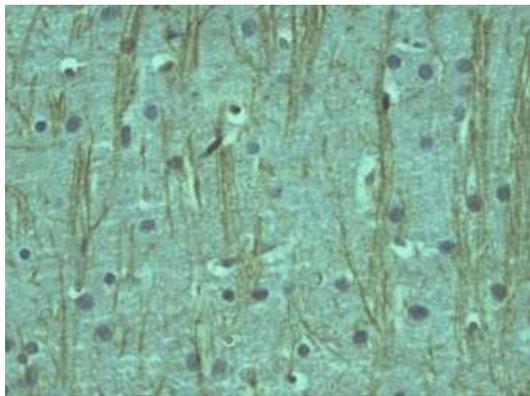
F1HDS



F1NDLPS



F1HDLPS



Figuro 4H – Fotomicrografias dos grupos F1NDS, F1HDS, F1NDLPS, F1HDLPS na camada molecular do cerebelo. Marcação imuno-histoquímica para GFAP. Obj. 40x.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram com clareza que a ingestão de uma dieta hipercalórica foi capaz de alterar a resposta astrocitária, caracterizada por um aumento da expressão de GFAP em todo o SNC da geração F0 e sugestiva de possível resposta neuroinflamatória generalizada. Além disso, mostram também os efeitos transgeracionais de uma dieta rica em gordura, uma vez que os filhotes de mães que receberam HD expressaram menos GFAP no SNC mesmo após desafio com LPS, sugerindo possível efeito adaptativo e de reprogramação às condições alimentares maternas mesmo antes da gestação.

Pôde-se observar no grupo F0HD um aumento significativo da expressão da GFAP em resposta à HD em todas as áreas do encéfalo analisadas neste estudo.

Um grande número de estudos aborda a neuroinflamação causada por HD, centrando-se, no entanto, principalmente na região hipotalâmica, uma vez que é no hipotálamo que se encontra o centro de controle metabólico e da homeostase energética (KALIN et al., 2015; YANG, 2015; BUCKMAN; ELLACOTT, 2014).

Chowen et al. (2016) também apresentam dados de que ratos em condições de sobrepeso por terem sido expostos à HD por um período de tempo prolongado apresentam aumento na expressão de GFAP no hipotálamo, em especial no núcleo arqueado.

A resposta inflamatória hipotalâmica manifesta-se rapidamente, sendo ativada por ingestão de HD e ocorrendo antes mesmo do aumento de peso corporal ou da inflamação sistêmica (CHOWEN et al., 2016; THALER et al., 2012). É provável que esse rápido efeito de astrogliose em resposta à ingestão de HD esteja diretamente ligado a componentes alimentares, tais como os ácidos graxos, sobre essas células gliais (CHOWEN et al., 2016; GAO et al., 2014; GUPTA et al., 2012).

Tais dados vêm ao encontro dos achados na geração F0, na qual se observou significativo aumento da expressão de GFAP nos núcleos arqueado e periventricular do hipotálamo, muito embora, essa resposta tenha sido extensiva também a outras áreas do SNC, como o córtex frontal, o córtex parietal, o corpo caloso, o núcleo accumbens, a ponte e as camadas molecular e granular do cerebelo.

Ainda foi pouco estudada a neuroinflamação após HD em outras áreas do encéfalo além do hipotálamo, mas alguns autores já exploraram o assunto, como,

por exemplo, Buckman et al. (2013), que observaram um aumento da expressão de GFAP em regiões extra-hipotalâmicas, tais como o hipocampo, a habenula medial, a cápsula interna e o núcleo reticular talâmico; Guillemot-Legris et al. (2016) analisaram em seu estudo a expressão de componentes inflamatórios, tais como IL-1 β , TNF- α e COX-2 no córtex cerebral e no cerebelo após consumo de HD. A região cerebelar respondeu com maior intensidade, enquanto o córtex cerebral não apresentou resposta significativa à HD em relação à expressão dos componentes pró-inflamatórios citados. Os autores atribuem esse fato à teoria de que cada área do SNC responde e se adapta de maneiras diferentes aos estímulos de agressão tecidual, o que parece não ser observado no presente estudo, já que todas as áreas analisadas da geração F0 responderam significativamente à HD. Pode-se considerar, porém, que tal discordância resulte de diferenças em relação aos modelos experimentais utilizados e à maneira como a neuroinflamação foi caracterizada nos diferentes estudos.

De Kloet et al. (2014) concluíram que, após um consumo de HD durante oito semanas, acontecia a ativação da cascata inflamatória não somente em regiões hipotalâmicas, mas também em regiões frontais do encéfalo, como o órgão subfornical, região essa que desempenha importante papel na regulação e na manutenção da função cardiovascular e da pressão arterial.

Em 2014, Cheon et al. realizaram um estudo no qual compararam os efeitos da astrogliose no septo cerebral por meio da expressão da GFAP em ratos que receberam HD e ND antes de um evento de isquemia cerebral transitória. Em seus achados, puderam concluir que os ratos que consumiram HD tiveram maior neuroinflamação que os ratos que consumiram ND, apresentando, conseqüentemente, morte neuronal mais pronunciada, uma vez que a ativação glial conduz à morte neuronal após danos isquêmicos no SNC por meio de mecanismos de excitotoxicidade (PETITO; HALABY, 1993; KATO et al., 1995).

Podemos, assim, afirmar que existe maior resposta neuroinflamatória em indivíduos que, em algum momento de sua existência, tiveram obesidade induzida por consumo de HD, embora sejam ainda pouco conhecidos os efeitos sobre o comportamento astrocitário das gerações futuras desses indivíduos obesos.

Durante a gravidez e o período neonatal, o indivíduo responde ao seu ambiente por meio da criação de vias anatômicas, fisiológicas e bioquímicas que moldam sua futura saúde (PEREZ-TORRERO et al., 2003; JOAQUIM et al., 2015).

No presente estudo, o grupo F1HDLPS mostrou redução significativa na resposta astrocitária de expressão da GFAP ao desafio com LPS quando comparado ao grupo F1NDLPS, sugerindo uma possível adaptação e reprogramação neuroimunológica da prole de ratas obesas e, mesmo quando não desafiadas com o LPS, o núcleo periventricular, a ponte e a camada molecular do cerebelo expressaram menos GFAP no grupo F1HDS que recebeu injeção de solução salina. Evidências experimentais e clínicas mostram que a programação do desenvolvimento corporal pode ser vista como fenômeno transgeracional adaptativo, cujos mecanismos são epigenéticos. A alimentação excessiva da mãe pode definir padrões específicos de distribuição da gordura corporal e de expressão de parâmetros relacionados ao processo inflamatório e à atividade metabólica de sua prole (JOAQUIM et al., 2015).

Vários estudos demonstram que a administração de LPS é capaz de promover neuroinflamação, geralmente evidenciada por uma maior expressão da GFAP (BIESMANS et al., 2013; DE SOUSA et al., 2015; HUANG et al., 2015).

Modelos experimentais com administração de LPS demonstram que esse se liga a receptores Toll-like (TLR) de macrófagos, desempenhando importante função na ativação da resposta imune adaptativa e resultando na amplificação de disfunções crônicas do metabolismo, como a aterosclerose e a resistência à insulina (NÚNEZ-RUIZ et al., 2016).

Nossos achados vão ao encontro dos resultados do trabalho de Joaquim et al. (2015), que observaram que ratos nascidos de mães que consumiram HD antes mesmo da gestação mostraram significativa redução da astrogliose em relação ao grupo controle após desafio com LPS para observação do comportamento doente.

Bilbo e Tsang (2010) observaram que filhos de ratas que consumiram HD apresentaram aumento significativo dos marcadores de células da micróglia, tais como CD11b, TLR2, TLR4, IL-1 β e IL-6. Esses marcadores aumentaram nas áreas do hipocampo ao nascimento, no desmame e na idade adulta e um aumento notável desses marcadores também foi observado após o desafio com LPS.

Os efeitos da HD sobre a função astrocitária constitui um assunto pouco discutido e explorado, tendo em vista a pequena quantidade de estudos publicados nesta linha de pesquisa, tanto sobre os efeitos transgeracionais da dieta hipercalórica quanto da privação alimentar materna sobre as células do SNC,

neuronalis ou não-neuronalis, o que ainda dificulta a compreensão dos possíveis mecanismos envolvidos para elucidação dos resultados observados.

Mais estudos sobre os efeitos transgeracionais da dieta são necessários para que possamos desvendar e entender os mecanismos envolvidos nos processos de reprogramação, sobretudo nas células gliais do SNC.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o consumo de uma dieta hipercalórica ingerida na puberdade provocou astrogliose nas áreas do SNC analisadas (corpo caloso, córtex frontal e parietal, núcleo accumbens, núcleos periventricular e arqueado do hipotálamo, ponte, camadas granular e molecular do cerebelo) das ratas do grupo F0HD, quando comparadas com aquelas que receberam dieta normocalórica no mesmo período (grupo F0ND), com aumento significativo na expressão astrocitária de GFAP.

A expressão astrocitária de GFAP na prole das ratas que receberam dieta hipercalórica na puberdade foi também modificada. Ratos cujas mães ingeriram dieta hipercalórica antes mesmo da gestação apresentaram menor expressão de GFAP nas mesmas áreas do SNC previamente descritas após desafio com LPS (grupo F1HDLPS), em relação ao grupo cujas mães receberam dieta normocalórica (grupo F1NDLPS), sugerindo, assim, efeito adaptativo da reação astrocitária.

REFERÊNCIAS

- ARGENTE-ÁRIZON, P.; FREIRE-REGATILLO, A.; ARGENTE, A.; CHOWEN, J. A. Role of non-neuronal cells in body weight and appetite control. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, p. 1-15, 2015.
- ASCHNER, M. Astrocytes as mediators of immune and inflammatory responses in CNS. **Neurotoxicology**, v. 19, p. 269-281, 1998.
- BIESMANS, S.; MEERT, T. F.; BOUWKNECHT, J. A.; ACTON, P. D.; DAVOODI, N.; DE HAES, P.; KUIJLAARS, J.; LANGLOIS, X.; MATTHEWS, L. J. R.; DONCK, L. V.; HELLINGS, N.; NUYDENS, R. Systemic Immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p.14, 2013.
- BILBO, S. D.; TSANG, V. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. **FASEB Journal**, v. 24, p. 2104–2115, 2010.
- BOURET, S.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. **Science**, v. 304, p. 63-64, 2004.
- BOURET, G.; GORSKI, J. N.; PATTERSON, C. M.; CHEN, S.; LEVIN, B. E.; SIMERLY, R. B. Hypothalamic neural projections are permanently disrupted in diet induced obese rats. **Cell Metabolism**, v. 7, p. 179-185, 2008.
- BUCKMAN, L. B.; THOMPSON, M. M.; MORENO, H. N.; ELLACOTT, K. L. Regional astrogliosis in the mouse hypothalamus in response to obesity. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 521, p.1322-1333, 2013.
- BUCKMAN, L. B.; ELLACOTT, K. L. J. The contribution of hypothalamic macroglia to the regulation of energy homeostasis. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 8, 2014. DOI: 10.3389/fnsys.2014.00212
- CAI, D. Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition induced diseases. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 24, p. 40-47, 2013.
- CHEON, S. H.; YAN, B. C.; CHEN, B. H.; PARK, J. H.; AHN, J. H.; KIM, I. H.; LEE, J. C.; PARK, Y. S.; KIM, M. J.; LEE, Y. L.; CHO, J. H.; WON, M. H. Accelerated and exacerbated effects of high dietary fat on neuronal damage induced by transient cerebral ischemia in the gerbil septum. **Endocrinology and metabolism**, v. 29, p. 328-335, 2014.
- CHIAVEGATTO, S.; BERNARDI, M. M. Prenatal versus postnatal effects on offspring weight gain of rats exposed to diphenhydramine: a critical evaluation of fostering procedures in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 219-221, 1991.

CHOWEN, J. A.; ARGENTE, J.; HORVATH, T. L. Uncovering novel roles of nonneuronal cells in body weight homeostasis and obesity. **Endocrinology**, p. 3001-3007, 2013.

CHOWEN, J. A.; ARGENTE-ARIZÓN, P.; FREIRE-REGATILLO, A.; FRAGO, L. M.; TAMAS, L. H.; ARGENTE, J. The role of astrocytes in the hypothalamic response and adaptation to metabolic signals. **Progress in Neurobiology**, v. 144, p. 68-87, 2016.

DE KLOET, A. D.; PIOQUINTO, D. J.; NGUYEN, D.; WANG, L.; SMITH, J. A.; HILLER, H.; SUMNERS, C. Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. **Physiology & Behavior**, v. 136, p. 31-38, 2014.

DE SANTIS, D. T.; SCHMALTZ, D. T. The mother-litter relationship in developmental rat studies: Cannibalism vs caring. **Developmental Psychobiology**, v. 17, p. 255-262, 1984.

DE SOUZA, D. F.; WARTCHOW, K. M.; LUNARDI, P. S.; BROLESE, G.; TORTORELLI, L. S.; BATASSINI, C.; BIASIBETTI; GONÇALVES, C. A. Changes in astroglial markers in a maternal immune activation model of schizophrenia in Wistar rats are dependent on sex. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 9, 2015. DOI: 10.3389/fncel.2015.00489.

FERNANDEZ, C. D. B.; BELLENTANI, F. F.; FERNANDES, G. S.; PEROBELLI, J. E.; FAVARETO, A. P.; NASCIMENTO, A. F.; CICOGNA, A. C.; KEMPINAS, W. D. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm mobility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 2011. DOI: 10.1186/1477-7827-9-32.

GARCIA-CÁRCERES, C.; CHUN-XIA, Y.; TSCHOP, M. H. Hypothalamic Astrocytes in Obesity. **Endocrinology Metabolism Clinics of North America**, v. 42, p. 57-66, 2013.

GAO, Y. Hormones and diet but not body weight, control hypothalamic microglial activity. **Glia**, v. 62, p. 17-25, 2014.

GOTTLIEB, M. G. V.; CRUZ, I. B. M.; BODANESE, L. C. Origem da síndrome metabólica: aspectos genético-evolutivos e nutricionais. **Scientia Medica**, v. 18, p. 31-38, 2008.

GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MASQUELIER, J.; EVERARD, A.; CANI, P. D.; ALHOUAYEK, M.; MUCCIOL, G. G. High-fat diet feeding differentially affects the development of inflammation in the central nervous system. **Journal of Neuroinflammation**, 2016. DOI: 10.1186/s12974-016-0666-8.

GUPTA, S.; KNIGHT, A. G.; GUPTA, S.; KELLER, J. N.; BRUCE KELLER, A. J. Saturated long chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, p. 1060-1171, 2012.

GUYENET, S. J.; NGUYEN, H. T.; HWANG, B. H.; SCHWARTZ, M. W.; BASKIN, D. G.; THALER, J. P. High-fat diet feeding causes rapid, non-apoptotic cleavage of caspase-3 in astrocytes. **Brain Research**, V. 1512, p. 97-105, 2013.

GZIELO, K.; KIELBINSKI, M.; PLOSZAJ, J.; JANECZKO, K.; GAZDZINSKI, S. P.; SETKOWICZ, Z. Long-term consumption of high-fat diet in rats: effects on microglial and astrocytic morphology and neuronal nitric oxide synthase expression. **Cellular and Molecular Neurobiology**, 2016. DOI 10.1007/s10571-016-0417-5.

HOLMES, A. P. et al. Reductions in hypothalamic Gfap expression, glial cells and α -tanyocytes in lean and hypermetabolic Gnasxl-deficient mice. **Molecular Brain**, 2016. DOI 10.1186/s13041-016-0219-1.

HORVATH, T. L.; SARMAN, B.; GARCÍA-CÁCERES, C.; ENRIORI, P. J.; SOTONVI, P.; SHANABROUGH, M.; BOROK, E.; ARGENTE, J.; CHOWEN, J. A.; PEREZ-TILVE, D.; PFLUGER, P. T.; BRÖNNEKE, H. S.; LEVIN, B. E.; DIANO, S.; COWLEY, M. A.; TSCHÖP, M. H. Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. **Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America**, v. 107, p. 14875-14880, 2010.

HUANG, C. F.; DU, J. X.; DENG, W.; CHENG, X. C.; ZHANG, S. Y.; ZHAO, S. J.; TAO, M. J.; CHEN, G. Z.; HAO, X. Q. Effect of prenatal exposure to LPS combined with pre and post-natal high-fat diet on hippocampus in rat offspring. **Neuroscience**. v. 286, p. 364-370, 2015.

JOAQUIM, A.; COELHO, C. P.; MOTTA, P. D.; BONDAN, E. F.; TEODOROV, E.; MARTINS, M. F.; KIRSTEN, T. B.; CASARIN, R. C.; BONAMIN, L. V.; BERNARDI, M. M. Transgenerational effects of a hypercaloric diet. **Reproduction, Fertility and Development**, 2015. DOI: 10.1071/RD15165.

KALIN, S.; HEPPNER, F. L.; BECHMANN, I.; PRINZ, M.; TSCHÖP, M. H.; YI, C. Hypothalamic innate immune reaction in obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, p. 339-351, 2015.

KATO, H.; KOGURE, K.; ARAKI, T.; ITOYAMA, Y. Graded expression of immunomolecules on activated microglia in the hippocampus following ischemia in a rat model of ischemic tolerance. **Brain**, v. 694, p. 85-93, 1995.

MAKKI, K.; FROGUEL, P.; WOLOWCZUK, I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. **ISRN Inflammation**, 2013. DOI: 10.1155/2013/139239.

MANNA, T. D.; DAMIANI, D.; SETIAN, N. Síndrome metabólica: revisão. **Revisões e Ensaios**, v. 28, p. 272-277, 2006.

MARIC, T.; WOODSIDE, B.; LUHESHI, G. N. The effects of dietary saturated fat on basal hypothalamic neuroinflammation in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 36, p. 35-45, 2014.

MARTINEZ, J. A.; CORDERO, P.; CAMPIÓN, J.; MILAGRO, F. I. Interplay of early-life nutritional programming on obesity, inflammation and epigenetic outcomes. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, p. 276-83, 2012.

MILLER, A. A.; SPENCER, S. J. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 42, p. 10-21, 2014.

NÚÑEZ-RUIZ, B.; DIJCK-BROUWER, J.; MUSKIET, A. J. The relation of saturated fatty acids with low-grade inflammation and cardiovascular disease. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 36, p.1-20, 2016.

PEREZ-TORRERO, E.; TORREROB, C.; COLLADO, P.; SALAS, M. A paradigm of undernourishing and neonatal rehabilitation in the newborn rat. **Nutritional Neuroscience**, v. 6, p. 113-115, 2003.

PETITO, C. K.; HALABY, I. A. Relationship between ischemia and ischemic neuronal necrosis to astrocyte expression of glial fibrillary acidic protein. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 11, p. 239-247, 1993.

RAO, K. R.; PADMAVATHI, I. J. N.; RAGHUNATH, M. Maternal micronutrient restriction programs the body adipocyte function and lipid metabolism in offspring: a review. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 13, p. 103-108, 2012.

RHODES, P.; CRAIGON, J.; GRAY, C.; RHIND, S. M.; LOUGHNA, P. T.; GRADNER, D. S. Adult-onset obesity reveals prenatal programming of glucose-insulin sensitivity in male sheep nutrient restricted during late gestation. **Plos One**, v.4, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007393.

RODRIGUEZ-HERNÁNDEZ, H.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, G.; REYES-ROMERO, M. A. Obesity and inflammation: Epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. **International Journal of Endocrinology**, p.1-11, 2013. DOI: 10.1155/2013/678159.

ROSS, M. G.; DESAI, M. Developmental programming of offspring obesity, adipogenesis, and appetite. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 56, p. 529-536, 2013.

SANCHEZ, M.; BONDAN, E. F.; LALLO, M. A.; SINHORINI, I. L.; DAGLI, M. L. Z.; MAIORKA, P. C.; PEREIRA, L. A. V. D.; GRAÇA, D. L. Immunohistochemical staining of the macrophagic and astrocytic response in the brainstem of Wistar rats submitted to the ethidium bromide gliotoxic model and treated with cyclophosphamide. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 64, p. 787-793, 2006.

SCHWARZ, J. M.; BILBO, S.D. Sex, glia and development: interactions in health and disease. **Hormones and Behavior**, v. 62, p. 243-253, 2012.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 1793-1801, 2006.

THALER, J.P.; YI, C. X.; SCHUR, E. A.; GUYENET, S. J.; HWANG, B. H.; DIETRICH, M. O.; ZHAO, X.; SARRUF, D. A.; IZGUR, V.; MARAVILLA, K. R.; NGUYEN, H. T.; FISCHER, J. D.; MATSEN, M. E.; WISSE, B. E.; MORTON, G. J.; HORVATH, T. L.; BASKIN, D. G.; TSCHÖP, M. H.; SCHWARTZ, M. W. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, p. 153-162, 2012.

VICKERS, M. H. Developmental Programming and Transgenerational Transmission of Obesity. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 64, p. 26-34, 2014.

ZHANG, X.; ZHANG, G.; ZHANG, H.; KARIN, M.; BAI, H.; CAI, D. Hypothalamic IKK β /NF- κ β and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. **Cell**, v. 135, p. 61-73, 2008.

YANG, Y. Astrocytes: targets in obesity. **Oncotarget**, v. 6, p. 12835-12836, 2015.