

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento

Felipe Rodrigues Pinto

**EXPRESSÃO DA DESIODASE 3 NO HIPOCAMPO DE FILHOTES DE RATAS
OBESAS**

São Paulo

2014

Felipe Rodrigues Pinto

**EXPRESSÃO DA DESIODASE 3 NO HIPOCAMPO DE FILHOTES DE RATAS
OBESAS**

Dissertação vinculada à linha de Pesquisa Básica em Neurobiologia e Comportamento no Desenvolvimento e seus transtornos, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento da Universidade Presbiteriana Mackenzie de São Paulo para a obtenção de título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro.

São Paulo

2014

P659e Pinto, Felipe Rodrigues.

Expressão da desidase 3 no hipocampo de filhotes de ratas obesas / Felipe Rodrigues Pinto. – 2014.

49 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Distúrbios do Desenvolvimento) -
Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, 2014.

Referências bibliográficas: f. 42-48.

UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Distúrbios do Desenvolvimento

Aprovado em: 07 de Agosto de 2014

Comissão Examinadora

Dissertação para a obtenção do título de mestre em Distúrbios do Desenvolvimento

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Miriam Oliveira Ribeiro

Universidade Presbiteriana Mackenzie

Primeira Examinadora: Profa. Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros

Universidade Presbiteriana Mackenzie

Segundo Examinador: Prof. Dr. Sérgio Gomes da Silva

Universidade Federal do Estado de São Paulo

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter permitido que eu chegasse até aqui e aos meus pais pelo incentivo ao estudo e ao esforço que me garantiu essa oportunidade.

À minha orientadora Prof.^a Dra. Miriam Oliveira Ribeiro pelos conselhos, direcionamentos, incentivo e paciência.

À Prof.^a Dra. Roberta Monterazzo Cysneiros por sua contribuição e colaboração, e por suas excelentes aulas em na matéria de Experimentos Animais.

Ao Prof. Dr. Marcelo Augusto Christoffolete pela disponibilidade em realizar as PCRs.

Aos funcionários do biotério, Sr. Domingos, Sr. Oliveiro e ao médico veterinário Alexandre.

Aos técnicos do laboratório, Ana, Nathália, Nilson e Vitor pela colaboração e disposição em ajudar.

Às colegas de laboratório Bárbara, Fernanda, Gustavo, Julia, Nailliw e Pollyana, pelo companheirismo, ensinamentos e ajuda.

E um agradecimento especial para Bruna, Cícera e Fabiane, esse trabalho não teria sido possível sem a ajuda incondicional de vocês. Quase tudo que aprendi durante o mestrado foi graças a vocês.

À Universidade Presbiteriana Mackenzie por ter me concedido em parceria com a CAPES a possibilidade de usufruir de uma bolsa de estudos integral durante o último ano e meio do Mestrado.

Resumo

A prevalência e a incidência da obesidade têm aumentado na sociedade ocidental e pode ser explicada em parte pelo consumo de uma dieta rica em gordura e carboidratos aliado à vida sedentária. A obesidade pode levar a uma condição conhecida como Síndrome Metabólica, que se caracteriza pela hiperglicemia, dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina. Além disso, estudos mostram que camundongos nascidos de mães obesas apresentam déficits de aprendizado e memória. Esses déficits podem ser causados por alterações na produção de neurotrofinas, essenciais para a formação da potenciação de longa duração que é à base da consolidação da memória de longo prazo. O hipotireoidismo também afeta o desenvolvimento do SNC dos filhotes e piora o desempenho cognitivo de indivíduos adultos. Os níveis séricos de hormônio tireoideano permanecem constantes e a sua disponibilidade para as células depende da atividade das desidases que ativam, por meio da desidase 2 (D2) ou inativam, por meio da desidase 3 (D3) o T4 a T3 ou a T3r, respectivamente. Além disso, as neurotrofinas, que reconhecidamente estão diminuídas no cérebro de filhotes de mães obesas, também são positivamente reguladas pelo T3. O presente estudo testou a hipótese de que a obesidade materna leva à alteração na expressão da D3 em hipocampo dos filhotes. Nossos estudos mostraram que, embora os testes empregados não tenham evidenciado prejuízos na memória e aprendizado dos filhotes de mães obesas, observamos menor expressão da D3 no hipocampo. Assim, é possível concluir que a obesidade materna altera a sinalização do hormônio tireoideano no hipocampo dos filhotes.

Palavras-chave: Obesidade, neurotrofinas, desidase 3, memória e aprendizado.

Abstract

The prevalence and incidence of obesity has increased in the western society and can be partially explained by the consumption of a high fat and sugar diet combined with a sedentary lifestyle. Obesity can lead to a condition known as Metabolic Syndrome, characterized by hyperglycemia, dyslipidemia, hypertension and insulin resistance. Furthermore, studies show that mice born from obese mothers have deficits in learning and memory. Those deficits may be caused by alteration in the production of neurotrophins, essential in the formation of the long term potentiation which is the base of the consolidation of long term memory. Hypothyroidism also affects the development of the Central Nervous System in the offspring and reduces cognitive performance in adults. Serum levels of thyroid hormones are constant and its availability for cells is dependent on the activity of deiodinases which may activate (D2) or inactivate (D3) the T4 into T3 or T3r, respectively. Moreover, neurotrophins that are known to be decreased in the brain of obese mothers also are positively regulated by the T3. This study tested the hypothesis that the maternal obesity leads to alteration in the expression of D3 in the offspring hippocampus. Even though the test used in this study has shown no prejudice in memory and learning in the offspring of obese mothers, a lower expression of D3 in the hippocampus was observed. Thus, it is possible to conclude that the maternal obesity alters the thyroid hormone signaling in the offspring hippocampus.

Key-words: Obesity, neurotrophins, deiodinase 3, learning and memory.

Lista de Figuras

- Figura 1:** A) Pesos das fêmeas dos grupos controle e experimental. B) Variação do peso das fêmeas dos grupos controle e experimental.....26
- Figura 2:** Curva de tolerância à glicose em ratas controle e alimentadas com dieta rica em gordura (40%) por 3 meses.....27
- Figura 3:** Número de vezes que os machos percorrem os quadrantes externos (QE), quadrantes internos (QI), e o número de vezes que o animal realiza self-grooming (SG) e se levanta (L) durante o teste e o re-teste.....28
- Figura 4:** Número de vezes que as fêmeas percorrem os quadrantes externos (QE), quadrantes internos (QI), e o número de vezes que o animal realiza self-grooming (SG) e se levanta (L) durante o teste e o re-teste.....29
- Figura 5:** Tempo em segundos gasto na exploração dos objetos A e B no primeiro dia de teste e nos objetos A e D no re-teste pelos machos do grupo controle e do grupo experimental.....30
- Figura 6:** Tempo em segundos gasto na exploração dos objetos A e B no primeiro dia de teste e nos objetos A e D no re-teste pelas fêmeas do grupo controle e do grupo experimental.....31
- Figura 7:** Tempo em segundos levado pelos machos e fêmeas do grupo controle e do grupo experimental para encontrar a isca no braço direito do labirinto.....32
- Figura 8:** Porcentagem de acerto dos machos e fêmeas do grupo controle e do grupo experimental para encontrar a isca no braço direito do labirinto.....32
- Figura 9:** A) Expressão do gene para D3. B) expressão do gene para BDNF. C) Expressão do gene para Relina. D) Expressão do gene para NT3. E) Expressão do gene ARC. F) Expressão do gene EGR-1.....34

Figura 10: Marcação por imunohistoquímica para a enzima D3 em hipocampo de filhotes machos de mães obesas.....	36
---	----

Sumário

Introdução.....	9
1. Obesidade.....	9
2. Memória.....	10
3. Memória e obesidade.....	13
4. Hormônios tireoidianos e neurotrofinas.....	18
5. Desiodases.....	19
Objetivos.....	22
Métodos.....	23
Análise estatística.....	27
Resultados.....	28
Discussão.....	38
Conclusão.....	41
Referências bibliográficas.....	42

Introdução

1. Obesidade

A obesidade é um problema de saúde global e sua incidência atinge níveis epidêmicos em algumas sociedades (TOZUKA, 2009a), o que leva a um número elevado de filhos nascidos de mães obesas (TOZUKA, et al., 2010). A incidência elevada da obesidade tem sido creditada ao aumento no consumo de alimentos hipercalóricos, característicos da dieta ocidental, e pouca atividade física (ANDERSEN, 2000).

A obesidade pode levar a uma condição conhecida como Síndrome Metabólica (SM), caracterizada, além da obesidade, pela resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão, baixo colesterol-HDL, e triglicérides-VLDL elevados, podendo levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II. Embora a causa da SM ainda seja desconhecida, acredita-se que diversos fatores estejam envolvidos, muitos deles relacionados com mudanças no estilo de vida (ALBERTI, 2004).

Diversos critérios de diagnóstico para a SM foram propostos, mas isso levou a confusões e impossibilidade de comparações entre estudos devido às diferentes definições. Portanto, em 2004 a International Diabetes Federation (IDF) junto com outras instituições formulou uma definição única: a SM, em humanos, é caracterizada pela obesidade e mais duas das seguintes condições: triglicérides elevados, baixo colesterol-HDL, pressão arterial elevada, elevada glicemia em jejum e diabetes tipo II (ALBERTI, 2004).

2. Memória

A memória é caracterizada por vários estágios de formação, os principais são aquisição (aprendizado), consolidação e evocação, sendo o hipocampo e a amígdala importantes durante esses processos (ABEL, T.; LATTAL, K. M., 2001).

A memória pode ser classificada em diversos tipos de acordo com o tempo de duração. A memória de trabalho dura alguns poucos segundos até que uma determinada ação possa ser executada. Quando a duração é de alguns minutos ela é chamada de memória de curta duração. Esses dois tipos não requerem alterações na expressão de genes ou na síntese de proteínas (IZQUIERDO, 2002).

A memória de longa duração, que pode variar o tempo de sua duração, podendo durar dias e até anos, e requer mudanças na expressão gênica e na síntese proteica para manter a informação (consolidação) em sinapses modificadas (IZQUIERDO, 2002).

Os processos de formação da memória são modulados por diversos sistemas de neurotransmissores dentre eles o dopaminérgico, serotoninérgico, histaminérgico, e noradrenérgico (IZQUIERDO, 2002).

O processo de formação da potenciação de longa duração, que é um aumento persistente da resposta de neurônios a breve estimulação repetitiva de axônios que fazem sinapses com ela, segue uma sequência bioquímica que se inicia na ativação de três tipos de receptores glutamatérgicos AMPA, causando a excitação repetida das células hipocâmpais, essa ativação através de segundos mensageiros e cascatas bioquímicas leva a um aumento na atividade das proteínas quinases A, B, C e G e a cálcio-calmodulina proteína quinase II, a seguir ocorre uma alteração nas subunidades dos receptores de glutamato e nas suas propriedades de ligação, e um aumento na expressão de fatores de transcrição principalmente o CREB, que estimula a produção de

RNAs mensageiros pelos núcleos das células pós-sinápticas (IZQUIERDO, 2002). A modulação desse processo divide-se em duas fases, a modulação recente é mediada localmente por sinapses GABAérgicas, colinérgicas e noradrenérgicas. A modulação tardia é modulada pela dopamina D₁, β-noradrenérgico e receptores 5HT1A no hipocampo, e vias dopaminérgicas, noradrenérgicas e serotoninérgicas (IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H., 1997).

O hipocampo é a principal estrutura relacionada à consolidação de memórias, pois diversas estruturas relacionadas à memória estão conectadas direta ou indiretamente ao hipocampo. No hipocampo ocorre a potenciação de longa duração que é considerada a base da consolidação de memórias (IZQUIERDO et al., 2006).

Diversos fatores participam do processo de formação de memória. As quatro neurotrofinas, BDNF, NT3, NT4 e NGF, produzidas pelo cérebro parecem ser chave para consolidação da memória. Essas moléculas são proteínas sintetizadas como (pro)neurotrofinas no retículo endoplasmático, levadas por grânulos secretores formados pelo complexo de Golgi para os dendritos e axônios, e liberadas nas fendas sinápticas (LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H., 2005).

Elas podem se ligar a dois tipos de receptores na membrana plasmática do neurônio-alvo, Trk (A, B, e C) e p⁷⁵. Os receptores Trk são específicos para cada neurotrofina, o NGF ligase ao TrkA, o BDNF e o NT4 ao TrkB, o NT3 ao TrkC, o receptor p⁷⁵ liga-se a todas as neurotrofinas (LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H., 2005).

A ativação do receptor Trk está associada com a memória de reconhecimento, contudo nenhuma das neurotrofinas é essencial para o processo de aquisição. Somente o BDNF, NGF e NT4 são essenciais para a consolidação desse tipo de memória. De fato, essas três neurotrofinas apresentam papéis semelhantes na consolidação da memória.

Aparentemente, o NT3 parece não atuar nas memórias de curto e longo prazo (CALLAGHAN, C. K.; KELLY, A. M., 2013), seu papel é o da diferenciação de células precursoras neuronais (NPCs) em neurônio, porém não se sabe de que forma neurônio recém formadas contribuem para a memória e o aprendizado (SHIMAZU ET AL., 2006)..

As proneurotrofinas ligam-se exclusivamente ao receptor p75 e em conjunto com outras proteínas podem desencadear diferentes respostas, incluindo apoptose e mielinização do neurônio (LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H., 2005). Uma possível ação das proneurotrofinas é eliminar células danificadas que expressão o p75, pois a expressão desse receptor pode aumentar após danos ao sistema nervoso (LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H., 2005).

O BDNF atua na transformação da potenciação de curto-prazo (STP) em longo-prazo (LTP), sendo possivelmente uma das proteínas da síntese proteica necessária para a consolidação da memória (OZAWA, T.; YAMADA, K.; ICHITANI, Y, 2014). A ligação do BDNF ao receptor TrkB leva a dimerização e autofosforilação de resíduos de tirosina no domínio intracelular do receptor ativando vias de sinalização que desempenham um papel na tradução de RNAm, essa tradução é importante, pois a consolidação da memória depende da síntese de diversas proteínas (YAMADA, NABESHIMA, 2003).

O BDNF atua na consolidação de memória de reconhecimento em ratos adultos, porém a sua ausência parece não afetar a memória de reconhecimento de curto prazo (CALLAGHAN, KELLY, 2013), evidenciando seu papel na consolidação da memória.

3. Memória e obesidade

Os estudos que relacionam a dieta ocidental com déficits cognitivos tem se concentrado nos dois principais componentes dessa dieta, que são ácidos graxos saturados e carboidratos simples (mono e dissacarídeos). Os ácidos graxos são caracterizados em saturados e insaturados, sendo os insaturados considerados benéficos para a saúde (Omega-3) (KANOSKI, DAVIDSON, 2011).

Refeições com alto teor de açúcares simples podem causar uma diminuição no desempenho em testes de memória realizados poucas horas após a refeição em seres humanos com diabetes tipo II (PAPANIKOLAOU et al., 2006), outros estudos também mostram que esse tipo de refeição pode levar a uma diminuição de desempenho em seres humanos não diabéticos (BENTON, MACONIE, WILLIAMS, 2007 e NABB, BENTON, 2006), porém ainda são necessários estudos para avaliar se os açúcares podem causar mudanças permanentes no desempenho (KANOSKI; DAVIDSON, 2011).

Apesar de esses estudos sugerirem que dietas ricas em carboidratos possam prejudicar processos de formação de memória e aprendizado, o estudo da obesidade induzida por dieta rica em gordura tem sido de grande valia por mimetizar a dieta ocidental.

Diversos estudos mostram que a obesidade leva a prejuízos na memória e aprendizado (TOZUKA et al., 2010; KANOSKI; DAVIDSON, 2011 e LINDQVIST et al, 2006), devido a mudanças no hipocampo, tais como diminuição das neurotrofinas, comprometimento do metabolismo da glicose e neuroinflamação (KANOSKI e DAVIDSON, 2011).

O comprometimento do metabolismo da glicose se deve ao quadro de resistência à insulina consequente à obesidade. Dessa forma, os níveis de insulina e glicose estão constantemente elevados em pacientes com diabetes tipo II, caracterizando um quadro de hiperglicemia e hiperinsulinemia constantes (PARK et al., 2000). Como a insulina é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica devido ao tamanho de sua molécula, a passagem da insulina do plasma para o sistema nervoso central depende de um processo de transporte mediado por receptores de insulina localizados na barreira hematoencefálica (BAURA et al., 1993). A administração de insulina melhora o desempenho em testes de memória tanto em seres humanos, quanto em ratos (PARK et al., 2000), evidenciando o papel da insulina na formação de potenciais de longa duração. A insulina pode afetar diversos processos relacionados à formação do potencial de longa duração, tais como o metabolismo do fosfoinositol, modulação da atividade do receptor NMDA, modulação da produção do óxido nítrico, e a fosforilação da proteína F1 (GAP-47) (PARK et al., 2000).

Outra possibilidade é a glicosilação de proteínas interferir na formação da memória. A glicosilação é um processo normal onde uma molécula de açúcar se liga a uma proteína dando origem a diversas variantes dependendo do local da ligação. A hiperglicemia resulta em um excesso de proteínas glicosiladas (SCHEDIN-WEISS, WINBLAD, TJERNBERG, 2014) e sabe-se que a glicosilação incorreta da proteína amiloide precursor (APP) pode estar ligada à formação de placas amilóides, compostas de β -peptídeo amiloide (A β), características da Doença de Alzheimer (SCHEDIN-WEISS, WINBLAD, TJERNBERG, 2014).

A obesidade traz implicações também para os filhos dos indivíduos obesos, pois as alterações presentes em indivíduos adultos, tais como a diminuição das neurotrofinas e aumento nos fatores inflamatórios devido à ingestão de alimentos altamente calóricos

podem também ser observados em filhos de mães obesas por motivos discutidos a seguir.

Estudos recentes mostram que filhotes de ratas obesas apresentam anormalidades no desenvolvimento neural (TOZUKA, 2009b). A neurogênese nesses filhotes é comprometida no período pós-natal manifestando-se como déficits no aprendizado e na memória (TOZUKA, 2009b). Uma das possíveis razões para as alterações observadas pode ser o dano celular mediado pelo estresse oxidativo devido ao acúmulo de ácidos graxos no cérebro de filhotes de mães obesas, uma vez que a obesidade leva ao aumento dos ácidos graxos livres no plasma. Também é possível que, a peroxidação em excesso de lipídios que ocorre na obesidade, cause danos aos neurônios. As células progenitoras neurais de filhotes de mães obesas são mais imunorreativas aos lipídios peroxidados do que filhotes das mães controle (TOZUKA, 2009b). Esses dados sugerem uma maior susceptibilidade dos neurônios dos filhotes que são gerados por ratas com síndrome metabólica.

Alterações no BDNF podem estar envolvidas na diminuição da capacidade de realização de tarefas relacionadas à aprendizagem espacial. De fato, observou-se uma redução nos níveis de BDNF no hipocampo de filhotes de camundongas obesas (TOZUKA, et al., 2010). O BDNF desempenha um papel importante na diferenciação, manutenção e sobrevivência de neurônios e se expressa abundantemente no hipocampo. Além disso, desempenha papel importante na regulação sináptica, na neurotransmissão e na plasticidade, bem como nos processo de aprendizagem e memória (NOBLE, 2011), atuando na consolidação da memória de curto prazo em memória de longo prazo (ABEL, LATTAL, 2001).

Assim, é possível que a obesidade materna seja a responsável pela redução nos níveis de BDNF nos filhotes através da passagem de nutrientes pela placenta, já que a alimentação rica em ácidos graxos e carboidratos simples reduzem os níveis de BDNF no hipocampo (KANOSKI, DAVIDSON, 2011), com consequentes alterações nos processos de aprendizado. Contudo, essa diminuição no BDNF pode ser revertida em ratos adultos através de exercício físicos, evidenciando que o sedentarismo participa das alterações observadas, além da dieta (MOLTENI et al., 2004).

A neurotrofina-3 (NT-3), assim como o BDNF, é um importante membro da família dos fatores neurotróficos, promovendo a diferenciação neuronal (WANG, et al., 2012). É sintetizada principalmente no giro dentato do hipocampo do cérebro adulto, e sua ausência leva a prejuízos na formação da memória hipocampo-dependente e no aprendizado (SHIMAZU, et al., 2006). Os níveis de NT-3 se encontram elevados no hipocampo de camundongos obesos, porém sem aumento na expressão do seu receptor (YAMADA-GOTO et al, 2004). Como esse fator neurotrófico encontra-se elevado na obesidade, é possível que a obesidade materna também altere a quantidade de NT-3 produzida nos seus filhotes.

O excesso de BDNF leva ao aumento da neurogênese no hipocampo e na amígdala. Já o excesso de NT-3 leva à diminuição da neurogênese. Assim, quando em excesso, esses fatores desempenham funções opostas no crescimento neuronal e nas atividades neurais (WANG, et al., 2012). De fato, camundongos obesos apresentam uma diminuição nos níveis de BDNF e na expressão do seu receptor no hipocampo (TOZUKA et al., 2010).

Outro aspecto relevante a ser considerado é o estado de inflamação induzido pela obesidade, que pode contribuir para as alterações observadas na prole de mães obesas. A obesidade e a diabetes tipo-2, caracterizada pela diminuição na resposta a

insulina nos tecidos periféricos, estão relacionadas com processos inflamatórios, pois se observa nos pacientes com a síndrome metabólica o aumento na produção de Fatores de Necrose Tumoral TNF-alfa, TNF-beta e nas interleucinas IL-6 e IL-10 pelos adipócitos hipertróficos (DANDONA, ALJADA, BANDYOPADHYAY, 2004 e BILBO, TSANG, 2010). Já foi demonstrado na literatura que estados de inflamação resultam em déficits no aprendizado (WANG et al., 2013).

Lipopolisacarídeos produzem déficits duradouros no aprendizado e alterações no hipocampo através das citocinina pré-inflamatórias IL-1b, IL-6 e TNF-alfa (WANG, et al., 2013). Além disso, a insulina possui um efeito antiinflamatório em nível celular e molecular (DANDONA, ALJADA, BANDYOPADHYAY, 2004), por isso a diabetes tipo II está relacionada a um aumento na produção de fatores inflamatórios (KANOSKI, DAVIDSON, 2011). Tomados em conjunto, esses dados da literatura sugerem uma possível participação dos fatores de inflamação nos processos de redução aprendizado.

A relina é uma glicoproteína associada à matriz extracelular e é de grande importância para o desenvolvimento do córtex e cerebelo desempenhando um papel modulatório na indução de sinapses no hipocampo. A relina se liga dois receptores distintos VLDLR e ApoER2, cada receptor coordena um aspecto distinto no posicionamento neural (HACK et al., 2007), além de inibir a apoptose neuronal no cérebro (BEFFERT et al. 2005). Relina e BDNF agem em paralelo regulando diversos processos durante o desenvolvimento neural, incluindo migração celular, e promovem a plasticidade neural de longo prazo no hipocampo (SUI, L.; REN, W.-W.; LI, B.-M, 2010). Assim, é possível que da mesma forma que a obesidade altera a expressão do BDNF e NT -3, a relina também esteja alterada nos filhotes de mães obesas.

Os genes Early Growth Response-1 (Egr-1) e Activity Regulated Cytoskeleton-associated protein (Arc) codificam proteínas que desempenham um papel importante na

plasticidade sináptica, aprendizado e memória (GINÉ, 2013). O Egr-1 é importante para a formação da memória de longo prazo (KATCHE, 2012), mostrando-se elevado na amígdala em processos de aprendizado (MALKANI, ROSEN, 2000). A expressão do gene Arc está aumentada em atividades que induzem potenciação de longo prazo como no labirinto aguático (GUZOWSKI, 2001). A expressão desses genes apresenta uma diminuição significativa em ratos com hipotireoidismo, isso demonstra que pode haver uma correlação entre a expressão desses genes e as deficiências no aprendizado apresentadas por esses ratos (GINÉ, 2013).

Os níveis de mRNA para os genes do BDNF e Arc estão elevados durante os processos de aprendizagem, reforçando o papel desses genes no aprendizado (RAPANELLI, FRICK, ZANUTTO, 2009).

Outra possível explicação é a passagem de quantidades insuficientes de hormônio tireoídiano da mãe para o filhote através da placenta até o meio da gestação onde a glândula tireoide do feto passa a produzir os próprios hormônios (BERNAL, NUNEZ, 1995), pois esse hormônio é responsável pela diferenciação e migração celular, sinaptogênese, formação da mielina e crescimento dendrítico e axonal (BERNAL, NUNEZ, 1995) através dos efeitos produzidos no BDNF, NT-3, relina.

4. Hormônios tireoídianos e neurotrofinas

Os hormônios tireoídianos são fundamentais para o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central desde a vida intrauterina e ao longo do período pós-natal (AHMED, 2012).

A glândula tireoide do feto humano é competente somente a partir da 10^a semana de gestação, mas a expressão dos receptores de T3 (TRs) começa a partir da 8^a semana de gestação (BERNAL, NUNEZ, 1995). Esses dados mostram que o desenvolvimento do Sistema Nervoso Central é dependente dos hormônios produzidos pela mãe durante a

gravidez (BERNAL, NUNEZ, 1995). De fato, o hipotireoidismo materno, mesmo quando leve, como no caso do hipotireoidismo subclínico, leva a déficits de aprendizado e memória nos filhotes (AHMED, 2012). É provável que esse déficit seja devido a alterações na expressão dos fatores reguladores dos processos de neurogênese, migração neuronal e sinaptogênese (TOZUKA et al., 2010; KANOSKI; DAVIDSON, 2011 e LINDQVIST et al, 2006).

Além disso, o hormônio tireoidiano regula as neurotrofinas que estão relacionadas aos processos de aprendizado e memória do hipocampo, tais como o BDNF, a NT-3 e a relina. No hipocampo de ratos com hipotireoidismo o déficit de hormônio tireoidiano causa um aumento na metilação dos genes do BDNF e da relina podendo levar a supressão da expressão desses genes (SUI, L.; LI, B.-M, 2010). Já o NT-3 é positivamente regulado pelo hormônio tireoidiano, uma vez que o T3 aumenta a transcrição do RNA desta neurotrofina (GIORDANO, et al. 1992). Além disso, o hipotireoidismo também leva à diminuição na expressão dos genes Egr-1 e Arc (GINÉ, 2013).

5. Desiodases

Apesar dos animais sintetizarem os hormônios tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), a última forma é a que apresenta atividade biológica por ser capaz de se ligar aos TRs enquanto o T4 não. Assim, o T4 é considerado um pré-hormônio, sendo convertido a T3 pela ação das enzimas chamadas desiodases. As enzimas desiodase 1 e desiodase 2 (D1 e D2) convertem o T4 em T3 enquanto a desiodase 3 (D3) inativa o T4 a T3 reverso (T3r), que é incapaz de se ligar ao receptor para o hormônio (TR) (BIANCO, KIM, 2006).

A importância do T3 se deve a capacidade desse hormônio em regular a expressão gênica em nos tecidos de vertebrados através de fatores de transcrição acionado pela ligação desse hormônio ao seu receptor TR (BIANCO, LARSEN, 2005). Os níveis sistêmicos de T3 são relativamente constantes em pacientes saudáveis ao longo do tempo. Assim, são as desidases que controlam a disponibilidade do T3 na célula pela a conversão do T4 em T3. Um desbalanço entre as desidases pode causar um hiper ou hipotireoidismo local. A D3 em excesso causa o hipotireoidismo local, pois converte o T4 em T3r, enquanto a D2 em excesso causa o hipertireoidismo local. O papel da D1 ainda precisa ser esclarecido, pois converte o T4 em T3 e o T3 em T2 em iguais proporções (BIANCO, KIM, 2006).

O metabolismo do hormônio tireoidiano pode estar alterado mesmo em pacientes que não apresentam doenças relacionadas a glândula tireoide, como os pacientes que sofrem de infarto, nesse caso os níveis de T4 e hormônio tireoestimulante (TSH) estão normais, porém há um aumento nos níveis de T3r e uma diminuição nos níveis de T3 devido a uma mudança na atividade das desidases (HAMILTON et al., 1990).

Os níveis de hormônio tireoidiano em adultos são incompatíveis com os níveis necessários para o desenvolvimento fetal, portanto são as desidases que regulam a concentração de hormônio disponível para o feto, em especial a D3 presente na placenta (OLIVARES, CARVALHO, 2010). Portanto, a interação entre as diversas desidases resulta no equilíbrio dos níveis de T3 disponíveis nos tecidos.

A nossa hipótese de trabalho contemplou a possibilidade da obesidade levar à uma alteração na expressão e na atividade da desidase do tipo 3, levando a um estado de hipotireoidismo no cérebro de filhotes de ratas de mães obesas. Esse hipotireoidismo

local levaria a uma alteração na expressão das neurotrofinas e outras proteínas, apresentando um papel nos déficits na memória e no aprendizado observado nos filhotes de mães obesas.

Objetivos

Objetivo geral

Associar a obesidade materna com possíveis déficits de aprendizado e memória causados por alterações na desidase 3 e em genes influenciados pelo hormônio tireoidiano.

Objetivos específicos

1 - Avaliar se a obesidade materna afeta processos de aprendizagem e memória nos filhotes.

2 – Avaliar se a obesidade materna altera a expressão do RNAm para o BDNF, NT-3, NGF, relina, Egr-1 e Arc e D3 e a expressão da enzima D3 no hipocampo de filhotes de mães obesas.

Métodos

Animais: Oito ratas Wistar com um mês de vida, separadas em dois grupos foram mantidas em gaiolas de plástico e submetidas a períodos de 12h de claro/escuro na temperatura de 22°C com acesso livre a comida e água durante três meses. O grupo controle recebeu dieta padrão da marca Nuvilab, e o grupo experimental recebeu dieta hiperlipídica (40%) da marca Rhoster composta de caseína, amido de milho, banha de porco, celulose, DL- Metionina, amido dextrinizado, bitartarato de colina, fosfato de cálcio dibásico, premix mineral AIN-93G, premix vitamínico AIN-93, queijo, sacarose para o desenvolvimento da obesidade. Após o período de três meses as ratas continuaram a receber as suas respectivas dietas, exceto durante o 16º e o 21º dias de vida dos filhotes, as ratas do grupo experimental receberam dieta padrão para que os filhotes não consumissem a dieta hiperlipídica. No 21º dia de vida dos filhotes ocorreu o desmame e a fêmea foi separada da ninhada e voltou a receber a dieta hiperlipídica. Os filhotes foram alimentados exclusivamente com a dieta padrão.

Após o período de três meses as ratas foram expostas a ratos machos para que ocorra o cruzamento. Cada rata permaneceu com no máximo oito filhotes de sua ninhada, os filhotes excedentes foram mortos pelo excesso de anestésico injetável (uretana). A ninhada proveniente desse cruzamento foi usada nos testes comportamentais. Um segundo cruzamento foi efetuado para obter uma segunda ninhada que foi usada nas alterações bioquímicas.

Procedimento experimental

O peso corporal das ratas foi medido diariamente até o desmame dos filhotes da segunda ninhada e o peso dos filhotes foi medido durante todo o protocolo experimental. Após o dia da fecundação, determinado pelo esfregaço vaginal, as ratas

foram separadas em gaiolas individuais e acompanhadas para a determinação da ocorrência de nascimentos prematuros.

Imunohistoquímica: Aos 30 dias de idade, dois filhotes de cada ninhada, um macho e uma fêmea (N=16), foram anestesiados com uretana (1200mg/Kg), e em seguida foi realizada a perfusão cardíaca, onde o animal anestesiado tem o coração exposto e é bombeada através de uma agulha inserida no ventrículo esquerdo uma solução de PB 4% por aproximadamente 10 minutos ou até que o fígado adquira uma coloração amarelada, em seguida é bombeada uma solução de PF 4% até que o corpo do animal fique rígido, a pressão da bomba é de aproximadamente 10 ml/min, ao final da perfusão os animais foram decapitados e suas cabeças foram mantidas em uma solução de PF 4% durante 24 horas. Após esse período os cérebros foram removidos dos crânios e mantidos por outro período de 24 horas em uma solução de sacarose 30%. Após essa etapa os cérebros foram mantidos em uma solução de PF 1%. Os cérebros foram fatiados em vibrátomo (Leica) em fatias com espessura de 50 micrômetros, as fatias foram utilizadas no imunoenensaio para a marcação com o anticorpo para a desidase 3 (D3) no hipocampo utilizando-se o ABC kit da Vectastain[®].

PCR em tempo real: Os níveis de RNAm para BDNF, NT-3, NGF, relina, Egr-1, Arc e D3 no hipocampo foram obtidos do tecido cerebral de 4 filhotes machos de 21 dias de cada grupo (N=8) anestesiados com uretana e decapitados em seguida, utilizou-se o kit de extração de RNA (RNeasy[®] Plus Universal Mini Kit) da Qiagen. Os níveis foram medidos através da técnica de PCR em tempo real. Os primers utilizados foram Relina 5'-AAACTACAGCGGGTGGAAACC-3' e 5'-ATTTGAGGCATGACGGACCTATAT-3'; BDNF 5'-CCATAAGGACGCGGACTTGTAC-3' e 5'-AGACATGTTTGCGGCATCCAGG-3'; Egr-1 5'-AGAAGCCTTTGCCTGTGACA-3' e 5'-CGTTCATCACTCCTGGCAAAC-3'; ARC 5'-

ACCGTCCCCTCCTCTCTTGA-3' e 5'-GGCACCTCCTCTTTGTAATCCTATT-3';
D3 5'-TTCATGGCGCGGATGAG-3' and 5'-GATGATAAGGAAGTCAACGTCGC-
3'; NT-3 5'- CAGCCCTTTTGAGGGACCAT-3' e 5'- TTCGGTCATTCAGTCTCGCC-
3; todos fornecidos pela Invitrogen™. O cDNA foi preparado utilizando-se o kit da
Invitrogen™ e o termociclador foi programado da seguinte forma: 1º ciclo: 25°C –
10 min; 2º ciclo: 50°C – 30 min; 3º ciclo: 85°C – 5 min; 4º ciclo: 37°C – 20 min.

Testes Comportamentais

Antes de cada teste comportamental os animais passam por um período de adaptação de 1 hora na sala onde foi realizado o teste com iluminação reduzida. Os instrumentos utilizados são limpos com álcool 5% após cada passagem de um animal.

Labirinto em T: todos os filhotes da primeira ninhada de cada fêmea foram submetidos ao teste. Os animais foram privados de ração por um período de 12 horas. Durante 5 dias alternados os animais passaram pela fase de aprendizado onde devem encontrar uma isca (chocolate) no braço direito do labirinto em cinco tentativas seguidas de no máximo 2 minutos cada uma. Se após 2 minutos o animal não encontrar a isca ele deve ser conduzido gentilmente até a isca. No sexto dia é realizado o teste propriamente dito, onde novamente o animal terá 5 tentativas de encontrar a isca no braço correto. Foi avaliado o tempo levado para encontrar a isca e o braço escolhido. No início os animais são colocados na parte central do labirinto com a porta fechada, em seguida a porta é aberta e o tempo é cronometrado. O critério para considerar satisfatório o aprendizado é de 80% de acerto (4 acertos em 5 tentativas).

Teste de Habituação em Campo Aberto (open field): os animais são colocados no centro do campo aberto, uma arena circular de acrílico dividida em 4

quadrantes internos e 8 externos, e tem 10 minutos para transitar livremente. É contabilizado o tempo de imobilidade (TI) em que o animal fica imóvel, o número de quadrantes externos e internos pelos quais o animal passou (entrou nos limites do quadrante com as quatro patas), o número de vezes em que foi realizado o self-grooming (autolimpeza), a defecação e o levantar (ficar apoiado somente nas patas traseiras sem estar apoiado nas laterais da arena). Um re-teste foi realizado no após 48 horas.

Teste de Reconhecimento de Objeto: Na mesma arena utilizada para o teste de campo aberto, os animais passaram por duas sessões de adaptação de 10 minutos cada em dias diferentes na arena sem nenhum tipo de estímulo. Após as sessões de adaptação, os animais passam por um treino onde podem explorar dois objetos diferentes (A e B) colocados em posições opostas dentro da arena durante 3 minutos. O teste é realizado 3 horas após a sessão de treino para avaliar a formação da memória de curto prazo. Neste teste o animal é colocado na arena com um dos objetos previamente apresentado nas sessões de adaptação e treino e um objeto desconhecido (objetos A e C) durante 3 minutos. O comportamento exploratório do animal consiste em cheirar ou tocar com o nariz ou as patas dianteiras o objeto. Os tempos gastos na exploração entre o objeto conhecido e o novo são comparados. O re-teste é realizado uma semana após o teste para avaliar a formação da memória de longo prazo. Para isso utiliza-se um objeto conhecido A e um desconhecido D.

Análise estatística

A construção dos gráficos e a análise estáticas foram realizadas utilizando o software Prisma (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo para todos os testes.

Resultados

No intuito de avaliar possíveis alterações na memória e aprendizado em filhotes de ratas obesas, tratamos ratas fêmeas por 90 dias com dieta hipercalórica para que os animais desenvolvessem obesidade. Como podemos observar nas Figuras 1A e B, o ganho de peso nas fêmeas tratadas com ração hipercalórica (grupo experimental) foi maior do que o ganho de peso das ratas alimentadas com a ração comum (grupo controle).

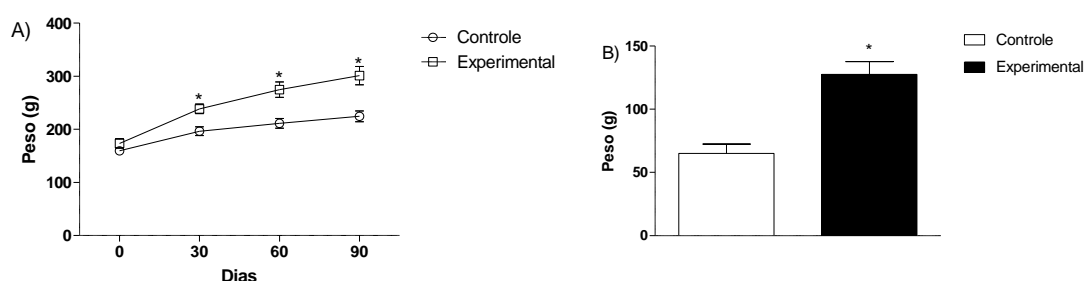


Figura 1: A) Pesos das fêmeas dos grupos controle e experimental, n=4. B) Variação do peso das fêmeas dos grupos controle e experimental, n=4. Os valores estão representados como Média±EP. * vs. Controle com $p < 0.003$.

A fim de confirmar que as fêmeas apresentavam outras anormalidades além da obesidade, ao final do período de 90 dias avaliamos a tolerância à glicose. A Figura 2A mostra o teste de tolerância à glicose (GTT), onde pode ser observado que as fêmeas experimentais apresentam uma maior dificuldade em metabolizar a glicose do que as fêmeas do grupo controle, consequência da obesidade.

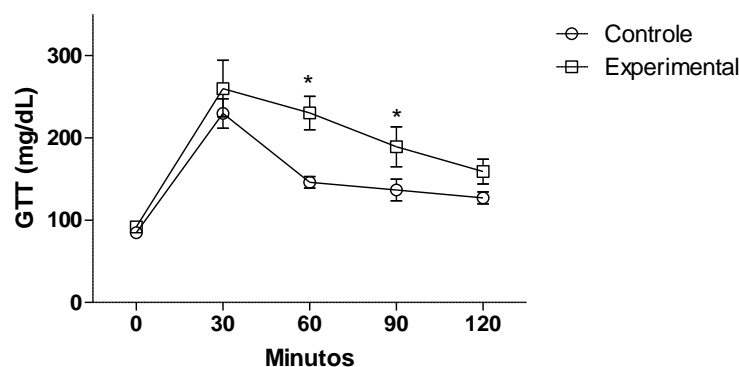


Figura 2: Curva de tolerância à glicose em ratos controle (n=4) e alimentadas com dieta rica em gordura (40%) por 3 meses (n=4). Os valores estão representados como Média \pm EP. * vs. Controle com $p < 0,05$.

Não observamos alterações no número de filhotes nos grupos controle ou experimental. Também não foi constatada prematuridade a partir do esfregaço vaginal realizado para determinar o dia da fecundação, sendo assim, todas as fêmeas tiveram um período de gestação de 21 dias. Os pesos dos filhotes também não se mostraram alterados ao nascimento ou ao longo do tempo em que os animais foram avaliados (Tabela 1).

Tabela 1: Número total de filhotes machos e fêmeas das ninhadas das fêmeas dos grupos controle e experimental e pesos inicial e final de cada grupo. Os valores de peso inicial e final estão representados como média.

	Controle		Experimental	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Número de filhotes	6,5 \pm 1,6	4,8 \pm 2,2	4,0 \pm 1,9	6,2 \pm 1,9
Peso inicial (5º dia)	10,0 \pm 1,5	9,6 \pm 1,9	9,9 \pm 0,9	10,0 \pm 1,2
Peso final (21º dia)	36,2 \pm 5,4	34,59 \pm 6,5	36,4 \pm 6,9	38,8 \pm 9,5

Quando os filhotes atingiram a idade de 21 dias eles passaram pelos testes comportamentais: *Open Field*, labirinto em T e reconhecimento de objeto a fim de determinar se a obesidade materna levou a alterações nos processos de memória e aprendizado como as descritas em estudos anteriores.

O primeiro teste realizado foi o *open field* e tem como objetivo avaliar a locomoção do animal e seu comportamento exploratório através da contagem do número de quadrantes externos e internos percorridos pelos animais, o número de *self-grooming* e o movimento de se apoiar nas patas traseiras sem se apoiar nas paredes da arena. O re-teste é realizado para avaliar a memória do animal.

Na Figura 3 podemos observar que os machos do grupo experimental e controle percorrem e exploram a arena durante o teste e o re-teste de forma semelhante, indicando que talvez que os animais não se recordam de já terem estado na arena. Na Figura 4 podemos observar que as fêmeas exibem o mesmo comportamento que os machos tanto no teste quanto no re-teste.

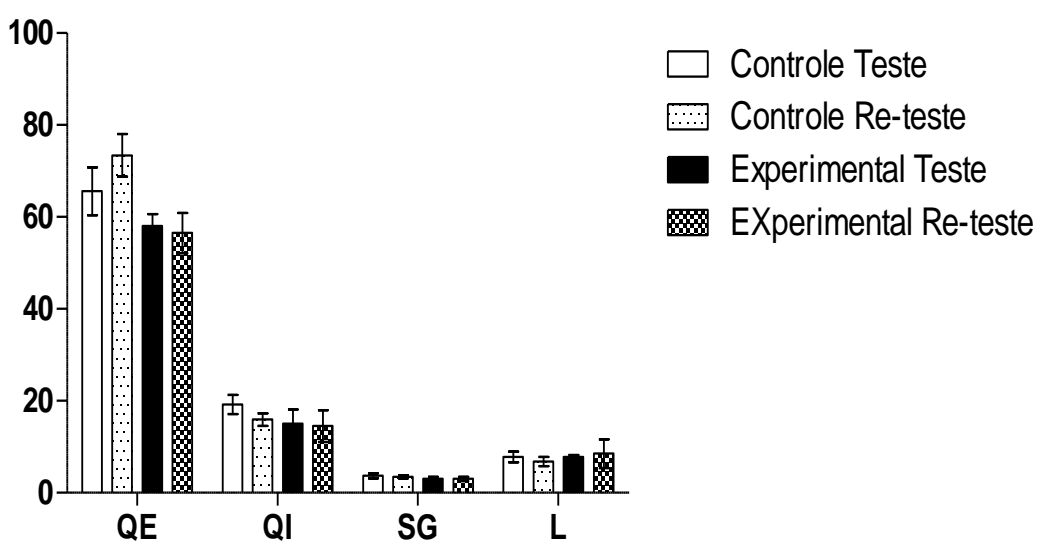


Figura 3: Número de vezes que os machos percorrem os quadrantes externos (QE), quadrantes internos (QI), e o número de vezes que o animal realiza self-grooming (SG) e se levanta (L) durante o teste e o re-teste, n=15 no grupo controle e n=5 no grupo experimental. Os valores estão representados como Média \pm EP.

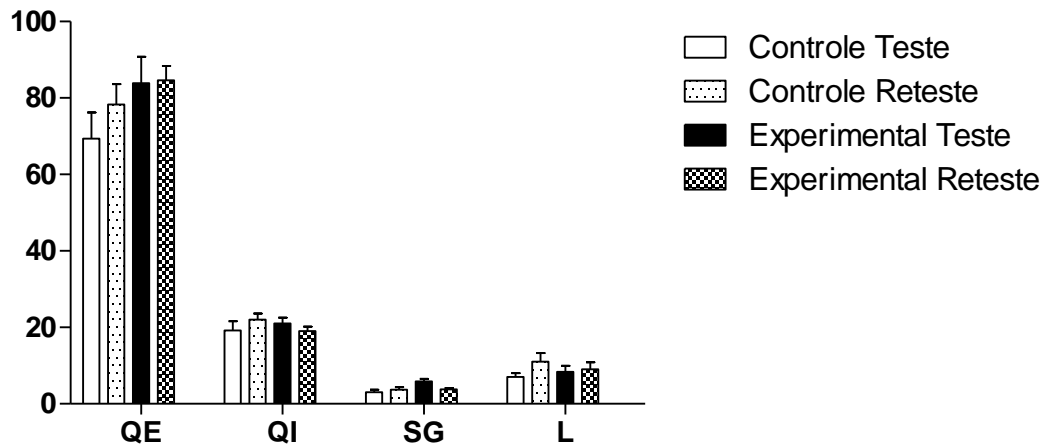


Figura 4: Número de vezes que as fêmeas percorrem os quadrantes externos (QE), quadrantes internos (QI), e o número de vezes que o animal realiza self-grooming (SG) e se levanta (L) durante o teste e o re-teste, n=9 no grupo controle e n=11 no grupo experimental. Os valores estão representados como Média \pm EP.

O teste seguinte, reconhecimento de objeto, tem como objetivo determinar se o animal é capaz de diferenciar um objeto já conhecido e outro desconhecido, ou seja, a formação de memória. Relembrando, os animais passaram por um período de treino de 10 minutos com dois objetos (A e B). No teste, realizado 3 horas após o treino, o animal passa um período de 3 minutos com um dos objetos conhecidos (A) e outro desconhecido (C). A Figura 5 mostra que o tempo gasto pelos machos de ambos os grupos na exploração do objeto previamente conhecido (objeto A) é menor quando comparado ao tempo gasto na exploração do objeto desconhecido (C), mostrando que os animais foram capazes de memorizar o objeto antigo. No entanto, não houve diferença entre os grupos estudados. O **re-teste, realizado uma semana após o teste, mostrou** que tempo gasto na exploração do objeto conhecido (A) e o objeto desconhecido (D) foi semelhante para os dois grupos, sugerindo que não houve retenção da memória. Esses resultados sugerem que a obesidade materna não levou a alterações na formação da memória detectáveis pelos testes empregados no presente estudo.

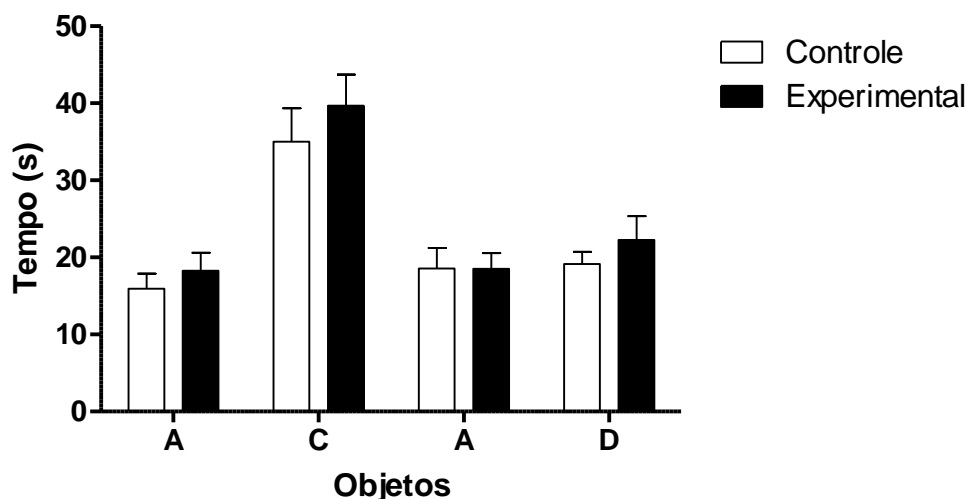


Figura 5: Tempo em segundos gasto na exploração dos objetos A e B no primeiro dia de teste e nos objetos A e D no re-teste pelos machos do grupo controle e do grupo experimental, $n=13$ no grupo controle e $n=8$ no grupo experimental. Os valores estão representados como Média \pm EP.

A Figura 6 mostra que o tempo gasto na exploração do objeto, pelas fêmeas dos grupos controle e experimental, previamente conhecido na fase de treino (objetos A e B) e dos objetos desconhecidos (C e D) nos dias de teste e re-teste. No primeiro dia de teste os animais demonstraram uma maior preferência pelo objeto desconhecido (C) em relação ao objeto conhecido (A), sendo que os animais experimentais passaram mais tempo explorando o objeto desconhecido do que os animais do grupo controle. No re-teste o tempo gasto na exploração do objeto desconhecido (D) foi semelhante para os dois grupos.

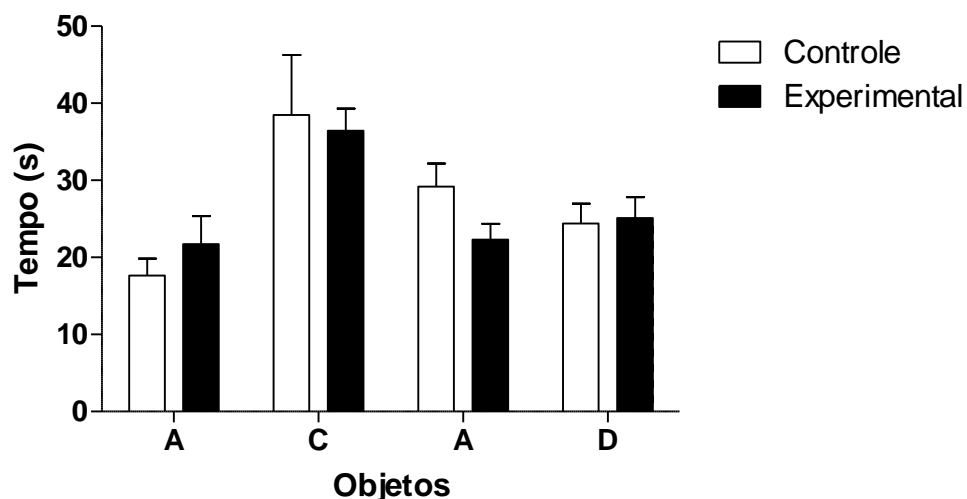


Figura 6: Tempo em segundos gasto na exploração dos objetos A e B no primeiro dia de teste e nos objetos A e D no re-teste pelas fêmeas do grupo controle e do grupo experimental, n=9 no grupo controle e n=16 no grupo experimental. Os valores estão representados como Média \pm EP.

O teste no labirinto em T avalia a memória dos animais, os animais passam por um período de 5 dias alternados de teste, nos quais eles têm 5 tentativas de encontrar a isca localizada sempre no mesmo braço do labirinto. No teste, o animal tem cinco tentativas de encontrar a isca, e o tempo em cada tentativa é medido.

Na Figura 7 observa-se que as fêmeas do grupo experimental levaram menos tempo para encontrar a isca no braço direito do labirinto nas cinco tentativas seguidas que compõem o teste, o que é inesperado. Apesar do tempo levado para os machos do grupo controle não ter sido significativamente maior do que para os animais do grupo experimental, existe uma tendência de aumento.

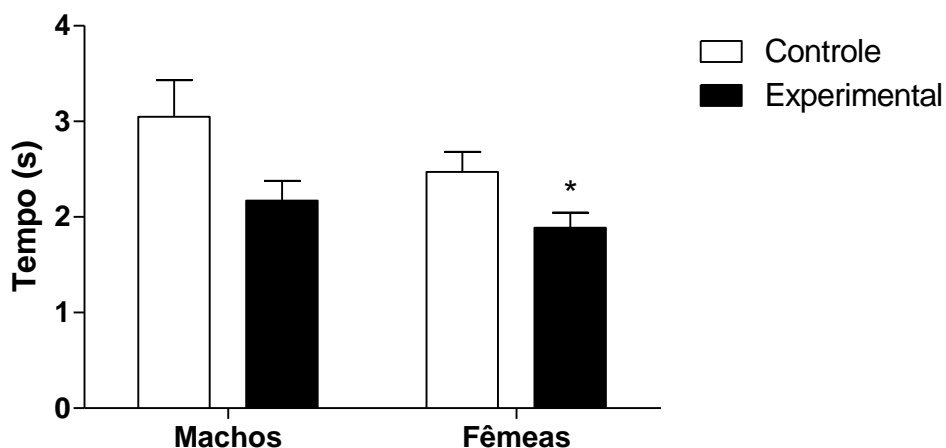


Figura 7: Tempo em segundos levado pelos machos e fêmeas do grupo controle e do grupo experimental para encontrar a isca no braço direito do labirinto, n=14 no grupo controle e n=15 no grupo experimental para os machos, n=11 no grupo controle e n=16 no grupo experimental para as fêmeas. Os valores estão representados como média ± EP. * $p < 0,003$ vs. Controle.

Na Figura 8, observa-se que a porcentagem de acerto foi muito semelhante entre os grupos controle e experimental tanto para os machos, quanto para as fêmeas, mostrando que os animais de ambos os grupos foram capazes de aprender a tarefa de encontrar a isca.

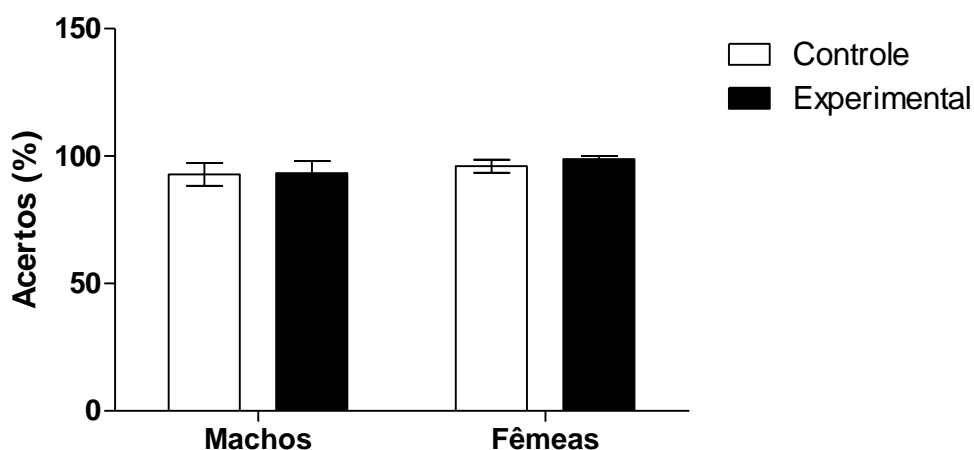


Figura 8: Porcentagem de acerto dos machos e fêmeas do grupo controle e do grupo experimental para encontrar a isca no braço direito do labirinto., n=14 no grupo controle e n=15 no grupo experimental para os machos, n=11 no grupo controle e n=16 no grupo experimental para as fêmeas. Os valores estão representados como média ± EP.

Para avaliarmos se a obesidade materna alterou a expressão de genes envolvidos na plasticidade neuronal, foram medidos os níveis de RNA, por PCR em tempo real. Também medimos a expressão gênica da enzima D3 a fim de estabelecer uma possível relação entre a sinalização do hormônio tireoidiano nos filhotes com a obesidade materna. Para tanto utilizamos o hipocampo de filhotes machos de mães controle e mães obesas (experimental) de onde foram extraídos o RNAm.

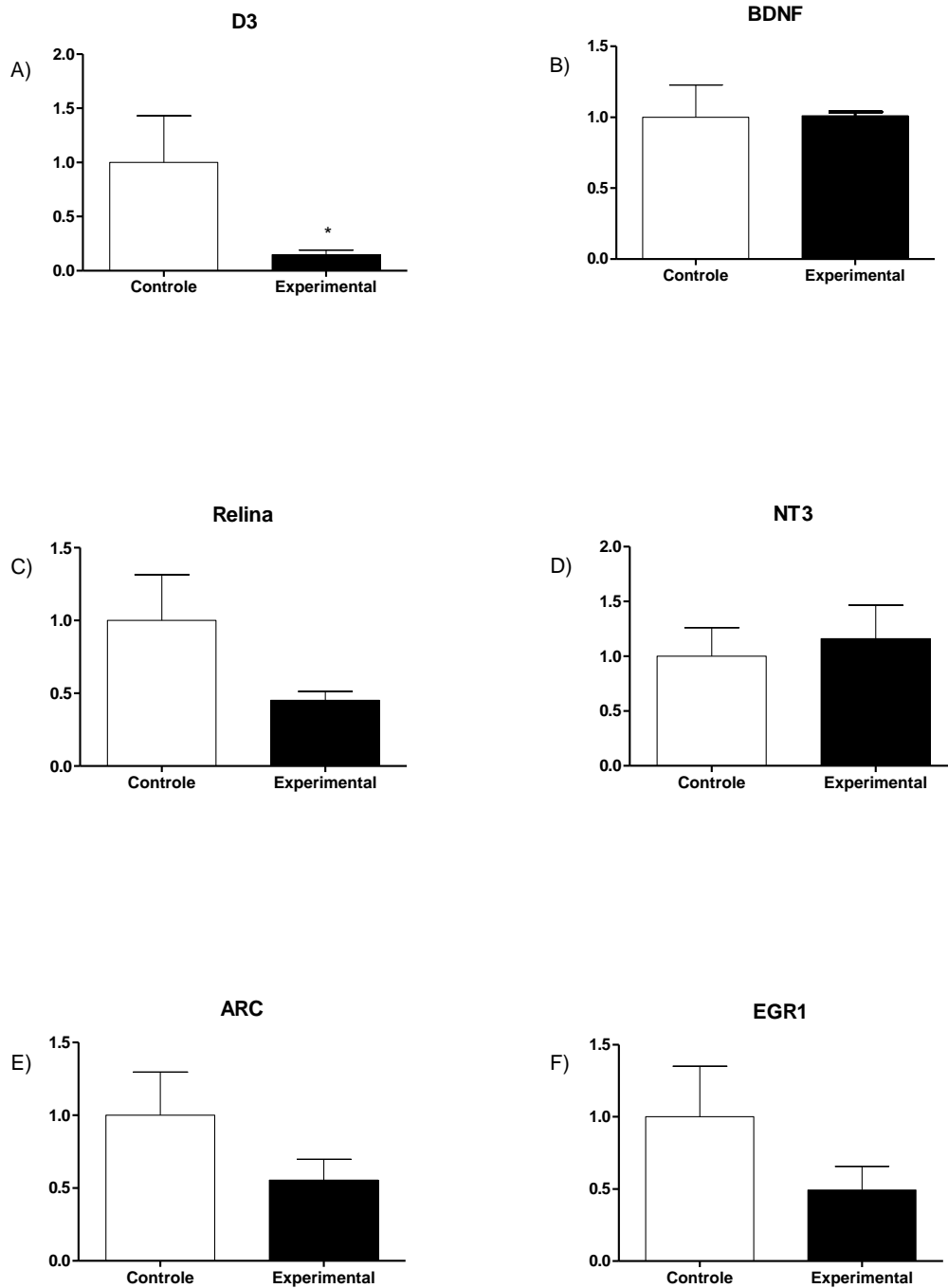


Figura 9: A) Expressão do gene para D3. B) expressão do gene para BDNF. C) Expressão do gene para Relina. D) Expressão do gene para NT3. E) Expressão do gene ARC. F) Expressão do gene EGR-1. n=4 no grupo controle e n=4 no grupo experimental. * vs Controle com $p < 0,05$. Os valores estão representados como Média \pm EP.

A desidase D3, responsável pela conversão do T4 em T3r, apresentou redução significativa nos animais do grupo experimental em relação ao grupo controle. Esse dado pode indicar uma compensação a um possível hipotireoidismo, já que com menos D3, uma menor quantidade de T4 é convertida em T3r, a forma inativa do T3.

Além da avaliação do RNAm para a D3, nós também avaliamos a expressão da enzima no hipocampo dos filhotes. Como podemos ver na Figura 13, pode se observar uma redução na marcação para a D3 no hipocampo de animais experimentais quando comparados com os animais controle. Estes achados estão em consonância com os achados de medida da expressão gênica no hipocampo.

Além da D3, avaliamos a expressão gênica de proteínas reguladas pelo T3 para verificar se houve alteração na disponibilidade de T3 no cérebro.

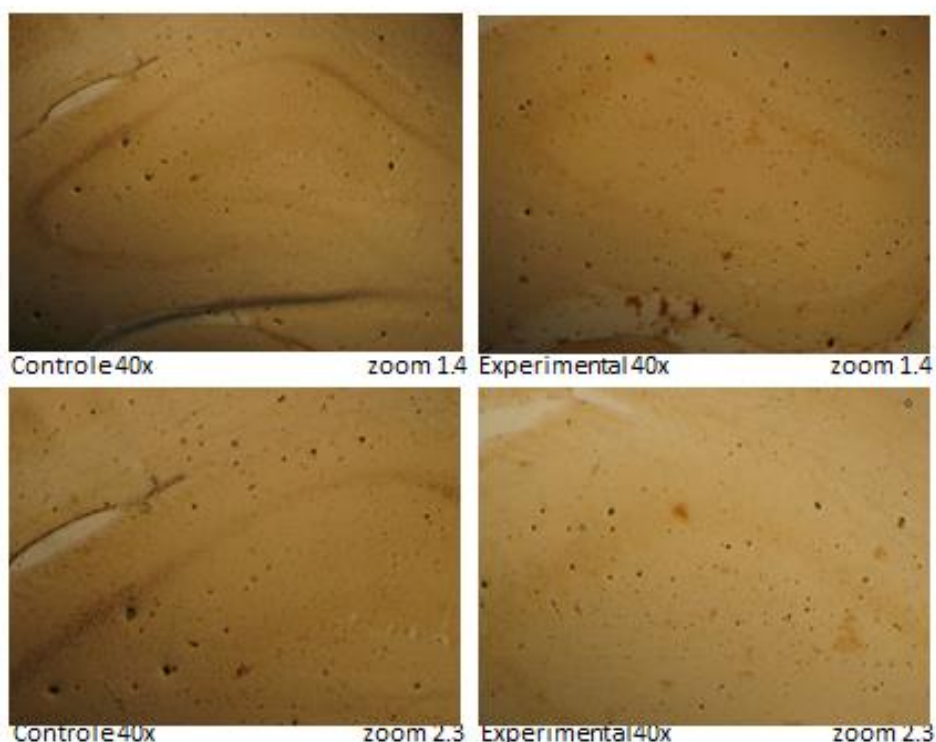


Figura 10: Marcação por imunohistoquímica para a enzima D3 em hipocampo de filhotes machos de mães obesas.

DISCUSSÃO

No presente estudo nós avaliamos alterações no hipocampo de filhotes de mães obesas envolvidas nos possíveis prejuízos dos processos de aprendizado e memória desses animais. Mais precisamente, avaliamos alterações na expressão de genes envolvidos em plasticidade neuronal, processo fundamental na aquisição e consolidação da informação. Além disso, tentamos estabelecer uma relação entre a sinalização do hormônio tireoidiano no hipocampo desses filhotes e a obesidade materna.

Os nossos dados não mostraram que a obesidade materna altere de forma importante o aprendizado e a formação de memória na prole. Na verdade, surpreendentemente, nós observamos melhor desempenho na tarefa de encontrar a isca no labirinto em T em fêmeas. É muito provável que os testes empregados no nosso estudo não tenham sido capazes de medir variações pequenas na habilidade de memorização das informações induzidas pela obesidade materna. É possível que testes mais desafiadores mostrassem essas diferenças. Assim, outros testes poderiam ser mais apropriados para detectar as sutis diferenças na capacidade cognitiva induzidas pela obesidade materna e demonstradas pela literatura, como o labirinto aquático de Morris.

No entanto, observamos que há alterações na expressão de genes no hipocampo que estão envolvidos com a plasticidade neuronal e que podem ajudar a compreender os mecanismos envolvidos no pior desempenho em tarefas de aprendizado e memória relatados por outros estudos (TOZUKA et al., 2010). No nosso estudo não encontramos diferenças na expressão do gene para a neurotrofina BDNF entre os grupos controle e experimental, diferentemente estudos anteriores que também utilizaram filhotes de camundongos fêmea obesas (TOZUKA, et al., 2010).

A relina possui importante papel na migração e diferenciação neuronal, bem como na modulação de sinapses no hipocampo. Sua ação ocorre em paralelo ao BDNF durante o desenvolvimento neural e sua expressão é positivamente regulada pelo T3 (SUI, L.; REN, W.-W.; LI, B.-M, 2010). Embora não haja significância estatística, a expressão desse gene também apresenta uma tendência a diminuição nos animais do grupo experimental. A neurotrofina NT3 desempenha um papel na diferenciação neuronal (WANG, et al., 2012) e sua ausência causa prejuízos na formação de memória de longo prazo dependente do hipocampo (SHIMAZU, et al., 2006). Como podemos ver na figura 9, não houve alteração na expressão do RNAm para essa proteína.

O gene Arc também apresenta tendência de diminuição na sua expressão, mas sem significância em relação ao grupo controle. Esse gene também desempenha um papel importante na plasticidade, aprendizado e memória (GINÉ, 2013). A expressão do gene Egr1 apresenta uma tendência de redução nos animais nascidos de mães obesas. Esse gene desempenha um papel importante na plasticidade sináptica e na formação da memória de longo prazo (KATCHE, 2012).

A expressão do RNAm para D3 está reduzida nos filhotes de mães obesas. Em concordância com a expressão de RNAm, observamos diminuição na expressão da enzima, detectada por imunohistoquímica. Tomados em conjunto, os dados sugerem que a obesidade materna de fato leva a uma redução na expressão da D3 no hipocampo dos filhotes.

Uma redução na expressão da D3 neste tecido não necessariamente significa que os níveis de T3 estejam aumentados no hipocampo. Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão e atividade da D3 não estão claros. Ainda são poucos os estudos que avaliaram a regulação da expressão da D3. Em modelos de infarto do miocárdio ocorre uma indução na expressão e atividade da D3 (UETA et al., 2012). De maneira

semelhante, em neurônios isolados de hipocampo, a hipóxia também induz significativamente a expressão da D3 (JO et al. 2012).

Os nossos dados trazem a possibilidade de que a obesidade materna possa também regular a expressão da D3 no hipocampo dos filhotes, mas por mecanismos ainda não claros.

Os demais genes estudados são positivamente regulados pelo T3 e poderiam nos mostrar se a alteração na expressão da D3 leva a um aumento efetivo na quantidade de T3 no cérebro. No entanto, os nossos achados são paradoxais. Os níveis de RNAm para ARC, ERG1 e relina estão apresentando uma aparente redução, embora não haja significância estatística. Já os níveis de BDNF e de NT3 não sofreram alterações.

Se de fato os níveis de RNAm para os genes positivamente regulados pelo T3 estão diminuídos, isso significa que os níveis de T3 no hipocampo também podem estar reduzidos e, portanto, é possível formular a hipótese de que a redução na D3 seja um mecanismo compensatório em resposta a um hipotireoidismo local. Esses dados precisam ser confirmados, mas apontam para uma importante contribuição da D3 nos processos de aprendizado e memória.

Conclusão

A obesidade materna diminui a expressão da Desiodase 3 no hipocampo da prole, ao contrário da nossa hipótese inicial.

Referências Bibliográficas

ABEL, T.; LATTAL, K. M. Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. **Current opinion in neurobiology**, v. 11, n. 2, p. 180–7, abr. 2001.

AHMED O.M. et al. Effects of experimentally induced maternal hypothyroidism and hyperthyroidism on the development of rat offspring: II-the developmental pattern of neurons in relation to oxidative stress and antioxidant defense system. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 30, n. 6, p. 517-37, out. 2012.

ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome - a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1059-62, 2004.

ALVAREZ-DOLADO, M. et al. Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 19, n. 16, p. 6979-93, 15 ago. 1999.

ANDERSEN, R. E. The spread of the childhood obesity epidemic. **CMAJ: Canadian Medical Association journal**, v. 163, n. 11, p. 1461-2, 28 nov. 2000.

BAURA, G. D. et al. Saturable Transport of Insulin from Plasma into the Central Nervous System of Dogs In Vivo. 1993.

BENTON D, MACONIE A, WILLIAMS C. The influence of the glycaemic load of breakfast on the behaviour of children in school. *Physiol Behav* 2007;92:717–24.

BERNAL, J.; NUNEZ, J. Thyroide hormones and brain development. **Eur J Endocrinol**, 133; 390-398, 1995. BIANCO, A. C.; KIM, B. W. Deiodinases : implications of the local control of thyroid hormone action. v. 116, n. 10, 2006.

BIANCO, A. C.; LARSEN, P. R. Cellular and structural biology of the deiodinases. **Thyroid : official journal of the American Thyroid Association**, v. 15, n. 8, p. 777–86, ago. 2005.

BILBO, S. D.; TSANG, V. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. **FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 6, p. 2104–15, jun. 2010.

CALLAGHAN, C. K.; KELLY, A. M. Neurotrophins play differential roles in short and long-term recognition memory. **Neurobiology of learning and memory**, v. 104, p. 39–48, out. 2013.

DANDONA, P.; ALJADA, A.; BANDYOPADHYAY, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. **Trends in immunology**, v. 25, n. 1, p. 4-7, jan. 2004.

GINÉ, E. et al. Developmentally-induced hypothyroidism alters the expression of Egr-1 and Arc genes and the sensitivity to cannabinoid agonists in the hippocampus. Possible implications for memory and learning. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 365, n. 1, p. 119-28, 5 jan. 2013.

GIORDANO, T. et al. Thyroid hormone regulation of NGF, NT-3 and BDNF RNA in the adult rat brain. v. 16, p. 239-245, 1992.

GUZOWSKI JF, SETLOW B, WAGNER EK, McGAUGH JL (2001) Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and zif268. *J Neurosci* 21(14):5089–5098.

HACK, I. et al. Divergent roles of ApoER2 and Vldlr in the migration of cortical neurons. **Development (Cambridge, England)**, v. 134, n. 21, p. 3883–91, nov. 2007.

HAMILTON, M., STENVENSON, L., LUU, M., WALDEN J., Altered thyroid hormone metabolism in advanced heart failure. *JACC*, v. 16, n. 1, p. 91-5, 1990.

IZQUIERDO I. (2002). *Memória*. Porto Alegre: ArtMed.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiology of learning and memory**, v. 68, n. 3, p. 285–316, nov. 1997.

JANSSEN, R. et al. Cardiac expression of deiodinase type 3 (Dio3) following myocardial infarction is associated with the induction of a pluripotency microRNA signature from the Dlk1-Dio3 genomic region. **Endocrinology**, v. 154, n. 6, p. 1973–8, jun. 2013.

KANOSKI, S. E.; DAVIDSON, T. L. Physiology & Behavior Western diet consumption and cognitive impairment : Links to hippocampal dysfunction and obesity. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 1, p. 59–68, 2011.

KATCHE, C. et al. Maintenance of long-term memory storage is dependent on late posttraining Egr-1 expression. **Neurobiology of learning and memory**, v. 98, n. 3, p. 220-7, out. 2012.

JO, S et al. Neuronal hypoxia induces Hsp40-mediated nuclear import of type 3 deiodinase as an adaptive mechanism to reduce cellular metabolism. *J Neurosci*. 2012 Jun 20;32(25):8491-500).

LINDQVIST, A et al. High-fat diet impairs hippocampal neurogenesis in male rats. **European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies**, v. 13, n. 12, p. 1385-8, dez. 2006.

LU, B.; PANG, P. T.; WOO, N. H. The yin and yang of neurotrophin action. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 6, n. 8, p. 603–14, ago. 2005.

MALKANI S, ROSEN JB: Specific induction of early growth response gene 1 in the lateral nucleus of the amygdala following contextual fear conditioning in rats. *Neuroscience* 2000, 97:693-702.

MOLTENI, R. et al. Exercise reverses the harmful effects of consumption of a high-fat diet on synaptic and behavioral plasticity associated to the action of brain-derived neurotrophic factor. **Neuroscience**, v. 123, n. 2, p. 429–440, jan. 2004.

NABB S, BENTON D. The influence on cognition of the interaction between the macro-nutrient content of breakfast and glucose tolerance. *Physiol Behav* 2006;87:16–23.

NOBLE, E. E. et al. The lighter side of BDNF. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 300, n. 5, p. R1053-69, 2011.

OLIVARES, E. L.; CARVALHO, D. P. Thyroid hormone metabolism in heart failure: iodothyronine deiodinases in focus. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 17, n. 5, p. 414–7, out. 2010.

OZAWA, T.; YAMADA, K.; ICHITANI, Y. Hippocampal BDNF treatment facilitates consolidation of spatial memory in spontaneous place recognition in rats. **Behavioural brain research**, v. 263, p. 210–6, 15 maio 2014.

PAPANIKOLAOU, Y. et al. Better cognitive performance following a low-glycaemic-index compared with a high-glycaemic-index carbohydrate meal in adults with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2006;49: 855–62.

PARK CR, SEELEYe RJ, CRAFT S, WOODS SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav* 2000;68:509–14.

RAPANELLI, M.; FRICK, L. R.; ZANUTTO, B. S. Differential gene expression in the rat hippocampus during learning of an operant conditioning task. **Neuroscience**, v. 163, n. 4, p. 1031–8, 10 nov. 2009.

SCHEDIN-WEISS, S.; WINBLAD, B.; TJERNBERG, L. O. The role of protein glycosylation in Alzheimer disease. **The FEBS journal**, v. 281, n. 1, p. 46–62, jan. 2014.

SEO, T.-B. et al. Treadmill exercise improves behavioral outcomes and spatial learning memory through up-regulation of reelin signaling pathway in autistic rats. **Journal of exercise rehabilitation**, v. 9, n. 2, p. 220–9, maio 2013.

SHIMAZU, K. et al. NT-3 facilitates hippocampal plasticity and learning and memory by regulating neurogenesis. **Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)**, v. 13, n. 3, p. 307-15, 2006.

SUI, L.; LI, B.-M. Effects of perinatal hypothyroidism on regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat hippocampus: Role of DNA methylation and histone acetylation. **Steroids**, v. 75, n. 12, p. 988-97, dez. 2010.

SUI, L.; REN, W.-W.; LI, B.-M. Administration of thyroid hormone increases reelin and brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus in vivo. **Brain research**, v. 1313, p. 9-24, 2010.

TOZUKA, Y.; WADA, E.; WADA, K. Current Perspective “Bio-communication ” Between Mother and Offspring: Lessons From Animals and New Perspectives for Brain. **Science**. v. 132, p. 127-132, 2009a.

TOZUKA, Y.; WADA, E.; WADA, K. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 6, p. 1920-34, jun. 2009b.

TOZUKA, Y. et al. Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. **Neurochemistry international**, v. 57, n. 3, p. 235-47, out. 2010.

UETA, B. et al. Absence of myocardial thyroid hormone inactivating deiodinase results in restrictive cardiomyopathy in mice. *Mol Endocrinol*. 2012 May;26(5):809-18)

WANG, K.-C. et al. Neonatal lipopolysaccharide exposure induces long-lasting learning impairment, less anxiety-like response and hippocampal injury in adult rats. **Neuroscience**, v. 234, p. 146-57, 27 mar. 2013.

WANG, Y. et al. BDNF and NT-3 expression by using glucocorticoid-induced bicistronic expression vector pGC-BDNF-IRES-NT3 protects apoptotic cells in a cellular injury model. **Brain research**, v. 1448, p. 137-43, 11 abr. 2012.

YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Current Perspective Brain-Derived Neurotrophic Factor / TrkB Signaling in Memory Processes. v. 270, p. 267–270, 2003.

YAMADA-GOTO, N. et al. Impairment of Fear-Conditioning Responses and Changes of Brain Neurotrophic Factors in Diet-Induced Obese Mice Neuroendocrinology. n. 6, p. 1120-1125, 2012.