

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RODRIGO SCHUH

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS ENVOLVIDOS
COM A REGULAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR EM RATOS WISTAR
SUBMETIDOS A TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR COM TACROLIMUS E
MICOFENOLATO MOFETIL**

CURITIBA

2017

RODRIGO SCHUH

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS
ENVOLVIDOS COM A REGULAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR EM
RATOS WISTAR SUBMETIDOS A TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR
COM TACROLIMUS E MICOFENOLATO MOFETIL**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínica Cirúrgica, no Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Co-orientadora: Profa Dra. Djanira Aparecida da Luz Veronez

CURITIBA

2017

Schuh, Rodrigo

Análise estereológica de núcleos hipotalâmico envolvidos com a regulação da ingestão alimentar em ratos wistar submetidos a tratamento imunossupressor com tacrolimus e micofenolato mofetil/
Rodrigo Schuh. – Curitiba, 2017.

61f. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Co-orientador: Prof.ª Dr.ª Djanira Aparecida da Luz Veronez

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Transplante. 2. Obesidade. 3. Imunossupressores. 4. Tacrolimo.
5. Ácido Microfenólico. 6. Hipotálamo. 7. Ratos Wistar. 8. Amostragem Aleatória e Sistemática. I. Matias, Jorge Eduardo. II. Veronez, Djanira Aparecida da Luz. III. Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WO 100




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA (CLÍNICA
CIRÚRGICA)

TERMO DE APROVAÇÃO


Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA (CLÍNICA CIRÚRGICA) da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **RODRIGO SCHUH** intitulada: **ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS ENVOLVIDOS COM A REGULAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR COM TACROLIMUS E MICOFENOLATO MOFETIL**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 18 de Dezembro de 2017.


EDUARDO JOSÉ BROMMELSTROET RAMOS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


OSLEI DE MATOS
Avaliador Externo (UTFPR)


SILVIO GOMES BETTEGA
Avaliador Externo (UFPR)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MEDICINA (CLÍNICA
CIRÚRGICA)

ATA Nº439

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM MEDICINA (CLÍNICA CIRÚRGICA)

No dia dezoito de Dezembro de dois mil e dezessete às 07:30 horas, na sala 701, Rua General Carneiro, 181 - 7º andar do HC, foram instalados os trabalhos de arguição do mestrando **RODRIGO SCHUH** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada **ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DE NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS ENVOLVIDOS COM A REGULAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A TRATAMENTO IMUNOSSUPRESSOR COM TACROLIMUS E MICOFENOLATO MOFETIL**. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA (CLÍNICA CIRÚRGICA) da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: **EDUARDO JOSÉ BROMMELSTROET RAMOS** (UFPR), **OSLEI DE MATOS** (UTFPR), **SILVIO GOMES BETTEGA** (UFPR). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra ao discente, para que o mesmo expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. O aluno respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais. A Banca Examinadora, então, reuniu-se e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO do aluno. O mestrando foi convidado a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. A aprovação no rito de defesa deverá ser homologada pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais do programa. A outorga do título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, **EDUARDO JOSÉ BROMMELSTROET RAMOS**, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 18 de Dezembro de 2017.


EDUARDO JOSÉ BROMMELSTROET RAMOS
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


OSLEI DE MATOS
Avaliador Externo (UTFPR)


SILVIO GOMES BETTEGA
Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Beatris Schuh e Flávio Antônio Schuh que são os maiores incentivadores e que sempre me apoiaram e propiciaram condições para que eu seguisse o caminho escolhido. Agradeço pela compreensão, ajuda, aprendizado, atenção e carinho.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Jorge Fouto Matias e Prof^a. Dr^a. Djanira Aparecida da Luz Veronez, por me darem a oportunidade de fazer o que me faz feliz, por nunca me deixar desistir nos momentos difíceis e por serem um exemplo de dedicação e profissionalismo.

Lais Soares Rodrigues, pelo apoio incondicional em todas as horas.

Aos amigos, que em alguns momentos me fizeram esquecer todos os problemas com boas risadas.

Ao Departamento de Biologia Celular – UFPR (professores e técnicos) pela ajuda científica e coleguismo, em especial a Herculano (Nino), Luiz Fávoro, Ivo Hartmann e Edvaldo Trindade.

Ao Setor de Ciências Biológicas e a Universidade Federal do Paraná.

À CAPES e FINEP por financiar o equipamento de captura das imagens.

CTAF – Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência – UFPR em especial Lisandra Maba e Israel Bini;

A Flávia Dorieux, Jeferson Aranha, Mattheus Lopes Pereira pelo auxílio no trabalho.

A Ademir Scortegagna, Eduardo Ramos e Marcelo Aranha pela amizade e por viabilizar este trabalho;

Um agradecimento especial a: Armin Weber, Luciane Carias Bittencourt de Oliveira, Amilton da Rocha Leal Junior, Fernando Tabushi, Sérgio Luiz Rocha, Maria Fernanda Torres, Sílvia Gomes Bettega, Rogério de Fraga e Oslei Matos.

A todos alunos da graduação, em especial a turma de Medicina UFPR - 2011.2, por tornarem os dias mais agradáveis.

RESUMO

Drogas imunossupressoras são indispensáveis para pacientes pós-transplante, diminuindo, significativamente, os riscos de rejeição inerentes à este tipo de procedimento. No entanto, seus efeitos colaterais sobre os núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação da ingestão de alimentos e o efeito no excessivo ganho de peso e suas comorbidades associadas são desconhecidos. Neste sentido, esta pesquisa teve como objetivo desenvolver a análise estereológica dos núcleos hipotalâmicos relacionados com a ingestão de alimentos em ratos Wistar submetidos ao tratamento com os imunossupressores tacrolimus (TAC) ou micofenolato mofetil (MMF), comparar a densidade neuronal e número total de neurônios hipotalâmicos entre ratos Wistar tratados com imunossupressores e com isso observar possíveis alterações nos núcleos hipotalâmicos paraventricular, área hipotalâmica lateral, dorsomedial, ventromedial e arqueado. O estudo experimental foi realizado em ratos Wistar machos submetidos ao tratamento das drogas imunossupressoras TAC e MMF, via oral, durante o período de 14 semanas. Os animais foram randomicamente categorizados em quatro grupos: Controle (sem administração da droga); Sham (administração de soro fisiológico (SF) 0,9%, via gavagem); Tacrolimus (administração de 1mg/kg ao dia de tacrolimus diluídos em SF 0,9%, via gavagem) e Micofenolato (administração de 30mg/kg ao dia de micofenolato mofetil diluídos em SF 0,9%, via gavagem). Após o período de tratamento imunossupressor, os animais foram eutanasiados e seus encéfalos fixados para posterior confecção de lâminas histológicas utilizando a coloração de Nissl. Essas lâminas foram fotodocumentadas e as imagens obtidas receberam “máscaras” delimitantes para posterior implantação do *dissector* físico para quantificação e análise estereológica dos corpos celulares dos neurônios hipotalâmicos. Não houve diferenças significativas nas densidades neuronais e nos números de neurônios hipotalâmicos dos núcleos paraventricular, área hipotalâmica lateral, dorsomedial, ventromedial e arqueado entre os grupos Controle, Sham, Tacrolimus e Micofenolato. Neste estudo, o tratamento de animais com imunossupressores TAC e MMF por 14 semanas não induziu alterações no número dos corpos celulares dos neurônios hipotalâmicos e não evidenciaram efeitos neurotóxicos dos imunossupressores TAC e MMF. Estudos complementares serão necessários para elucidar a atuação dos imunossupressores TAC e MMF no hipotálamo.

Palavras Chave: Transplante. Obesidade. Imunossupressores. Tacrolimus. Ácido Micofenólico. Hipotálamo. Ratos Wistar. Amostragem Aleatória e Sistemática.

ABSTRACT

Immunosuppressive drugs are indispensable to post-transplant patients for significantly reducing the inherent risks of graft rejection related to the procedure. However, the side effects on the hypothalamic nuclei responsible for regulation of food intake and the effect on excessive weight gain and the related complications are unknown. Therefore, this research aimed to perform stereological analysis of the hypothalamic nuclei related to food intake in Wistar rats submitted to immunosuppressive treatment with tacrolimus (TAC) or mycophenolate mofetil (MMF) in order to compare neuronal density and total number of neurons in the hypothalamic paraventricular, lateral hypothalamic area, dorsomedial, ventromedial and arched. The experimental study was performed in male Wistar rats submitted to immunosuppressive treatment with TAC or MMF, orally, during a 14-week period. The animals were randomly categorized into four groups: Control (no drug administration); Sham (0.9% saline solution administration, by gavage); Tacrolimus (administration of 1mg/kg/day of tacrolimus diluted in 0.9% saline solution by gavage) and Mycophenolate (administration of 30mg/kg/day of mycophenolate mofetil diluted in 0.9% saline solution by gavage). After the immunosuppressive treatment, animals were euthanized and their brains fixed for subsequent histological slides using Nissl staining. These slides were photodocumented and the images obtained received delimiting "masks" for later implantation of the physical dissector to quantify and stereologically analyze the cellular bodies of the hypothalamic neurons. There were no significant differences in neuronal densities and numbers of hypothalamic neurons of the paraventricular nuclei, lateral hypothalamic area, dorsomedial, ventromedial and arched between the Control, Sham, Tacrolimus and Mycophenolate groups. In this study, the experimental treatment with immunosuppressive CT or MMF for 14 weeks did not induce changes in the number of cell bodies of hypothalamic neurons and did not show neurotoxic effects of the used immunosuppressant agents. Additional studies will be needed to elucidate the performance of the immunosuppressants CT and MMF in the hypothalamus.

Keywords: Transplantation. Obesity. Immunossuppressive Agents. Tacrolimus. Mycophenolic Acid. Hypothalamus. Rats, Wistar. Random and Systematic Sampling.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- HIPOTÁLAMO E LOCALIZAÇÃO DOS NÚCLEOS MEDIAIS E DO NÚCLEO LATERAL	16
FIGURA 2	- DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	24
FIGURA 3	- IMAGEM REPRESENTATIVA DA FIGURA 46 DO ATLAS ESTEROTÁXICO DE COORDENAS DO ENCÉFALO DO RATO.....	26
FIGURA 4	- ESQUEMATIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS CORTES RELATIVOS AOS NÚCLEOS PA E HL.....	27
FIGURA 5	- ESQUEMATIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS CORTES RELATIVOS AOS NÚCLEOS DM, VM E ARC.....	27
FIGURA 6	- DISPOSIÇÃO DOS CORTES E MARCAÇÃO DAS LÂMINAS REFERENTES À PRIMEIRA ÁREA (OBTENÇÃO DOS NÚCLEOS PA E HL).....	28
FIGURA 7	- DISPOSIÇÃO DOS CORTES E MARCAÇÃO DAS LÂMINAS REFERENTES À SEGUNDA ÁREA (OBTENÇÃO DOS NÚCLEOS VM, DM E ARC).....	28
FIGURA 8	- EXEMPLO DE MARCAÇÃO UTILIZADA NO LAMINÁRIO PARA O CONTROLE DAS AMOSTRAS.....	29
FIGURA 9	- IMAGEM REPRESENTATIVA DA FIGURA 53 DO ATLAS ESTEROTÁXICO DE COORDENADAS DO ENCÉFALO DO RATO.....	30
FIGURA 10	- NÚCLEOS ESTUDADOS, SUA DEVIDA LOCALIZAÇÃO NAS FIGURAS 46 E 53 DO ATLAS ESTEROTÁXICO E DISPOSIÇÃO DOS CORTES NAS LÂMINAS.....	31
FIGURA 11	- EXEMPLO DE IMAGEM DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR OBTIDA COM O EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA TODA FOTODOCUMENTAÇÃO DO MATERIAL.....	33
FIGURA 12	- IMAGEM OBTIDA DO NÚCLEO PA COM A SOBREPOSIÇÃO DA MÁSCARA DELIMITANTE DA ÁREA E O <i>DISSECTOR</i> FÍSICO EM SEU INTERIOR.....	34
FIGURA 13	- IMAGEM REPRESENTATIVA DA ÁREA TESTE COM CONTAGEM E DELIMITAÇÃO DA LINHA PERMITIDA (VERDE) E PROIBIDA (VERMELHA)..	35
FIGURA 14	RESULTADOS DE PESO DOS ANIMAIS.....	37
FIGURA 15	- NÚCLEO PARAVENTRICULAR DELIMITADO POR MÁSCARA	39
FIGURA 16	- ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL DELIMITADA POR MÁSCARA.....	41
FIGURA 17	- NUCLEO DORSOMEDIAL DELIMITADO POR MÁSCARA.....	43
FIGURA 18	- NUCLEO VENTROMEDIAL DELIMITADO POR MÁSCARA.....	45
FIGURA 19	- NUCLEO ARQUEADO DELIMITADA POR MÁSCARA.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	- ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR.....	38
GRÁFICO 2	- MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR.....	38
GRÁFICO 3	- ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL.	40
GRÁFICO 4	- MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DA ÁREA HIPOTALÂMICA....	40
GRÁFICO 5	- ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DO NÚCLEO DORSOMEDIAL.....	42
GRÁFICO 6	- MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO DORSOMEDIAL.....	42
GRÁFICO 7	- ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DO NÚCLEO VENTROMEDIAL.....	44
GRÁFICO 8	- MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO VENTROMEDIAL.....	44
GRÁFICO 9	- ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DO NÚCLEO ARQUEADO.....	46
GRÁFICO 10	- MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO ARQUEADO....	46

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	- VARIAÇÃO DO PESO CLASSIFICADOS PELO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL.....	13
QUADRO 2	- SINALIZADORES DE APETITE.....	17

LISTA DE SIGLAS

μm	- Micrômetro(s)
μm^3	- Micrômetro(s) cúbico(s)
2-AG	- 2-Arachidonoylglycerol
ABTO	- Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
AgRP	- Agouti Related Protein

AMPK	-	AMP-Activated Protein Kinase
ARC	-	Núcleo Arqueado (Arcuate Nucleus)
At	-	Área Teste
CCK	-	Cholecystokinin
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNI	-	Calcineurin Inhibitor
cm	-	Centímetro(s)
CSA	-	Ciclosporina
DM	-	Núcleo Dorsomedial (Dorsomedial Hypothalamus Nucleus)
DNA	-	Ácido Desoxirribonucléico
DXA	-	Densitometria por Emissão de Raios X de Dupla Energia
GIP	-	Gastric Inhibitory Polypeptide
GLP-1	-	Glucagon Like Peptide – 1
HL		Área Hipotalâmica Lateral (Lateral Hypothalamic Area)
IMC	-	Índice de Massa Corporal
Kg	-	Quilograma(s)
m ²	-	Metro(s) quadrado(s)
mg	-	Miligrama(s)
ml	-	Mililitro(s)
mm	-	Milímetro(s)
mm ³	-	Milímetro(s) cúbico(s)
MMF	-	Micofenolato Mofetil
mTOR	-	mammalian Target of Rapamycin
Na	-	Densidade por Área
NPY	-	Neuropeptídeo Y
Nv	-	Densidade Numérica
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OPAS	-	Organização Pan-Americana da Saúde
PA	-	Núcleo Paraventricular (Paraventricular Hypothalamus Nucleus)
POMC	-	Pró-opiomelanocortin
PP	-	Polipeptídeo P
PYY	-	Peptídeo YY
RNA	-	Ácido Ribonucleico

SF	-	Soro Fisiológico
SM	-	Síndrome Metabólica
VM	-	Núcleo Ventromedial (Ventromedial Hypothalamus Nucleus)
TAC	-	Tacrolimus
α -MSH	-	Alpha Melanocyte Stimulating Hormone

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad lib.	-	<i>Ad libitum</i> (à vontade)
<i>Et al.</i>	-	E colaboradores

LISTA DE SÍMBOLOS

%	-	Por cento
\geq	-	Maior ou igual a
<	-	Menor que
>	-	Maior que
US\$	-	Dólar americano
α	-	Alfa
®	-	Marca registrada
°C	-	Grau(s) Celsius
°	-	Grau(s)
\pm	-	Mais ou menos
+	-	Mais
μ	-	Micro
Σ	-	Somatório
\leq	-	Menor ou igual a
=	-	Igual a

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS.....	12
1.1.1	Objetivo geral.....	12
1.1.2	Objetivos específicos.....	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1	OBESIDADE.....	13
2.2	REGULAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR.....	15
2.3	TRANSPLANTE E OBESIDADE.....	18
2.4	IMUNOSSUPRESSORES.....	19
2.4.1	Tacrolimus (TAC).....	20
2.4.2	Micofenolato Mofetil (MMF).....	20
2.5	ESTEREOLOGIA.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	ANIMAIS.....	23
3.2	ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS.....	24
3.3	COLETA DO MATERIAL PARA ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	25
3.4	MICROTOMIA E COLORAÇÃO.....	25
3.5	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA.....	32
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36
4	RESULTADOS	37
4.1	PESO DOS ANIMAIS.....	37
4.2	ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DOS NUCLEOS HIPOTALÂMICOS.....	37
4.2.1	NÚCLEO PARAVENTRICULAR.....	37
4.2.2	AREA HIPOTALAMICA LATERAL.....	40
4.2.3	NÚCLEO DORSOMEDIAL.....	42
4.2.4	NÚCLEO VENTROMEDIAL.....	44
4.2.5	NUCLEO ARQUEADO.....	46
5	DISCUSSÃO	48
5.1	ESCOLHA DO ANIMAL EXPERIMENTAL.....	48
5.2	CONSIDERAÇÕES GERAIS DO MODELO EXPERIMENTAL.....	48

5.3	EFEITOS DOS IMUNOSSUPRESSORES NOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS.....	50
5.4	ASPECTOS DETERMINANTES DA NEUROTOXICIDADE DOS IMUNOSSUPRESSORES.....	52
5.5	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
6	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO.....	61

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2015, o Brasil aparece em segundo lugar (mundialmente) no número absoluto de transplantes realizados (renal e hepático) totalizando 7453 transplantes. Destes, 5648 foram de rim e 1805 de fígado (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (ABTO), 2017).

Nas últimas décadas, as taxas de sobrevida pós-transplante hepático aumentaram para 85% em cinco anos e para 56% após 20 anos, devido, principalmente, aos avanços das técnicas cirúrgicas, do manejo imunológico e dos cuidados pré e pós-operatórios (BRAUN *et al.*, 2009). Entretanto, o aumento da sobrevida de pacientes submetidos ao transplante hepático veio acompanhado do aumento na prevalência de doenças crônicas, geralmente superior às prevalências encontradas na população geral. Nesse âmbito, destaca-se o ganho de peso excessivo experimentado por esses pacientes gerando o sobrepeso e a obesidade. Há relato sobre a incidência de obesidade em 40% dessa população já no primeiro ano pós-transplante e, após três anos da operação, cerca de 70% dos pacientes apresenta excesso de peso corporal (RICHARDS *et al.*, 2005).

A obesidade é uma consequência comum pós-transplante hepático e renal. Com poucas exceções, pacientes que são obesos pré-transplante, permanecem acima do peso, enquanto aproximadamente um terço dos pacientes com peso normal tornam-se obesos pós-transplante. Esse excesso de peso predispõe a doenças osteoarticulares, síndrome metabólica, incluindo doença cardiovascular, diabetes, doença renal e dislipidemia (WATT; CHARLTON, 2010).

O uso de medicamentos imunossupressores como fator de risco para o excesso de peso pós-transplante hepático ainda é controversa. Alguns trabalhos encontraram a associação com uso de ciclosporina (CSA) e esteróides e o ganho de peso ou o excesso de peso, mas nem todos (ANASTACIO *et al.*, 2013).

Estudos com animais experimentais sobre os mecanismos que levam à perda do controle homeostático do balanço energético após o uso de imunossupressores são escassos. Em humanos existem indícios da relação entre obesidade e tratamento com imunossupressores pós-transplante (ANASTACIO *et al.*, 2013). Nesse sentido, supostamente, alterações hipotalâmicas ocorrem como efeito colateral do tratamento e com isso o ganho de peso e a obesidade.

Intervenções capazes de frear ou limitar o comprometimento do hipotálamo podem se tornar importantes estratégias para a prevenção da obesidade no tratamento com imunossupressores pós-transplante. Assim, a identificação de alterações morfológicas nos núcleos hipotalâmicos envolvidos na regulação da ingestão de alimentos e do metabolismo energético podem contribuir com a elucidação dos mecanismos que favorecem o ganho de peso pelo uso de medicações imunossupressoras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral:

Analisar, por meio de parâmetros estereológicos, as possíveis alterações de núcleos hipotalâmicos envolvidos com a regulação da ingestão alimentar em ratos Wistar submetidos ao tratamento com os imunossupressores tacrolimus (TAC) e micofenolato mofetil (MMF).

1.1.2 Objetivos Específicos:

- a) comparar a densidade neuronal e número total de neurônios dos núcleos hipotalâmicos: paraventricular (PA), área hipotalâmica lateral (LH), dorsomedial (DM), ventromedial (VM) e arqueado (ARC) entre ratos Wistar tratados com os imunossupressores, TAC e MMF;
- b) observar outras possíveis alterações morfológicas nos núcleos hipotalâmicos;
- c) analisar os efeitos neurotóxicos do TAC e MMF nas estruturas do hipotálamo de ratos Wistar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 OBESIDADE

A obesidade é definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como o acúmulo excessivo ou anormal de gordura, que pode resultar em dano à saúde do indivíduo e é considerada um dos principais problemas de Saúde Pública da atualidade.

A Organização Mundial da Saúde estimou que em 2014, 1,9 bilhões de pessoas se enquadravam com sobrepeso e mais de 600 milhões de pessoas atendiam os critérios de obesidade (TRAN *et al.*, 2016).

Vários métodos são utilizados para se dimensionar o grau de obesidade de um indivíduo, como a bioimpedância, densitometria por emissão de raios X de dupla energia (DXA), as tabelas de massa e estatura, a medida da circunferência abdominal e o índice de massa corporal (IMC). Dentre esses, o mais prático e frequente parâmetro utilizado é o do IMC, que se calcula tomando-se como base a massa corporal em quilos, dividido pela estatura, em metros quadrados (kg/m^2). Utilizando esse critério, indivíduos com $\text{IMC} \geq 30$ são considerados obesos (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2017). A classificação de peso, de acordo com o IMC, está apresentada no QUADRO 1.

QUADRO 1 – VARIAÇÕES DO PESO CLASSIFICADOS PELO ÍNDICE DE MASSA CORPORAL

CLASSIFICAÇÃO	IMC
ABAIXO DO PESO	$< 18,5 \text{ kg/m}^2$
PESO NORMAL	18,5 a 24,9 kg/m^2
SOBREPESO	25 a 29,9 kg/m^2
OBESIDADE	30 a 39,9 kg/m^2
OBESIDADE EXTREMA	$\geq 40 \text{ kg/m}^2$

FONTE: *National Institutes Of Health, 2017.*

NOTA: IMC – Índice De Massa Corporal

Desde 1960, a porcentagem de adultos acima de 20 anos, cujo peso corporal ultrapassa o nível do peso considerado como adequado, aumentou de 54,9% em 1960 para 74% em 1994 (MOKDAD *et al.*, 2001). No biênio 2013-2014, a prevalência de obesidade foi de 35,2% entre os homens e 40,5% entre as mulheres

nos Estados Unidos (FLEGAL *et al.*, 2016). Nos Estados Unidos, dois terços dos adultos estão classificados nas categorias sobrepeso ou obeso (SPIEKER; PYZOCHA, 2016).

Em países europeus, a prevalência da obesidade em adultos cuja idade oscila entre 40 a 60 anos, varia de 15 a 44% em mulheres e de 10 a 18%, em homens. Em países orientais, a frequência da obesidade diminui consideravelmente, indicando taxas de 3% da população da China e do Japão, mas, por outro lado, há relatos de 41 a 70%, na Austrália e Nova Zelândia (STEVENS; TRUESDALE, 2003). Já em toda a América Latina e Caribe, a obesidade e o sobrepeso vem aumentando, com um impacto maior nas mulheres e uma tendência de crescimento nas crianças. De modo geral, o excesso de peso atinge aproximadamente 58% da população da América Latina e Caribe, isso corresponde a 360 milhões de pessoas. Com exceção de Haiti (38,5%), Paraguai (48,5%) e Nicarágua (49,4%), todos os países encontrados nessas regiões apresentam mais da metade da sua população com sobrepeso (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO) E A ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS), 2017).

Outro importante registro destaca o aumento de obesidade em crianças. Em 2014, quase metade (48%) de todas as crianças com sobrepeso e obesas com idade inferior a cinco anos vivia na Ásia e um quarto (25%) na África. O número de pessoas nessa faixa etária com excesso de peso na África quase duplicou desde 1990 (de 5.4 a 10.3 milhões). No Brasil, o número de adolescentes obesos triplicou no período entre 1975 e 1997 (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2016).

Em razão do considerável acometimento de comorbidades, estima-se que anualmente, nos Estados Unidos, 280.000 óbitos estejam relacionados à obesidade, constituindo essa enfermidade a segunda maior causa de morte prevenível, perdendo em número, somente para os riscos associados ao tabagismo (ALLISON *et al.*, 1996). Além do aumento de comorbidades, a obesidade associa-se à discriminação e à estigmatização social.

Em meados da década de 1990, o custo anual americano com obesidade foi de aproximadamente 100 bilhões de dólares (ALLISON *et al.*, 1996; WOLF; COLDITZ, 1998). Anualmente, as comorbidades associadas às pessoas obesas e com excesso de peso, nos Estados Unidos, geram despesas médicas diretas

estimadas em de US\$ 209.7 bilhões, além dos gastos indiretos relacionados, que chegam a ordem de US\$ 66 bilhões. Somente o valor com despesas diretas já representa 20% do valor total destinado à saúde anualmente (SPIEKER; PYZOCHA, 2016). Além desse custo elevado, o fator econômico produtivo de pacientes obesos tem recebido destaque na literatura atual. Para pessoas com 20 a 30 anos de idade e com IMC > 45, a probabilidade de anos de vida perdida é de 13 anos para homens e de 8 anos para mulheres. Assim, para homens, tal condição representa 22% de redução na expectativa de vida, e, por extensão, profundo efeito negativo sobre a vida produtiva do indivíduo, situação que desencadeia, por sua vez, importante e comprometedor impacto socioeconômico (MANSON; BASSUK, 2003).

Existem mais de quarenta comorbidades associadas à obesidade e que podem ser didaticamente classificadas em cinco categorias: anatômicas, metabólicas, degenerativas, neoplásicas e psicológicas (KAPLAN, 2003). Importante salientar que muitas comorbidades, exacerbam a obesidade, como por exemplo, pacientes com artrite que em consequência da imobilidade, são propensos a ficarem mais obesos, desencadeando, assim, um círculo vicioso (MANSON; BASSUK, 2003).

Um aumento em 20% do peso, acima do peso corporal ideal, diminui a expectativa de vida em aproximadamente 20% (FONTAINE *et al.*, 2003). Esse fato deve-se as comorbidades, atualmente definidas como síndrome metabólica (que são o conjunto de fatores associados à morbidade e mortalidade em longo prazo (PERITO; LUSTIG; ROSENTHAL, 2016)).

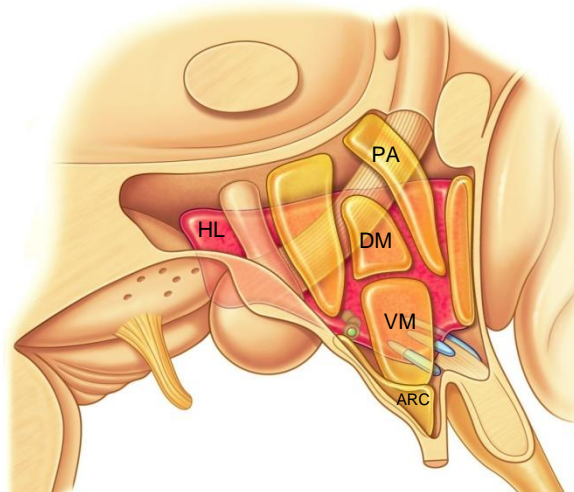
Outro fator importante, é que o custo no tratamento destas comorbidades tem aumentado mundialmente, além dos custos socioeconômicos e psicológicos no tratamento desses pacientes (SPIEKER; PYZOCHA, 2016).

2.2 REGULAÇÃO DA INGESTÃO ALIMENTAR

Desde 1940, vem sendo demonstrado que o hipotálamo atua como o principal centro regulador da ingestão alimentar. Esse processo envolve complexa interação entre hormônios, neuropeptídeos, monoaminas e neurotransmissores, que agem em diversas regiões do hipotálamo, denominadas núcleos hipotalâmicos (COSTENTIN, 2004) (FIGURA 1).

A ingestão alimentar e o gasto de energia são controlados por sistemas neurais complexos e redundantes, verdadeiros sistemas integradores, recebendo sinais aferentes desde o sistema digestório passando pelo tecido adiposo e chegando às estruturas centrais. Tem havido muito progresso na identificação do papel do hipotálamo e do tronco encefálico nos vários mecanismos hormonais e neurais pelos quais o cérebro é informado sobre a disponibilidade dos nutrientes ingeridos e estocados (DAMIANI; DAMIANI; MENEZES FILHO, 2010). Sabe-se que dietas com alto teor de gordura diminuem a densidade celular neuronal e aumentam o volume do hipotálamo (NAMAVAR *et al.*, 2012).

FIGURA 1 – HIPOTÁLAMO E LOCALIZAÇÃO DOS NÚCLEOS MEDIAIS (EM AMARELO) E DO NÚCLEO LATERAL (EM VERMELHO).



FONTE: Figura modificada de Gray, H; Carter, H. (2011).

LEGENDA - PA: Núcleo Paraventricular

HL: Área Hipotalâmica Lateral

DM: Núcleo Dorsomedial

VM: Núcleo Ventromedial

ARC: Núcleo Arqueado

Tais regiões interagem anatômica e funcionalmente entre si, recebendo estímulos aferentes da periferia e modulando respostas eferentes, que por fim, induzem ao aumento ou à diminuição da ingestão alimentar. Dentre as áreas e núcleos hipotalâmicos relacionados com a ingestão alimentar, destacam-se os núcleos: Paraventricular (PA), Área Hipotalâmica Lateral (LH), Dorsomedial (DM), Ventromedial (VM) e Arqueado (ARC) (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Esses núcleos recebem sinais diretamente de hormônios, como a grelina gástrica, o neuropeptídeo Y (NPY), o peptídeo YY, o hormônio α -MSH, a insulina, a leptina, além de receberem sinais de órgãos periféricos por meio de fibras vagais aferentes que

atingem a região ventrolateral da medula e, posteriormente, atingem o hipotálamo, modulando assim a ingestão alimentar (QUADRO 2).

QUADRO 2 – SINALIZADORES DE APETITE

SINALIZADOR	PRODUZIDO	AÇÃO
Grelina	Estômago e hipotálamo	Orexígena
Insulina	Pâncreas	Anorexígena
Anandamida e 2AG	Intestinal e cerebral	Orexígena
Leptina	Adipócitos e Estômago	Anorexígena
CCK	Intestino	Anorexígena
PYY (3-36)	Íleo e Cólon	Anorexígena
Opióides (Endorfinas)	Cérebro e tronco encefálico	Orexígena
NPY	Hipotálamo	Orexígena
AgRP	Hipotálamo	Orexígena
CART	Hipotálamo	Anorexígena
POMC	Hipotálamo	Anorexígena
MSH	Hipotálamo	Anorexígena
GLP-1	Íleo, Cólon e Reto	Anorexígena
Oxintomodulina	Final do jejuno e íleo	Anorexígena
PYY (1-36)	Íleo e Cólon	Orexígena
Glicossensores portais	Veia porta	Anorexígena
amilina	Pâncreas	Anorexígena
Adiponectina	Adipócito	Anorexígena
Resistina	Células mononucleares, adipócitos, Pâncreas	Orexígena
Enterostatina	Intestino	Anorexígena
Bombesina e GIP	Estômago	Anorexígena
Glucagon	Pâncreas	Anorexígena
Polipeptídeo P (PP)	Pâncreas	Anorexígena
mTOR	Hipotálamo	Anorexígena
AMPK	Hipotálamo	Orexígena

FONTE: (DAMIANI D.; DAMIANI D., 2011).

Outro fator relevante trata-se do hipotálamo possuir conexões com o sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, controlando a atividade de diversos órgãos, como pâncreas, suprarrenal e fígado (INUI; MEGUID, 2003).

Foi estabelecido que a lesão do hipotálamo ventromedial provoca hiperfagia e obesidade, e a lesão do hipotálamo lateral causa afagia e até mesmo a morte por inanição (NAMAVAR *et al.*, 2012).

A respeito das regiões hipotalâmicas e de hormônios que regulam a ingestão alimentar, o núcleo arqueado, o neuropeptídeo Y e o hormônio α -MSH são os mais estudados (SCHWARTZ *et al.*, 2000).

Além dos neuropeptídeos, o sistema monoaminérgico também participa da regulação da ingestão alimentar, constituindo o princípio ativo da grande maioria das drogas contra a obesidade. Dentre as monoaminas, a serotonina inibe o apetite.

Além disso, a inoculação de agentes serotoninérgicos no hipotálamo resulta na diminuição da ingestão de alimentos, assim como a utilização de antagonistas conduz a efeito oposto (LAVIANO; MEGUID; ROSSI-FANELLI, 2003). Dentre os receptores serotoninérgicos, o receptor 1B, quando estimulado, induz à diminuição da ingestão alimentar, e grupos neuronais que expressam esses receptores localizam-se na área hipotalâmica lateral e nos núcleos paraventricular, ventromedial e dorsomedial (MAKARENKO; MEGUID; UGRUMOV, 2002). Somando-se a esses trabalhos sobre a bioquímica que envolve os núcleos hipotalâmicos, os dados de estudos quantitativos estereológicos *pós-mortem* do cérebro tem aumentado significativamente nosso conhecimento sobre o papel do sistema nervoso central na regulação da ingestão de alimentos (WALLOE; PAKKENBERG; FABRICIUS, 2014).

2.3 TRANSPLANTE E OBESIDADE

O transplante hepático é o padrão de tratamento para várias doenças hepáticas em estágio terminal e insuficiência hepática aguda (HARA *et al.*, 2015). Os avanços de técnica cirúrgica e de drogas imunossupressoras têm aumentado a sobrevida desses pacientes. A prevalência de complicações cardiovasculares vem sendo a maior causa de mortalidade tardia de pacientes transplantados, tanto para rim quanto para fígado. Em transplantados de fígado é a causa mais comum de mortalidade tardia de causa não hepática, com variação de 19% a 42%. A síndrome metabólica e seus componentes, incluindo obesidade, hipertensão, dislipidemia e diabetes *mellitus*, contribuem para tais eventos cardiovasculares e cerebrovasculares, bem como doença renal após o transplante. A síndrome metabólica é exacerbada por vários fatores, dentre os quais se destacam imunossupressão, dieta inapropriada, tabagismo e vida sedentária, aumentando significativamente o risco de aterosclerose (OLIVEIRA; STEFANO; ALVARES-DA-SILVA, 2013; HARA *et al.*, 2015).

A incidência dos sinais e sintomas de síndrome metabólica aumenta no período pós-transplante hepático. A incidência prévia de diabetes é de aproximadamente 15% e atinge 30 a 40% pós-transplante, enquanto a incidência de hipertensão arterial sobe de aproximadamente 15% para 60 a 70% após o procedimento. Hiperlipidemia, que é incomum antes do transplante, possui incidência de aproximadamente 50 a 70% após o procedimento. Com esses dados,

a incidência de síndrome metabólica pós-transplante hepático é de aproximadamente 44 a 58%, seis meses após o transplante (LARYEA *et al.*, 2007; PFITZMANN *et al.*, 2008; WATT *et al.*, 2008).

As medicações utilizadas pós-transplante podem ter impacto na resistência à insulina. Corticosteróides induzem a resistência insulínica de forma dose-dependente, diminuindo a produção de insulina pelas células beta, aumentando a gliconeogênese e diminuindo a utilização periférica de glicose. Os inibidores da calcineurina, como o TAC e a ciclosporina (CSA), podem diminuir a síntese e secreção de insulina pelas células beta e/ou induzir a resistência com hiperinsulinemia (SCHACKE; DOCKE; ASADULLAH, 2002).

2.4 IMUNOSSUPRESSORES

Para Anastácio *et al.* (2013) a utilização de medicamentos imunossupressores como fator de risco para o excesso de peso pós-transplante ainda é controverso.

O objetivo da imunossupressão nos transplantes é de induzir a tolerância ao enxerto, mantendo a capacidade do sistema imune de neutralizar microrganismos patogênicos. O grande avanço da terapia imunossupressora ocorreu no início da década de 80, quando a CSA foi incorporada aos regimes de imunossupressão já existentes, os quais eram baseados principalmente no uso da prednisona e azatioprina.

No início dos anos 90, a incorporação do TAC impulsionou ainda mais o arsenal de drogas utilizadas para o controle da rejeição pós-transplante. Dentre os imunossupressores, destacam-se o corticóide, TAC, CSA, MMF e a rapamicina.

Em relação ao transplante renal, a evolução no arsenal de drogas tem proporcionado a utilização de distintos esquemas de imunossupressão, viabilizando o uso racional das drogas, redução dos efeitos colaterais e otimização de resultados. Estes esquemas atualmente consistem em uma associação de um inibidor da calcineurina (CNI), associado a um agente antiproliferativo e um corticóide (KALLURI; HARDINGER, 2012).

O TAC e o MMF ocupam papel de destaque na terapia pós-transplante, sendo amplamente utilizados como agentes centrais nos esquemas de imunossupressão (HALLORAN, 2004).

2.4.1 Tacrolimus (TAC)

O TAC (FK 506 - Prograf®) foi introduzido no transplante hepático por Starzl em 1989, tendo sido utilizado primariamente como terapia de resgate em pacientes com rejeição resistente a CSA. TAC é produzido a partir de um fungo (*Streptomyces tsukubaenses*), fazendo parte da família dos macrolídeos e com poder de ação aproximadamente 100 vezes maior que a CSA, sendo também um inibidor da calcineurina. Apesar de quimicamente diferentes, CSA e TAC possuem mecanismos de ação similares, inibindo o gene responsável pela transcrição da interleucina 2. TAC não é dependente dos sais biliares para sua absorção. A absorção de TAC ocorre principalmente no duodeno e secundariamente no restante do intestino delgado e cólon, metabolizado pelo fígado, no sistema microsomal P450 (CHAN; GARNEAU; HAJJAR, 2015). Níveis sanguíneos devem ser cuidadosamente verificados, pois podem estar elevados em pacientes com função pobre do enxerto.

A nefrotoxicidade, assim como na CSA, é o grande fator limitante de seu emprego. Ensaios clínicos recentes e meta-análises revelaram que o TAC teve melhor desempenho em relação a CSA após transplante renal, diminuindo a rejeição aguda do enxerto, falhas no tratamento e aumentando a sobrevivência em longo prazo do enxerto. Além disso, a incidência de hipertensão, hiperlipidemia, hiperplasia gengival e hirsutismo foi menor com TAC (MOK *et al.*, 2016).

Efeitos colaterais gastrintestinais como náusea, diarreia e anorexia são comuns no início do tratamento. Pode gerar hipertensão arterial, porém, em menor grau e de mais fácil controle, quando comparado à CSA. Possui efeitos tóxicos para o sistema nervoso central similares aos da CSA, sendo que a alteração neurológica relacionada ao TAC foi apresentada pela primeira vez como leucoencefalopatia em 1996 (HINCHEY *et al.*, 1996), com melhora após a diminuição da dose ou substituição da droga. Há também, relato de caso onde a droga possa ter causado complicações neurológicas após ter sido administrada em criança com rim transplantado (KWUN, 2011).

2.4.2. Micofenolato Mofetil (MMF)

O MMF (Cellcept®) e o micofenolato sódico (MFS)(Myfortic®) são antimetabólicos mais seletivos, derivados semi-sintéticos do ácido micofenólico, que

possui ação final de inibir a síntese de purinas. É um potente inibidor da inosinamonofosfatodesidrogenase, bloqueando a formação de guanosina e impedindo assim a replicação de DNA nos linfócitos B e T. O MMF foi introduzido no mercado, após alguns estudos terem demonstrado que ele é mais efetivo na prevenção de episódios de rejeição do que a azatioprina. Dentre os efeitos colaterais, destacam-se diarreia, náusea, vômito, dispepsia e mielossupressão. A formulação do Myfortic® consiste de comprimidos revestidos gastro-resistentes, contendo MMF sódico, desenvolvidos para ajudar a proteger o trato gastrointestinal superior (CHAN; GARNEAU; HAJJAR, 2015), contra os efeitos colaterais do ácido micofenólico.

2.5 ESTEREOLOGIA

A estereologia é definida na ciência como "a interpretação espacial das secções". É um campo interdisciplinar que se preocupa em grande parte com a interpretação tridimensional de secções planas (2D) de materiais ou tecidos. Proporciona técnicas práticas para extrair informação quantitativa sobre um material tridimensional a partir de medições feitas em secções planas bidimensionais do material. A estereologia é um método que utiliza amostragem aleatória e sistemática para fornecer dados imparciais e quantitativos. É uma ferramenta importante e eficiente em muitas aplicações da microscopia (como Petrografia, ciência de materiais e biociências, incluindo histologia, ossos e Neuroanatomia).

Além das informações das seções planas bidimensionais, a estereologia é especialmente útil quando a amostra tem uma dimensão espacial inferior à do material original. Portanto, a estereologia é freqüentemente definida como a ciência de estimar informações dimensionais superiores a partir de amostras de dimensões menores (*INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEREOLOGY*, 2017).

Ela é baseada em princípios fundamentais da geometria, como por exemplo, o princípio de Cavalieri, estatísticas (principalmente inferência de amostragem). A etimologia da palavra deriva do grego *stereos* (sólido) e *logia* (estudo) e seu emprego vem desde meados do século XIX, quando em 1843 Achille Ernest Delesse, um geólogo e mineralogista francês, descreveu um método para estimar o volume de determinado mineral em uma rocha baseado em uma amostra da rocha (princípio de *Delesse*). Somente a partir da metade do século XX que esta ciência

passou a ser amplamente utilizada na área médica, e a partir dos anos 80 novos estudos aperfeiçoaram os métodos de amostragem, reduzindo as tendenciosidades e tornando suas técnicas mais consistentes (MANDARIM-DE-LACERDA, 2000).

Mandarim-de-Lacerda (2000) cita a estereologia como sendo uma ciência baseada em algumas premissas: além dos princípios já mencionados (Delesse e Cavalieri), o Efeito Holmes, onde a espessura da amostra deve ser fina suficiente para não superestimar o número de elementos na secção, também deve ser considerado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

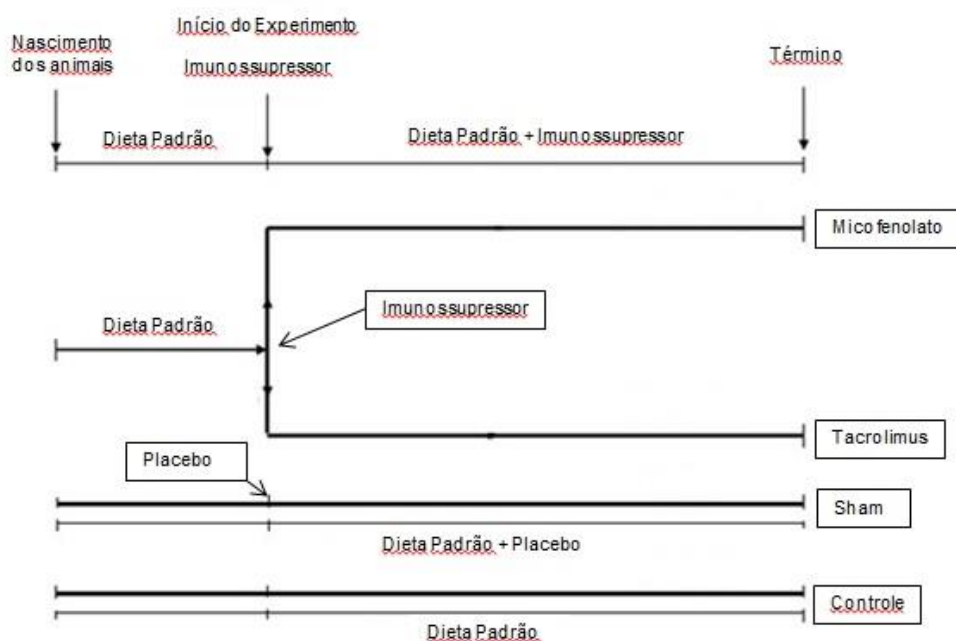
3.1 ANIMAIS

Para o estudo, foram utilizados 24 ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus albinus*, Ordem Rodentia, Classe Mammalia) com 70 dias de idade, e peso entre 300 e 350 gramas, fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas após aprovação concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (ANEXO). Estes animais permaneceram durante todo o período em que se desenvolveu a pesquisa, alojados em gaiolas apropriadas (em grupos contendo no máximo 5 animais) em ambiente, com ciclos diurno/noturno de 12 horas, temperatura ambiente de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade de 45% e com água e ração para ratos ad lib. Após período de aclimatação, os ratos foram aleatoriamente divididos em quatro grupos de 6 animais com as seguintes denominações:

- Grupo Controle – Sem administração de medicação.
- Grupo Sham – Administração com o placebo de dose diária de SF 0,9% via gavagem.
- Grupo Tacrolimus - Administração de uma dose diária de TAC (1mg/kg peso) diluído em SF 0,9%, via gavagem.
- Grupo Micofenolato – Administração de uma dose diária de MMF (30 mg/kg peso) diluído em SF 0,9%, via gavagem.

Cada grupo de animais cumpriu o delineamento experimental apresentado na FIGURA 2.

FIGURA 2 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



FONTE: O Autor (2016).

3.2 ADMINISTRAÇÃO DE DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS

Os medicamentos TAC e MMF foram diluídos em SF 0,9% imediatamente antes de sua utilização. Para fins de padronização, as diluições foram realizadas seguindo sempre o mesmo protocolo: 9mg de TAC diluídos em 7 ml de SF 0,9%, perfazendo 1,28mg/ml; 500mg de MMF (1 comprimido) diluídos em 30 ml de SF 0,9%, perfazendo 16,7 mg/ml. Após a diluição, o volume oferecido aos animais era semelhante entre os grupos, bem como no grupo Sham, não ultrapassando 0,7ml, com o intuito de reduzir a possibilidade de refluxo do material instilado. As doses utilizadas foram de 1mg/kg de TAC e 30mg/kg de MMF.

Os medicamentos e/ou placebo foram administrados via gavagem. Para realizar esta tarefa, os animais foram imobilizados, por meio de contenção manual, baseada numa compreensão firme da caixa torácica com finalidade de restringir os movimentos e garantindo assim que os mesmos permanecessem imobilizados durante o procedimento. A sonda de gavagem, acoplada a uma seringa de 1 ml foi introduzida na cavidade oral, passando pelo esôfago para chegar ao estômago. Após verificar a passagem da sonda no trato digestivo, a solução era delicadamente

injetada, evitando desta forma, o refluxo da mesma e um possível desconforto ao animal.

Os animais foram acompanhados por um período de 14 semanas. Durante este tempo, tiveram o peso monitorado semanalmente para possíveis ajustes da medicação. Durante todo o período de estudo, os animais receberam identificações individuais em sua cauda, possibilitando a adaptação da dose adequada para cada animal ao longo do tempo.

Ao final deste período, os animais foram mortos e submetidos ao procedimento de retirada do encéfalo para análise.

3.3 COLETA DO MATERIAL PARA ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

Para a realização do procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados com uma associação de xilazina (5mg/kg) e cetamina (100mg/Kg) intraperitoneal.

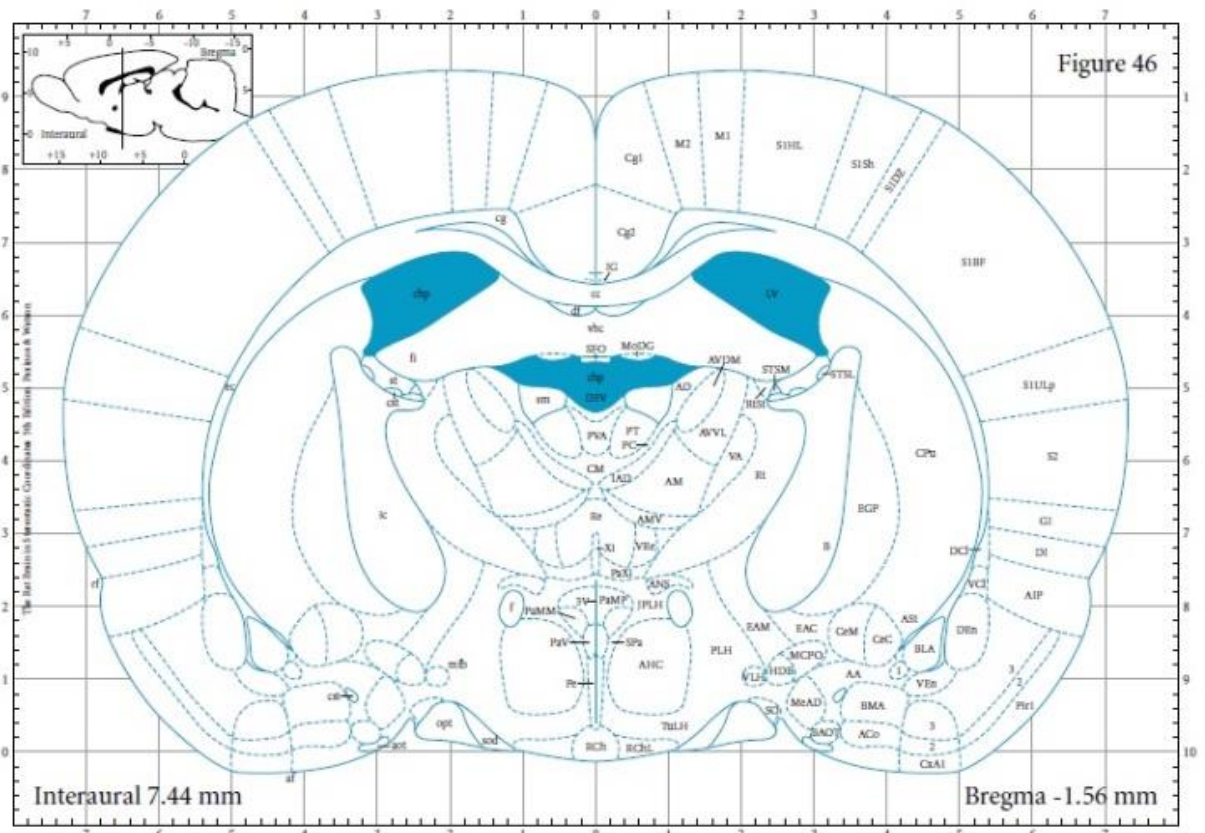
Após a anestesia, foi realizada coleta sanguínea e com isso diminuição drástica da volemia do animal seguida de decapitação por meio de guilhotina manual para, posteriormente, executar a trepanação e remoção dos encéfalos utilizando bisturi, tesoura curva, espátula metálica e tesoura de ponta fina. Em seguida, estes foram fixados em solução de Alfac (formaldeído (37- 40%), ácido acético glacial e álcool etílico 80°) durante um período de 16 horas e realocados em recipientes contendo álcool 70° onde permaneceram até o momento da emblocagem em resina Paraplast®.

3.4 MICROTOMIA E COLORAÇÃO

Foram realizados cortes aleatórios e uniformemente isotrópicos (AUI) dos encéfalos, utilizando o micrótomo Gebrauchshinweise fur Minot-Mikrotom, modelo 1212 da empresa E. Leitz Wetzlar para obtenção dos 7µm de espessura.

Os blocos contendo os encéfalos foram corretamente posicionados e alinhados à navalha para que fosse iniciado o processo de corte. Pela sucessiva obtenção de cortes e observação dos mesmos, foi encontrada a primeira região do hipotálamo que viria a ser coletada (FIGURA 3).

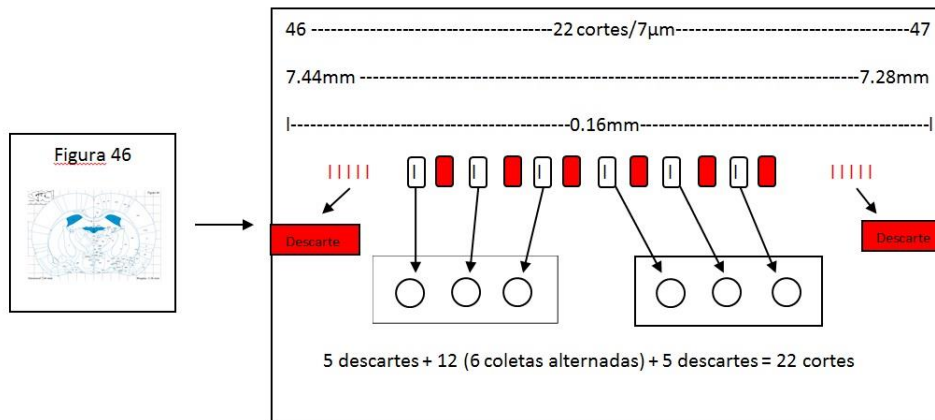
FIGURA 3 – IMAGEM REPRESENTATIVA DA FIGURA 46 DO ATLAS ESTEREOTÁXICO DE COORDENADAS DO ENCÉFALO DO RATO.



FONTE: Figura Modificada de Paxinos G., Watson C. (2005).

Após confirmação de tal área, foi realizado o protocolo descrito na FIGURA 4, que se baseava em descartar os 5 primeiros cortes e obter seis cortes alternados entre os 12 seguintes, onde foram posicionados em ordem na lâmina os 6 cortes alternados, descartando os outros 6 não usados para o estudo. Ao final desta coleta, foram realizados e descartados mais 5 cortes afim de padronização do protocolo, chegando ao limite da espessura do corte representado pela figura (nesse caso, a figura 46 apresentava espessura de 0,16mm, equivalente a 22 cortes de 7 μ m, assim sendo, descartamos os 5 primeiros, os 5 últimos e os 6 alternados não selecionados para o estudo estereológico. Os 6 cortes selecionados serviram para o estudo dos núcleos paraventricular e área hipotalâmica lateral.

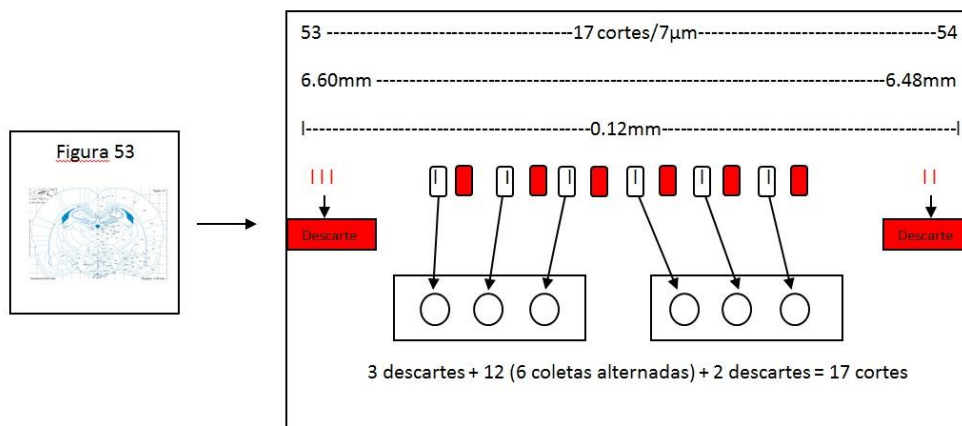
FIGURA 4 – ESQUEMATIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS CORTES RELATIVOS AOS NÚCLEOS PA E HL.



FONTE: Modificada de Paxinos G., Watson C. (2005).

Após finalizado o procedimento, foi realizada a microtomia, tendo como base os valores fornecidos pelo guia estereotático, entre a figura 47 (obtida ao final dos cortes da primeira área) até a próxima região de interesse, a figura 53 do atlas estereotático de coordenadas do encéfalo do rato, localizada à 0,68mm de distância da área anteriormente mencionada. Nesta área (53) foram descartados os 3 primeiros cortes, selecionados para estudo os 6 cortes alternados dos próximos 12 cortes e finalizado o procedimento com mais 2 cortes que foram descartados (FIGURA 5). Os 6 cortes selecionados nesta área serviram para o estudo estereológico dos núcleos DM, VM e ARC.

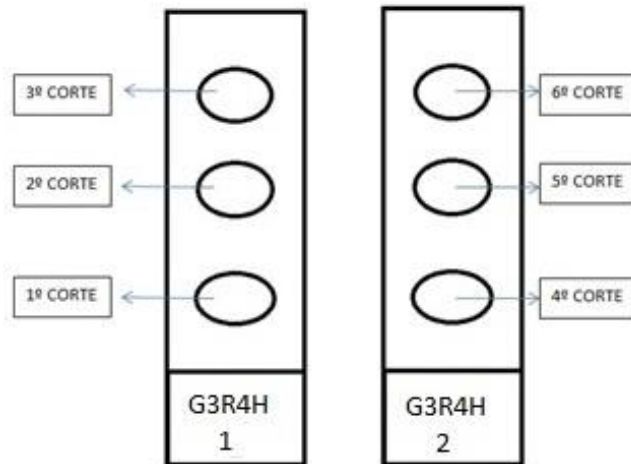
FIGURA 5 - ESQUEMATIZAÇÃO DO PROCEDIMENTO PARA OBTENÇÃO DOS CORTES RELATIVOS AOS NÚCLEOS DM, VM E ARC.



FONTE: Figura Modificada de Paxinos G., Watson C. (2005).

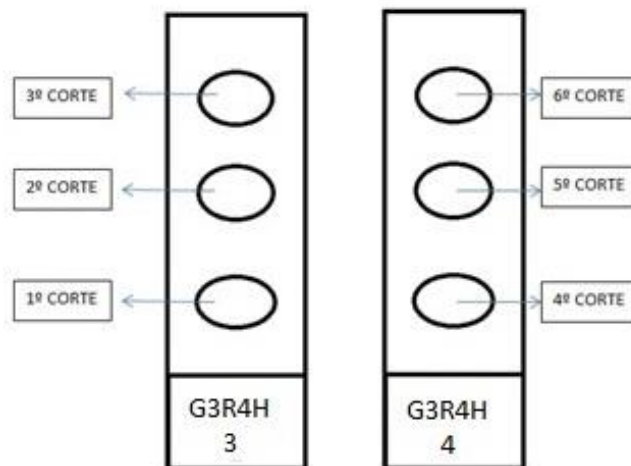
O processo que se sucedeu pós-corte foi repetido em ambas as áreas. FIGURAS 6 e 7.

FIGURA 6 - DISPOSIÇÃO DOS CORTES E MARCAÇÃO DAS LÂMINAS REFERENTES À PRIMEIRA ÁREA (OBTENÇÃO DOS NÚCLEOS PA E HL).



FONTE: O Autor (2016).

FIGURA 7 - DISPOSIÇÃO DOS CORTES E MARCAÇÃO DAS LÂMINAS REFERENTES À SEGUNDA ÁREA (OBTENÇÃO DOS NÚCLEOS VM, DM E ARC).

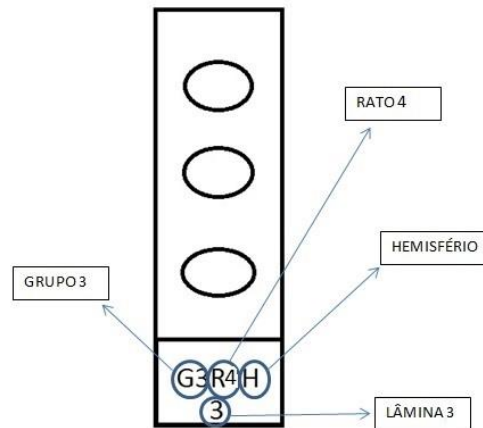


FONTE: O Autor (2016).

As lâminas passaram pelo processo de limpeza clássica antes da sua marcação e posterior utilização. Assim sendo, mesmo novas, estas foram lavadas com detergente e água corrente para posteriormente serem imersas em solução de ácido clorídrico (5%) por 15 minutos. Após este período, o excesso foi removido e

uma solução de álcool 70% foi utilizada para retirar qualquer resíduo para que finalmente as lâminas fossem demarcadas com grafite, conforme a FIGURA 8.

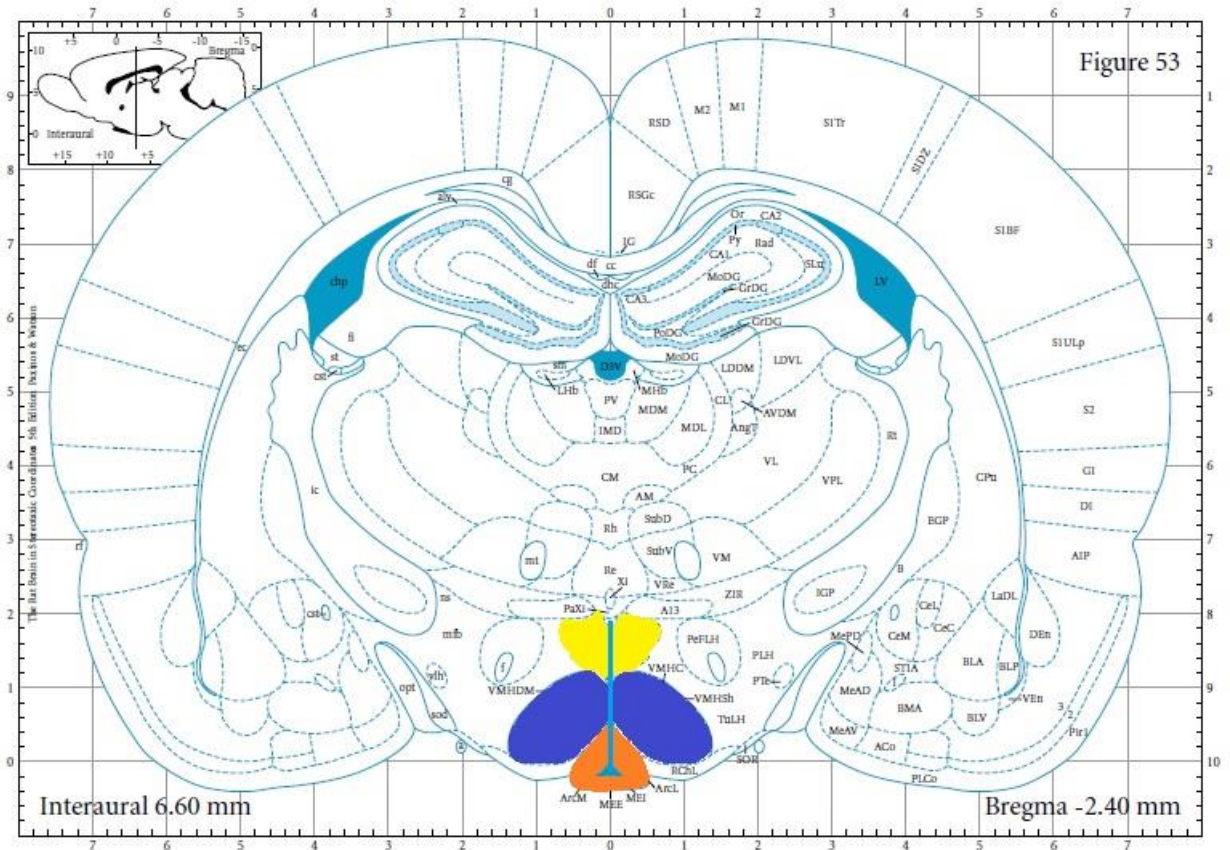
FIGURA 8 - EXEMPLO DE MARCAÇÃO UTILIZADA NO LAMINÁRIO PARA O CONTROLE DAS AMOSTRAS.



FONTE: O Autor (2016).

As áreas específicas do hipotálamo do rato foram selecionadas de acordo com o Guia Estereotáxico de Coordenadas descrito por George Paxinos e Charles Watson (*The Rat Brain – In Stereotaxic Coordinates*, 2005). A ilustração base para elaboração das máscaras utilizadas para quantificação dos núcleos PA e LH equivale à figura 46 do atlas (Interaural - 7,44mm e Bregma - 1,56mm) (FIGURA 3). A segunda ilustração, utilizada para localização dos núcleos VM, DM e ARC, equivale à figura 53 do atlas (Interaural - 6,60mm e Bregma – 2,40mm) FIGURA 9.

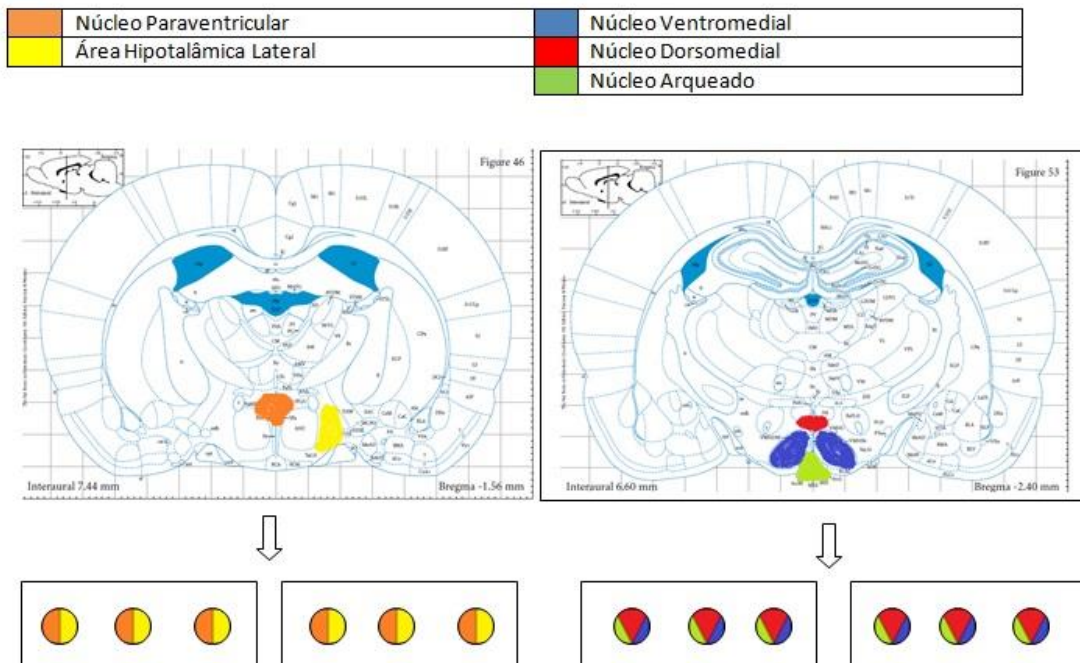
FIGURA 9 - IMAGEM REPRESENTATIVA DA FIGURA 53 DO ATLAS ESTEROTÁXICO DE COORDENADAS DO ENCÉFALO DO RATO



FONTE: Figura Modificada de Paxinos G., Watson C. (2005).

As duas regiões representadas pelas figuras foram selecionadas devido a sua ampla e segura exposição dos referidos núcleos e para otimização de todo processo envolvendo a histologia, reduzindo o material utilizado, diminuindo o tempo e minimizando os possíveis riscos inerentes que envolvem todo processo de microtomia e preparação de laminário (FIGURA 10).

FIGURA 10 - NÚCLEOS ESTUDADOS, SUA DEVIDA LOCALIZAÇÃO NAS FIGURAS 46 E 53 DO ATLAS ESTEROTÁXICO E DISPOSIÇÃO DOS CORTES NAS LÂMINAS.



FONTE: Figura modificada de Paxinos G., Watson C. (2005).

Todo material processado, após o corte no micrótomo, classificação e acomodação na lâmina, foi distendido em uma gota de solução de albumina (clara de ovo e glicerina homogeneizados na proporção de 1:1), sobre placa aquecedora Quimis®, a uma temperatura de 40°C, com adição de albumina quando necessário para uma maior e melhor distensão do corte. Este processo foi realizado manualmente com auxílio de pincel e estilete para que o material pudesse apresentar a melhor qualidade possível tendo como objetivo uma fotodocumentação satisfatória.

Depois de finalizados os processos de microtomia, classificação, ajuste e acomodação, os cortes já nas lâminas, foram acondicionados em estufa de esterilização e secagem Nova Ética® durante 48 horas (temperatura de 40°C) para posteriormente passarem pelo processo de coloração histológica.

A técnica histológica para coloração utilizada foi a de Nissl, que realça o corpo celular, em particular o retículo endoplasmático, devido ao seu corante (cresil violeta) que marca em azul o RNA carregado negativamente e é utilizado para evidenciar características estruturais importantes dos neurônios.

A bancada de coloração completa é constituída em diversas etapas, começando pela desidratação do material. Esta fase consiste em passagem do

material em 3 recipientes distintos contendo álcool em diferentes graduações (por ordem: 75%, 95% e 100%). O tempo em cada um deles é de 3 minutos. Logo após, tem início a fase da remoção de gordura, que consiste na permanência do material em recipiente contendo álcool e clorofórmio na proporção de 1:1 por 10 minutos. Ao término desta etapa, foi utilizado novamente o álcool e 3 graduações (por ordem: 100%, 95% e 75%) além de água destilada, totalizando 4 estágios, com o objetivo de hidratar o material, que permaneceu em cada um desses estágios por 3 minutos.

Quando terminado todo o processo citado acima (desidratação-hidratação), o material permaneceu por tempo definido pelo observador em solução de cresil violeta a 37°C.

Após corado, o material foi lavado com água destilada pelo tempo de 3 minutos e submetido à solução de álcool 75% + 10 gotas de ácido acético pelo período de 3 minutos. Quando terminada esta etapa, a lâmina foi mergulhada rapidamente por 3 vezes em solução contendo álcool 95% + 10 gotas de ácido acético para evidenciar a coloração. Caso fosse satisfatória, o material seguia para outros 3 recipientes contendo, nesta ordem, álcool 95%, álcool 100% e álcool etil-butílico (proporção 1:1) onde permanecia por 3 minutos em cada.

A última etapa, antes da montagem das lâminas utilizando Entellan®, foi a passagem do material por duas soluções de xilol pelo período de 5 minutos cada.

3.5 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA

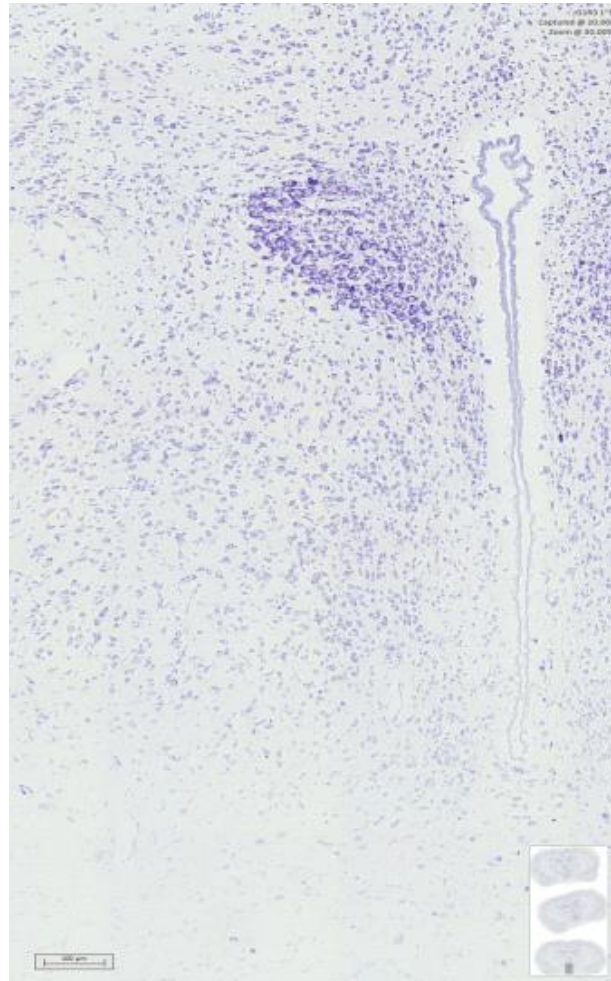
Para a quantificação estereológica dos corpos celulares dos neurônios dos núcleos hipotalâmicos (ARC, PA, DM, VM e LH) foi utilizado o Princípio do *Dissector Físico*. Este sistema impõe a aplicação de uma moldura formada por uma linha proibida e por outra permitida, delimitando uma área de 40.000 μm^2 . Foram contabilizados apenas os corpos celulares dos neurônios do plano superior que se encontravam dentro da moldura ou tocando a sua linha permitida, desde que não passasse pela linha proibida.

Foram determinados os seguintes parâmetros estereológicos dos corpos celulares dos neurônios dos núcleos hipotalâmicos: densidade numérica (Nv) e densidade de área (Na).

Todo laminário foi fotodocumentado (FIGURA 11) no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Fluorescência Convencional e Confocal e essas imagens foram

obtidas utilizando a câmera CoolCube 1 - Metasystems acoplada ao microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software de captura automatizada Metafer 4/VSlide (Metasystems, Altlussheim, DE) e observada no software VsViewer® (Metasystems, Altlussheim, DE).

FIGURA 11 - EXEMPLO DE IMAGEM DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR OBTIDA COM O EQUIPAMENTO UTILIZADO PARA TODA FOTODOCUMENTAÇÃO DO MATERIAL.

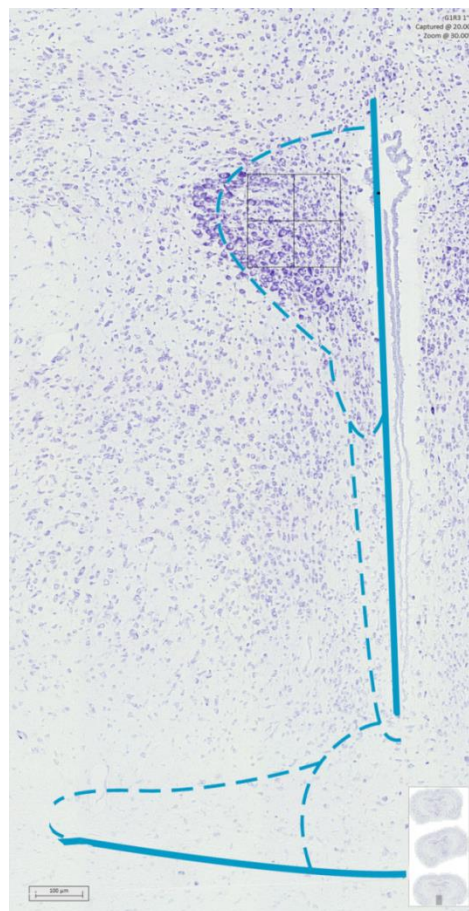


FONTE: O Autor (2016).

Posteriormente, as imagens obtidas foram trabalhadas no software VsViewer® com aumento de 30 vezes, tendo como objetivo a seleção e obtenção do local desejado para análise em cada corte, com aumento e precisão adequados para o ajuste das máscaras e as grades do *dissector* físico, destinados a delimitar a área de quantificação. Para esta captação, foi utilizado Ultrabook Asus S550C conectado a um monitor de vídeo Hewlett Packard EliteDisplay E241i no qual houve a distinção entre as áreas hipotalâmicas nos hemisférios encefálicos, gerando imagens distintas

para cada antímero. Com a ajuda do software Photoshop CS 6 Extended® (Adobe), foram criadas máscaras (baseadas nas figuras do Guia Estereotáxico de Paxinos e Watson, 2005) para cada uma dessas imagens e seu antímero correspondente, com objetivo de delimitar o núcleo. Posteriormente, foi confeccionado o *dissector* físico com dimensões de 200 x 200 µm, específico para a quantificação celular em cada núcleo, como mostra a FIGURA 12.

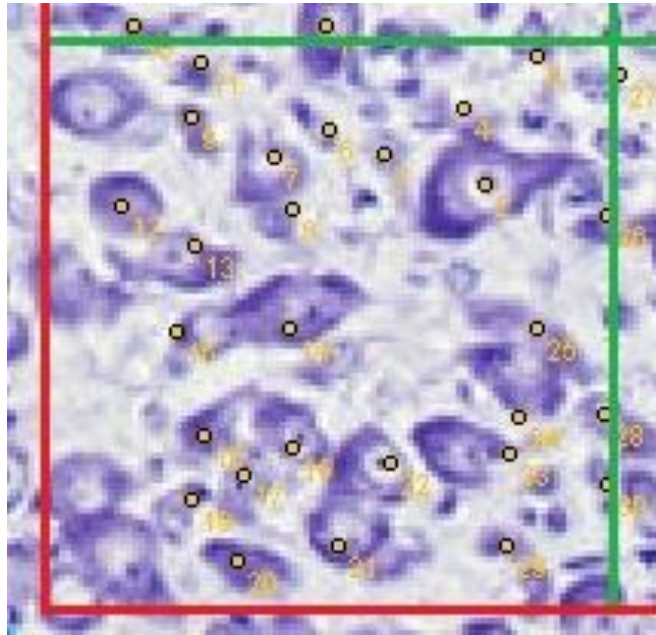
FIGURA 12 - IMAGEM OBTIDA DO NÚCLEO PA COM A SOBREPOSIÇÃO DA MÁSCARA DELIMITANTE DA ÁREA E O *DISSECTOR* FÍSICO EM SEU INTERIOR.



FONTE: O Autor (2016).

A quantificação foi obtida manualmente com auxílio do software ImageJ®, onde foram selecionados e identificados todos neurônios no *dissector* físico, sempre a partir das linhas de quantificação e suas restrições (FIGURA 13).

FIGURA 13 – IMAGEM REPRESENTATIVA DA ÁREA TESTE COM CONTAGEM E DELIMITAÇÃO DA LINHA PERMITIDA (VERDE) E PROIBIDA (VERMELHA).



FONTE: O Autor (2016).

Para obtenção dos parâmetros tridimensionais dos núcleos hipotalâmicos (ARC, PA, DM, VM E LH) foram aplicadas as seguintes equações:

Densidade Numérica (Nv) dos corpos celulares dos neurônios:

$$\text{Vol}[\text{dissector}] = e \cdot \text{At}$$

$$Nv = \Sigma Q / \text{Vol}[\text{dissector}] (1/\text{mm}^3)$$

onde:

e = espessura do micrômetro

At = área-teste do plano superior

ΣQ = número de corpos celulares de neurônios

Para obtenção da Densidade por Área (Na):

$$N = N / \text{At} (\mu\text{m}^3)$$

onde:

N = número de perfis celulares observados na área-teste (At)

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se os dados apresentavam distribuição normal, e foram considerados paramétricos. Para avaliar possíveis diferenças entre os hemisférios, nos núcleos avaliados, foi realizado o teste t de Student. Para avaliar diferenças entre os grupos, considerando os dois hemisférios dos cortes, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo *post hoc* de Newman-Keuls. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média para um $p \leq 0,05$.

Para avaliação do peso dos animais, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias seguido do pós teste de Bonferroni.

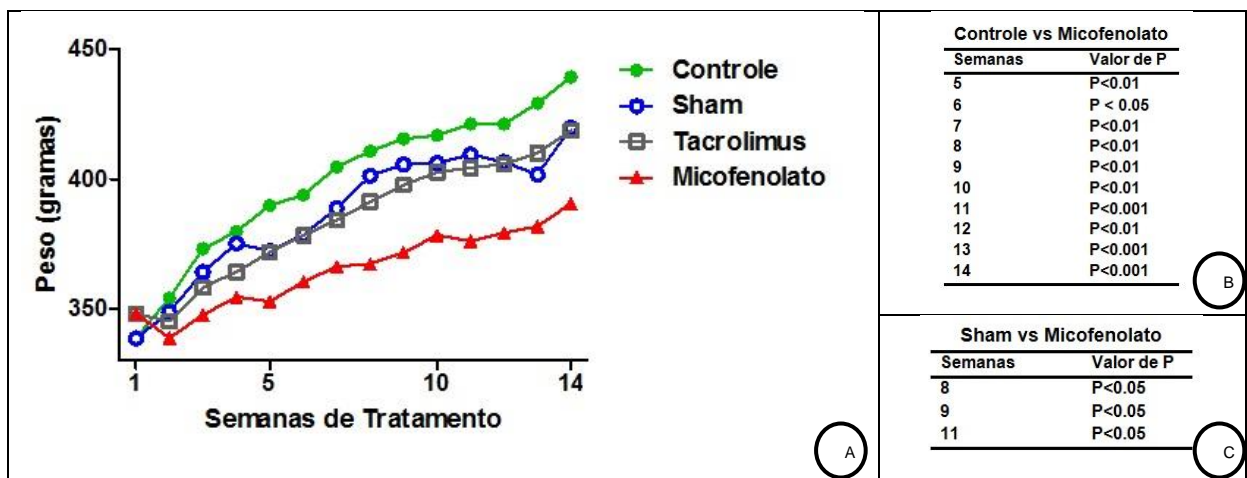
O software utilizado para as análises estatísticas e a geração dos gráficos foi o Prisma (GraphPad Prism[®], versão 5.01).

4 RESULTADOS

4.1 PESO DOS ANIMAIS

Todos animais ganharam peso no decorrer do estudo (FIGURA 14-A), entretanto pôde-se observar impacto negativo do uso de MMF sobre o ganho de peso quando comparado aos grupos Controle e Sham FIGURA 14 (B e C).

FIGURA 14 – RESULTADOS DE PESO DOS ANIMAIS



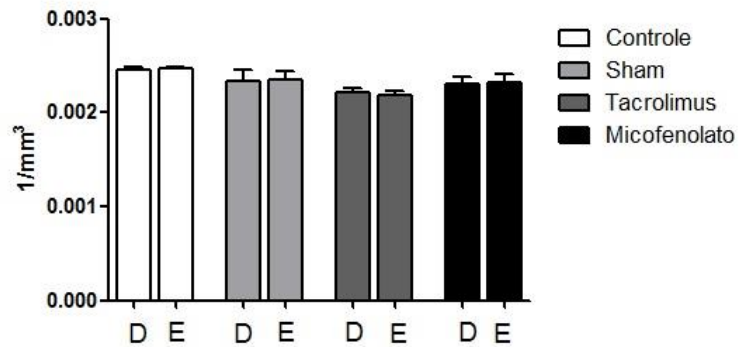
FONTE: O Autor (2017).

4.2 ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS

4.2.1 NÚCLEO PARAVENTRICULAR

A quantificação de neurônios do PA (GRÁFICO 1), mostrou não haver diferenças significativas entre os dois antímeros encefálicos para os grupos avaliados: Controle ($p=0,77$; $t=0,30$), Sham ($p=0,95$; $t=0,05$), Tacrolimus ($p=0,60$; $t=0,53$) e Micofenolato ($p=0,86$; $t=0,17$).

GRÁFICO 1 - ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR.



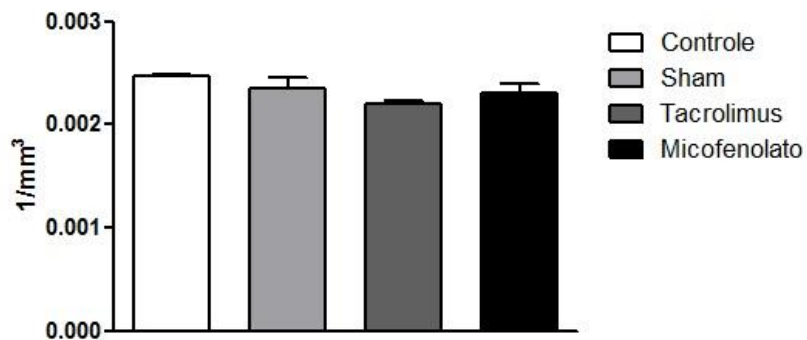
(N=6/GRUPO), $P \geq 0,05$. TESTE T.

FONTE: O Autor (2017).

LEGENDA: D= Hemisfério Direito
E= Hemisfério Esquerdo

Na comparação da densidade neuronal entre os grupos (GRÁFICO 2) (FIGURA 15) foi observado que não houve diferenças estatísticas entre eles [$F(3,20)=2,327$; $P=0.1054$], no respectivo núcleo.

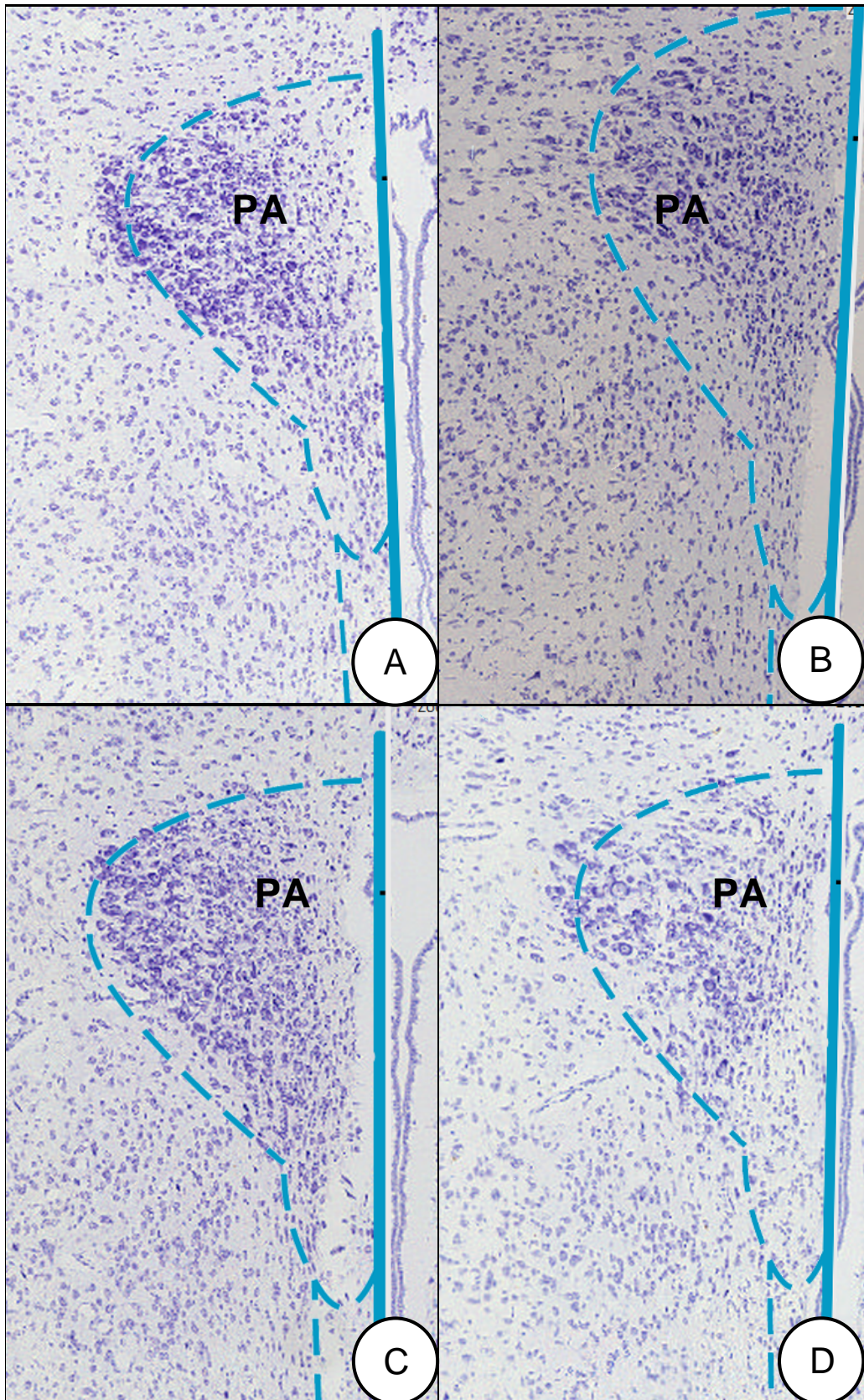
GRÁFICO 2 – MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR.



(N=6/GRUPO), $P \geq 0,05$. ONE WAY ANOVA.

FONTE: O Autor (2017).

FIGURA 15 – NÚCLEO PARAVENTRICULAR DELIMITADO POR MÁSCARA
(ADAPTADA DE PAXINOS E WATSON, 2005).
LEGENDA: A- CONTROLE; B – SHAM; C – TACROLIMUS; D – MICOFENOLATO.

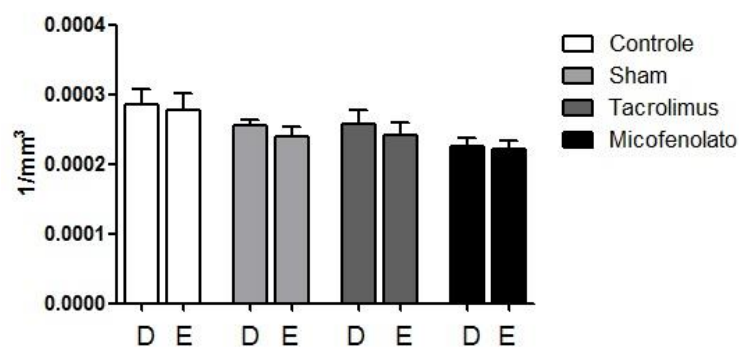


FONTE: O Autor (2016).

4.2.2 ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL

Analisando a quantificação de neurônios da LH (GRÁFICO 3), foi verificado não haver diferença significativa entre os núcleos presentes nos antímeros encefálicos dos grupos avaliados: Controle ($p=0,80$; $t=0,26$), Sham ($p=0,33$; $t=1,02$), Tacrolimus ($p=0,50$; $t=0,69$) e Micofenolato ($p=0,83$; $t=0,22$).

GRÁFICO 3 - ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL.



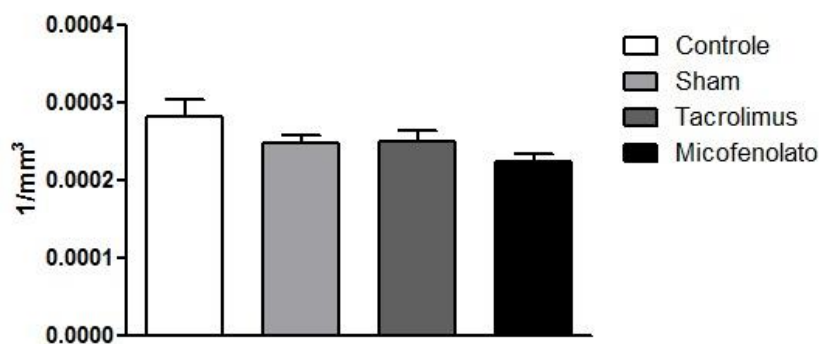
(N=6/GRUPO), $P \geq 0,05$. TESTE T.

FONTE: O Autor (2017).

LEGENDA: D= Hemisfério Direito
E= Hemisfério Esquerdo

Comparando a concentração neuronal entre os grupos (GRÁFICO 4) (FIGURA 16) foi observado que não houve diferenças estatísticas entre eles [$F(3,20)=2,618$; $P=0.0792$], no núcleo LH.

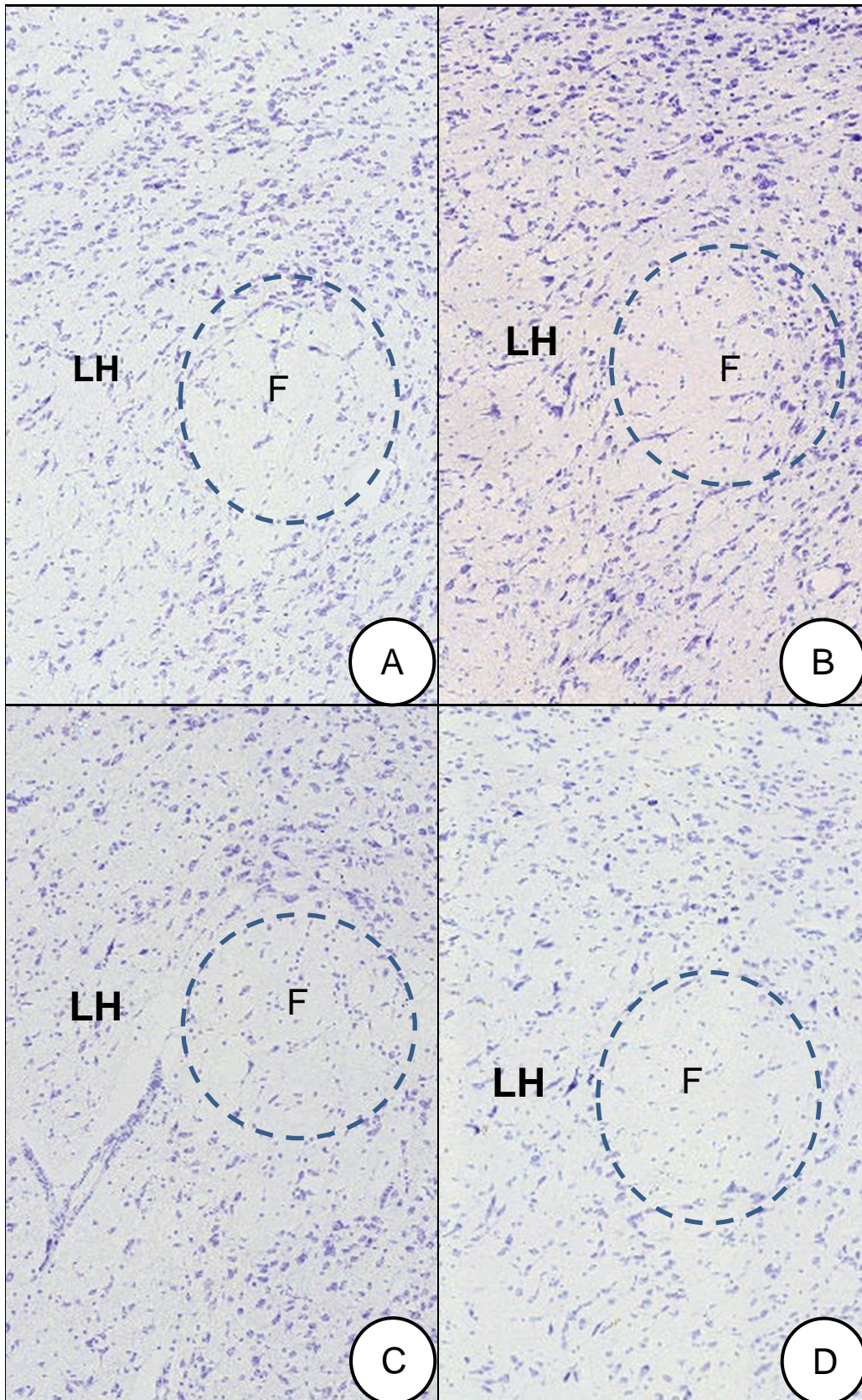
GRÁFICO 4 - MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DA ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL.



(N=6/GRUPO), $P \geq 0,05$. ONE WAY ANOVA.

FONTE: O Autor (2017).

FIGURA 16 – ÁREA HIPOTALÂMICA LATERAL DELIMITADA POR MÁSCARA
(ADAPTADA DE PAXINOS E WATSON, 2005)
LEGENDA: A - CONTROLE; B - SHAM; C - TACROLIMUS; D - MICOFENOLATO; FÓRNICE (F)

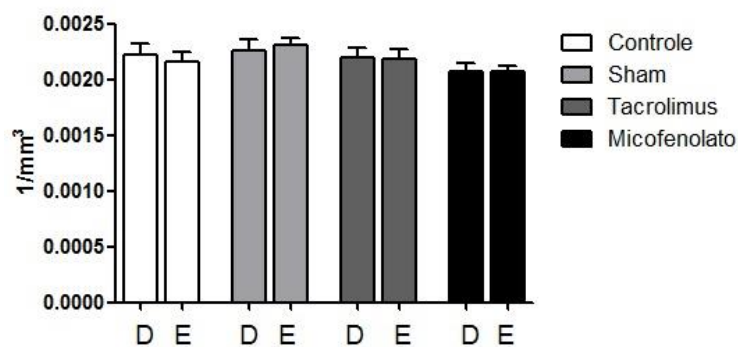


FONTE: O Autor (2016).

4.2.3 NÚCLEO DORSOMEDIAL

Após a realização dos testes estatísticos dos resultados obtidos com a quantificação de neurônios do DM (GRÁFICO 5), percebeu-se não haver diferenças significativas entre os dois hemisférios para os grupos avaliados: Controle ($p=0,69$; $t=0,40$), Sham ($p=0,67$; $t=0,43$), Tacrolimus ($p=0,95$; $t=0,06$) e Micofenolato ($p=0,99$; $t=0,01$).

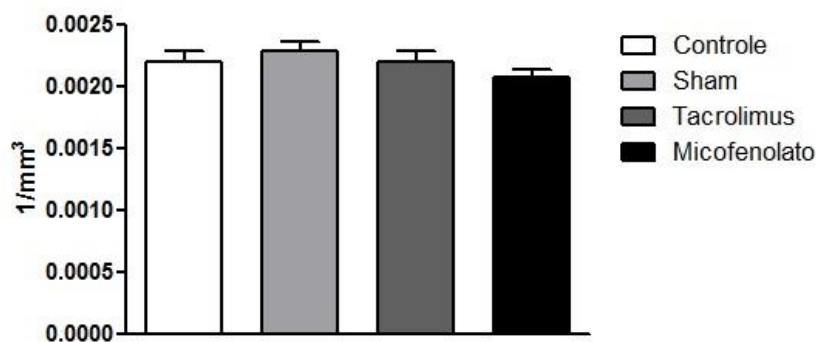
GRÁFICO 5 - ANÁLISE ESTEREOOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DO NÚCLEO DORSOMEDIAL.



(N=6/GRUPO), $P \geq 0,05$. TESTE T.
 FONTE: O Autor (2017).
 LEGENDA: D= Hemisfério Direito
 E= Hemisfério Esquerdo

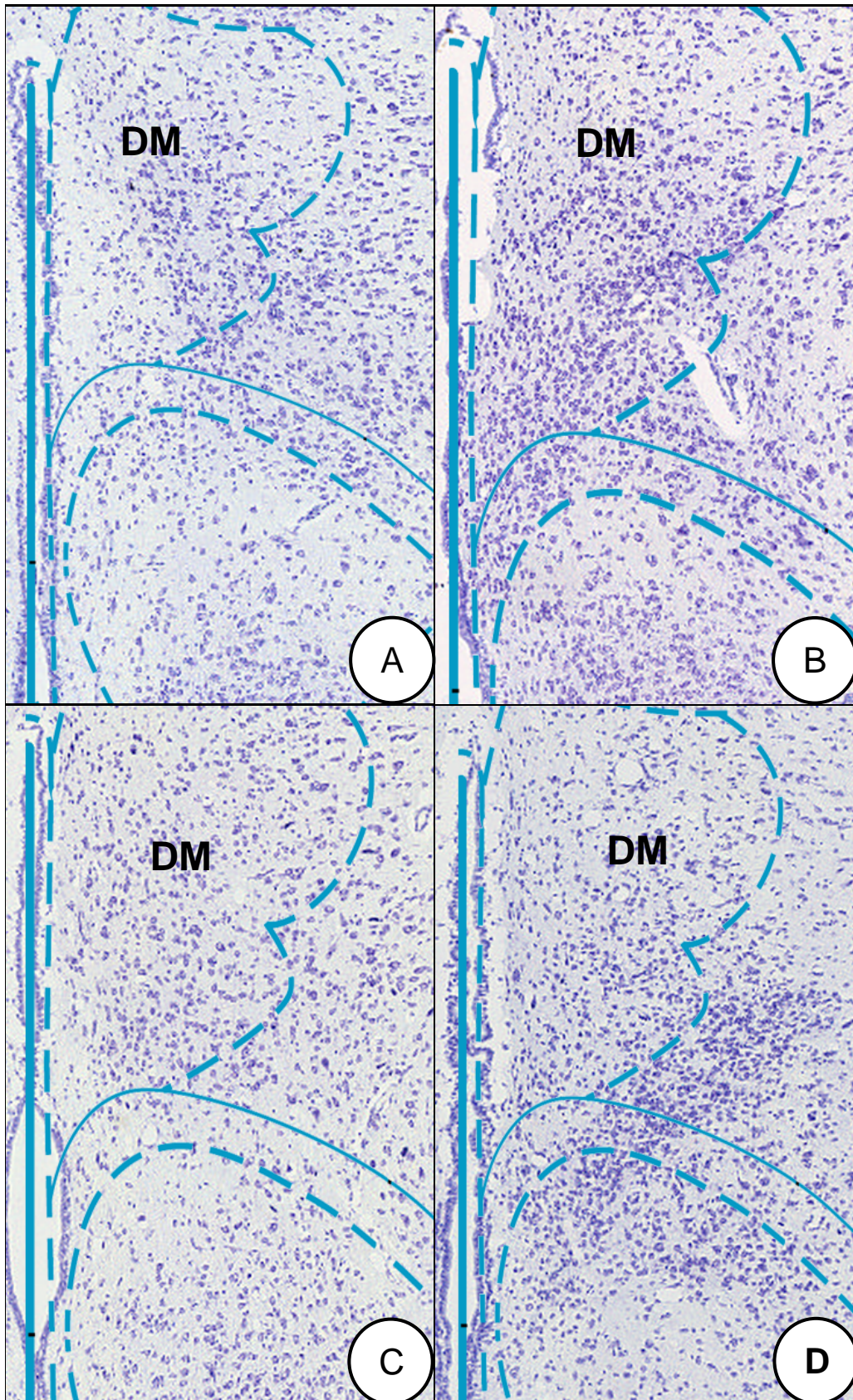
Comparando a concentração de neurônios por área do núcleo DM (GRÁFICO 6) (FIGURA 17) não verificou-se diferenças estatísticas entre os grupos analisados [$F(3,20)=1,104$; $P=0.3707$], para o núcleo DM.

GRÁFICO 6 - MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO DORSOMEDIAL.



(N=6/GRUPO) $P \geq 0,05$. ONE WAY ANOVA.
 FONTE: O Autor (2017).

FIGURA 17 – NÚCLEO DORSOMEDIAL DELIMITADO POR MÁSCARA
(ADAPTADA DE PAXINOS E WATSON, 2005)
LEGENDA: A- CONTROLE; B – SHAM; C – TACROLIMUS; D – MICOFENOLATO.

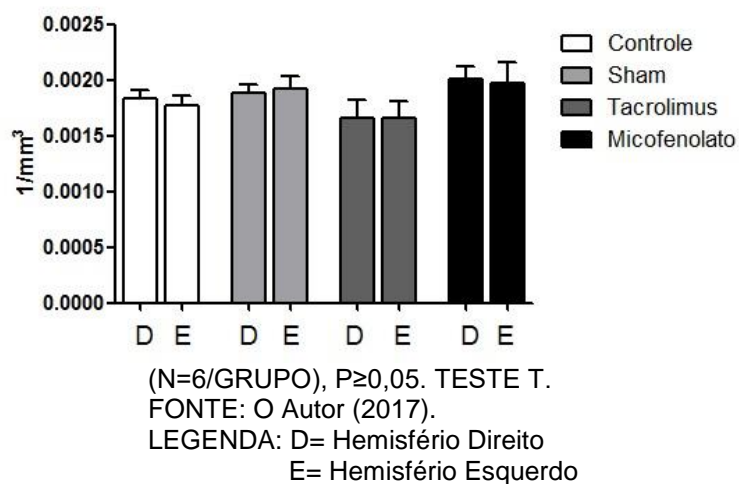


FONTE: O Autor (2016).

4.2.4 NÚCLEO VENTROMEDIAL

A quantificação de neurônios do núcleo VM (GRÁFICO 7), revelou não haver diferenças significativas entre os dois hemisférios para os grupos avaliados, segundo teste t: Controle ($p=0,67$; $t=0,44$), Sham ($p=0,77$; $t=0,30$), Tacrolimus ($p=0,99$; $t=0,01$) e Micofenolato ($p=0,88$; $t=0,14$).

GRÁFICO 7 - ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEURONAL DO NÚCLEO VENTROMEDIAL.



Ao considerar a concentração neuronal (GRÁFICO 8) (FIGURA 18) não foi detectada diferença estatística significativa entre os grupos [$F(3,20)=1,641$; $P=0.2117$], no respectivo núcleo.

GRÁFICO 8 - MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO VENTROMEDIAL.

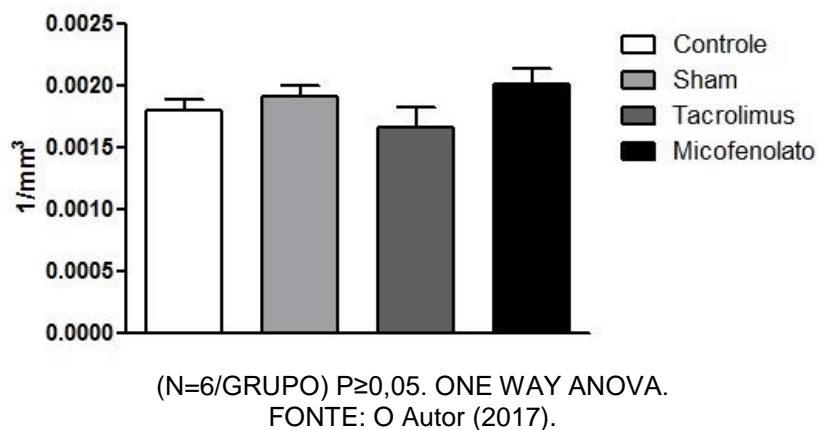
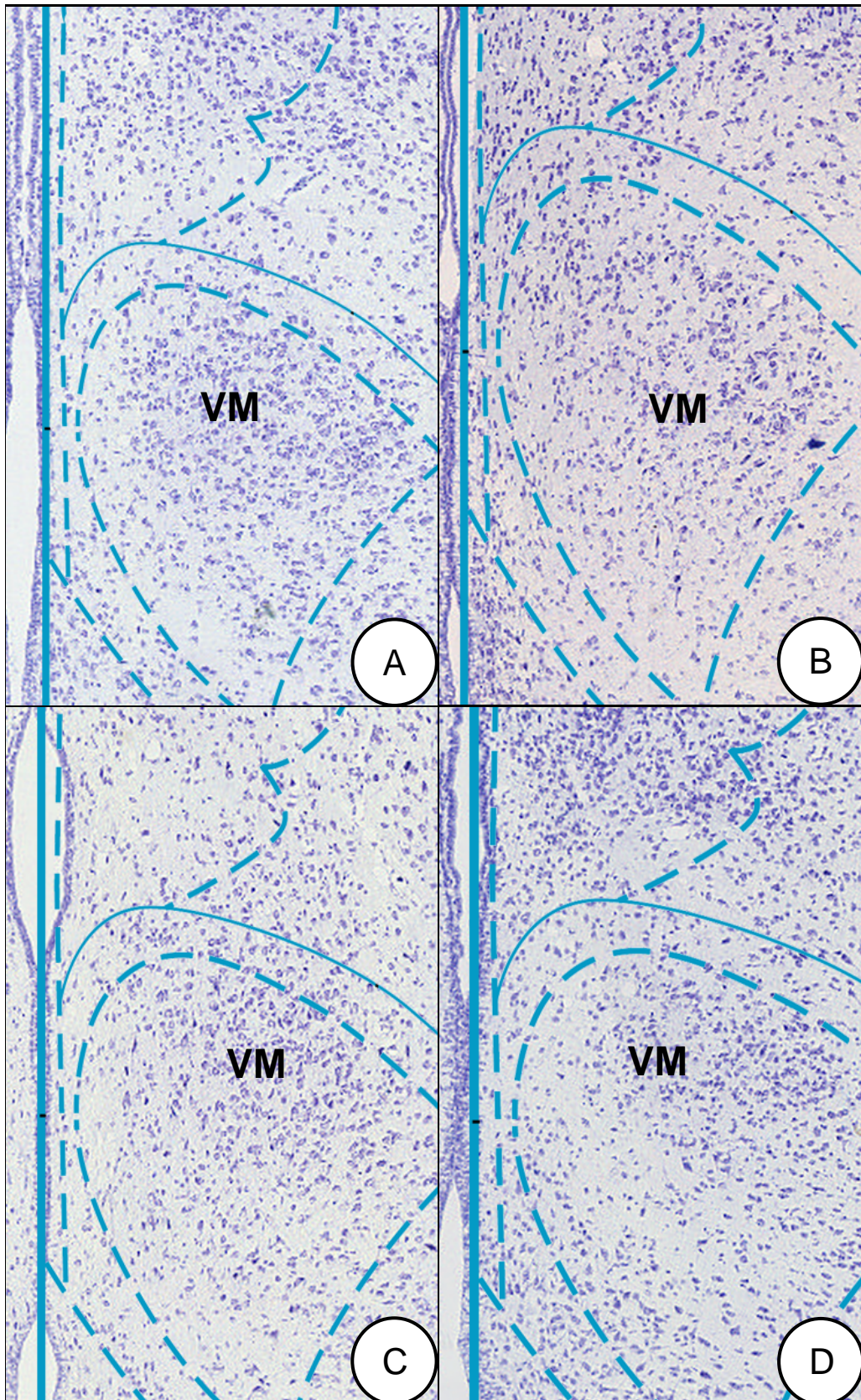


FIGURA 18 – NÚCLEO VENTROMEDIAL DELIMITADO POR MÁSCARA
(ADAPTADA DE PAXINOS E WATSON, 2005)
LEGENDA: A- CONTROLE; B – SHAM; C – TACROLIMUS; D – MICOFENOLATO.

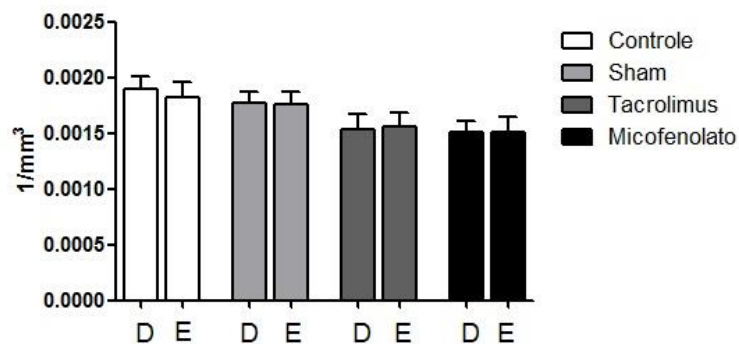


FONTE: O Autor (2016).

4.2.5 NÚCLEO ARQUEADO

Analisando a quantificação de neurônios do núcleo ARC (GRÁFICO 9), foi verificado que não houve diferenças significativas entre os dois hemisférios para os grupos avaliados: Controle ($p=0,68$; $t=0,42$), Sham ($p=0,96$; $t=0,04$), Tacrolimus ($p=0,92$; $t=0,09$) e Micofenolato ($p=0,98$; $t=0,01$).

GRÁFICO 9 - ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DA DENSIDADE NEUROSNAL DO NÚCLEO ARQUEADO.



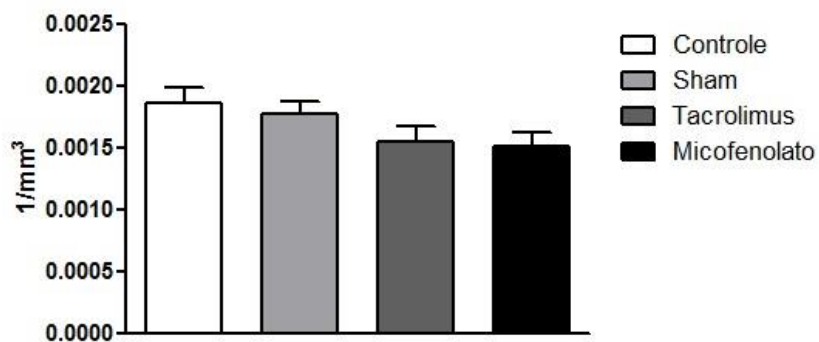
(N=6/GRUPO), $P \geq 0,05$. TESTE T.

FONTE: O Autor (2017).

LEGENDA: D= Hemisfério Direito
E= Hemisfério Esquerdo

Comparando a densidade neuronal dos grupos (GRÁFICO 10) (FIGURA 19) verificamos que não houve diferenças estatísticas entre eles [$F(3,20)=2,133$; $P=0.1281$], no núcleo ARC.

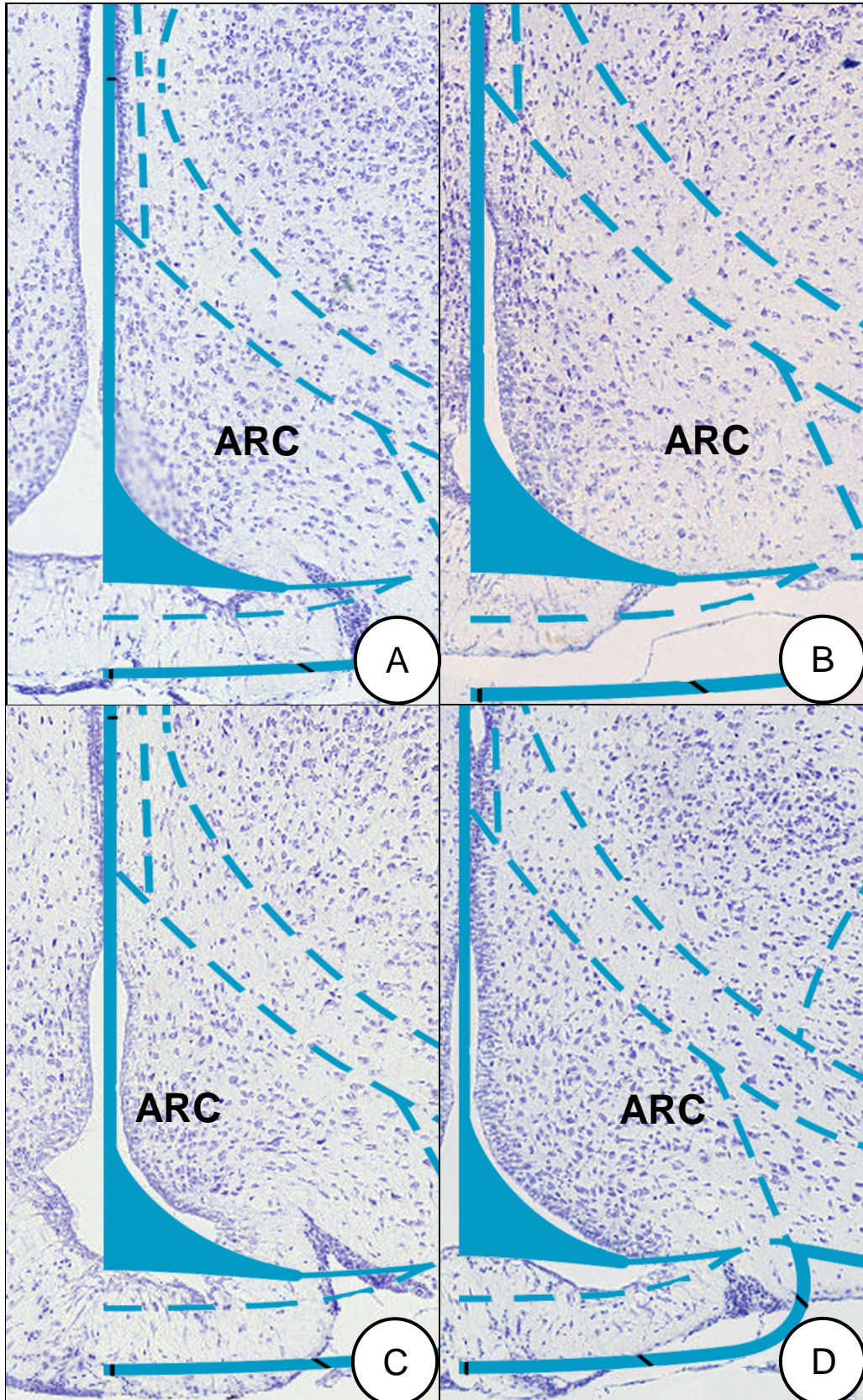
GRÁFICO 10 - MORFOQUANTIFICAÇÃO DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO ARQUEADO.



(N=6/GRUPO), $P \geq 0,05$. ONE WAY ANOVA.

FONTE: O Autor (2017)

FIGURA 19 – NÚCLEO ARQUEADO DELIMITADO POR MÁSCARA
(ADAPTADA DE PAXINOS E WATSON, 2005).
LEGENDA: A - CONTROLE; B – SHAM; C – TACROLIMUS; D – MICOFENOLATO.



FONTE: O Autor (2016).

5 DISCUSSÃO

5.1 ESCOLHA DO ANIMAL EXPERIMENTAL

Foram utilizados os mesmos animais experimentais da tese de doutorado intitulada “Estudo comparativo dos efeitos do uso de tacrolimus e micofenolato mofetil sobre a espermatogênese de ratos: análise histomorfométrica e de apoptose celular” (ARANHA, 2015).

Desta forma, o critério utilizado no presente trabalho para a escolha dos animais experimentais fundamentou-se no princípio dos 3 Rs: redução, reposição e refinamento conforme a Lei 11.794/2008 que regulamenta o uso de animais na experimentação científica.

Todos os animais utilizados no estudo foram ratos Wistar, machos, aos quais foram aplicadas as diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) que preconiza o respeito ao animal e determina o método de eutanásia mais adequado. Neste caso, foi feita decapitação para remoção do encéfalo após anestesia e punção venosa transcardíaca com indução de hipovolemia.

5.2 CONSIDERAÇÕES GERAIS DO MODELO EXPERIMENTAL

As bases teóricas do modelo experimental utilizado nesta pesquisa fundamentaram-se em dois aspectos:

1. a ocorrência de ganho de peso em pacientes pós-transplantados fazendo uso de imunossupressores;
2. a análise de possíveis alterações dos núcleos hipotalâmicos envolvidos com a regulação da ingestão de alimentos em ratos Wistar submetidos ao tratamento com os imunossupressores, TAC e MMF.

No presente trabalho, foi utilizado um modelo experimental com a finalidade de observar a quantificação dos neurônios dos núcleos hipotalâmicos PA, LH, DM, VM, e ARC em ratos Wistar machos tratados ou não com os imunossupressores MMF e TAC. Desta forma, foi constituído o grupo Controle, sem administração de medicação; o grupo Tacrolimus com a administração de uma dose diária de TAC (1mg/kg peso) diluído em solução fisiológica 0,9%; o grupo Micofenolato com a

administração de uma dose diária de MMF (30 mg/kg peso) diluído em solução fisiológica 0,9% e o grupo Sham com a administração de solução fisiológica 0,9%. Sendo utilizada a via gavagem para os grupos Tacrolimus, Micofenolato e Sham.

O método estereológico para o estudo morfoquantitativo dos corpos celulares dos neurônios dos núcleos hipotalâmicos demonstrou ser eficiente para aquisição da densidade neuronal e número total de neurônios hipotalâmicos para posterior comparação entre ratos Wistar não tratados e tratados com os imunossupressores, TAC e MMF. No entanto, devido à distribuição neuronal anisotrópica do hipotálamo, não foi possível a obtenção da estimativa volumétrica de cada núcleo hipotalâmico envolvido com a regulação da ingestão de alimentos.

Não foi encontrado na literatura protocolo de pesquisa semelhante para análise dos efeitos dos imunossupressores, TAC e MMF no hipotálamo de ratos Wistar e sua relação com a obesidade.

Oliveira (2017) desenvolveu um estudo estereológico nos mesmos núcleos hipotalâmicos (PA, LH, DM, VM e ARC), em ratos Wistar com o intuito de analisar as implicações do modelo da programação metabólica sobre a citoarquitetura hipotalâmica e seus parâmetros com a obesidade.

Da mesma forma, alguns autores têm investigado as alterações provocadas pelo quadro de obesidade no modelo desencadeado pelas injeções de glutamato monossódico devido à neurotoxicidade celular no hipotálamo (JIN *et al.*, 2015; GOMES; FREITAS; GRASSIOLLI, 2016).

No entanto, relatos sobre o caráter neurotóxico dos imunossupressores no hipotálamo são escassos na literatura. Desta forma, é mínima a abordagem a respeito do TAC e MMF como fatores etiológicos relacionados ao quadro de obesidade. Além disso, as correlações diretas existentes entre imunossupressores, núcleos hipotalâmicos e obesidade ainda não estão bem esclarecidos, como descrito por Anastácio *et al.*, (2013) que se referem à utilização de medicamentos imunossupressores como fator de risco para o excesso de peso pós-transplante ainda ser controversa.

Mesmo assim, diversos estudos relatam ganho de peso significativo em pacientes pós-transplante. Frequentemente, esse ganho de peso pode chegar a ser excessivo, resultando em um quadro de obesidade acompanhada das suas comorbidades associadas. O que tem apresentado ser um problema de saúde pública crescente e relacionado, principalmente, aos casos de pacientes submetidos

a transplantes de rins, fígado e coração (ANASTACIO *et al.*, 2013; LOPEZ-VILELLA *et al.*, 2015; TRAN *et al.*, 2016)

5.3 EFEITOS DOS IMUNOSSUPRESSORES NOS NÚCLEOS HIPOTALÂMICOS

A suplementação com os imunossupressores TAC e MMF não causou alteração significativa na densidade neuronal nos núcleos hipotalâmicos, paraventricular, área hipotalâmica lateral, dorsomedial, ventromedial e arqueado. Este resultado pode ser explicado, possivelmente, pela ausência de um grupo específico tratado, simultaneamente e de forma associada, com TAC e MMF como convencionalmente ocorre em tratamentos de pacientes pós-transplantes que adquiriram obesidade.

A ausência de alterações morfoquantitativas dos neurônios hipotalâmicos nos diferentes grupos estudados não confirma notoriamente ausência de efeitos dos imunossupressores nos núcleos hipotalâmicos. Desta forma, outros métodos investigativos tornam-se necessários para avaliar os efeitos neurotóxicos dos imunossupressores no hipotálamo.

Segundo Richards *et al.*, (2005) um dado relevante trata da ocorrência da perda de vias aferentes e eferentes entre o fígado e o hipotálamo durante a cirurgia de transplante hepático. Com isso, ocorre desordem do papel do fígado na homeostase metabólica, podendo atrasar a saciedade pós-prandial e, portanto, influenciar diretamente o consumo excessivo de alimentos. No entanto, até o momento, não foram estabelecidos dados conclusivos que permitam determinar se este fato tem um efeito sobre a ingestão de alimentos e a massa corporal dos pacientes pós-transplantes. Contudo, esse dado poderia abrir mais um caminho para justificar a ausência de alteração na densidade neuronal hipotalâmica, porém, os animais do referente estudo não foram submetidos a qualquer intervenção cirúrgica semelhante ao procedimento de transplante hepático.

No escasso número de estudos encontrados que abordam os efeitos dos imunossupressores no hipotálamo, mais especificamente nos núcleos hipotalâmicos estudados, não há consenso em relação a sua atuação na citoarquitetura nesta área do encéfalo. Entretanto, na literatura foram citadas possíveis alterações nos núcleos hipotalâmicos com a tentativa de justificar a desorganização do controle da fome e

saciedade exercida por neurônios hipotalâmicos envolvidos com o desenvolvimento do quadro de obesidade (PLAGEMANN *et al.*, 1999; BERTHOUD, 2012).

Corroborando com resultados obtidos, Oliveira (2017), não encontrou alterações significativas na densidade numérica e na densidade de área dos núcleos hipotalâmicos PA, ARC e HL, por meio da análise estereológica, no modelo de programação metabólica.

Com base em outros modelos experimentais invasivos, por meio da injeção de glutamato monossódico em altas concentrações em camundongos, (Zelezna *et al.*, (2009) e Rojas-Castaneda *et al.*, (2016) relataram o rápido ganho de peso animal por consequência da alta toxicidade causada nas células dos núcleos hipotalâmicos envolvidos com a ingestão de alimentos.

Contrariamente, neste estudo não foi identificado ganho de peso acentuado nos grupos, independentes, tratados com TAC e MMF. Assim, constatou-se diminuição significativa de peso no grupo de animais tratados com MMF quando comparados aos grupos, Controle e Sham. Quanto aos dados obtidos na pesagem dos animais no grupo tratados com TAC, não houve diminuição significativa do peso quando comparado aos grupos Controle e Sham. Provavelmente, esta variação do ganho de peso deve-se primeiramente a falta de associação entre fármacos e secundariamente ao curto período de tempo de tratamento.

Gu *et al.*, (2016) observaram que não houve ganho de peso com o uso associado de TAC com triptolide, via intraperitoneal, por 150 dias em animais experimentais transplantados. Tal situação justifica-se pelo fato do triptolide inibir o efeito colateral de ganho de peso pelo TAC. No entanto, esse tratamento foi por tempo mais prolongado, em relação a este estudo, em 52 dias de diferença, o que pôde ser crucial, considerando o tempo de vida do rato Wistar.

Da mesma forma, diversos estudos tem demonstrado que a interação medicamentosa ocasionada pela combinação de fármacos pode ser responsável pelo aumento de peso dos pacientes pós-transplantados, o que comumente, ocorre na prática clínica (PALMER; SCHAFFNER; THUNG, 1991; STEGALL *et al.*, 1995; NEAL *et al.*, 2001; RICHARDS *et al.*, 2005; KALLURI; HARDINGER, 2012). Foi constatado por Canzanello *et al.* (1997) e Bianchi *et al.* (2008) aumento excessivo de peso, incluindo quadros de obesidade em 15% dos pacientes pós-transplantes hepáticos, tratados com a associação das drogas imunossupressoras, TAC e CSA.

No entanto, quando Canzanello *et al.* (1997) administraram, individualmente, TAC e CSA notaram ausência de ganho de peso significativo.

De forma semelhante, Everhart *et al.* (1998) observaram que indivíduos transplantados tratados com CSA no final do primeiro ano tinham um maior risco de obesidade do que as pessoas tratadas com TAC tratadas nesse mesmo período.

Sendo assim, os resultados corroboram com os dados apresentados devido à ausência de aumento significativo de peso nos animais tratados isoladamente com TAC.

5.4 ASPECTOS DETERMINANTES DA NEUROTOXICIDADE DOS IMUNOSSUPRESSORES

Apesar da neurotoxicidade dos imunossupressores não ser o único foco dessa pesquisa, torna-se pertinente o levantamento dos principais aspectos neurotóxicos de alguns imunossupressores conhecidos devido a seus efeitos inibidores de calcineurina, principalmente, TAC e CSA.

O estudo desenvolvido por Asai *et al.*, (1999) relatou que altos níveis de calcineurina podem levar à morte neuronal. Desta forma, diversas terapias com imunossupressores inibidores de calcineurina tentam substituí-las, quando possível, ou associar essas drogas à outras que não apresentam efeitos neurotóxicos, como é o caso do MMF, que segundo Mukherjee (2009) e Anghel *et al.* (2013) não possui efeito de neurotoxicidade. Contudo, a bula aprovada pela ANVISA em 29 de outubro de 2015 do medicamento Cellcept[®], utilizado no estudo como suplementação do MMF informa que nos testes realizados, entre 3% e 10% dos pacientes apresentaram vertigem, depressão, convulsão, tremores, neuropatias, alucinações, delírio entre outros efeitos de ordem neurológica e além destes, apresentaram ganho de peso classificado como muito comum nos casos de transplantes cardíacos e comum quando estes pacientes foram submetidos a transplantes renal e hepático.

Sendo assim, a interação medicamentosa entre imunossupressores e outras drogas pode ser responsável pelo quadro neurotóxico de determinadas regiões do Sistema Nervoso, favorecendo desta forma o elevado ganho de peso e o desenvolvimento do quadro de obesidade. No entanto, a continuidade das pesquisas é necessária para elucidar de fato o envolvimento dos imunossupressores na fisiopatologia da obesidade adquirida por pacientes pós-transplantados.

5.5 PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de não terem sido detectados efeitos neurotóxicos específicos do uso de imunossuppressores TAC e MMF, não se pode descartar a presença de alterações bioquímicas capazes de gerar estado fisiopatológico tal como a obesidade. Desta forma, outros estudos se fazem necessários para elucidar a atuação dos imunossopressores, TAC e MMF, no hipotálamo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos por meio da análise estereológica dos núcleos hipotalâmicos permitiram concluir que:

- a) não houve diferenças significativas nas densidades neuronais e número total de neurônios hipotalâmicos dos núcleos PA, LH, DM, VM e ARC entre os grupos Controle, Sham e tratados com os imunossuppressores, Tacrolimus e Micofenolato;
- b) não foram identificadas alterações morfológicas e quantitativas nos núcleos hipotalâmicos estudados;
- c) as alterações encontradas no número dos corpos celulares dos neurônios hipotalâmicos não evidenciam efeitos neurotóxicos específicos dos imunossuppressores TAC e MMF.

REFERÊNCIAS

- ALLISON, D. B. et al. The heritability of body mass index among an international sample of monozygotic twins reared apart. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 20, n. 6, p. 501-6, Jun 1996. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782724> >.
- ANASTACIO, L. R. et al. Overweight in liver transplant recipients. **Rev Col Bras Cir**, v. 40, n. 6, p. 502-7, Nov-Dec 2013. ISSN 1809-4546 (Electronic) 0100-6991 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24573630> >.
- ANGHEL, D. et al. Neurotoxicity of immunosuppressive therapies in organ transplantation. **Maedica (Buchar)**, v. 8, n. 2, p. 170-5, Jun 2013. ISSN 1841-9038 (Print) 1841-9038 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24371481> >.
- ARANHA, M. A. **Estudo comparativo dos efeitos do uso de tacrolimus e micofenolato mofetil sobre a espermatogênese de ratos: análise histomorfométrica e de apoptose celular**. 2015. (Tese de Doutorado). PPG- Clínica Cirúrgica, Universidade Federal do Paraná
- ASAI, A. et al. High level calcineurin activity predisposes neuronal cells to apoptosis. **J Biol Chem**, v. 274, n. 48, p. 34450-8, Nov 26 1999. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567426> >.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS (ABTO). 2017. Disponível em <<http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=515&c=900&s=0&friendly=registro-brasileiro-de-transplantes-estatistica-de-transplantes>>. Acesso em 25 maio 2017.
- BERTHOUD, H. R. The neurobiology of food intake in an obesogenic environment. **Proc Nutr Soc**, v. 71, n. 4, p. 478-87, Nov 2012. ISSN 1475-2719 (Electronic) 0029-6651 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22800810> >.
- BIANCHI, G. et al. Metabolic syndrome in liver transplantation: relation to etiology and immunosuppression. **Liver Transpl**, v. 14, n. 11, p. 1648-54, Nov 2008. ISSN 1527-6473 (Electronic) 1527-6465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18975273> >.
- BRAUN, F. et al. Quality of life after liver transplantation. **Transplant Proc**, v. 41, n. 6, p. 2564-6, Jul-Aug 2009. ISSN 1873-2623 (Electronic) 0041-1345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19715975> >.
- CANZANELLO, V. J. et al. Evolution of cardiovascular risk after liver transplantation: a comparison of cyclosporine A and tacrolimus (FK506). **Liver Transpl Surg**, v. 3, n. 1, p. 1-9, Jan 1997. ISSN 1074-3022 (Print) 1074-3022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9377752> >.
- CHAN, G.; GARNEAU, P.; HAJJAR, R. The impact and treatment of obesity in kidney transplant candidates and recipients. **Can J Kidney Health Dis**, v. 2, p. 26, 2015. ISSN 2054-3581 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26236496> >.

COSTENTIN, J. [Physiological and neurobiological elements of food intake]. **Ann Pharm Fr**, v. 62, n. 2, p. 92-102, Mar 2004. ISSN 0003-4509 (Print) 0003-4509 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15107726> >.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D.; MENEZES FILHO, H. C. Controle do apetite: mecanismos metabólicos e cognitivos. v. 32, n. 3, p. 211-222, 2010.

DAMIANI, D.; DAMIANI, D. Sinalização cerebral do apetite. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v.9, p. 138-45, 2011.

EVERHART, J. E. et al. Weight change and obesity after liver transplantation: incidence and risk factors. **Liver Transpl Surg**, v. 4, n. 4, p. 285-96, Jul 1998. ISSN 1074-3022 (Print) 1074-3022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9649642> >.

FLEGAL, K. M. et al. Trends in Obesity Among Adults in the United States, 2005 to 2014. **JAMA**, v. 315, n. 21, p. 2284-91, Jun 07 2016. ISSN 1538-3598 (Electronic) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27272580> >.

FONTAINE, K. R. et al. Years of life lost due to obesity. **JAMA**, v. 289, n. 2, p. 187-93, Jan 08 2003. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517229> >.

GOMES, J. R.; FREITAS, J. R.; GRASSIOLLI, S. Effects of Physical Exercise on the Intestinal Mucosa of Rats Submitted to a Hypothalamic Obesity Condition. **Anat Rec (Hoboken)**, v. 299, n. 10, p. 1389-96, Oct 2016. ISSN 1932-8494 (Electronic) 1932-8486 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27488821> >.

GRAY, H.; CARTER, H. V. Anatomia - A base anatômica da prática clínica. In: STANDRING, S. (Ed.). **Anatomia - A base anatômica da prática clínica**. 40. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. cap. 21, p.316-318.

GU, C. et al. Triptolide Reduces the Required Dose of Tacrolimus by Attenuating Inflammation, Enhancing Immunosuppression, and Increasing Donor Chimerism in a Heterotopic Hindlimb Transplantation Model. **Plast Reconstr Surg**, v. 138, n. 6, p. 1243-1253, Dec 2016. ISSN 1529-4242 (Electronic) 0032-1052 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27879593> >.

HALLORAN, P. F. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. **N Engl J Med**, v. 351, n. 26, p. 2715-29, Dec 23 2004. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616206> >.

HARA, Y. et al. Prevalence and risk factors of obesity, hypertension, dyslipidemia and diabetes mellitus before and after adult living donor liver transplantation. **Hepatol Res**, v. 45, n. 7, p. 764-70, Jul 2015. ISSN 1386-6346 (Print) 1386-6346 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25196899> >.

HINCHEY, J. et al. A reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. **N Engl J Med**, v. 334, n. 8, p. 494-500, Feb 22 1996. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8559202> >.

INTERNATIONAL SOCIETY FOR STEREOLOGY. 2017. Disponível em < http://www.stereologysociety.org/One_Stereology.html> Acesso em 24 maio 2017).

INUI, A.; MEGUID, M. M. Cachexia and obesity: two sides of one coin? **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 6, n. 4, p. 395-9, Jul 2003. ISSN 1363-1950 (Print) 1363-1950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12806212> >.

JIN, Y. J. et al. BDNF levels in adipose tissue and hypothalamus were reduced in mice with MSG-induced obesity. **Nutr Neurosci**, v. 18, n. 8, p. 376-82, 2015. ISSN 1476-8305 (Electronic) 1028-415X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26230366> >.

KALLURI, H. V.; HARDINGER, K. L. Current state of renal transplant immunosuppression: Present and future. **World J Transplant**, v. 2, n. 4, p. 51-68, Aug 24 2012. ISSN 2220-3230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24175197> >.

KAPLAN, L. M. Body weight regulation and obesity. **J Gastrointest Surg**, v. 7, n. 4, p. 443-51, May-Jun 2003. ISSN 1091-255X (Print) 1091-255X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763397> >.

KWUN, W. H. Tacrolimus related neurologic complication after pediatric kidney transplantation. **J Korean Surg Soc**, v. 81, n. 3, p. 225-8, Sep 2011. ISSN 2093-0488 (Electronic) 1226-0053 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22066126> >.

LARYEA, M. et al. Metabolic syndrome in liver transplant recipients: prevalence and association with major vascular events. **Liver Transpl**, v. 13, n. 8, p. 1109-14, Aug 2007. ISSN 1527-6465 (Print) 1527-6465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17663411> >.

LAVIANO, A.; MEGUID, M. M.; ROSSI-FANELLI, F. Improving food intake in anorectic cancer patients. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 6, n. 4, p. 421-6, Jul 2003. ISSN 1363-1950 (Print) 1363-1950 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12806216> >.

LOPEZ-VILELLA, R. et al. Incidence of development of obesity after heart transplantation according to the calcineurin inhibitor. **Transplant Proc**, v. 47, n. 1, p. 127-9, Jan-Feb 2015. ISSN 1873-2623 (Electronic) 0041-1345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25645789> >.

MAKARENKO, I. G.; MEGUID, M. M.; UGRUMOV, M. V. Distribution of serotonin 5-hydroxytryptamine 1B (5-HT_{1B}) receptors in the normal rat hypothalamus. **Neurosci Lett**, v. 328, n. 2, p. 155-9, Aug 09 2002. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12133578> >.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Fisiologia e fisiopatologia: estereologia do rim: determinação do V_v, N_v e volume médio do glomérulo. **J. Bras. Nefrol**, v. 22, p. 103-109, 2000. . **Stereological tools in biomedical research**. Rio de Janeiro: 2003.

MANSON, J. E.; BASSUK, S. S. Obesity in the United States: a fresh look at its high toll. **JAMA**, v. 289, n. 2, p. 229-30, Jan 08 2003. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517236> >.

MOK, C. C. et al. Tacrolimus versus mycophenolate mofetil for induction therapy of lupus nephritis: a randomised controlled trial and long-term follow-up. **Ann Rheum Dis**, v. 75, n. 1, p. 30-6, Jan 2016. ISSN 1468-2060 (Electronic) 0003-4967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550339> >.

MOKDAD, A. H. et al. The continuing epidemics of obesity and diabetes in the United States. **JAMA**, v. 286, n. 10, p. 1195-200, Sep 12 2001. ISSN 0098-7484 (Print) 0098-7484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559264> >.

MUKHERJEE, S.; MUKHERJEE, U. A comprehensive review of immunosuppression used for liver transplantation. **J Transplant**, v. 2009, p. 701464, 2009. ISSN 2090-0015 (Electronic) 2090-0007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20130772> >.

NAMAVAR, M. R. et al. Effects of high-fat diet on the numerical density and number of neuronal cells and the volume of the mouse hypothalamus: a stereological study. **Anat Cell Biol**, v. 45, n. 3, p. 178-84, Sep 2012. ISSN 2093-3673 (Electronic) 2093-3665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23094206> >.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. 2017. Disponível em < <https://www.niddk.nih.gov/health-information/health-statistics/overweight-obesity>>. Acesso em 27 maio 2017.

NEAL, D. A. et al. Beneficial effects of converting liver transplant recipients from cyclosporine to tacrolimus on blood pressure, serum lipids, and weight. **Liver Transpl**, v. 7, n. 6, p. 533-9, Jun 2001. ISSN 1527-6465 (Print) 1527-6465 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11443583> >.

OLIVEIRA, B. A. C. **Implicações Do Modelo Da Programação Metabólica Sobre A Citoarquitetura Hipotalâmica E Parâmetros De Obesidade. Como A Suplementação Com Óleo De Peixe Pode Influenciar Neste Cenário?** 2017. (Dissertação de Mestrado). PPG- Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná

OLIVEIRA, C. P.; STEFANO, J. T.; ALVARES-DA-SILVA, M. R. Cardiovascular risk, atherosclerosis and metabolic syndrome after liver transplantation: a mini review. **Expert Rev Gastroenterol Hepatol**, v. 7, n. 4, p. 361-4, May 2013. ISSN 1747-4132 (Electronic) 1747-4124 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23639094> >.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. 2015. Disponível em: < http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4997:relatorio-da-comissao-pelo-fim-da-obesidade-infantil-busca-reverter-aumento-de-sobrepeso-e-obesidade&Itemid=820> Acesso em 28 maio 2017.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA / ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. 2017. Disponível em: < http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5331:fao-opas-

sobrepeso-afeta-quase-metade-da-populacao-de-todos-os-paises-da-america-latina-e-caribe&Itemid=820>. Acesso em 28 maio 2017.

PALMER, M.; SCHAFFNER, F.; THUNG, S. N. Excessive weight gain after liver transplantation. **Transplantation**, v. 51, n. 4, p. 797-800, Apr 1991. ISSN 0041-1337 (Print) 0041-1337 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2014532> >.

PAXINOS, G., WATSON, C. **The Rat Brain** - in stereotaxic coordinates. 5. ed. Elsevier. (CD-ROM).

PERITO, E. R.; LUSTIG, R. H.; ROSENTHAL, P. Metabolic Syndrome Components After Pediatric Liver Transplantation: Prevalence and the Impact of Obesity and Immunosuppression. **Am J Transplant**, v. 16, n. 6, p. 1909-16, Jun 2016. ISSN 1600-6143 (Electronic) 1600-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26751054> >.

PFITZMANN, R. et al. Long-term results after liver transplantation. **Transpl Int**, v. 21, n. 3, p. 234-46, Mar 2008. ISSN 0934-0874 (Print) 0934-0874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18031464> >.

PLAGEMANN, A. et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergetic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Res**, v. 836, n. 1-2, p. 146-55, Jul 31 1999. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10415413> >.

RICHARDS, J. et al. Weight gain and obesity after liver transplantation. **Transpl Int**, v. 18, n. 4, p. 461-6, Apr 2005. ISSN 0934-0874 (Print) 0934-0874 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15773968> >.

ROJAS-CASTANEDA, J. C. et al. Neonatal exposure to monosodium glutamate induces morphological alterations in suprachiasmatic nucleus of adult rat. **Int J Exp Pathol**, v. 97, n. 1, p. 18-26, Feb 2016. ISSN 1365-2613 (Electronic) 0959-9673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26799547> >.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v. 96, n. 1, p. 23-43, Oct 2002. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12441176> >.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-71, Apr 06 2000. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766253> >.

SPIEKER, E. A.; PYZOCHA, N. Economic Impact of Obesity. **Prim Care**, v. 43, n. 1, p. 83-95, viii-ix, Mar 2016. ISSN 1558-299X (Electronic) 0095-4543 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26896202> >.

STEGALL, M. D. et al. Metabolic complications after liver transplantation. Diabetes, hypercholesterolemia, hypertension, and obesity. **Transplantation**, v. 60, n. 9, p. 1057-60, Nov 15 1995. ISSN 0041-1337 (Print)

0041-1337 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7491685> >.

STEVENS, J.; TRUESDALE, K. P. Epidemiology and consequences of obesity. **J Gastrointest Surg**, v. 7, n. 4, p. 438-42, May-Jun 2003. ISSN 1091-255X (Print) 1091-255X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12763396> >.

TRAN, M. H. et al. Kidney transplantation in obese patients. **World J Transplant**, v. 6, n. 1, p. 135-43, Mar 24 2016. ISSN 2220-3230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27011911> >.

WALLOE, S.; PAKKENBERG, B.; FABRICIUS, K. Stereological estimation of total cell numbers in the human cerebral and cerebellar cortex. **Front Hum Neurosci**, v. 8, p. 508, 2014. ISSN 1662-5161 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25076882> >.

WATT, K. D. et al. Survival after liver transplantation for hepatitis C is unchanged over two decades in Canada. **Can J Gastroenterol**, v. 22, n. 2, p. 153-4, Feb 2008. ISSN 0835-7900 (Print) 0835-7900 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18299733> >.

WATT, K. D.; CHARLTON, M. R. Metabolic syndrome and liver transplantation: a review and guide to management. **J Hepatol**, v. 53, n. 1, p. 199-206, Jul 2010. ISSN 1600-0641 (Electronic) 0168-8278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20451282> >.

WOLF, A. M.; COLDITZ, G. A. Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. **Obes Res**, v. 6, n. 2, p. 97-106, Mar 1998. ISSN 1071-7323 (Print) 1071-7323 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545015> >.

ZELEZNA, B. et al. Anorexigenic effect of cholecystokinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. **Physiol Res**, v. 58, n. 5, p. 717-23, 2009. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19093718> >.

ANEXO



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 752

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

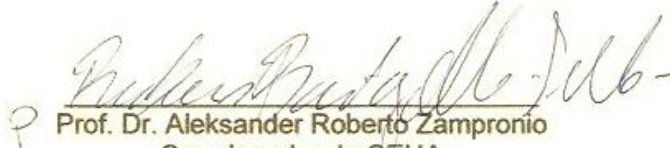
PROCESSO: 23075.049881/2013-11

APROVADO: 19/12/2013 – R.O. 11/2013

TÍTULO: Avaliação da espermatogênese em ratos submetidos à imunossupressão

AUTORES: Rogerio de Fraga, Marcelo Alves Aranha

DEPARTAMENTO: Anatomia


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA