

Daniele Braz Torres

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DA
ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO DA
ESTRIA TERMINAL DE RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS À
RESTRIÇÃO PROTÉICA GESTACIONAL**

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E DA ESTRUTURA
TRIDIMENSIONAL DE NEURÔNIOS DO NÚCLEO DA ESTRIA TERMINAL DE
RATOS MACHOS ADULTOS EXPOSTOS À RESTRIÇÃO PROTÉICA
GESTACIONAL**

Daniele Braz Torres

Dissertação apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Ciência Médicas da UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Médica, área de concentração: Biologia estrutural, celular, molecular e do desenvolvimento. Sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Aline Boer e Co-orientação do Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

T636a Torres, Daniele Braz, 1980 -
Avaliação de parâmetros comportamentais e da
estrutura tridimensional de neurônios do núcleo da estria
terminal de ratos machos adultos expostos à restrição
protéica gestacional / Daniele Braz Torres. – Campinas,
SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Patrícia Aline Boer.
Coorientador : José Antonio Rocha Gontijo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glicocorticoides. 2. Ansiedade. 3.
Desenvolvimento fetal. I. Boer, Patrícia Aline. II.
Gontijo, José Antonio Rocha. III. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Gestational protein restriction triggers hiperanxiety in adulthood due to changes in the bed nucleus of stria the terminalis (BNST).

Palavras-chave em inglês:

Glucocorticoids

Anxiety

Fetal development

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Banca examinadora:

Patrícia Aline Boer [Orientador]

Wellerson Rodrigo Scarano

Claudia Vianna Maurer Morelli

Data da defesa: 27-01-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca examinadora de Tese de Mestrado

Daniele Braz Torres

Orientador(a): Prof. Dr. Patricia Aline Boer

Membros:
Professor (a) Doutor (a) Wellerson Rodrigo Scarano
Professor (a) Doutor (a) Claudia Vianna Maurer Morelli
Professor (a) Doutor (a) Patricia Aline Boer

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/01/2012

*Dedico este trabalho ao meu porto
seguro, os meus pais Xavier e Dirce, aos
meus irmãos Juliano e Letícia e a minha
irmã que a vida me deu de presente,
minha cunhada Daniele.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar pela oportunidade e por ter realizados verdadeiros milagres em minha vida durante este trabalho.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Patrícia Aline Boer e ao meu Co-Orientador Prof. Dr. Gontijo que mesmo sem me conhecerem me concederam esta oportunidade de trabalhar em sua equipe, agradeço pela confiança e carinho de sempre. Agradeço sempre pela chance que vocês me deram de através do nosso trabalho viajar e conhecer outras culturas, estas foram experiências para uma vida toda.

Agradeço muito à Profa. Dra. Francis que me deu força e me trouxe até esta oportunidade.

Ao Prof. Godinho que sempre colaborou de todas as formas que pode para este trabalho se tornar viável. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas. Obrigada de coração por acreditar sempre nesta idéia.

A todos os funcionários da Unesp e da Unicamp que de forma direta ou indireta colaboraram comigo. Às secretárias Luciana, Salete e Regina, sempre dispostas a tirar minhas dúvidas. Aos técnicos Ricardo e José Eduardo pela ajuda de sempre. De forma especial à Dona Têra, fazer este trabalho sem seus cafés teria sido bem mais difícil!

A toda a equipe de alunos do Laboratório Hidro Salino da Unicamp, minha gratidão e meu carinho.

A todos os amigos que eu pude fazer neste tempo no Departamento de Morfologia da Unesp de Botucatu, alguns que levo pra vida toda com certeza, Flávia e Kelly pelo teto quando chegue aqui, Sinho, Glaurinha, Danilo, Robson, Carlinha e André, Thiago e Brunno, enfim são muitos os parceiros, desculpe não citar todos, são muitos!

A toda Família Mesquita que sempre me recebeu com tanta alegria em sua casa. Tenho um orgulho danado ter feito esta amizade com vocês, são especiais para mim.

À Capes e à Fapesp pelo suporte financeiro a este trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, Carla, Bárbara, Samuel, Carolina, Letícia, Leandro, Louise, Selma e Margarete pela ajuda, pelo companheirismo, pelos momentos de descontração, pela torcida nos momentos de desespero.

De forma muito especial à Agnes minha amiga, companheira sempre comigo em todos os momentos, ter conhecido esta pessoa incrível foi um presente de Deus. Trabalhar com cada um de vocês foi uma honra, aprendi muito.

À equipe da Universidade do Minho, que de parceiros de trabalhos e tornaram amigos especiais.

Aos animas que apesar da falta de escolha, contribuíram com sua vida para que este trabalho fosse possível.

Ao meu namorado Luciano, que mesmo tão distante esta sempre comigo.

E por fim a minha família que de forma incondicional me apoio nesta jornada, mesmo com a distância, estão sempre presentes na minha vida. Ao meu padrinho (“in memorian”) que se orgulhava de mim. Amo muito vocês!

Resumo



Em países desenvolvidos e em desenvolvimento a desnutrição materno-infantil tem repercussões evidentes sobre a saúde de populações. Isto se deve a alterações no desenvolvimento ontogênico, vinculada à manifestação programada de alterações no desenvolvimento morfológico e funcional de órgãos e sistemas. A programação fetal por desnutrição ou restrição protéica, leva à exposição fetal aumentada aos glicocorticóides maternos e altera a função pós-natal do eixo hipocampo-hipotálamo-pituitária-adrenal podendo ocasionar, no adulto, exposição aumentada cronicamente a glicocorticóides (GC) ou exacerbação na resposta ao estresse. O núcleo da estria terminal (BNST) está localizado em uma posição chave para regular a resposta ao estresse e tem sido implicado no comportamento de ansiedade. Evidências sugerem que esta região cerebral é altamente plástica em termos da morfologia e química neuronal frente a estímulos deletérios. Neste trabalho nós caracterizamos o BNST de ratos adultos submetidos à restrição protéica *in útero* pela análise da morfologia dendrítica através do Golgi-cox, da expressão da 11 β HSD₂, de receptores AT₁ (de angiotensina II), 5 HT_{1A}, 5 HT_{2A} (de 5 HT), MR (de mineralocorticóide) e GR (de glicocorticóide). Adicionalmente, estudamos parâmetros comportamentais nestes animais. Nossos resultados mostraram que a restrição protéica gestacional provocou redução no comprimento e na arborização dendrítica de neurônios do BNST paralelamente ao aumento na expressão de receptores envolvidos na ansiogênese e redução na expressão daqueles envolvidos no comportamento ansiolítico. Adicionalmente, o estudo comportamental no labirinto em cruz elevado revelou aumento no comportamento de ansiedade. Nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que a restrição protéica gestacional produz alterações morfológicas e neuroquímicas no BNST que podem estar envolvidas no aumento da ansiedade na prole.

Palavras chave: ansiedade, desenvolvimento fetal, glicocorticóides

Abstract



In developed and developing countries maternal and child malnutrition has obvious repercussions on the population health. This is due to changes in ontogenetic development, linked to the manifestation of programmed changes in morphological and functional development of organs and systems. The fetal programming by malnutrition or protein deficiency leads to increased fetal exposure to maternal glucocorticoids and alters the function of postnatal hippocampal-hypothalamic-pituitary-adrenal axis that may result in chronically increased exposure to glucocorticoids (GC) or exacerbated stress response in adults. The BNST is located in a key position to regulate stress response and has been implicated in anxiety behavior. Evidence suggests that this brain region is highly plastic and responsive to deleterious stimuli in terms of neuronal morphology. In this work we characterized adult rats submitted to *in utero* protein restriction in by BNST morphology and 11 β HSD₂, AT₁ (angiotensin II receptor), 5 HT_{1A}, 5 HT_{2A} (5 HT receptors), MR (mineralocorticoid receptor) e GR (glucocorticoid receptor) expression. Additionally, we investigated behavior parameters in these animals. Our results show that LP offspring presented significant reduction in dendritic tree length in BNST neurons in parallel to the rise in the expression of anxiogenic receptors and reduction in anxiolytic. Additionally, the elevated plus maze analyze showed elevated anxiety-like behavior. Our results demonstrate for the first time that gestational protein restriction can induce significant morphological and neurochemical changes in the BNST that can be related to an anxious behavior in the progeny.

Key Words: anxiety, fetal programming, glucocorticoids

- ACTH-** Hormônio adrenocorticotrófico
- AT1R-** Receptor de angiotensina tipo 1
- BNST-** Núcleo da Estria Terminal
- BNSTL -** Divisão lateral do BNST
- BNSTM -** Divisão medial do BNST
- BLA-** Núcleo basolateral da amígdala
- BDA-** Traçado anterógrado biotinilada amino-dextrano
- BLAp-** Núcleo basolateral da amígdala posterior
- BHT-** Butil hidroxitolueno
- BNSTdl-** Núcleo da estria terminal dorsolateral
- BNSTdm-** Núcleo da estria terminal dorsomedial
- CeL-** Núcleo central da amígdala lateral
- CV-** Coeficiente de variação
- CRF-** Hormônio liberador de corticotrofina
- CEMIB-** Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas
- COBEA-** Princípios Éticos na Experimentação animal adotado pelo colégio brasileiro de experimentação animal
- CeA-** Núcleo central da amígdala
- CeM-** Núcleo central da amígdala medial
- CEEA-** Comissão de ética na experimentação animal
- CEATOX-** Centro de Assistência Toxicológica
- DAG-** Distância ano-genital
- DEX-** Dexametasona
- DOHaD-** Origem desenvolvimentista da saúde e da doença
- GC-** Glicocorticóides
- GR-** Receptores de glicocorticóides
- HPHA-** Eixo hipocampo-hipotálamo-pituitária-adrenal
- LP-** Low protein
- LCE-** Labirinto em cruz elevado

MR- Receptores de mineralocorticóides
Mea- Amígdala medial
NP- Normal protein
OP- Teste do Campo Aberto
Ov- Núcleo oval
PVN- Núcleo paraventricular
RAS- Sistema renina angiotensina
RIA- Radioimunoensaio
Mea- Amígdala medial
SNC- Sistema nervoso central
VTA- Núcleo ventral tegmentar
5HT- Serotonina
11 β HSD₂- 11 beta-hidroxiesteróide- desidrogenase tipo 2

Figura 1	Representação esquemática do eixo HHPA.....	41
Figura 2	Fotomicrografia de uma secção horizontal de cérebro de rato.....	42
Figura 3	Esquema das vias do estresse	44
Figura 4	Esquema das vias interativas e áreas de extensão da amígdala.....	45
Figura 5	Peso ao nascer dos machos.....	71
Figura 6	Peso semanal.....	72
Figura 7	Peso do cérebro.....	72
Figura 8	LCE Braço aberto.....	73
Figura 9	LCE Braço aberto/total.....	74
Figura 10	LCE Braço fechado.....	74
Figura 11	Número de entradas braço aberto.....	75
Figura 12	Número de entradas braço fechado.....	75
Figura 13	<i>Hole Board</i> coordenação.....	76
Figura 14	<i>Hole Board</i> exploração.....	76
Figura 15	<i>Open Field</i> / levantamento.....	77
Figura 16	<i>Open Field</i> / locomoção	78
Figura 17	<i>Open Field</i> / cruzamento	78
Figura 18	<i>Open Field</i> / congelamento	79
Figura 19	<i>Open Field</i> / limpeza	79
Figura 20	Comprimento dos neurônios do BNST.....	80
Figura 21	Análise de sholl	81
Figura 22	Western Blotting 5HT _{1A}	82
Figura 23	Western Blotting 5HT ₂	82
Figura 24	Western Blotting GR.....	83
Figura 25	Western Blotting MR	83
Figura 26	Western Blotting 11βHSD ₂	84
Figura 27	Western Blotting AT1.....	84
Figura 28	Western Blotting CRF ₁	85

Figura 29 Western Blotting CRF.....	85
Figura 30 Níveis basais de corticosterona.....	86
Figura 31 Sumarização dos resultados obtidos por Western Blotting	97

Foto 1 Geral	57
Foto 2 Campo aberto	58
Foto 3 Campo aberto	59
Foto 4 Labirinto em Cruz Elevado	60
Foto 5 Labirinto em Cruz Elevado	60
Foto 6 Labirinto em Cruz Elevado	61
Foto 7 <i>Hole Board</i>	62
Foto 8 <i>Hole Board</i>	62
Foto 9 Vibrótomo	64
Foto 10 Lâminas	64
Foto 11 Aspecto de neurônio do BNST	65
Foto 12 Neurônio reconstruído em 3D	66

Resumo	viii
Abstract	xvii
1-Introdução	35
1.1 Eixo HPA e estresse	40
1.2 O conceito de amígdala estendida.....	42
1.3 Amígdala e BNST como mediadores da resposta ao estresse.....	43
1.4 Mediadores ansiolíticos e ansiogênicos presentes no BNST.....	47
2- Justificativas e Objetivos.....	49
3- Metodologia	53
3.1 Animais	55
3.2 Estudo Comportamental	57
3.2.1 Teste do Campo Aberto (<i>Open Field</i>)	57
3.2.2 Labirinto em cruz elevado (<i>Elevated Plus Maze</i>)	59
3.2.3 <i>Hole Board</i>	61
3.3 Corticosterona sérica	63
3.4 Golgi-Cox	63
3.5 Análise Dendrítica	65
3.6 Western Blotting	66
3.7 Apresentação dos dados e análise estatística.....	67
4- Resultados	69
4.1 Peso ao nascer/ semanal/ cérebro.....	71
4.2 Perfil comportamental	73

4.2.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	73
4.2.2 <i>Hole Bord</i>	76
4.2.3 <i>Open Field</i>	77
4.3 Golgi-cox	80
4.4 Análise de Sholl	81
4.5 Western Blotting	82
 5- Discussão	 88
 6- Conclusão	 99
 7-Referências Bibliográficas	 104
 8- Apêndices	 120

1.Introdução



Nos últimos anos, um conjunto crescente de evidências tem sustentado a hipótese de que distúrbios ocorridos em períodos críticos do desenvolvimento fetal podem determinar alterações permanentes ou a longo prazo na fisiologia ou morfologia de um determinado órgão (Ashton, 2000). O conceito de “programação fetal” sugere que o feto possa ser programado durante o desenvolvimento intra-uterino para desenvolver doenças na idade adulta. A desnutrição pré-natal é o modelo mais extensamente estudado de programação fetal e tem sido utilizado como uma das chaves para entender a origem de doenças relacionadas à hipertensão arterial (Langley-Evans, 1997; Edwards et al., 2001). De acordo com essa teoria, restrições no estado nutricional perinatal das mães provocam restrições no peso ao nascer. A elevada exposição à glicocorticoesteróides seria a base para o desenvolvimento da elevação da pressão sanguínea durante a infância, adolescência e/ou na idade adulta (Barker et al., 1989; Law et al., 1991; Williams et al., 1992; Seckl, 1998).

O primeiro relato da associação entre eventos precoces da vida e o desenvolvimento posterior de doença cardiovascular foi feito por Forsdahl (1967). Na população estudada, a mortalidade por doença cardiovascular e cerebrovascular estava correlacionada às taxas de mortalidade infantil na mesma população. Em seguida, investigações epidemiológicas demonstraram correlação entre a pressão sanguínea materna e de sua prole, sugerindo ser este um fator determinante. Vários modelos de subnutrição fetal foram desenvolvidos, nos quais o baixo peso da prole ao nascer era associado à elevação pressórica na idade adulta (Persson e Jansson, 1992; Woodall et al, 1996; Prentice 1991; Godfrey et al., 1996). Posteriormente, Barker (1995; 1997; 1998) mostrou a associação entre o peso ao nascer e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares no adulto, sugerindo a partir desta associação, a hipótese de que o retardo do crescimento fetal aumenta o risco de desenvolver doenças cardiovasculares na fase adulta.

As maiores evidências acerca das influências fetais na programação de doenças cardiovasculares bem como sobre a pressão arterial, surgiu a partir de trabalhos que empregaram métodos de manipulação de dietas maternas em ratos durante a gestação, como meio de induzir restrição protéica. Neste caso as

alterações nas dietas funcionam como estresse nutricional. Variações no conteúdo de proteína nestas dietas foram planejadas para produzir restrição leve (12% de caseína), moderada (9%) e severa (6%) (Langley-Evans, 1996).

Esses experimentos resultaram em alterações variáveis no peso dos recém-natos e no tamanho das placentas. Os animais submetidos a restrição desenvolveram hipertensão arterial a partir da quarta semana de vida a qual foi mantida até a idade adulta (Langley-Evans, 1994; 1995). Recentemente, estudos em nosso laboratório confirmaram que a restrição protéica, durante toda a gestação em ratas, causa elevação pressórica na prole adulta e que esta hipertensão arterial induzida é pelo menos em parte, decorrente da redução no número de glomérulos associada à expressiva retenção tubular renal de sódio e água (Mesquita et. al., 2010a; 2010b). A restrição protéica materna anterior à gestação não modificou os resultados e mesmo períodos curtos (1 semana) de restrição protéica gestacional foram suficientes para induzir alterações na pressão arterial (Langley-Evans, 1996).

O principal fator envolvido na gênese da programação fetal é a diminuição na concentração e atividade da 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD₂) placentária (Benediktsson et al., 1993; Stewart et al., 1995; Langley-Evans et al., 1996; Langley-Evans, 1997). A diminuição na 11 β -HSD₂ placentária devido à restrição protéica produz aumento da exposição fetal a corticosteróides endógenos maternos (Langley-Evans et al., 1996).

O cérebro é extremamente sensível à programação pré-natal. Diversos agentes como fatores de crescimento, de transcrição e nutrientes podem afetar permanentemente o desenvolvimento neural (Welberg e Seckl, 2001). Particularmente os esteróides têm propriedades poderosas na programação neural (Matsumoto e Arai, 1997).

O fato da resposta ao estresse ocasionar liberação de grande quantidade de corticóides sugere que este esteróide é um candidato como fator programador no paradigma do estresse pré-natal (Welberg e Seckl, 2001)

Diversos trabalhos sugerem que o baixo peso ao nascimento pode ser um fator de risco para desordens psicopatológicas relacionadas ao desenvolvimento

neural, tais como o autismo (Burd et al., 1999) depressão na idade adulta e suicídio (Barker et al., 1995). Welberg e Seckl (2001) demonstraram que nesta última situação o baixo peso ao nascimento não é um fator crucial *per se*, servindo, provavelmente, como um marcador para estes efeitos.

Em ratos, existem evidências de que a função pós-natal do eixo hipocampo-hipotálamo-pituitária-adrenal (HHPA) pode ser alterada por eventos pré-natais. Tais alterações podem ocasionar, no adulto, exposição cronicamente aumentada a glicocorticóides (GC) bem como resposta exacerbada a estímulos estressantes. Essas alterações são geralmente atribuídas a modificações na capacidade de retroalimentação hipotálamo-hipofisária de esteróides, decorrente de um *downregulation* de receptores condicionado por alterações na expressão de genes reguladores para receptores de GC (incluindo receptores glicocorticóides (GR) e mineralocorticóide (MR) no hipocampo). Paralelamente, ocorrem alterações em neurotransmissores em várias outras regiões do encéfalo (para revisão ver Welberg e Seckl, 2001).

Alterações na expressão destes receptores podem levar, em longo prazo, à disfunção na regulação da concentração plasmática de adrenocorticotrofina (ACTH) e de GC. Em fetos de porco, foi determinada a presença de RNAm para GR por todo o cérebro, sendo a maior concentração encontrada nos núcleos paraventriculares (PVN) hipotalâmicos. Já o RNAm para MR está presente exclusivamente no sistema límbico (hipocampo, amígdala, e giro dentado) ocorrendo maior concentração no hipocampo (Lingas, et al., 1999). Estes autores demonstraram, em porcos, que a restrição nutricional materna altera a expressão destes receptores em períodos gestacionais relacionados ao maior desenvolvimento neural. Já em ratos, do 5º ao 8º dia de vida ocorre extensa maturação neuroendócrina com rápida expressão de MR e GR (Dobbing e Sands, 1979).

Como os sistemas de neurotransmissores e GC neurais interagem para modular tanto o comportamento quanto a atividade do eixo HHPA (McEwen, 1987) é possível que os efeitos do estresse pré-natal sejam mediados por alterações permanentes nestes sistemas (Welberg e Seckl, 2001).

O comportamento de ansiedade é mediado pela amígdala, provavelmente via hormônio liberador de corticotrofina (CRF) (Schulkin et al., 1994) cuja transcrição é facilitada pelos corticosteróides (Makino et al., 1994; Hsu et al., 1998; Hatalski et al., 1998). A prole de ratas submetidas à carboxolano (que inativa a 11β -HSD) apresenta expressão aumentada de GR na amígdala, podendo aumentar a sensibilidade a concentrações elevadas de corticosteróides (Welberg et al., 2000) induzindo aumento do CRF.

Devemos ainda considerar que a regulação do eixo HHPA pelo hipocampo e outras estruturas límbicas é mediada, em parte, por relés sinápticos no núcleo da estria terminal (BNST) (Cullinan et al., 1993; Feldman et al., 1990; Gray et al., 1993; Herman et al., 1994; Onaka e Yagi, 1998; Prewitt e Herman 1998; Zhu et al., 2001). O BNST está situado em uma posição chave para regular não somente o comportamento de ansiedade, mas também as respostas ao estresse implicadas em neuropatologias e distúrbios neuropsicológicos. Além disso, evidências sugerem que o BNST tem alta plasticidade podendo esta ser influenciada pelo estresse (Walker et al., 2003).

1.1 Eixo HHPA e estresse

A maioria dos estressores exercem seus efeitos no eixo HHPA, a via do estresse endócrino primário. O CRF é secretado a partir de uma sub-região do hipotálamo conhecida como núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) para estimular a produção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Após sua liberação pela hipófise anterior, o ACTH estimula a secreção de glicocorticóides supra-renais - cortisol em humanos e corticosterona nos animais - para a corrente sangüínea. Disfunções neste circuito periférico de estresse contribuem para vários eventos relacionados com doenças neuropsiquiátricas.

Quando somos confrontados com o perigo, o organismo ativa os circuitos de estresse no cérebro. Estes circuitos de estresse promovem a liberação de adrenalina e cortisol a partir da adrenal gerando a resposta de luta ou fuga. O

cortisol é importante para a atividade catabólica liberando energia armazenada. Entretanto altas concentrações de cortisol podem causar depressão, doença cardíaca, e aumento da susceptibilidade à infecção. Via corrente sanguínea o cortisol chega ao hipocampo onde se liga a GR emitindo sinais que desligam o circuito de estresse diminuindo a produção de cortisol. Ratos e humanos com maior quantidade de GR são mais sensíveis a variações na concentração de cortisol, e recuperam-se do estresse mais rapidamente (Jankard e Herman, 2008).

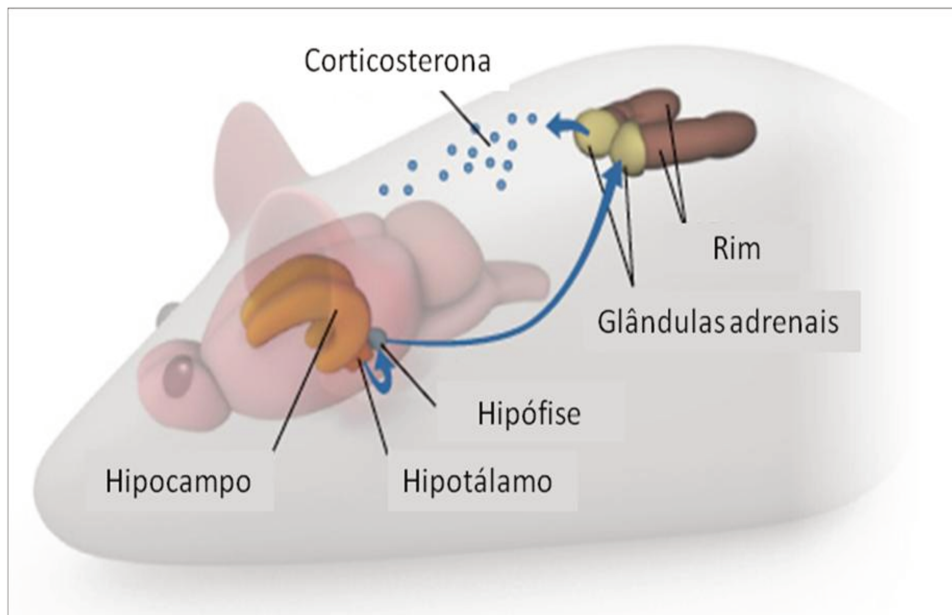


Figura 1: Representação esquemática do eixo HHPA. Os sinais de estresse partem do hipotálamo para a hipófise e, em seguida, para às glândulas supra-renais. As glândulas supra-renais liberam o hormônio corticosterona (e adrenalina, não mostrada). Quando as células do hipocampo detectam cortisol, que se liga ao receptor GR, eles mandam um sinal para que o hipotálamo desligue o circuito de estresse. (extraído e adaptado de <http://learn.genetics.utah.edu/content/epigenetics/rats/>).

1.2 O conceito de *amígdala estendida*

Baseando-se nas observações iniciais de Johnston (1923), o conceito de amígdala estendida foi desenvolvido e explorado em maiores detalhes por Alheid et al (1998) e Alheid and Heimer (1988). Eles demonstraram que os núcleos central (CeA) e medial (CeM) da amígdala e o núcleo da estria terminal (BNST) são conectados por colunas de células localizadas por toda a estria terminal, as fibras do trato que conecta estes núcleos da amígdala ao BNST e também na parte localizada ventralmente, do tronco cerebral basal. Eles também mostraram que o CeA emite projeções principalmente para a divisão lateral do BNST (BNSTL) e a amígdala medial (MeA) emite projeções principalmente para a divisão medial do BNST (BNSTM). Eles denominaram este processo contínuo de células de amígdala estendida. Além disso, o CeA e o BNSTL são muito similares anatomicamente em termos de “*inputs*”, “*outputs*”, tipos celulares, e conteúdo neuroquímico, especialmente, no que diz respeito aos elevados níveis de peptídeos encontrados em ambas as estruturas (Alheid et al, 1995). O núcleo basolateral da amígdala (BLA) também emite projeções não só para o CeA, mas também para o BNSTL, especialmente partindo da parte caudal do BLA (BLAC) (Dong et al, 2001; McDonald, 1991; Weller e Smith, 1982 (Figura 2).

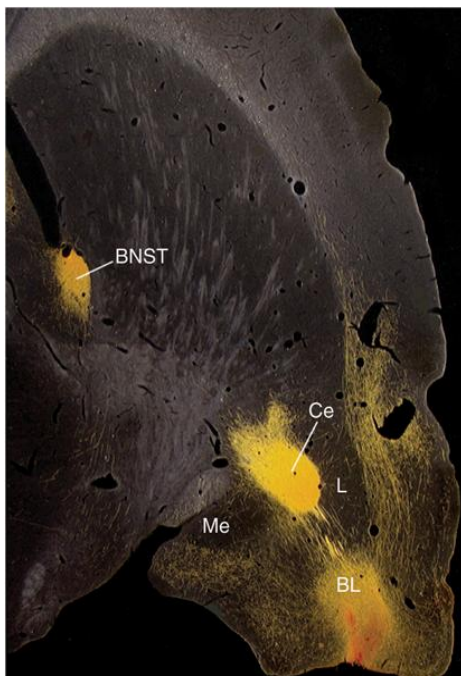


Figura 2: Fotomicrografia de uma seção horizontal de 30 µm do cérebro de rato. O corte foi obtido em um ângulo que permite a visualização da amígdala e do BNST no mesmo plano transversal. (extraído de Davis et al 2010).

1.3 Amígdala e BNST como mediadores da resposta ao estresse

O termo estresse tem diferentes significados na literatura científica mas geralmente é usado para designar alguma circunstância que represente ameaça à homeostase do organismo. Assim, mesmo os estímulos considerados positivos (como por exemplo o exercício) podem ser considerados estressores devido ao fato de alterarem o estado de “repouso” do organismo (revisto em Hammack et al 2010). A ameaça à homeostase produz respostas endócrinas, catabólicas, periféricas e autonômicas ao estresse através da ativação de neurônios PVN que contem o fator liberador de corticotrofina (CRF). Estas auxiliarão no sentido de prover o organismo com a energia requerida para abordar alterações homeostáticas e/ou modular as respostas estressoras após estas terem iniciado (Sapolsky et al. 2000; Ulrich-Lai e Herman 2009).

Duas áreas ricas em CRF que medeiam à resposta a estressores incluem o BNST e o CeA. Tem sido sugerido que a ativação do BNST ou do CeA coordena a rede de respostas comportamentais apropriadas para a luta frente às ameaças percebidas e, ao mesmo tempo, engajando sistemas catabólicos periféricos que suportem estas alterações comportamentais. Conseqüentemente, tanto o CeA quanto o BNST tem sido implicados na mediação da resposta ao estresse bem como tem sido considerados críticos para o comportamento afetivo (medo e ansiedade) (Walker et al., 2003, 2009.)

Contrariamente ao CeA, que tem sido implicado na resposta de curta duração (fásica) e à ameaças previsíveis, o BNST tem sido sugerido como o mediador da resposta de longo prazo (tônica) como a ansiedade, respondendo a ameaças potencializadas negativamente de longa duração, difusas e/ou imprevisíveis (Walker et al. 2003, 2009; Waddell et al. 2006; Walker e Davis 2008).

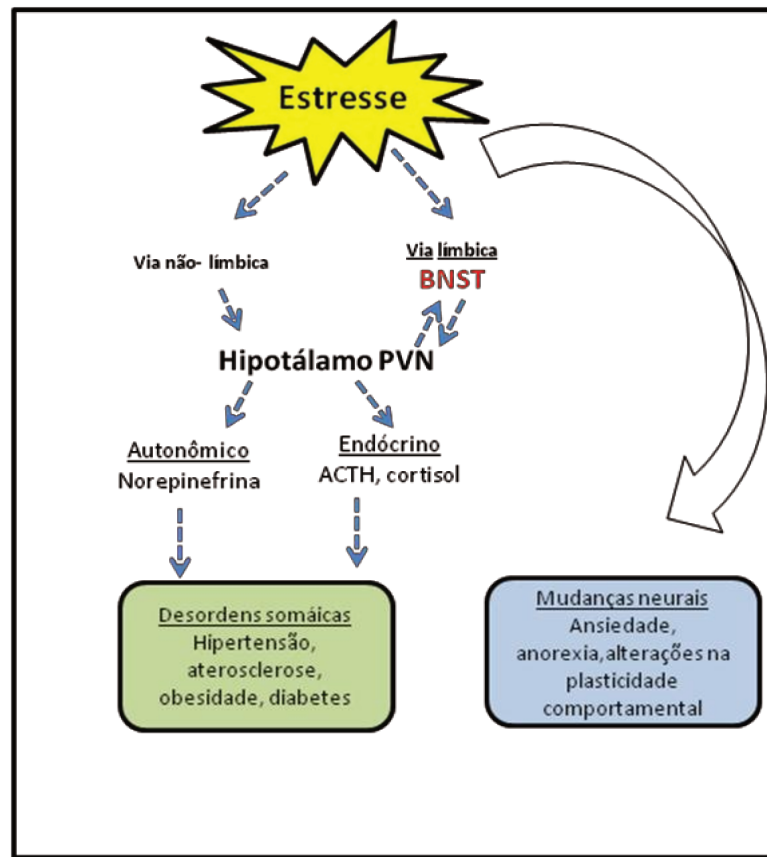


Figura 3: Esquema das vias do estresse. O estresse ativa tanto as vias límbicas quanto as não límbicas, as quais podem convergir para os núcleos paraventriculares (PVN) hipotalâmicos gerando respostas endócrinas e autonômicas. A ativação límbica do BNST mediada, direta ou indiretamente, pelo estresse via PVN contribui para o comportamento de ansiedade. O estresse crônico pode acarretar alterações na neuroplasticidade levando, em longo prazo, à ansiedade e desordens somáticas. (Extraído e adaptado de Hammack S.E et al 2010)

Tipos específicos de estressores iniciam a ativação do PVN via diferentes regiões do cérebro. Estressores que requerem estruturas límbicas, ativam sistemas de resposta ao estresse via projeções para o PVN bem como através de projeções extra hipotalâmicas aos núcleos cerebrais associados a comportamentos de medo e ansiedade (Herman et al. 1996; Ulrich-Lai e Herman 2009; Figura 3).

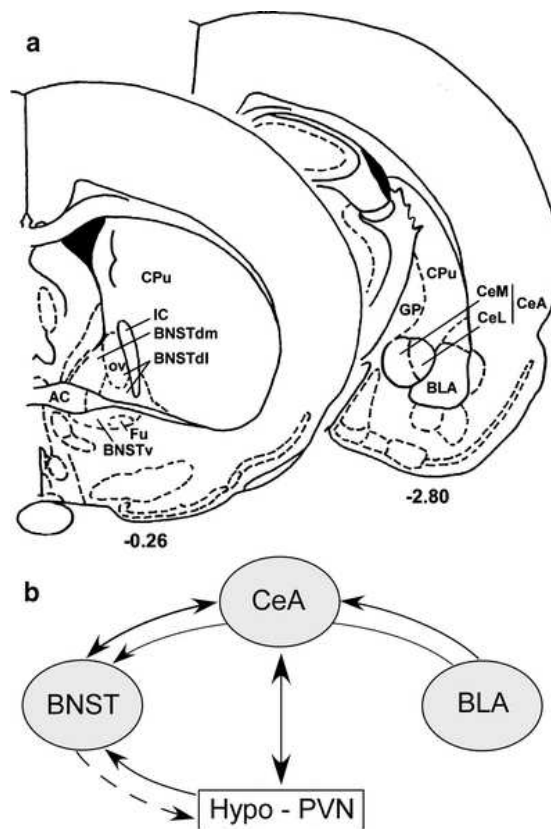


Figura 4: Esquema das vias interativas e áreas de extensão da amígdala. A. Seções coronais simplificadas de cérebro de rato ilustrando as áreas do BNST (bregma -0.26) e a amígdala (bregma -2.80). O núcleo oval (Ov) do BNST dorsolateral (BNSTdl) é ilustrado; O BNST anterolateral circunda o BNSTdl e pode incluir o BNST dorsomedial (BNSTdm). Similarmente os dois componentes maiores do núcleo central da amígdala (CeA) são as divisões medial (CeM) e lateral (CeL). **b.** O BNST e o CeA tem projeções recíprocas. O BLA projeta não somente para o CeA mas tem também fibras que o atravessam em direção ao BNST. As projeções recíprocas entre BNST e CeA são melhor descritas embora possam ser identificadas fibras diretas do PVN ao BNST. O BNST pode influenciar as funções hipotalâmicas por vias neurais diretas ou indiretas (seta pontilhada). (Extraído de Hammack S.E et al 2010)

Tem sido demonstrado que tanto a exposição crônica a estressores como tratamentos farmacológicos (ex: corticosterona) influenciam na plasticidade do BNST (revisto em Hammack et al 2010). Diversos estudos demonstram que a expressão de CRF no BNST foi aumentada após situação onde o indivíduo é subjugado socialmente por período prolongado (estresse social crônico) a estresse crônico moderado ou tratamento crônico com corticosterona (Makino et al. 1994; Watts e Sanchez-Watts 1995; Schulkin et al. 1998). Adicionalmente, tem sido demonstrado que esses tratamentos aumentam os sinais de neuroplasticidade no BNST; a exposição ao modelo de estresse crônico inesperado foi associada ao aumento no volume do BNST e no comprimento dos dendritos neuronais (Pego et al. 2008). A imobilização crônica aumentou o número de pontos de ramificações na arborização dendrítica de neurônios do BNST (Vyas et al. 2002, 2003). Enquanto, o modelo de estresse variado por uma semana aumentou o comprimento dendrítico de neurônios deste núcleo (May, Braas and Hammack, unpublished data).

Tem sido observadas correlações fisiológicas à neuroplasticidade do BNST já que a exposição crônica à drogas de abuso tem sido relacionadas ao aumento das correntes excitatórias pós sinápticas em núcleo ventral tegmentar (VTA) para neurônios do BNST, bem como aumento na expressão de transportadores de norepinefrina no BNST (Macey et al. 2003).

Elevações no CRF e na neuroplasticidade do BNST tem sido associadas ao aumento do comportamento de ansiedade e anhedonia (um sintoma de depressão, Stout et al., 2000). Conseqüentemente, a exposição crônica a estressores facilita a função do BNST mudando a neuroquímica, a morfologia e a fisiologia desta estrutura e estas alterações estão associadas ao aumento do medo e ansiedade.

Com base nestes dados o aumento na neuroplasticidade do BNST tem sido implicado como mediador das desordens de ansiedade em humanos onde a etiologia está associada à exposição crônica a estressores.

1.4 Mediadores ansiolíticos e ansiogênicos presentes no BNST

O CRF é conhecido por influenciar as respostas de ansiedade e o receptor CRF₁ pode ser particularmente importante neste sentido (Davis, 1992; Merali et al., 2004; Muller et al., 2003). Adicionalmente à liberação de CRF no sangue os neurônios do PVN apresentam projeções para outros locais do sistema nervoso central como BNST, CeA e VTA, resultando em uma variedade de respostas nestas regiões cerebrais (para revisão ver Corominas et al., 2010).

Em resposta ao estresse, o CRF regula a atividade do eixo HHPA e desencadeia mudanças em outros sistemas de neurotransmissores, tais como a serotonina (5-HT) (Millan, 2005; Holsboer, 2003; Nestler et al., 2002; Leonard, 2005; Holmes et al., 2003).

Um substancial corpo de evidências na literatura tem implicado o sistema 5-HT na modulação do comportamento de medo e ansiedade (Graeff et al., 1996; Handley et al., 1993; Handley, 1995; Lowry et al., 2005; 2008). Os receptores de 5-HT tem sido classificados em 7 famílias distintas (5-HT₁₋₇) que medeiam ações excitatórias e inibitórias quando ativados por 5-HT. Hammack et al., (2009) injetaram antagonistas seletivos do receptor 5-HT_{1A} no BNST e observaram aumento dose-dependente no comportamento de ansiedade, isto é, um comportamento ansiogênico. Estes mesmos autores verificaram que a ativação de 5-HT_{2A}, 5-HT_{2c} e ou 5-HT₇ é ansiogênica.

O sistema 5-HT é suscetível ao estresse e ao cortisol. O estresse agudo causa liberação de 5-HT pelas células do núcleo da rafe, mas estresse em longo prazo pode depletar estes estoques (Fontenot et al., 2005). Esta depleção pode ser permanente: em macacos que foram estressados por 14 meses e mantidos em recuperação por mais 14 meses as concentrações de 5-HT no córtex pré-frontal ventral nunca retornaram aos valores observados antes do estresse (Fontenot et al., 2005). O estresse pode afetar as células da rafe através dos receptores de glicocorticóides, os quais estão presentes em células serotoninérgicas (Laaris et al., 1995) e afetam o tipo e a quantidade de proteínas produzidas por estas células. No BNST GR (Kream et al., 1983) e MR (para revisão ver Gomez-

Sanchez, 2011) também estão implicados no comportamento ansiogênico e ansiolítico, respectivamente.

Outros receptores que tem sido implicados nos principais mecanismos controladores das respostas comportamentais e cognitivas ao estresse são os receptores de Angiotensina II (angio II) do tipo 1 (AT1). Saavedra et al (2006) testaram esta hipótese no labirinto em cruz elevado e verificaram que o tratamento com *Condesartam* levou ao aumento significativo do tempo de permanência dos animais nos braços abertos, indicando efeito ansiolítico claro deste antagonista de AT₁.

2. Justificativa e Objetivos



Tendo em vista a fundamentação apresentada anteriormente o desenvolvimento deste estudo se **JUSTIFICA** pela:

- Prevalente desnutrição materno-infantil, com evidentes repercussões sobre a saúde de populações e, a merecida preocupação para o desenvolvimento de políticas de saúde pública que minimizem os efeitos desta em países desenvolvidos e em desenvolvimento;
- Conhecida repercussão fetal da desnutrição materno-infantil em períodos críticos do desenvolvimento ontogênico, vinculada à manifestação programada de alterações no desenvolvimento morfológico e funcional de órgãos e sistemas;
- Programação fetal por restrição protéica alterando a função pós-natal do eixo HHPA podendo ocasionar, no adulto, exposição aumentada cronicamente a GC ou exacerbação na resposta ao estresse;
- Presença de 11β HSD₂, GR, MR, AT₁, 5HT_{1A} e 5HT_{2A}, CRF e CRF₁ no BNST que são ativados pelo estresse e contribuem para o controle neural da resposta endócrina e comportamental de adaptação ao estresse;
- Modulação via corticosteróides de alterações estruturais tanto no volume quanto na estrutura fina (por ex: número de sinapses e morfologia dendrítica) de estruturas cerebrais;
- Possível exposição crônica do BNST aos hormônios do estresse devido a programação fetal por restrição proteica podendo afetar sua neuroquímica, morfologia e fisiologia;
- Alta incidência de distúrbios de ansiedade.

Assim, foram **OBJETIVOS** do presente estudo estudar, em ratos adultos submetidos *in utero* à restrição protéica comparativamente aos seus controles:

- 1) parâmetros comportamentais;
- 2) corticosterona sérica diurna;
- 3) a morfologia da estrutura geral e dendrítica do BNST;
- 4) a expressão protéica de 11β HSD₂, GR, MR, AT₁, 5HT_{1A} e 5HT_{2A}, CRF e CRF₁ em BNST isolado.

3. Metodología



3.1 Animais

Ratos Wistar-Hannover machos n=20 e fêmeas n=40 provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, SP (CEMIB) foram utilizados para os estudos que aconteceram no Laboratório de Programação Fetal na Universidade Estadual Paulista Unesp, Campus de Botucatu.

Os experimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação animal adotado pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA) e foram aprovados pela comissão de ética na experimentação animal (CEEa) protocolo 29/08-CEEa da Universidade Estadual Paulista- Unesp, Campus de Botucatu.

Os animais permaneceram com água e ração padrão para roedores *ad libitum* da quarta semana de vida quando chegaram ao biotério até a confirmação da prenhez. Os mesmos foram mantidos no biotério com temperatura e umidade controlada, com sistema de luz 12h/12h.

Ao atingirem doze semanas, iniciaram-se os acasalamentos com 40 fêmeas e 20 machos. Ao final da tarde, dentro da caixa de cada macho foram colocadas as fêmeas, no dia seguinte às 07h00am foi realizado o lavado vaginal das fêmeas para detectar presença ou não de espermatozóide. As fêmeas, com prenhez confirmada foram separadas imediatamente de forma individual. A partir deste momento, as mesmas foram divididas em dois grupos com 20 fêmeas em cada grupo, sendo que um grupo recebeu ração normoproteica (17%) NP (normal protein) e outro ração hipoproteica (6%) LP (low protein). As dietas normoproteica e hipoproteica foram produzidas pela Pragsoluções biociências, compostas pelos seguintes itens: (quadro 1);

INGREDIENTES	PROTEINA NORMAL 17%	BAIXA PROTEÍNA 6%
Amido de milho	410,10g	484,80g
Caseína	188,90g	66,70g
Amido dextrinizado	130,50g	159,00g
Sacarose	100,00g	121,00g
Óleo de soja	70,00g	70,00g
Celulose microcristalina	50,00g	50,00g
Mix mineral AIN 93	35,00g	35,00g
Mix vit AIN 93	10,00g	10,00g
L cistina	3,0g	3,0g
Bitartarato de colina	2,5g	2,5g
BHT	0,014g	0,014g

Quadro 1: Formulação da ração utilizada (g/kg).

Portanto, foram ofertados 30 gramas de ração para evitar o risco de haver uma restrição de oferta da mesma. Durante toda prenhez foi verificado o peso dos animais assim como o consumo de ração para acompanhar a evolução de peso e a quantidade de ração consumida.

Ao nascimento, as dietas foram retiradas e retornou-se a dieta padrão para roedores e água *ad libitum*. Nesse momento também foi mensurada a distância ano-genital (DAG) para verificar o sexo e a pesagem dos filhotes. A prole composta por mais de oito animais foi reduzida imediatamente preservando-se sempre o maior número possível de machos. Quando os animais atingiram vinte e três dias realizou-se o desmame. Os machos de cada prole foram realocados para continuidade do estudo com 2 ou 3 animais por caixa. Todos os animais utilizados para o acasalamento bem como as fêmeas das proles foram sacrificados em câmara de CO₂.



Foto 1: Local onde os animais ficaram durante o período dos experimentos.

3.2 Estudo Comportamental

Todos os testes foram realizados no CEATOX da Universidade Júlio de Mesquita Filho - Botucatu (Unesp). Os mesmos foram realizados na 15ª semana de vida dos animais no período matutino sempre pelos mesmos avaliadores. Antes de cada sessão os animais eram mantidos por 1 hora na sala de testes do CEATOX para ambientação. Foi escolhido um filhote de cada prole (NP, n=13 e LP, n= 13) de forma aleatória para realização dos testes.

3.2.1 Teste do Campo Aberto (*Open Field*):

Trata-se de um aparelho construído conforme especificações modificadas por Broadhurst (1960). Esse aparelho é apropriado para demonstrar possíveis diferenças entre animais normais e animais com alterações no sistema nervoso central (SNC), em termos de suas habilidades para adquirir e utilizar informação espacial, bem como para habituação a um novo ambiente que estimula o medo e a emocionalidade. O campo aberto consiste de uma arena circular de

madeira, sendo o chão dividido por meio de círculos concêntricos e segmentos de reta em partes similares. A arena dista do chão tendo uma cortina na sua parte frontal aberta e na parte superior, quatro lâmpadas vermelhas de 40 Watts, os quais permitem ao observador ter uma visão global do animal e dificulta a este, a visão do experimentador.

Para a observação comportamental, os animais foram colocados no centro da arena e, durante 3 minutos, registrou-se: o número de vezes em que o animal adentrava com as quatro patas em uma das divisões da arena e o número de vezes em que cruzava o centro da arena (atividade locomotora); o número de vezes em que o animal ficava sobre as duas patas traseiras para explorar o ambiente (levantar); o tempo de auto-limpeza e o tempo em que permaneceu completamente imóvel (congelamento).

A elevação da taxa de ambulação e a exploração de setores mais centrais tendem a indicar uma condição de menor resposta emocional de medo; já o aumento do tempo de limpeza e o de congelamento reflete aumento de emocionalidade e medo (Trombini et al., 2001).

Ao final de cada sessão, o aparelho era limpo com álcool etílico 5% v/v, para retirar o cheiro do animal anterior.



Foto 2: Campo Aberto (*Open Field*) utilizado em nosso estudo.



Foto 3: Campo Aberto (*Open Field*) separado por círculos concêntricos e seguimentos de reta.

3.2.2 Labirinto em cruz elevado (*Elevated Plus Maze*):

O estado de ansiedade dos animais foi avaliado em labirinto em cruz elevado (LCE). Este teste comportamental foi descrito por Pellow & Chopin (1985), e convalidado por Pellow & File (1986), para o estudo de drogas ansiolíticas e ansiogênicas em ratos. Este teste fundamenta-se na aversão dos roedores a espaços abertos e altos, o que acarreta estimulação tanto dos centros do medo como da exploração, sendo interpretado como indutor da ansiedade.

O aparelho consiste em um labirinto em cruz, com dois braços fechados e dois braços abertos elevados do chão. Os animais foram colocados no espaço central do labirinto com a cabeça voltada para o espaço fechado e registrou-se o número de vezes e o tempo em segundos em que o animal entrava e permanecia nos braços abertos e fechados, a cada minuto, durante 5 minutos.

O índice de ansiedade corresponde à razão entre o número de entradas nos braços abertos e o número total de entradas. Este índice é diretamente proporcional ao efeito ansiolítico do animal (Trombini et al., 2001).

Ao final de cada sessão, o aparelho era limpo com álcool etílico 5% v/v, para retirar o cheiro do animal anterior.



Foto 4: Labirinto em Cruz Elevado utilizado em nosso experimento.



Foto 5: O animal era colocado sempre com a cabeça voltada para um dos braços fechados no Labirinto em Cruz Elevado.



Foto 6: Labirinto em Cruz Elevado com dois braços abertos e dois braços fechados distantes do chão.

3.2.3 *Hole board*

Este aparelho é construído de acordo com especificações propostas por Meyer e Caston (2005) e consiste numa caixa de fundo quadrado, com paredes elevadas e assoalho do fundo todo preenchido com orifícios eqüidistantes.

Para o teste, cada animal foi colocado no centro do assoalho do fundo da caixa e o tempo de observação foi de 5 minutos. Sendo avaliada a coordenação motora, pelo número de vezes que alguma das patas do animal for introduzida acidentalmente em um dos orifícios (*pawdip*) e a atividade exploratória, pelo número de vezes em que o animal enfiava a cabeça em um orifício (*headdip*).

Ao final de cada sessão, o aparelho era limpo com álcool etílico 5% v/v, para retirar o cheiro do animal anterior.



Foto 7: Aparelho de *Hole Board* utilizado em nosso experimento. Com assoalho distante do solo e paredes laterais elevadas.

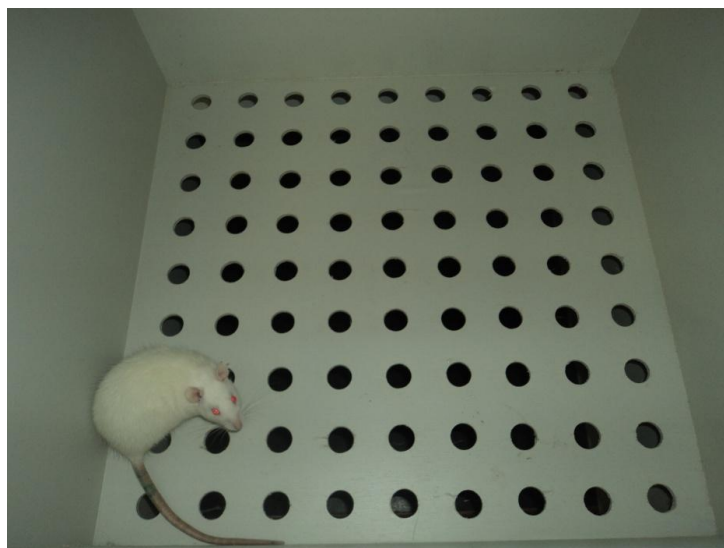


Foto 8: *Hole Board* com assoalho perfurado por orifícios equidistantes.

3.3 Corticosterona sérica

Amostras de sangue foram coletadas, em animais de 16 semanas, pela veia da cauda entre 8:00 e 8:30 horas da manhã. A dosagem foi feita pelo método de radioimunoensaio (RIA) usando um kit comercial (kit de Immnu Chem Rie). O coeficiente de variação (CV) do teste é de 7,5%. A sensibilidade analítica é de 5 ng / mL e da sensibilidade funcional é de 25 ng/ mL, com CV de precisão intermédia de 20%.

3.4 Golgi-Cox

Na 16ª semana de vida sob anestesia profunda com ketamina (75mg/kg) e xilasina (10mg/kg), os animais (NP, n=4 e LP, n=4) foram perfundidos com solução salina 0,9% e processados de acordo com o protocolo descrito por Gibb & Kolb (1998).

Os cérebros foram removidos e imersos em solução de Golgi-Cox (uma solução 1:1 de dicromato de potássio 5% e cloreto de mercúrio 5% diluído 4:10 com cromato de potássio 5% -Glaser e Van Der Loos 1981) durante 14 dias; os cérebros foram então transferidas para uma solução de sacarose 30% (mínimo 3 dias), antes de serem cortados em um vibrótomo. Secções coronais (200 µm de espessura) foram coletadas em lâminas. Posteriormente os cortes foram alcalinizados em amônia 18,7% em Dektol (Kodak), fixados em Kodak Rapid Fix (preparada conforme instruções da embalagem com omissão da solução B), desidratadas em serie etanólica crescente, diafanizadas em xilol e montadas



Foto 9: Aparelho de Vibrótomo utilizado para realizar os cortes coronais dos encéfalos.



Foto 10: Aspectos de um jogo de lâminas montados. Com suas identificações cobertas para que a reconstrução fosse realizada em ensaio “cego”.

3.5 Análise Dendrítica

A reconstrução foi realizada em quatro animais de cada grupo experimental, para cada animal, foram selecionados cinco neurônios da região do BNST totalizando quinze neurônios reconstruídos por animal.

Para cada neurônio selecionado (foto 12), todos os ramos da árvore dendrítica foram reconstruídos em ampliação de 600x usando um microscópio motorizado (Axioplan 2, Carl Zeiss, Alemanha), com objetivas de imersão, e ligado a uma câmera (DXC-390, Sony Corporation, Tóquio, Japão) e software Neurolucida (Microbrightfield, VT).

A análise tridimensional dos neurônios reconstruídos foi realizada utilizando software Neurolucida (Microbrightfield). Foram reconstruídos quarenta e sete neurônios dos animais do grupo NP, e quarenta e cinco neurônios do grupo LP, sendo uma média de onze neurônios reconstruídos por animal. Vários aspectos da morfologia dendrítica foram examinados. Para avaliar as mudanças globais, o comprimento total das árvores basal e apical e número de ramificações dendríticas basal e apical foram comparados entre os grupos, utilizando análise de variância one-way (ANOVA) (Uylings & Van Pelt 2002). Para avaliar as diferenças na organização dendrítica, uma versão em 3D da análise de Sholl (Sholl 1956; Uylings & Van Pelt 2002) foi realizada. Para isso, contamos o número de intersecções com os dendritos de esferas concêntricas posicionados em intervalos radiais de 10 μm e, além disso, foi mensurado o comprimento da árvore dendrítica localizada entre duas esferas consecutivas.

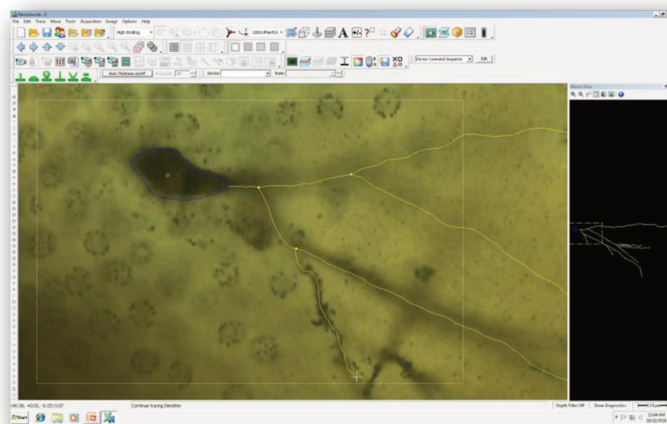


Foto 11: Aspecto de um neurônio do BNST observado em microscópio.

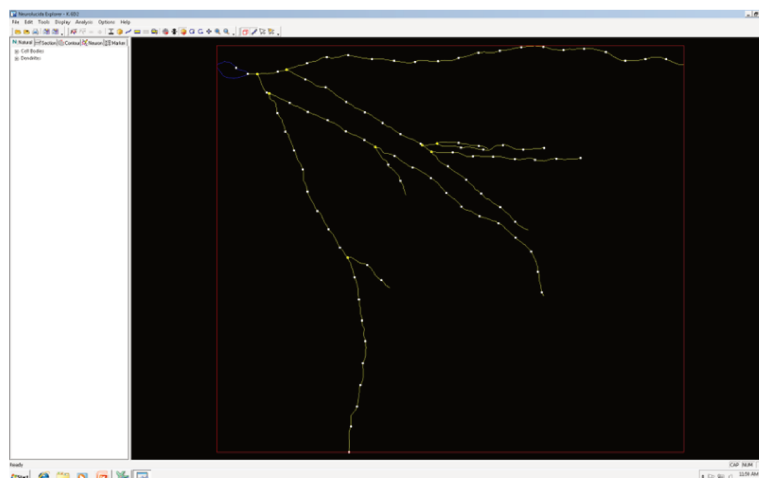


Foto 12: Aspecto da reconstrução em 3D vista no microscópio de um neurônio do BNST.

3.6 Western Blotting

Ao completarem 16 semanas os animais (NP, n=5 e LP n=5) foram sacrificados por decapitação e os cérebros foram removidos imediatamente e o BNST foi isolado. Os mesmos foram homogenizados em tampão de extração, contendo trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X-100 1% e 0,1 mg/mL de aprotinina. Após serem centrifugados e coletado o sobrenadante, a solução obtida foi conservada em freezer a -80°C.

Quantificação de proteínas:

As proteínas totais foram quantificadas utilizando-se o método de Bradford. O material homogenizado foi tratado com buffer Laemmli contendo 100 mmol/L de dithiothreitol (DTT), aquecido em banho a 100°C por 5 minutos e a quantidade correspondente a 100 microgramas de proteína foram aplicados em gel SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) em cuba vertical o qual foi colocado em aparelho de eletroforese Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad). A eletroforese das proteínas no gel foi feita a 120V. Depois da

separação eletroforética as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas a 4°C overnight com anticorpo primário. Os anticorpos utilizados foram AT₁ rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:200, GR rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:500, MCR rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:200, 11β-HSD₂ goat polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição 1:200, 5HT_{1A} goat polyclonal IgG (abcam) com diluição de 1:300, 5HT_{2A} rabbit polyclonal IgG (abcam) com diluição de 1:100, CRF goat polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:200 e CRF₁ goat polyclonal IgG (abcam) com diluição de 1:200.

Posteriormente, as membranas foram lavadas com solução basal e incubadas com anticorpo secundário específico por 2 horas em temperatura ambiente.

As bandas imunoreativas foram detectadas utilizando-se solução reveladora no Imagequant 350. As imagens obtidas foram escaneadas e a intensidade das bandas quantificadas por densidade ótica (UNSACANIT). Os valores da densidade obtidos foram utilizados para análise estatística.

3.7 Apresentação dos dados e análise estatística

Todos os dados são apresentados como médias ± EPM. Os dados obtidos ao longo do tempo foram analisados por ANOVA apropriado ou Kruskal-Wallis one-way análise de variância. Comparações post hoc entre os meios selecionados foram feitas pelo teste de Bonferoni quando a ANOVA inicial indicou diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Comparações envolvendo apenas duas amostras de observações independentes tendem dentro ou entre os grupos foram feitas usando o teste T de Student ou Mann-Whiney. Valor de $p < 0,05$ foi considerado para indicar significância. As imagens desenvolvidas foram digitalizadas (Epson Stylus 3500) e intensidade das bandas foram quantificadas por densitometria óptica (UNSACANIT). O Teste Turkey-Kramer para comparações múltiplas foi utilizado para análise. O nível de significância fo fixado em $p < 0,05$

4.Resultados



4.1 Peso ao Nascer/Semanal/Cérebro

Em nosso estudo verificamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos LP e NP em relação ao peso ao nascer. O grupo LP apresentou um menor peso ao nascer quando comparado com o grupo NP na prole de machos (NP="6.052 $\pm$ 0.05147 n=83" v LP="5.842 $\pm$ 0.05491 n=70" $p=0,0061$) (Figura 5). Após a sexta semana de vida os pesos foram iguais entre os dois grupos e permaneceram assim até a décima sexta semana de vida (Figura 6). Na 16ª semana não foram encontradas diferenças no peso do encéfalo entre os grupos NP e LP (NP= "0.5278 $\pm$ 0.03704 n=16" v LP="0.5658 $\pm$ 0.02613 n=25" $p=0,3934$) (Figura 7).

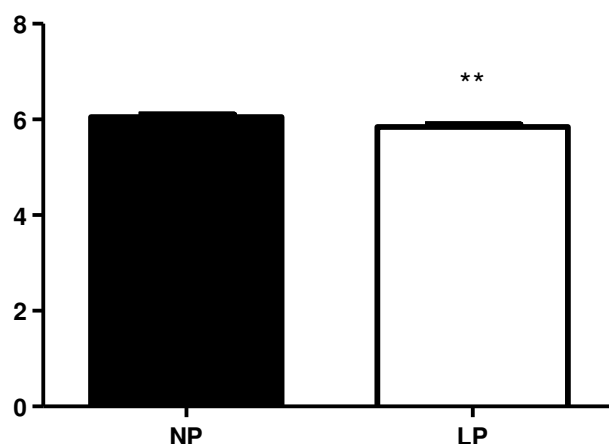


Figura 5: Peso ao nascer da prole de machos dos grupos NP e LP.

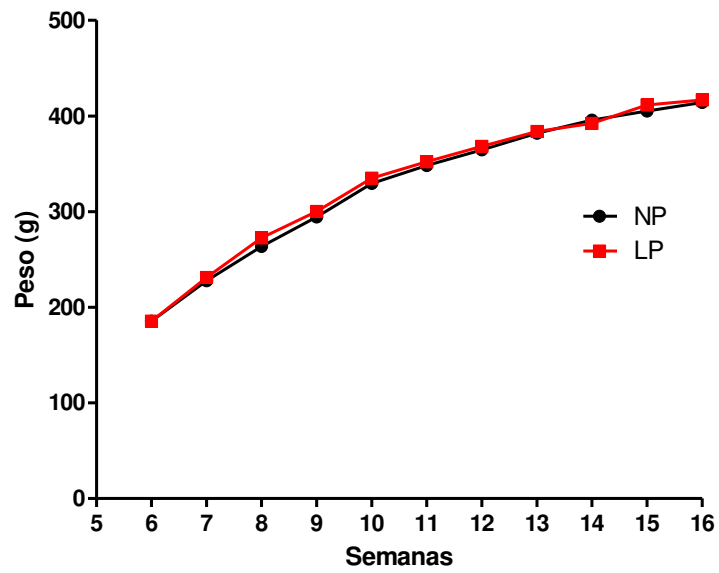


Figura 6: Peso semanal dos animais da 6ª até a 16ª semana de vida pós natal.

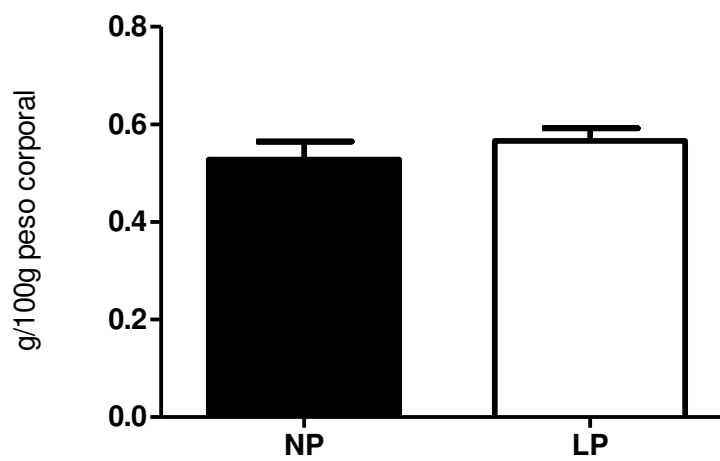


Figura 7: Peso do cérebro de animais com 16 semanas do grupo NP e LP.

4.2 Perfil comportamental

4.2.1 Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

Os animais do grupo LP permaneceram um tempo estatisticamente menor nos braços abertos comparando com o grupo NP. (NP= 57.68 ± 6.856 n=13" v LP= 31.62 ± 8.449 n=12" $p= 0,0242$) (Figura 8). Isso se confirma quando o tempo de permanência no braço aberto é dividido pelo tempo total do teste, sendo este parâmetro um indicativo de ansiedade (NP= 0.1442 ± 0.01404 n=8" v LP= 0.05838 ± 0.01629 n=13" " $p=0,0018$) (Figura 9).

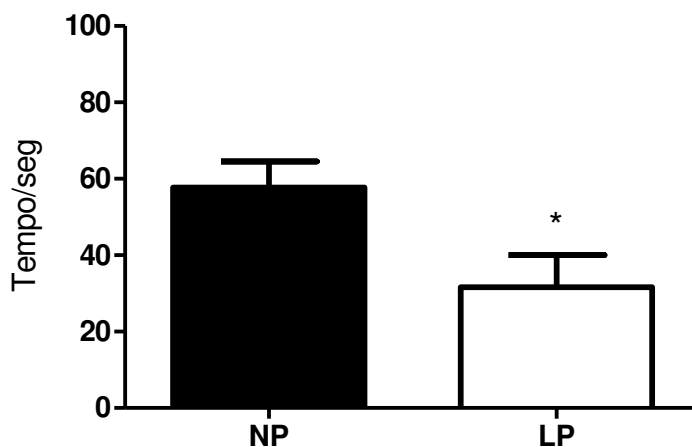


Figura 8: Labirinto em Cruz Elevado, tempo de permanência nos braços abertos.

* $p < 0,05$

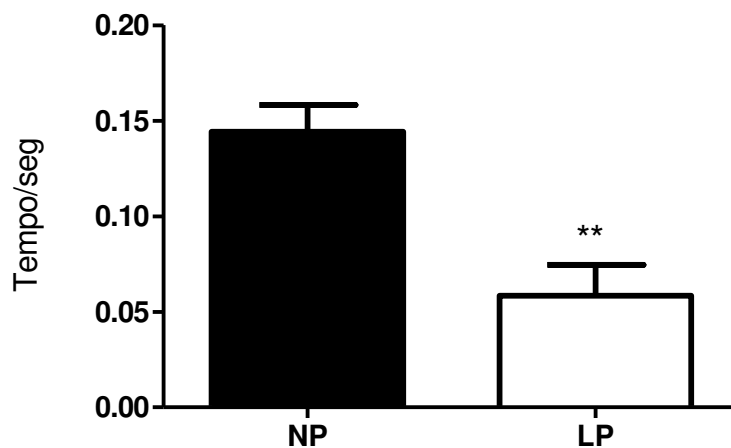


Figura 9: Braço aberto dividido pelo tempo total * $p < 0,05$)

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação ao tempo de permanência nos braços fechados (NP= "168.3 $\pm$ 6.966 n=13" v LP= "192.4 $\pm$ 11.44 n=12" $p = 0,0800$) (Figura 10). Quanto ao número de entradas nos braços abertos (figura 11); (NP= "3.769 $\pm$ 0.3782 n=13" v LP= "2.692 $\pm$ 0.7106 n=13" $p=0,1935$) e nos fechados (Figura 12); (NP= "9.308 $\pm$ 0.5236 n=13" v LP="8.154 $\pm$ 0.6289 n=13" $p=0,1714$) não encontramos diferença significativa entre os grupos

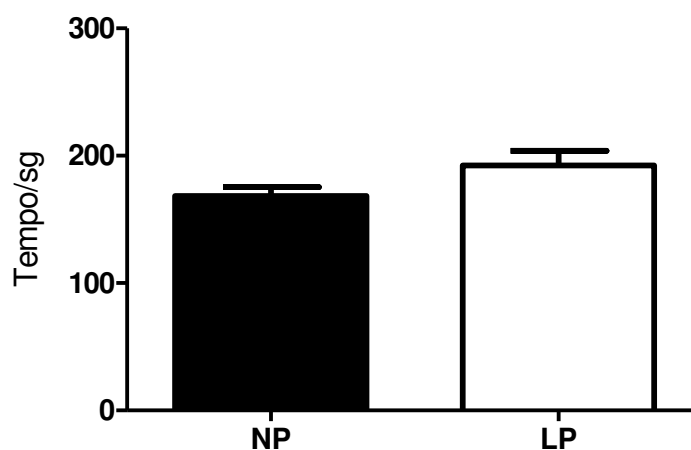


Figura 10: Tempo de permanência nos braços fechados

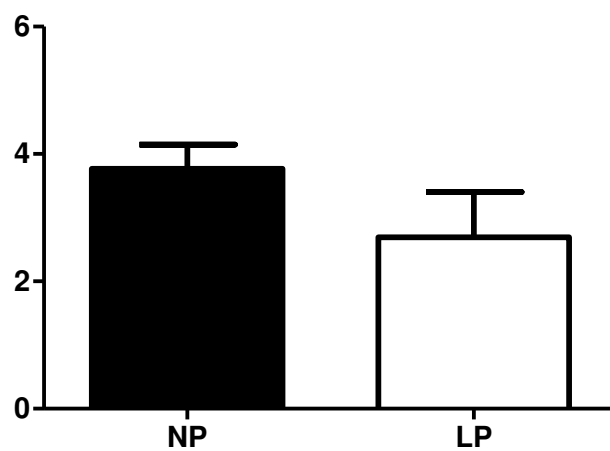


Figura 11: Número de entradas nos braços abertos

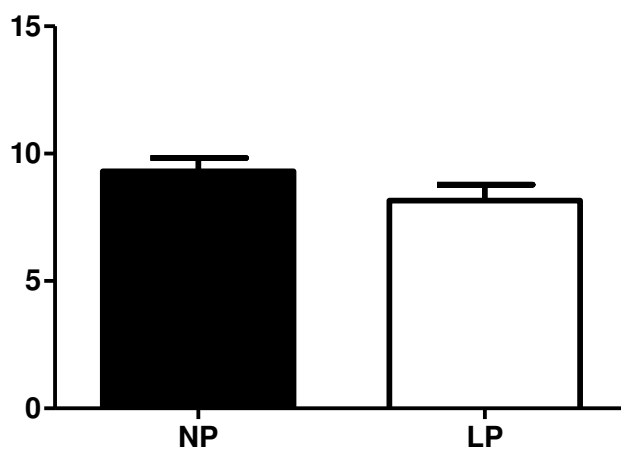


Figura 12: Número de entradas nos braços fechados.

4.2.2 HOLE BOARD

Os resultados obtidos no *Hole Board* não revelaram diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados. Coordenação motora (NP="4.385 ± 0.6557 n=13" v LP="3.667 ± 0.4495 n=12" $p=0,3836$) (Figura 13); e exploração (NP="20.62 ± 3.656 n=13" v LP="26.33 ± 2.419 n=12" $p=0,2128$) (Figura 14).

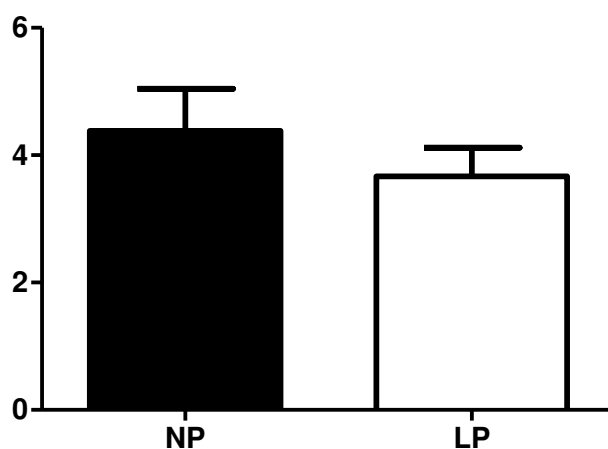


Figura 13: *Hole Board* coordenação motora

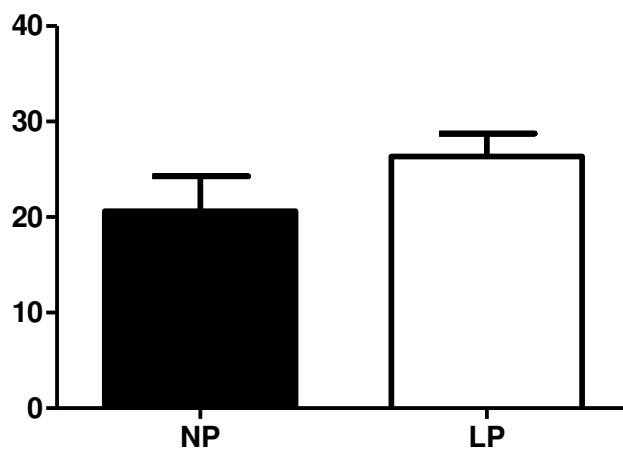


Figura 14: Índice de exploração no teste do *Hole Board*

4.2.3 OPEN FIELD

No teste do *open-field* foram avaliados comportamentos que envolvem medidas de exploração e ansiedade. Em relação ao número de vezes em que o animal ficava sobre as duas patas traseiras para explorar o ambiente (levantamento) não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. (NP= " 19.15 ± 2.485 n=13" v LP= " 19.00 ± 0.9541 n=13" $p=0,9544$ (Figura 15), bem como o número de vezes em que o animal adentrava com as quatro patas em uma das divisões da arena (NP= " 59.15 ± 2.828 n=13" v LP= " 60.92 ± 2.934 n=13" $p=0,6681$) (Figura 16) e o número de vezes em que cruzava o centro da arena (atividade locomotora) (NP= " 1.250 ± 0.2787 n=12" v LP= " 1.000 ± 0.2774 n=13" $p=0,5317$) (Figura 17).

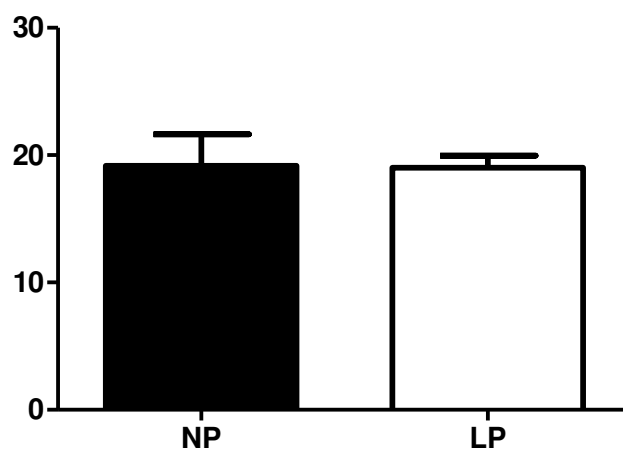


Figura 15: Números de vezes que o animal se levantava

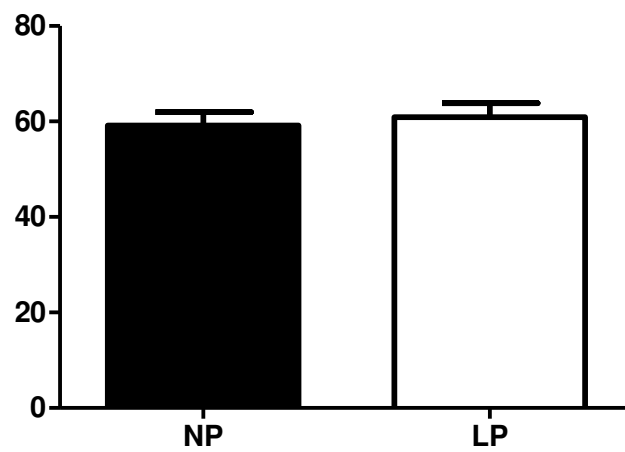


Figura 16: Número de vezes que o animal se deslocava com as quatro patas de um quadrante para o outro, sendo este o indicativo de locomoção.

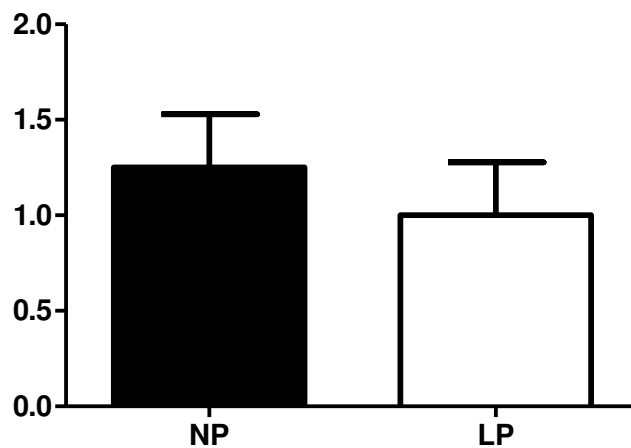


Figura 17: Número de vezes que o animal se cruzava com as quatro patas no centro da arena.

O tempo em que o animal permaneceu completamente imóvel (congelamento) (NP="0.9750 ± 0.7593 n=12" v LP="0.1933 ± 0.1411 n=12" $p=0,3225$) (Figura 18) e o tempo de auto-limpeza não demonstraram diferenças significativas (NP="0.7133 ± 0.5604 n=12" v LP="0.8958 ± 0.5963 n=12" $p=0,8256$) (Figura 19).

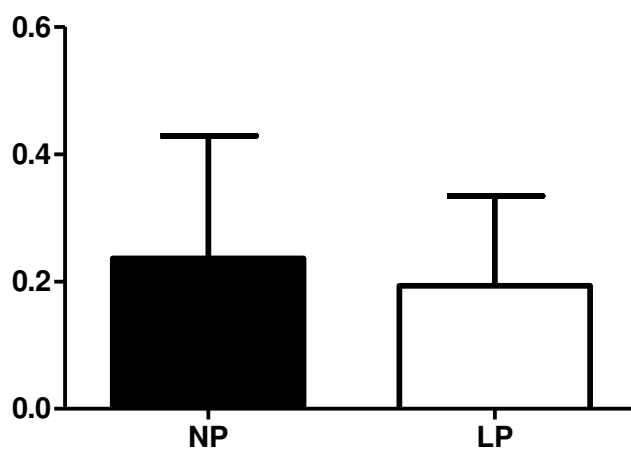


Figura 18: Tempo total em que o animal ficava imóvel durante o teste.

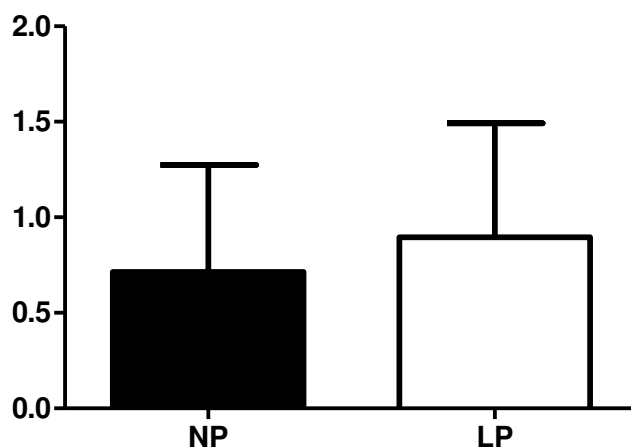


Figura 19: Quantas vezes o animal se limpou durante o teste.

4.3 Golgi-cox

Na figura 20 foi comparado o comprimento dos dendritos em micrometros (μm) reconstruídos em 3D pela técnica do Golgi-cox entre o grupo NP e LP, onde se observa uma redução estatisticamente significativa a aproximadamente 530 μm do pericário do comprimento dos neurônios dos animais do grupo LP, (NP="763.0 $\pm$ 50.02 n=47" v LP="637.8 $\pm$ 37.30 n=45" $p=0,0493$).

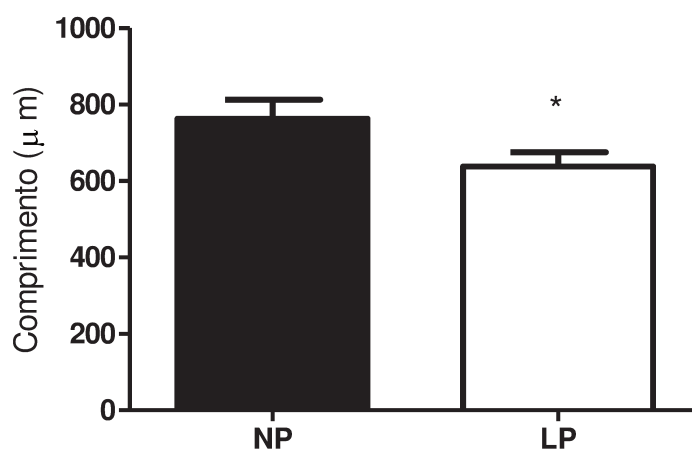


Figura 20: Comprimento dos dendritos do BNST

4.3.1 Análise de Sholl

No raio que compreende o intervalo entre 170 e 320 μm a partir do pericário, houve redução significativa nas ramificações dendríticas no grupo LP (Figura 21).

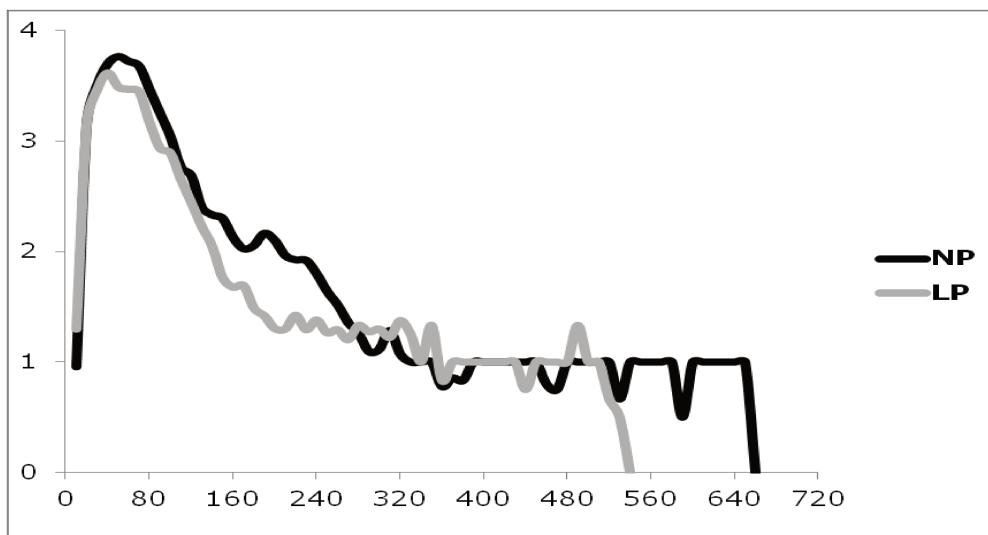


Figura 21: Distribuição espacial dos neurônios do BNST

Raio 10 – 160: NP $2,93 \pm 0,77$ v LP $2,73 \pm 0,74$; $p=0,47$

Raio 170 – 320: NP $1,64 \pm 0,39$ v LP $1,34 \pm 0,12$; $p=0,007^*$

Raio 330 – 480: NP $0,94 \pm 0,09$ v LP $1,01 \pm 0,13$; $p=0,09$

Raio 490 – 660: NP $0,90 \pm 0,26$ v LP $0,75 \pm 0,47$; $p=0,35$

* $p<0,05$

4.4 Western Blotting

Na análise por Western blotting no BNST isolado os animais do grupo LP apresentaram uma diminuição de 27,42% na expressão de 5HT_{1A} (NP= 100.0 ± 5.485 n=3 v LP 72.58 ± 16.84 n=2 p= 0,1532) (figura 22), já a expressão de 5HT_{2A} não foi alterada (NP= 100.0 ± 5.580 n=4 v LP 91.21 ± 16.13 n=4 p= 0,6249) (figura 23).

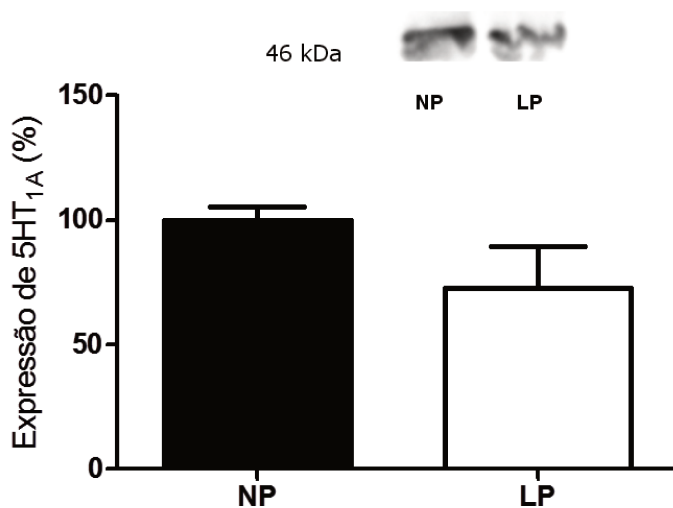


Figura 22: Expressão de 5HT_{1A} no BNST.

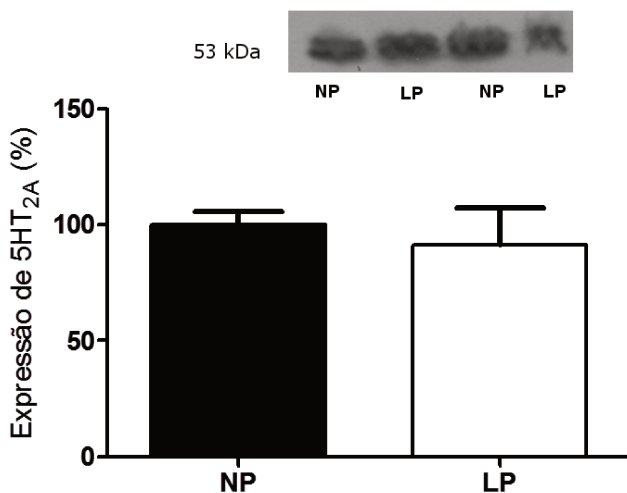


Figura 23: Expressão de 5HT_{2A} no BNST.

Houve um aumento da expressão de GR nos animais do grupo LP em 31,6% (NP=100.0 $\pm$ 26.38 n=4 v LP 131.6 $\pm$ 31.54 n=3 p= 0,4743) (figura 24). Entretanto a expressão de MR foi significativamente reduzida em 70,11% nestes animais (NP= 100.0 $\pm$ 22.13 n=3 v LP 29.89 $\pm$ 10.57 n=3 p= 0,0460) (figura 25).

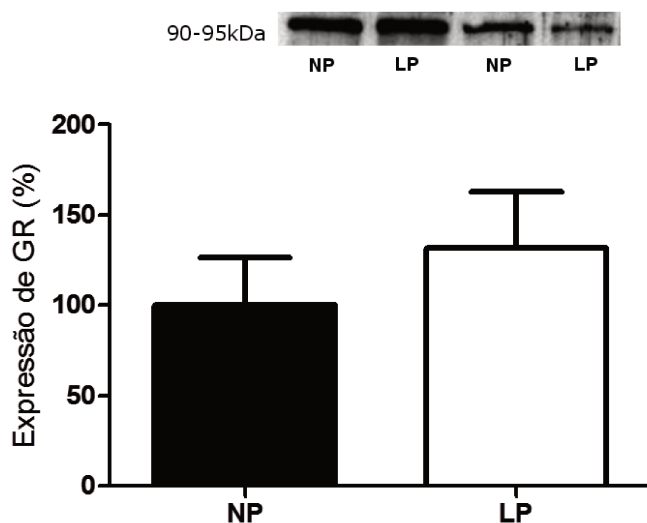


Figura 24: Expressão de GR no BNST.

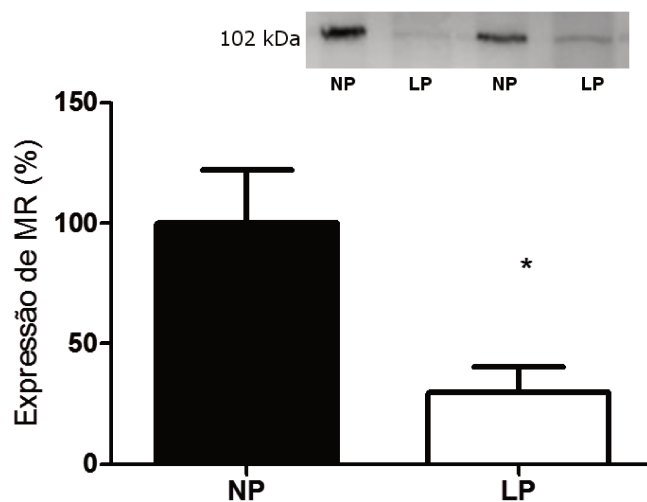


Figura 25: Expressão de MR no BNST

A expressão de 11BHSD₂ apresentou uma diminuição de 33,67% nos animais do grupo LP (NP= 100.0 ± 14.03 n=3 v LP 66.33 ± 15.27 n=3 p=0,1798) (figura 26) já a expressão de AT₁ aumentou em 64,2% nos animais com restrição protéica gestacional (NP= 100.0 ± 50.07 n=3 v LP 164.2 ± 47.04 n=3 p= 0,4028) (figura 27).

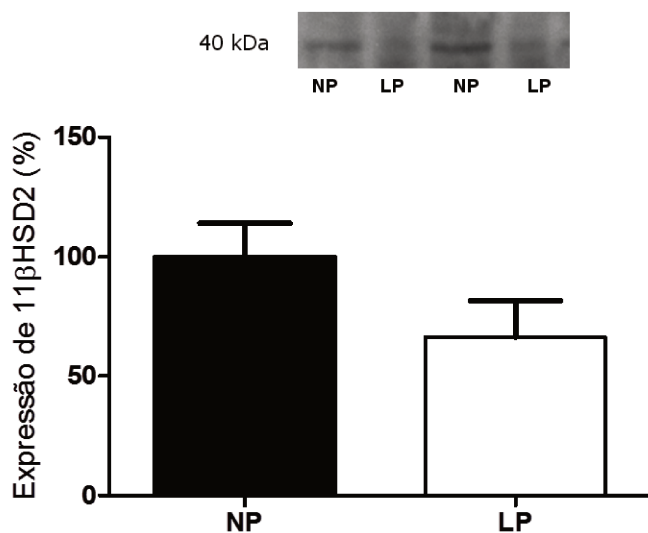


Figura 26: Expressão de 11BHSD₂ no BNST.

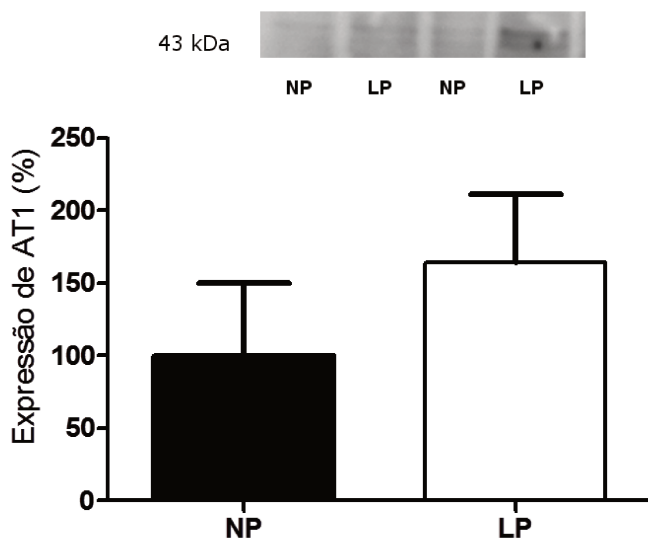


Figura 27: Expressão de AT₁ no BNST.

O receptor CRF_1 apresentou uma significativa redução em sua expressão de 83,35% nos animais do grupo LP (NP 100.0 ± 28.27 $n=3$ v LP 16.65 ± 2.057 $n=3$ $p=0,0424$) (figura 28). A expressão de CRF permaneceu inalterada (NP $=100.0 \pm 7.275$ $n=3$ v LP 101.7 ± 17.30 $n=2$ $p=0,9215$) (figura 29).

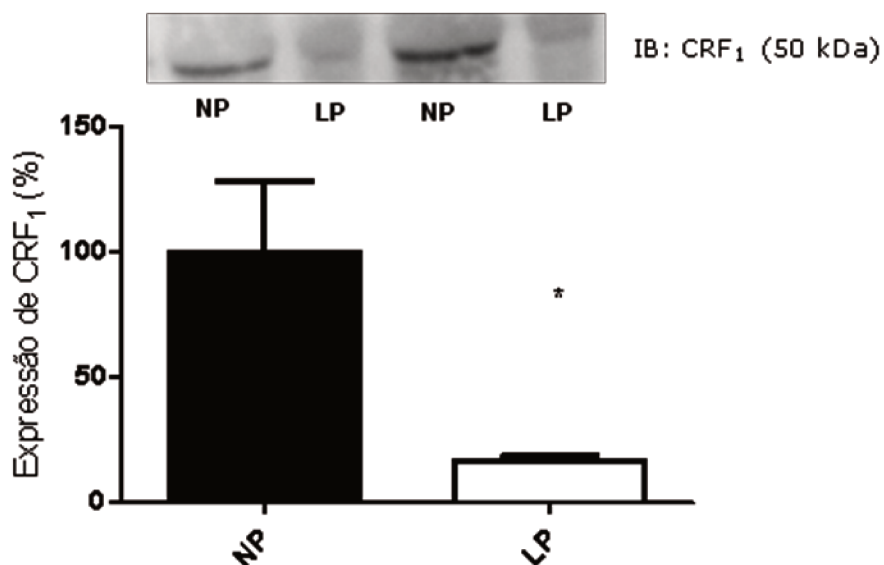


Figura 28: Expressão de CRF_1 no BNST

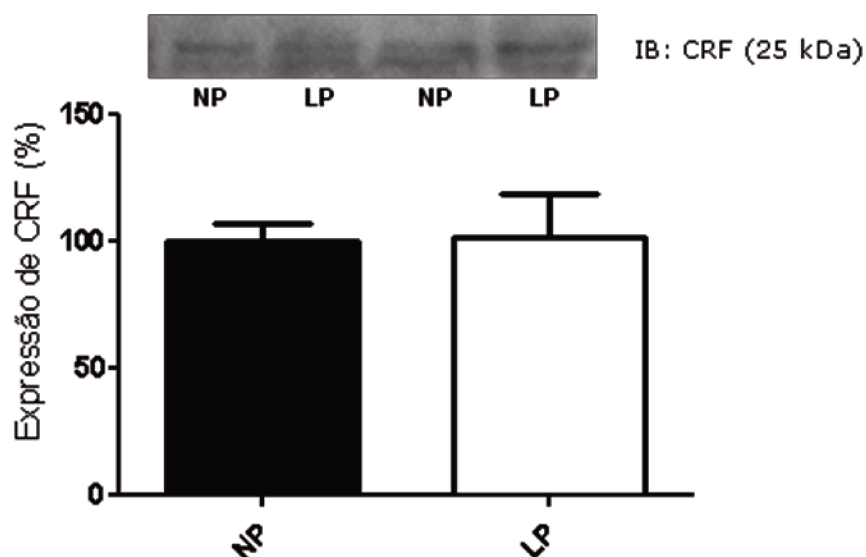


Figura 29: Expressão de CRF no BNST.

A restrição protéica gestacional provocou uma alteração nos níveis basais de corticosterona, revelando diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 30) NP=78.58 ± 17.89 n=6 v LP=183.1 ± 34.86 n=5 p=0.02.

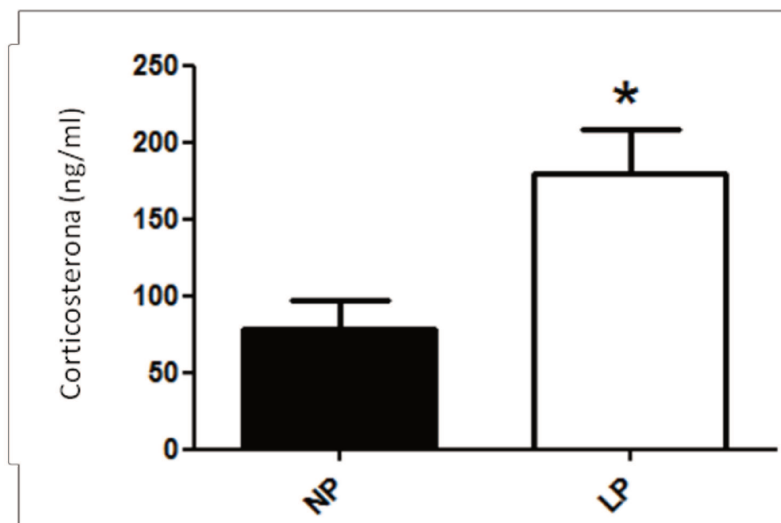


Figura 30: Níveis basais de corticosterona.

5. Discussão



Em países desenvolvidos e em desenvolvimento a desnutrição materno-infantil tem repercussões evidentes sobre a saúde de populações. Isto se deve a alterações no desenvolvimento ontogênico, vinculada à manifestação programada de alterações no desenvolvimento morfológico e funcional de órgãos e sistemas. A programação fetal por desnutrição ou restrição protéica, leva a exposição fetal aumentada aos glicocorticóides maternos e altera a função pós-natal do eixo hipocampo-hipotálamo-pituitária-adrenal podendo ocasionar, no adulto, exposição aumentada cronicamente a glicocorticóides (GC) e/ou exacerbação na resposta ao estresse. Essas alterações são geralmente atribuídas a modificações na taxa de *feedback* de esteróides, condicionada pelo nível de expressão de genes para receptores de GC. Os corticosteróides modulam alterações estruturais, tanto no volume quanto na estrutura fina neuronal, podendo alterar o número de sinapses e a morfologia dendrítica. O núcleo da estria terminal (BNST) medeia resposta ao estresse estando envolvido no comportamento afetivo, de medo e de ansiedade. Estudos demonstram que a exposição crônica ao estresse e o tratamento com corticosterona durante a gestação ou no adulto, influenciam na plasticidade do BNST sugerindo que estes fatores atuam como mediadores das desordens de ansiedade. O objetivo do presente estudo foi estudar em ratos adultos submetidos *in utero* à restrição protéica, comparativamente aos seus controles: 1) a concentração sérica de corticosterona; 2) parâmetros comportamentais; 3) a morfologia da estrutura geral e dendrítica do BNST. 4) a expressão de 11 β HSD₂, GR, MR, AT₁, 5HT_{1A}, 5HT_{2A}, CRF e CRF₁.

Os resultados deste trabalho confirmam a significativa redução do peso ao nascer, já descrita pelo nosso grupo neste modelo de restrição protéica gestacional (Mesquita et al 2010). A partir da sexta semana de vida o peso dos animais do grupo LP é igual ao do grupo NP e assim permanece até a décima sexta semana.

No entanto, pela avaliação morfológica dos neurônios do BNST, após a técnica de Golgi-Cox, observamos redução significativa de cerca de 16% no comprimento dendrítico. Esta redução ocorreu a aproximadamente 530 μ m do

pericário sendo que nos neurônios do grupo NP os dendritos se estenderam mais 130 μm .

Além disso, no raio que compreende o intervalo entre 170 e 320 μm a partir do pericário, houve redução significativa nas ramificações dendríticas no grupo LP.

A literatura tem demonstrado que tanto a exposição crônica a estressores quanto tratamentos farmacológicos (ex: corticosterona) influenciam a plasticidade do BNST (revisto em Hammack et al 2010). A exposição ao estresse crônico inesperado foi associada ao aumento no volume do BNST e no comprimento dos dendritos (Pego et al 2008) e a imobilização crônica aumentou as ramificações dendríticas de neurônios do BNST (Vyas et al 2002; 2003). Entretanto estes estudos foram feitos em ratos adultos, já no nosso modelo ocorre exposição gestacional a corticosteróides durante o período do desenvolvimento do BNST. Não existe descrição da modulação da plasticidade do BNST durante sua gênese e nossos achados podem representar adaptação durante o desenvolvimento embrionário à alta exposição aos glicocorticóides maternos em decorrência do estresse nutricional.

Estudos demonstraram que a exposição gestacional ao estresse (Weinstock et al 1992) ou à administração de hormônios do estresse (Fameli et al 1994) durante a gestação leva ao aumento na concentração plasmática de corticosterona na prole. Realmente um grande número de estudos vem demonstrando que o estresse pré-natal está associado à alterações do eixo HHPA da prole (para revisão ver Charil et al 2010), corroborando assim os nossos resultados, com o aumento de corticosterona plasmática na prole dos animais do grupo LP.

Wellman (2001) verificou que a injeção de corticosterona em ratos adultos diariamente durante três semanas provocou reorganização da arborização dendrítica e redução no comprimento dos dendritos distais de neurônios do córtex pré-frontal.

Estudos em animais demonstram claramente que o estresse pré-natal afeta a morfologia do cérebro da prole, entretanto os mecanismos envolvidos nestes

efeitos ainda não são conhecidos. A placenta e o eixo HHPA da mãe e da prole são candidatos importantes.

Embora a grande maioria dos resultados destes estudos tenha sido obtida em animais estes podem ser extrapolados para humanos. Não existe sincronicidade no desenvolvimento das diferentes estruturas neurais sendo que cada uma tem seu padrão e tempo específicos de desenvolvimento durante os períodos pré e pós-natais. Estes processos envolvem “janelas” diferentes e parcialmente sobrepostas de vulnerabilidade ao estresse. Assim é difícil determinar o período de maior suscetibilidade à estressores durante a gestação, considerando que a maioria dos estudos animais dos efeitos do estresse gestacional sobre o desenvolvimento do cérebro envolve roedores e estresse de fêmeas prenhas durante a última semana gestacional, o qual é um período de desenvolvimento ativo de várias regiões do cérebro destes animais. Além disso, estudos em macacos *Rhesus* sugerem que o estresse gestacional pode ter efeitos neurais similares aos obtidos em roedores. Estes resultados sugerem que tanto a proliferação quanto os eventos subseqüentes como migração podem ser afetados. Além disso, a diferenciação celular pode também ser prejudicada (Rice e Barone, 2000).

O estresse gestacional afeta diversas regiões neurais incluindo hipocampo, amígdala, corpo caloso, neocortéx, cerebelo e hipotálamo e frequentemente resulta em redução no volume dos tecidos que compõem estas estruturas.

Não somente a morfologia, mas também a neuroquímica pode ser afetada por fatores pré-natais. Tanto o estresse gestacional quanto a exposição pré-natal à dexametasona (DEX), principalmente no último terço da gestação, altera permanentemente o desenvolvimento do sistema monoaminérgico. O sistema 5-HT é particularmente sensível e a DEX decresce tanto a concentração quanto a retroalimentação do 5-HT cerebral e também a densidade de recaptção de 5HT nos locais de sinapses (Slotkin et al 2006). Nossos resultados demonstram que em ratos LP ocorreu redução de cerca de 27% dos receptores 5-HT_{1A} no BNST. A localização celular do receptor 5-HT_{1A} é somato-dendrítica e esta redução pode

estar relacionada à diminuição de cerca de 20% no comprimento dos dendritos do BNST.

A ativação dos receptores 5-HT_{1A} medeia a resposta inibitória, frente ao 5HT na maioria dos neurônios do BSNT levando à resposta ansiolítica, isso é, reduzindo o comportamento de ansiedade (Levita et al 2004). Inversamente o receptor 5HT_{2A} medeia a resposta excitatória, isso é, ansiogênica (para revisão ver Hammack et al 2009).

O BNST exibe um padrão complexo de resposta à 5HT que é mediado por diversos subtipos de receptores. Dados de Hammack et al (2009) sugerem que os neurônios do BNST são capazes de responder à 5HT com inibição e excitação, e assim estes autores propuseram que esta complexidade pode auxiliar na explicação de dados que descrevem papéis ansiolíticos e ansiogênicos após ativação por 5HT. Estes autores verificaram que 49% dos neurônios do BNST respondem a 5HT de forma mista excitatória/inibitória, entretanto a magnitude da resposta inibitória é maior. Assim, a maioria dos neurônios do BNST foi mais hiperpolarizado na presença de 5HT exógeno, sugerindo que a liberação de 5HT no BNST pode agir de forma a atenuar sua atividade e o comportamento de ansiedade em estados não patológicos. Além disso, o 5HT tem maior afinidade pelo 5HT_{1A} quando comparada a outros subtipos de receptores expressos no BNST (Uphouse, 1997; Zifa e Fillion, 1992) e assim baixas concentrações de 5HT poderiam favorecer a inibição do BNST. Além da tendência a redução na expressão de 5HT_{1A} verificada em nosso trabalho, a expressão de 5HT_{2A} permaneceu igual indicando a prevalência do efeito inibitório, isto é, ansiogênico provocado pela ativação do 5HT_{1A}.

Não somente os receptores serotoninérgicos podem estar envolvidos nas alterações neuroquímicas do BNST provocadas pela programação fetal. Como já citado, os corticosteróides desempenham papel central na gênese das alterações neurais, quer seja por estresse psicológico ou nutricional ou mesmo por administração de DEX durante a gestação. Nossos resultados demonstraram redução significativa de cerca de 70% na expressão de MR paralelamente a elevação na expressão de GR em aproximadamente 31%.

O entendimento da atividade transcricional do MR não está bem esclarecido uma vez que a afinidade intrínseca destes receptores é similar àquela observada para cortisol e corticosterona (homem e roedor respectivamente).

As concentrações de cortisol ou corticosterona circulantes são, respectivamente, 100 e 1000x maior que a concentração de mineralocorticóides no plasma. A afinidade do GR pelo cortisol ou corticosterona é de aproximadamente 1/10 daquela observada para MR. Por outro lado, a afinidade de GR para aldosterona é de aproximadamente 1/10 daquela observada para cortisol e corticosterona. A maioria dos MR, incluindo os do SNC, são pelo menos parcialmente ocupados por glicocorticóides quando estes se encontram em concentração plasmática normal, enquanto os GR são ocupados pelo cortisol ou corticosterona durante o estresse ou durante os picos de concentração relacionadas ao ciclo circadiano desses hormônios.

Como em nosso modelo existe elevação crônica dos níveis de corticosteróide, estes estariam ligados, preferencialmente, aos MR. Entretanto a redução de cerca de 70% desses receptores indica maior disponibilidade para que o corticosteróide se ligue ao GR, mesmo por que a expressão destes esteja aumentada em cerca de 30%.

Somado a isso observamos redução de aproximadamente 33% na expressão da $11\beta\text{HSD}_2$ que inativa os corticosteróides e assim teremos presumivelmente aumento na concentração de corticosterona e favorecendo à ligação desta ao GR.

O BNST está intimamente relacionado ao eixo HHPA e esta facilitação da ligação dos corticosteróides aos GR poderia estar relacionada ao aumento na atividade deste eixo.

A elevação na expressão de GR e de receptores ansiolíticos serotoninérgicos (5HT_{1A}) associados ao aumento na concentração de corticosterona pode ser responsável pelo aumento do comportamento de ansiedade observado no LCE nos animais do grupo LP do presente estudo.

Desde 1986 (Barker e Osmond) quando o conceito da origem desenvolvimentista da saúde e da doença (DOHaD) durante a vida fetal foi

estabelecido, o desenvolvimento do sistema renina angiotensina (RAS) tem atraído a atenção dos pesquisadores. Diversos estudos sobre a participação deste sistema na programação fetal têm sido feitos (Fitzsimons, 1998) e progressos recentes tem demonstrado a importância do RAS, tanto no desenvolvimento fetal quanto no pós natal, em modelos de programação fetal.

A participação do RAS no estresse tem sido demonstrada em vários estudos sobre a localização dos receptores de angiotensina II e pela elevação na expressão de angiotensina II no SNC. Estas evidências são claramente estabelecidas com a demonstração de que a inibição de angiotensina II atenua não somente a resposta hormonal e simpatoadrenal ao estresse, mas também a atividade de centros corticais superiores reduzindo a ansiedade em roedores.

Sabendo que o bloqueio de receptor AT_1 (AT_1R) afeta significativamente os níveis de CRH e que este está envolvido no controle regulatório cognitivo e comportamental, nós avaliamos a expressão dos AT_1R no BNST de animais do nosso modelo.

Nossos experimentos demonstraram significativo decréscimo no tempo de permanência dos animais do grupo LP nos braços abertos indicando efeito ansiogênico causado possivelmente pela expressão aumentada em cerca de 64% dos receptores de AT_1 no BNST. Na realidade se somarmos todos os resultados obtidos por Western Blotting como esquematizado na figura 31, poderemos concluir que alterações na expressão protéica encontradas no grupo LP levam a ansiogênese ou reduzem o papel ansiolítico.

O BNST é uma região de modulação de sinais provenientes de áreas corticais e límbicas sensíveis ao estresse com conexões para o eixo HHPA e tronco cerebral. Nós verificamos pela primeira vez neste trabalho que em LP ocorre atrofia de neurônios do BNST e redução na expressão MR, $5HT_{1A}$, $11\beta HSD_2$, e CRF_1 paralelamente à elevação na expressão de GR, MR e AT_1 que podem estar envolvidos na plasticidade neuronal observada. Neste modelo as elevações séricas e locais de glicocorticóides podem promover redução da atividade tônica inibitórias do BNST implicando em mudanças neuroanatomicas e neurofuncionais desta região cerebral.

Os achados do presente estudo representam o impacto pré natal da desnutrição protéica, correspondente a situação de estresse nutricional, no BNST que está envolvido no comportamento de ansiedade. Nós demonstramos, pela primeira vez, que a exposição materna a restrição protéica durante o desenvolvimento neural da prole causa importantes mudanças neuroquímicas, e morfológicas no BNST tornando estes animais vulneráveis em teste de ansiedade na idade adulta.

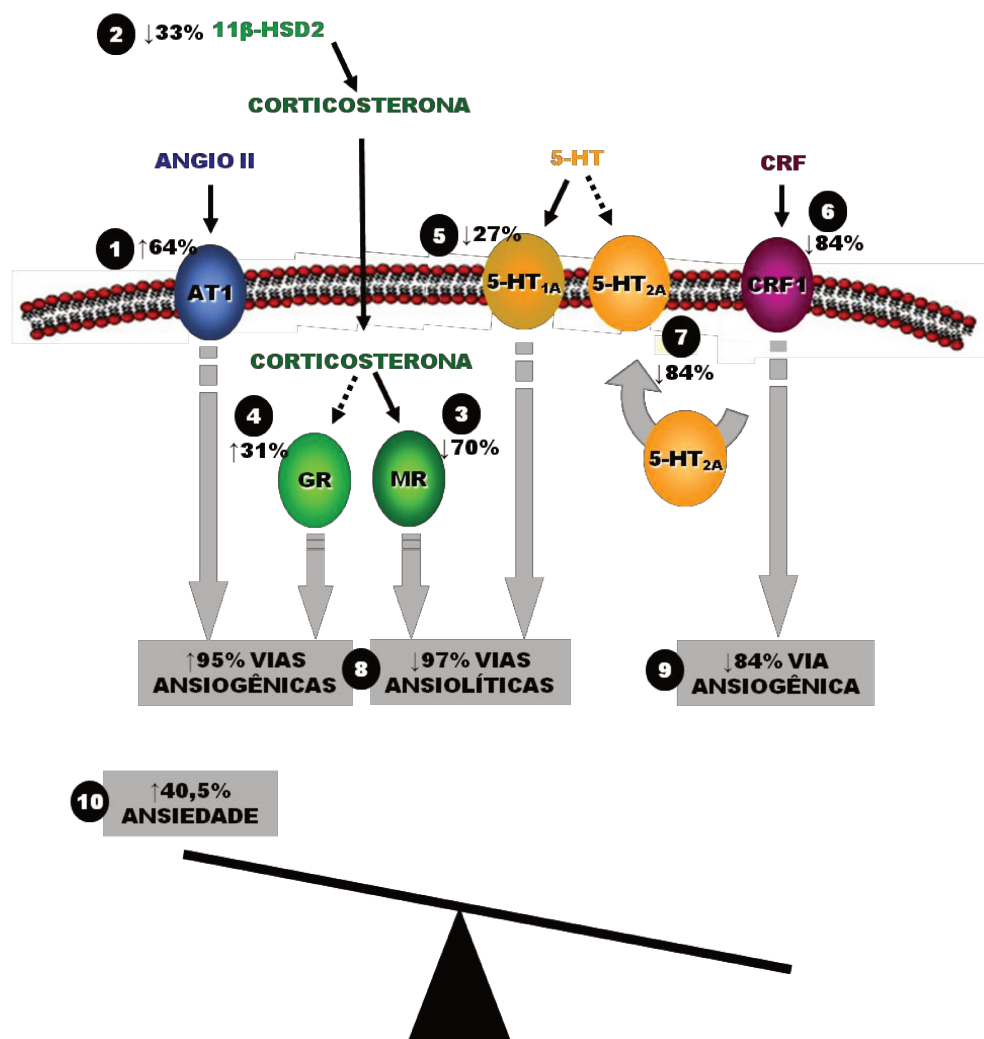


Figura 31: Esquema representando os resultados obtidos em Western Blot de BNST isolado (1-9) e labirinto em cruz elevado (10). Em animais do grupo LP comparativamente ao NP observamos: 1-) Aumento de 64% na expressão do receptor AT₁ cuja via resulta em ansiogênese; 2-) Redução de 33% na expressão de 11β- HSD₂ que inativa a corticosterona, isto é, aumento de 33% na concentração deste esteróide no BNST; 3-) A corticosterona liga-se preferencialmente ao MR (seta contínua), entretanto ocorre redução de 70% na sua expressão; 4-) Assim a corticosterona se ligará ao GR cuja expressão está aumentada em 31%; 5-) O 5-HT liga-se preferencialmente ao receptor 5-HT_{1A} cuja expressão está reduzida em 27%; 6-) A expressão do receptor de CRF está reduzida em 84% e, como a via de sinalização deste receptor envolve o direcionamento do receptor 5-HT_{2A} para a membrana (7) podemos inferir que ocorre decréscimo de sua função, embora sua expressão não esteja alterada. Como resultado temos alterações em vias ansiolíticas e ansiogênicas (8 e 9) que sugerem desregulação que resulta no aumento do comportamento de ansiedade observado(10).

6. Conclusão



Os principais resultados do estudo demonstraram:

- 1) Diminuição do peso ao nascer da prole de machos LP quando comparados ao grupo NP;
- 2) Após a sexta semana de vida os pesos foram iguais entre os dois grupos e permaneceram assim até a décima sexta semana de vida pós natal;
- 3) O peso do cérebro dos animais não foi afetado por este modelo experimental;
- 4) Comportamento de ansiedade nos animais do grupo LP demonstrado pelo LCE;
- 5) A restrição protéica durante o período gestacional não alterou a coordenação motora e níveis exploração demonstrados no *Hole Board*;
- 6) O comportamento de exploração e ansiedade avaliadas pelo *Open Field* também não foram afetados pela restrição protéica durante o período gestacional;
- 7) Significativa redução no comprimento dos dendritos do Núcleo da Estria Terminal (BNST) dos animais do grupo LP;
- 8) Redução significativa nas ramificações dendriticas dos animais do grupo LP no intervalo que compreende entre 170 e 320 μm a partir do pericário;
- 9) Redução na expressão protéica de 5HT_{1A} nos animais do grupo LP.
- 10) Aumento na expressão protéica de GR nos animais do grupo LP;
- 11) Significativa redução na expressão de MR nos animais do grupo LP;
- 12) Os níveis de expressão protéica de 5HT_{2A} não foram alterados;
- 13) Redução da expressão de 11 β HSD₂ nos animais do grupo LP;
- 14) Aumento da expressão de AT₁ nos animais do grupo LP;
- 15) Os níveis de expressão de CRF permaneceram inalterados;
- 16) Redução significativa na expressão de proteínas de CRF1 nos animais do grupo LP.

A restrição protéica gestacional vem sendo estudada por diversos grupos em todo o mundo, e os resultados apresentados neste trabalho contribuem para o

melhor entendimento das diversas patologias associadas a esta condição. A superexposição fetal aos glicocorticóides maternos parece estar associada às alterações aqui apresentadas.

O sistema nervoso central, mais especificamente o Núcleo da Estria Terminal, demonstrou ser sensível a este modelo experimental. Foram verificadas alterações na morfologia do BNST, bem como na expressão de diversas proteínas relacionadas aos mecanismos que levam ao comportamento de ansiedade, o qual foi confirmado pelo perfil comportamental dos animais submetidos à restrição protéica gestacional.

O estudo demonstra um aumento das vias que levam à ansiogênese e redução das vias ansiolíticas no BNST.

Em síntese os resultados CONFIRMAM que a Restrição Proteica Gestacional diminui o peso ao nascer com recuperação após a 6ª semana. E mostraram que dieta hipoprotéica (LP) produz comportamento ansiogênico em animais adultos (16 semanas). Estes resultados foram comprovados por diminuição no comprimento dos neurônios do BNST e diminuição das ramificações dendríticas no grupo LP

Concluindo os resultados do presente estudo mostram que o tratamento de mães com dieta hipoproteica causa alterações morfo-funcionais específicas no BNST e resultam em alterações comportamentais (ansiogênico) na idade adulta.

7. Referências Bibliográficas



ALHEID, G.F.; BELTRAMINO, C.A.; OLMOS, J.S.; FORBES, M.S.; SWANSON D.J.; HEIMER, L. The neuronal organization of the supracapsular part of the stria terminalis in the rat: the dorsal component of the extended amygdale. **Neuroscience** 1998; 84:967-996.

ALHEID, G.F.; BELTRAMINO, C.A.; OLMOS J.S.; HEIMER, L. Supracapsular portions of the rat extended amygdale. **European Neuroscience Meeting Amsterdam** 1995;104.

ALHEID, G.F.; HEIMER, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: the striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominat. **Neuroscience** 1988; 27(1):1-39.

ASHTON, N. Perinatal development and adult blood pressure. **Braz J Med Biol Res** 2000; 33:731-740.

BARKER, D.J. In utero programming of chronic disease. **Clin Sci (Lond)** 1998; 95:115-128.

BARKER, D.J. Intra-uterine programming of the adult cardiovascular system. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 1997;6:106-110.

BARKER, D.J. The fetal and infant origins of disease. **Eur J Clin Invest** 1995; 25:457-463.

BARKER, D.J.; OSMOND, C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. **J Epidemiol Community Health** 1986; 40(1):37-44.

BARKER, D.J.; OSMOND, C.; GOLDING, J.; KUH, D.; WADSWORTH, M.E.J. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular diasease. **BMJ** 1989; 298:564-567.

BARKER, D.J.; OSMOND, C.; RODIN, I.; FALL, C.H.D.; WINTER, P.D. Low weight gain in infancy and suicide in adult life. **Br Med J** 1995; 311-1203.

BENEDIKTSSON, R.; LINDSAY, R.S.; NOBLE, J.; SECKL, J.R.; EDWARDS, C.R. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. **Lancet** 1993; 34:339-341.

BROADHURST, P.L. Experiments in psychogenetics. In: EYSENK, H.J. **Experiments in personality**. London: Rutledge and Keagan Paul, 1960; 31-61.

BURD, L.; SEVERUD, R.; KERBESHIAN, J.; KLUG, M.G. Prenatal and perinatal risk factors for autism. **J Perinat Med** 1999; 27:441-450.

CHARIL, A.; LAPLANTE, D.P.; VAILLANCOURT, C.; KING, S. Prenatal stress and brain development. **Brain Res Rev** 2010; 65(1):56-79.

COROMINAS, M.; RONCERO, C.; CASAS, M. Corticotropin releasing factor and neuroplasticity in cocaine addiction. **Life Sci** 2010; 86:1–9.

CULLINAN, W.E.; HERMAN, J.P.; WATSON, S.J. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. **J Comp Neurol** 1993; 332:1-20.

DAVIS, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Ann Rev Neurosci** 1992;15:353–375.

DAVIS, M.; WALKER, D.L.; MILES, L.; GRILLON, C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology** 2010; 35(1):105-135.

DOBBING, J.; SANDS, J. Comparative aspects of the brain growth spurt. **Early Hum Dev** 1979; (1):79–83.

DONG, H.W.; PETROVICH, G.D.; WATTS, A.G.; SWANSON, L.W. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. **J Comp Neurol** 2001; 436:430–455.

EDWARDS, L.J.; COULTER, C.L.; SYMONDS, M.E.; MCMILLEN, I.C. Pre-natal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 2001; 28:938-941.

FAMELI, M.; KITRAKI, E.; STYLIANOPOULOU, F. Effects of hyperactivity of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during pregnancy on the development of the HPA axis and brain monoamines of the offspring. **Int J Dev Neurosci** 1994;12(7):651-659.

FELDMAN, S.; CONFORTI, N.; SAPHIER, D. The preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis are involved in the effects of the amygdale on adrenocortical secretion. **Neuroscience** 1990; 37:775-779.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev** 1998; 78(3):583-686.

FONTENOT, M.B.; KAPLAN, J.R.; MANUCK, S.B.; ARANGO, V.; MANN, J.J. Long-term effects of chronic social stress on serotonergic indices in the prefrontal cortex of adult male cynomolgus macaques. **Brain Res** 1995; 705:105-108.

FORSDAHL, S. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? **Br J Prev Soc Med** 1967; 31:91-95

GIBB, R.; KOLB, B. A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. **J Neurosci Methods** 1998; 79:1-4.

GLASER, E.M.; VAN DER LOOS, H. Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. **J Neurosci Methods** 1981; 4:117–125.

GODFREY, K.; ROBINSON, S.; BARKER, D.J, OSMOND C, COX V. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. **BMJ** 1996;17;312 (7028):410-414.

GOMEZ-SANCHEZ, E.P. Mineralocorticoid receptors in the brain and cardiovascular regulation: minority rule? **Trends Endocrinol Metab.** 2011 (5):179-187.

GRAY, T.S.; PIECHOWSKI, R.A.; YRACHETA, J.M.; RITTENHOUSE, P.A, BETHEA, C.L.; VAN DE KAR, L.D. Ibotenic acid lesions in the bed nucleus of the stria terminalis attenuate conditioned stress-induced increases in prolactin, ACTH and corticosterone. **Neuroendocrinology** 1993; 57:517–524.

GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S.; DE ANDRADE, T.G.; DEAKIN, J.F. Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. **Pharmacol Biochem Behav** 1996; 54(1):129-141.

HAMMACK, S.E.; GUO,J.D.; HAZRA,R.; DABROWSKA,J.; MYERS,K.M.; RAINNI E, D.G. The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: implications for anxiety. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 2009;33(8):1309-1320.

HAMMACK, S.E.; ROMAN, C.W.; LEZAK, K.R.; KOCHO-SHELLENBERG, M. GRIMMIG, B.; FALLS, W.A.; BRAAS, K.; MAY, V. Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. **J Mol Neurosci** 2010;42(3):327-340.

HANDLEY, S.L. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. **Pharmacol Ther** 1995; 66:103-148.

HANDLEY, S.L.; MCBLANE, J.W.; CRITCHLEY, M.A.; NJUNG'E, K. Multiple serotonin mechanisms in animal models of anxiety: environmental, emotional and cognitive factors. **Behav Brain Res** 1993;58(1-2):203-10.

HATALSKI, C.G.; GUIRGUIS, C.; BARAM, T.Z. Corticotropin releasing factor mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus and the central nucleus of the amygdala is modulated by repeated acute stress in the immature rat. **J Neuroendocrinol** 1998;10: 663-669.

HERMAN, J.P.; CULLINAN, W.E.; WATSON, S.J. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. **J Neuroendocrinol** 1994; 6:433-442.

HERMAN, J.P.; DOLGAS, C.M.; RUCKER, D.; LANGUB, M.C. JR. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. **J Comp Neurol** 1996; 369:165–187.

HOLSBOER, F. Corticotropin-releasing hormone modulators and depression. **Curr Opin Investig Drugs** 2003; 4:46-50.

HOLMES, A.; HEILIG, M.; RUPNIAK, N.M.; STECKLER, T.; GRIEBEL, G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. **Trends Pharmacol Sci** 2003; 24:580–588.

HSU, D.T.; CHEN, F.L.; TAKAHASHI, L.K.; KALIN, N.H. Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis. **Brain Res** 1998; 788:305-310.

JANKARD, R.; HERMAN, J.P. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. Stress, Neurotransmitters, and Hormones: **Ann N Y Acad Sci** 2008; 1148: 64-73.

JOHNSTON, J.B. Further contributions to the study of the evolution of the forebrain. **Anatomical Laboratory University of Minnesota** 1923.

KLOET, D.E.; VREUGDENHIL, E.R.; OITZL, M.S.; JOELS, M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease, **Endocr Rev** 1998; 19:269–301.

KREAM, J.; MULAY, S.; FUKUSHIMA, D.K.; SOLOMON, S. Determination of plasma dexamethasone in the mother and the newborn after administration of the hormone in a clinical trial. **J Clin Endocrinol Metab** 1983; 56(1):127-133.

LAARIS, N.; HAJDAHMANE, S.; HAMON, M.; LANFUMEY, L. Glucocorticoid receptor-mediated inhibition by corticosterone of 5-HT_{1A} autoreceptor functioning in the rat dorsal raphe nucleus. **Neuropharmacology** 1995; 34:1201-1221

LANGLEY-EVANS, S.C.; JACKSON, A.A. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. **Clin Sci (Lond)** 1994; 86:217-222,

LANGLEY-EVANS, S.C.; JACKSON, A.A. Captopril normalizes systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets. **Comp Biochem Physiol A Physiol** 1995; 110:223-228.

LANGLEY-EVANS, S.C.; WELHAM, S.J.; SHERMAN, R.C.; JACKSON, A.A. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. **Clin Sci (Lond)**. 1996; 91:607-615.

LANGLEY-EVANS, S.C. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. **Life Sci** 1997; 60:1213-1221.

LAW, C.M.; BARKER, D.J.P.; BULL, A.R.; OSMOND, C. Maternal and fetal influences on blood pressure. **Arch Dis Child** 1991; 61:1291-1295.

LEONARD, B.E. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. **Eur Psychiatry** 2005; 20:302–306.

LEVITA, L.; HAMMACK, S.E.; MANIA, I.; LI, X.Y.; DAVIS, M.; RAINNIE, D.G. 5-hydroxytryptamine_{1A}-like receptor activation in the bed nucleus of the stria terminalis: electrophysiological and behavioral studies. **Neuroscience** 2004;128(3):583-596.

LINGAS, R.; DEAN, F.; MATTHEWS, S.G. Maternal nutrient restriction (48h) modifies brain corticosteroid receptor expression and endocrine function in the fetal guinea pig. **Brain Res** 1999; 846: 236-242.

LOWRY, C.A.; JOHNSON, P.L.; HAY-SCHMIDT, A.; MIKKELSEN, J.; SHEKHAR, A. Modulation of anxiety circuits by serotonergic systems. **Stress** 2005; 8:233-246.

LOWRY, C.A.; HALE, M.W.; EVANS, A.K.; HEERKENS, J.; STAUB, D.R.; GASSER, P.J. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. **Ann NY Acad Sci** 2008; 1148:86–94.

MACEY D.J.; SMITH, H.R.; NADER, M.A.; PORRINO, L.J. Chronic cocaine self-administration upregulates the norepinephrine transporter and alters functional activity in the bed nucleus of the stria terminalis of the rhesus monkey. **J Neurosci** 2003;23(1):12-16.

MAKINO, S.; GOLD, P.;W.; SCHULKIN, J. Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone messenger-RNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Brain Res** 1994; 640:105-112.

MATSUMOTO, A.; ARAI, Y. Sexual differentiation of neuronal circuitry in the neuroendocrine hypothalamus. **Biomed Rev** 1997; 7:5-15.

MCDONALD, A.J. Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain **Neuroscience** 1991; 44:15-33

MCEWEN, B.S. Glucocorticoid±biogenic amine interactions in relation to mood and behavior. **Biochem Pharmacol** 1987; 36:1755-1763.

MERALI, Z; KHAN, S; MICHAUD, D.S.; SHINOSITOL, PHOSPATEPY ,S.A; ANISMAN H. Does amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRF) mediate anxiety-like behaviors? Dissociation of anxiogenic effects and CRF release. **Eur J Neurosci** 2004; 20:229–239.

MESQUITA, F.F.; GONTIJO, J.A.R.; BOER, P.A. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. **Nephrol Dial Transplant** 2010 a; 25:380-388.

MESQUITA, F.F.; GONTIJO, J.A.R.; BOER, P.A. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life (Review). **Braz J Med Biol Res** 2010b (in press).

MEYER L, CASTON, J. Repeated stress alters caffeine action on motor coordination in C57B16/J male mice. **Brain Res** 2005; 1039:171-176.

MILLAN, M.J. Serotonin 5-HT_{2C} receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies. **Therapie** 2005; 60:441-460.

MULLER, M.B. Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. **Nat Neurosci** 2003; 6:1100-1107.

NESTLER, E.J.; BARROT, M.; DILEONE, R.J.; EISCH, A.J.; GOLD, S.J.; MONTEGGIA, L.M. Neurobiology of depression. **Neuron** 2002; 34:13–25.

ONAKA, T.; YAGI, K. Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in neuroendocrine and behavioral responses to fear-related stimuli in rats. **Brain Res** 1998; 788:287– 293.

PÊGO, J.M.; MORGADO, P.L.G.; CERQUEIRA, J.J., ALMEIDA, O.F.X.; SOUSA, N. Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. **Eur J Neurosci** 2008; 27:1503-1516.

PELLOW, S.; CHOPIN, M. The effect os putative anxiogenic compounds (FG 7142, CGS 8216 and Ro 15-1788) on the rat corticosterone response. **Physiol Behav** 1985; 35:587-590.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory acitivity in an elevated plus maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem Behav** 1986; 24:525-529.

PERSSON, E.; JANSSON, T. Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. **Acta Physiol Scand** 1992; 145(2):195-196.

PRENTICE, A.M. Can maternal dietary supplements help in preventing infant malnutrition? **Acta Paediatr Scand** 1991; Suppl.374:67-77.

PREWITT, C.M.F.; HERMAN, J.P. Anatomical interactions between the central amygdaloid nucleus and the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat—a dual tract-tracing analysis. **J Chem Neuroanat** 1998; 15:173-185.

RICE, D.; BARONE, S.JR. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environ Health Perspect** 2000;108 (Suppl 3):511-533.

SAAVEDRA, J.M.; BENICKY, J.; ZHOU, J. Angiotensin II: multitasking in the brain. **J Hypertens Suppl** 2006; 24(1):S131-137.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions, **Rev Endocr** 2000; 21:55–89.

SCHULKIN, J.; GOLD, P.W.; MCEWEN, B.S. Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. **Psychoneuroendocrinology** 1998; 23(3):219-243.

SCHULKIN, J.; MCEWEN, B.S.; GOLD, P.W. Allostasis, amygdala, and anticipatory angst. **Neurosci Biobehav Rev** 1994; 18:385-396.

SECKL, J.R. Physiologic programming of the fetus. **Clin Perinatol** 1998; 25: 939–964.

SHOLL, D.A. The measurable parameters of the cerebral cortex and their significance in its organization. **Prog Neurobiol** 1956; 2:324–333.

SLOTKIN, A.; KREIDER, M.L.; TATE, C.A.; SEIDLER, F.J. Critical prenatal and postnatal periods for persistent effects of dexamethasone on serotonergic and dopaminergic systems. **Neuropsychopharmacology** 2006; 31(5):904-911.

STEWART, P.M.; WHORWOOD, C.B.; MASON, J.I. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1995; 55(5-6):465-471

STOUT, S.C.; MORTAS, P.; OWENS, M.J.; NEMEROFF, C.B.; MOREAU, J. Increased corticotropin-releasing factor concentrations in the bed nucleus of the stria terminalis of anhedonic rats. **Eur J Pharmacol** 2000; 401(1):39-46.

TROMBINI, T.V.; PEDROSO, C.G.; PONCE, D.; ALMEIDA, A.A.; GODINHO, A.F. Developmental lead exposure in rats: is a behavioral sequel extended at F2 generation? **Pharmacol Biochem Behav** 2001; 68:743-751.

ULRICH-LAI, Y.M.; HERMAN, J.P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nat Rev Neurosci** 2009; 10:397-409.

UPHOUSE, L. Multiple serotonin receptors: too many, not enough, or just the right number? **Neurosci Biobehav Rev** 1997; 21(5):679-698.

UYLINGS, H.B.M.; VAN, P.J. Measures for quantifying dendritic arborizations. **Network: comput neural syst** 2002 13:397-414

VYAS, A.; BERNAL, S.; CHATTARJI, S. Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. **Brain Res** 2003; 965(12):290-294.

VYAS, A.; MITRA, R.; SHANKARANARAYANA, R.B.S.; CHATTARJI, S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **Neurosci** 2002; 122(15):6810-6818.

WADDELL, J.; MORRIS, R.W.; BOUTON, M.E. Effects of bed nucleus of the stria terminalis lesions on conditioned anxiety: aversive conditioning with long-duration conditional stimuli and reinstatement of extinguished fear. **Behav Neurosci** 2006; 120(2):324-336

WALKER, D.L.; MILES, L.A.; DAVIS, M. Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 2009; 33(8):1291-1308.

WALKER, D.L.; DAVIS, M. Role of the extended amygdala in short-duration versus sustained fear: a tribute to Dr. Lennart Heimer. **Brain Struct Funct** 2008; 213(1-2):29-42.

WALKER, D.L.; TOUFEXIS, D.J.; DAVIS, M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. **Eur J Pharmacol** 2003; 463:199– 216

WATTS, A.G.; SANCHEZ-WATTS, G. Region-specific regulation of neuropeptide mRNAs in rat limbic forebrain neurones by aldosterone and corticosterone. **J Physiol** 1995; 484:721-736.

WEINSTOCK, M.; MATLINA, E.; MAOR, G.I.; ROSEN, H.; MCEWEN, B.S. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. **Brain Res** 1992; 595(2):195-200.

WELBERG, L.A.; SECKL, J.R. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. **J Neuroendocrinol** 2001; 13: 113-128.

WELBERG, L.A.M.; SECKL, J.R.; HOLMES, M.C. Inhibition of 11b-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. **Eur J Neurosci** 2000; 12:1047-1054.

WELLER, K.L.; SMITH, D.A. Afferent connections to the bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Res** 1982; 232: 255-270

WELLMAN, C.L. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. **J Neurobiol** 2001; 49(3):245-253.

WILLIAMS, S.; GEORGE, I.M.; SILVA, P.A. Intrauterine growth retardation and blood pressure at age seven and eighteen. **J Clin Epidemiol.** 1992; 45:1257-1263.

WOODALL, S.M.; JOHNSTON, B.M.; BREIER, B.H.; GLUCKMAN, P.D. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. **Pediatr Res** 1996; 40: 438-443.

ZIFA, E.; FILLION, G. 5-Hydroxytryptamine receptors. **Pharmacol Rev** 1992; 44(3):401-58.

ZHU, W.; UMEGAKI, H.; SUZUKI, Y.; MIURA, H.; IGUCHI, A. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in hippocampal cholinergic system-mediated activation of the hypothalamo – pituitary – adrenocortical axis in rats. **Brain Res** 2001; 916:101-106.

8. Apêndice



**GESTACIONAL PROTEIN RESTRICTION TRIGGERS HYPERANXIETY IN
ADULTHOOD DUE TO CHANGES IN THE BED NUCLEUS OF STRIA THE
TERMINALIS (BNST)**

D. B. Torres¹, A. Lopes¹, A.J. Rodrigues⁴, J.J Cerqueira⁴, J.M Pêgo⁴, A.F. Godinho², J.A.R. Gontijo³, N. Sousa⁴ and P.A. Boer¹

¹Fetal Programming Laboratory, Department of Morphology and ²Toxicology Centre of Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil; ³Hydro-saline Metabolism Laboratory, Nucleus of Medicine and Experimental Surgery, Medicine Clinic Department, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ⁴Life and Health Sciences Research Institute, School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal.

Correspondence address:

Patrícia Aline Boer, BSC, PhD, Department of Morphology, Botucatu Bioscience Institute, UNESP- São Paulo State University, 18600-000 Botucatu, SP, Brazil

Phone: +55 14 3811-6264 R118

E-mail: alineboer@yahoo.com.br

ABSTRACT

Exposure to gestational stressors is known to triggers programming brain effects, namely in the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, that may predispose to disorders in adulthood. The bed nucleus of the stria terminalis (BNST) is located in a key position to regulate the HPA axis and the stress response and has been implicated in anxiety behavior. Evidence suggests that this brain region is highly plastic and responsive to deleterious stimuli in terms of neuronal morphology. Herein, we performed a multimodal analysis of the BNST of adult rats submitted to protein restriction *in utero*. We found an impoverished dendritic arborization in BNST neurons, in parallel enhanced anxiety-like behavior and elevated plasmatic corticosterone levels, in rats submitted to gestational protein restriction. With respect to proteins studied we observed increased activity of signaling cascades that trigger anxiety behavior and parallel reduction in the activity of cascades that induce anxiolytic behavior that may underlie the increase in anxiety-like behavior. This work represents the first demonstration that BNST is “programmed” by gestational protein restriction, resulting in fine structural changes and neurochemical adaptations of these brain region that constitute potential underlying causes of the altered behavioral states.

Keywords: fetal programming; gestational protein restriction; bed nucleus of the stria terminalis; anxiety; hypothalamic-pituitary-adrenal axis

A growing body of evidence supports the hypothesis that disturbances during critical periods of fetal development may determinate permanent structural and functional alterations in organs and systems and predispose individuals to metabolic, endocrine, and cardiovascular diseases later in life (Ashton 2000; Barker 1998; Lesage et al. 2006; O'Regan et al. 2004; Plagemann 2004; Seckl 2004). Gestational psychological and nutritional stresses may be involved with pathological fetal programming as shown in several experimental models (Woodall et al. 1996; Godfrey et al. 1996; Langley-Evans et al. 1996; Mesquita et al. 2010a; 2010b). Although the precise underlying mechanisms are still unclear, maternal undernutrition and hormonal deregulation have both been proposed to induce intrauterine fetal programming. During normal pregnancy, the fetus is protected from the higher maternal glucocorticoid (GC) levels by placental 11- β HSD2, which efficiently inactivates corticosterone to 11-dehydrocorticosterone in rodents. In the low-protein diet (LP) model it has been demonstrated a decreased activity and expression of this placental enzyme and, as a consequence, there is an excessive exposure of fetuses to maternal steroids (Benediktsson et al. 1993; Stewart et al. 1995; Langley-Evans et al. 1996; Langley-Evans 1997).

The brain is extremely sensitive to gestational programming and many neuro-humoral factors such as steroids, transcriptional factors and nutritional availability can permanently affect neural development (Welberg and Seckl 2001; Matsumoto 1991). Among the neural structures, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis has been demonstrated to be particularly susceptible to the programming effects of gestational stressors (for a review see Darnaudéry and Maccari 2008). Recently, Oliveira et al. (2011) have demonstrated that antenatal glucocorticoids can modulate anxiety and fear behavior,

in parallel to bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and amygdala morphological, neurochemical and molecular changes. BNST mediates anxiety-like behavior in animals and humans (Walker and Davis 2008; Straube et al. 2007; Duvarci et al. 2009; Pêgo et al. 2008); in addition, by modulating corticotrophin-releasing factor (CRF)-expressing neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN), the BNST plays a direct role in the regulation of HPA axis (Dunn 1987; Herman et al. 1994). Thus, in the present study, we aim to analyze the structure and function of the BNST in adult animals exposed to gestational protein restriction to search for programming effects in this brain region that is implicated in both the control of the HPA axis and in anxiety behavior.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals - The experiments were conducted on age-matched, female offspring of sibling-mated Wistar Hannover rats (250-300 g) allowed free access to water and normal rat chow. The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation. Our local colonies originated from a breeding stock supplied by CEMIB/Unicamp, Campinas, SP, Brazil. Immediately after weaning at 3 weeks of age, animals were maintained under controlled temperature (25°C) and lighting conditions (0700h-1900h), with free access to tap water and standard rodent laboratory chow (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) and followed up to 12 weeks of age. The dams were maintained on isocaloric standard rodent laboratory (with normal protein content [NP], 17% protein) or low protein content ([LP] 6% protein) chow *ad libitum* intake throughout the entire pregnancy. The day that sperm were seen in the vaginal smear was designated as day 1 of pregnancy. All groups returned to the NP chow intake after delivery. Food consumption was determined every day (subsequently

normalized for body weight), and body weight was recorded once a week. The male pups were weighted and ano-genital distance (AGD) measured. These animals were followed and maintained with normal chow until 16 week old. Rats from the NP (n=13 rats from different mothers) and LP (n=12 rats from different mothers) groups were used for behavioral analysis. Following the behavioral tests, animals were deeply anaesthetized with a mixture of ketamine (75 mg/kg body weight, i.p.) and xylazine (10mg/kg body weight, i.p.) and the level of anesthesia was controlled by monitoring the corneal reflex. The rats were perfused transcardially with saline (0.9%) for 15 min, under constant pressure, for Golgi–Cox staining.

2.2. Behavioral analysis

2.2.1. Open field test

Animals were individually tested for 5 min each in an open-field arena (43.2 x 43.2 cm) that had transparent acrylic walls and a white floor (model ENV-515; Med Associates Inc.). Each subject was initially placed in the centre of the arena and horizontal activity and instant position were registered, using a system of two 16-beam infrared arrays connected to a computer. Total distances were used as indicators of locomotor activity. Times and distances in the predefined central and peripheral areas were recorded and used to calculate the ratio of time spent in the central area over total time of the trial, and distance travelled in the central as a function of total area. Number and duration of rearing were recorded. The test room was illuminated with bright white light.

2.2.2. Elevated plus maze (EPM)

Animals were tested over 5 min in the EPM, a black polypropylene ‘plus’-shaped maze (ENV-560; Med Associates Inc, St Albans, VT 05478, USA) at a height of 72 cm above the floor. The maze consisted of two facing open arms (50.8 x 10.2 cm) and two closed arms (50.8 x 10.2 x 40.6 cm). Testing was performed under bright white light. The times spent in the open arms, junction area and closed arms, as well as the number of entrances and explorations in each section, were recorded using a system of infrared photo beams, the crossings of which were monitored by computer. The times spent in each of the compartments of the EPM are presented as percentages of the total duration of the trial.

2.3. Histological procedures

Brains from animals that had been transcardially perfused with 0.9% saline and were processed for Golgi–Cox staining according to a published protocol (Gibb and Kolb 1998). Briefly, brains were removed and immersed in Golgi–Cox solution (a 1 : 1 solution of 5% potassium dichromate and 5% mercuric chloride diluted 4 : 10 with 5% potassium chromate (Glaser and Van der Loos 1981) for 14 days; brains were then transferred to a 30% sucrose solution (3 days) before being cut on a vibratome. Coronal sections (200 µm thick) were collected in 6% sucrose and blotted dry onto gelatin-coated microscope slides. They were subsequently alkalinized in 18.7% ammonia, developed in Dektol (Kodak, Linda-Velha, Portugal), fixed in Kodak Rapid Fix (prepared to manufacturer’s instructions), dehydrated through a graded series of ethanol’s, and cleared in xylene before being mounted and cover slipped. Slides were coded before morphometric analysis in both sets.

2.3.1. Dendritic tree analysis

Three-dimensional reconstructions of representative Golgi-impregnated neurons from the BNST were made. The criteria used to select neurons for reconstruction were as follows: (i) full impregnation of the neurons along the entire length of the dendritic tree; (ii) dendrites without significant truncation of branches; (iii) relative isolation from neighboring impregnated neurons to avoid interference with the analysis; and (iv) no morphological changes attributable to incomplete dendritic impregnation of Golgi–Cox stain. For each selected neuron, all branches of the dendritic tree and the location of all dendritic spines were reconstructed at 600x magnification, using a motorized microscope (Carl Zeiss Axioplan 2, with oil immersion objectives), attached to a camera (DXC-390; Sony Co., Japan) and Neurolucida software (MicroBrightField, VT, USA). Three-dimensional analysis of the reconstructed neurons was performed using NeuroExplorer software (MicroBrightField). In each brain, 10-13 neurons were studied; as a result in this study we have analyzed 94 BNST neurons. Several aspects of dendritic morphology were examined. To assess overall changes, total dendritic length and number of dendrites were compared between groups.

2.4. Corticosterone levels

Blood samples of NP and LP 16 week old male rats were collected by tail venipuncture at 8:00 am for the assessment of basal morning time serum CORT levels. CORT concentrations were assayed by a double antibody RIA method specifically for rats, using a commercial kit (kit de ImmnuChem Rie). The coefficient of variation (CV) of test is 7.5%. The analytical Sensitivity is 5 ng/mL and the functional sensitivity is 25 ng/mL with CV of intermediate precision of 20%.

2.5. Western Blot – Sixteen-week-old male rats from the NP (n=3) and LP (n=3) groups were used. After euthanasia by cervical dislocation, the BNST was removed, minced coarsely and homogenized immediately in 10 volumes of solubilization buffer (10 ml/L Triton-X 100, 100 mmol/L Tris[hydroxymethyl]amino-methane (Tris) pH 7.4, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF) and 0.1 mg/ml aprotinin at 4°C, using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA) operated at maximum speed for 20 s. The tissue extracts were centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 40 min, and the supernatants used as sample. Protein quantification was performed using the Bradford method. For quantitation, both tissue and total extract samples (250µg protein) were subjected to SDS-PAGE. After electrophoresis separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then blotted with specific antibody. The samples were treated with Laemmli buffer containing 100 mmol/l dithiothreitol (DTT), heated in a boiling water bath for 4 min and subjected to 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a Bio-Rad minigel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad). Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membranes was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean). The non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2 h at 22°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated at 4°C overnight with primary antibodies against 11β-HSD2, glucocorticoid (GR) and mineralocorticoid receptor (MR), angiotensin type 1 receptor (AT1), 5HT receptors (5HT_{1A} and 5HT_{2A}), CRF and

receptor (CRF1), diluted in blocking buffer (3% non-fat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). Then, the nitrocellulose membranes were incubated in peroxidase conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were detected using the enhanced chemiluminescence method (RPN 2108 ECL Western blotting analysis system; Amersham Biosciences) and were detected by Imagequant 350.

2.6. Data presentation and statistical analysis

All data are reported as means $\pm$ SEM. Data obtained over time were analyzed using appropriate ANOVA or Kruskal–Wallis one-way analysis of variance. *Post hoc* comparisons between selected means were made by Bonferroni's contrast test when initial ANOVA indicated statistical differences between experimental groups. Comparisons involving only two samples of independent observations tend within or between groups were made using a Student's or Mann–Whitney *U* tests. A *P* value < 0.05 was considered to indicate significance. Images of the developed autoradiographs were scanned (Epson Stylus 3500) and band intensities were quantitated by optical densitometry (Scion Image Corporation). The Tukey–Kramer test for multiple comparisons was used for analysis. The level of significance was set at $P \leq 0.05$.

3. RESULTS

3.1. Gestational low protein diet affect birth weight but not adult body and brain weights

The birth weight of the LP male pups was significantly reduced when compared to NP male pups ($p= 0.006$; Fig. 1a). However, differences in body weight (LP vs. NP offspring) were abolished with increasing maturity (Fig. 1b) and by the time animals were analyzed there were no significant changes in body weight. The weight of brains, corrected for body weight, were not different in 16-wk old LP rats when compared to NP (LP= 0.56 ± 0.02 g, $n=25$ vs. NP= 0.53 ± 0.037 g, $n=16$ $p= 0.39$).

3.2. Gestational low protein diet triggers an anxiety phenotype in adulthood

The analysis of the number of open (LP: 2.7 ± 0.7 vs. NP: 3.8 ± 0.4 , $p= 0.2$) and close (LP: 8 ± 0.6 vs. NP: 9 ± 0.5 , $p= 0.2$) arms entries did not reveal significant differences between experimental groups (Fig. 2a). However, the progeny of mothers with LP diet displayed a significant reduction of time in the open arms as compared with NP animals (LP: 31.62 ± 8.45 vs. NP: 57.68 ± 6.85 , $p= 0.02$; Fig. 2b).

Locomotion, as well as other parameters tested in the Open field at 16 week old rats, were not significantly different between NP and LP for all parameters analyzed (Table1).

3.3. Gestational low protein diet triggers dendritic atrophy in BNST neurons

Dendritic tree analysis showed significant reduction in dendritic length in BNST neurons of rats from LP group when compared with NP (LP $637.8 \mu\text{m} \pm 37.3$, $n=45$ vs. NP $763.0 \mu\text{m} \pm 50.02$, $n=47$, $p=0.04$) (Fig. 3a). Sholl analysis revealed a significant reduction of dendritic intersections between 170 and 320 μm from the perikarya (NP $1,64 \pm 0,39$ vs. LP $1,34 \pm 0,12$; $p=0,007$) in LP when compared with that observed in NP (Fig. 3b).

3.4. Gestational low protein diet effect on CORT levels in Adulthood

Basal diurnal CORT determinations reveal significant differences among groups (Fig. 4), with LP animals displaying higher CORT levels in adulthood rats when compared to NP rats (NP=78.58 ± 17.89, n=6 vs. LP183.1 ± 34.86, n=5, p=0.02).

3.5. Western blot analysis

Western blot analysis in isolated BNST from male offspring of NP and LP revealed that the levels of GR and AT1 in LP animals was 31 and 64% higher when compared to that of the NP group (Fig. 5). In contrast, the levels of 11β-HSD2 (33%), MR (70%), 5HT1A (27%) and CRF1 (84%) were reduced in the BNST of LP rats (Fig. 5). The levels of 5HT_{2A} and CRF were not different among the experimental groups (Fig. 5).

4. DISCUSSION

Numerous studies have established that several different prenatal and postnatal manipulations could program HPA axis function in adult animals (Kapoor et al. 2006). The concept of fetal programming suggests that the fetus is programmed *in utero* to develop a number of adult diseases, including cardiovascular, metabolic and neuropsychiatric diseases (Ashton 2000; Markham and Koenig 2011). The occurrence of nutritional deficiency, especially due to the reduction of protein intake, during the critical period of brain development, results in multiple morphologic, and neurochemical changes in the central nervous system besides behavioral changes (Morgane et al. 1993; 2002; Strupp and Levitsky 1995). In the current study, we confirm previous findings showing a significant reduced body mass at birth in the gestational restricted-protein model. However, beyond the

sixth week of age the body mass of both groups was similar. We also did not find differences in the brain weight of LP rats when compared to NP offspring at 16 weeks-of-age.

The BNST is a rostral forebrain structure recognized as an important relay station that links the amygdala and hippocampus with the PVN and brain stem regions (Herman et al. 1994; Pacak et al. 1995; Davis et al. 1997); it also receives projections from the perifornical area of the hypothalamus (Allen and Cechetto 1993). This location and pattern of connectivity endows the BNST with an important role in the stress response. Stimulation of this hypothalamic area mimics stress-induced neuroendocrine and autonomic responses, i.e. elevation of blood pressure, heart rate, plasma norepinephrine, and epinephrine (Allen and Cechetto 1993; Stoddard et al. 1986a; b).

The behavioral characterization of anxiety-like behavior in the adult progeny of mothers exposed to LP diet during gestation revealed a hyperanxious phenotype. Given the role of the BNST in determining anxiety behavior (Davies et al. 1997; Pêgo et al. 2008), we underwent a 3D morphometric analysis of dendritic arborizations in this brain region. A significant atrophy of the dendritic arborization of BNST neurons, with reduction of 16% in dendritic intersections and length neurons as demonstrated by Golgi Cox technique was found in the LP group compared to NP rats of same age. Interestingly, this variation goes opposite to the one observed in the BNST of chronically stressed rats. Studies of chronic gestational exposure to stressors, such as pharmacological doses of corticosterone treatment or nutritional stress, promotes changes in the BNST plasticity (Fameli et al. 1994; Hammack et al. 2010) associated to increased plasma corticosterone levels in offspring. The same was observed in the present study. These findings are in line with several studies showing elevated basal corticosterone levels in prenatal stress rats (Takahashi et al. 1998;

Stöhr et al. 1998) up until weaning, whereas others found no effect of prenatal stress on basal corticosterone (Fride et al. 1986; Peters 1982; Henry et al. 1994). The chronic stress has been linked to increased BNST volume and dendritic length (Pêgo et al. 2008), while chronic immobilization increased neurons dendritic branches (Vyas et al. 2002; 2003). On the other hand, Wellman (2001) found that the injection of corticosterone on adult rats daily for 3 weeks promoted reorganization of dendritic arborization and reduction in length of distal post-synaptic neurons in the prefrontal cortex. However, while the latter studies were done in animals exposed to stress in adulthood, in the current study, the exposure to a stressor occurred during gestation. Curiously, similar contrasting findings were observed in the nucleus accumbens of animals exposed to prenatal vs. adult exposure to high GCs (Rodrigues et al. 2011). To the best of our knowledge, there is no prior ontogenetic description of BNST plasticity in this experimental model.

Importantly, the levels of circulating corticosteroids have been shown to induce altered emotional behavior, namely increased anxiety. We and others have been demonstrated that protein restriction in pregnant rat program elevated levels of plasma glucocorticoid in adulthood (Langley-Evans et al. 1996). In the fetal life, this hormone may penetrate the blood brain barrier and act on MR and CR receptors found in BNST neurons, resulting in dendritic atrophy (Vyas 2003) and how will be discussed later, increases the anxiety response (Shepard 2009).

Nutritional stress in adult offspring caused a persistent increase in the number of neurons expressing CRF, and this peptide is known to promote spine and dendrite loss (Chen et al. 2008). While the mechanisms by which early-life stress enhances CRF expression in central nervous system are not fully understood, seems that CRF mRNA neurons expression in immature rats is augmented by glucocorticoids (Brunson et al. 2001),

and plasma levels of the latter were chronically elevated during the period of early-life stress (Avishai-Eliner et al. 2001). In the present study, we found a striking reduction of BNT MR and CRF receptors associated to increased GR expression in adult LP offspring compared to control. Also, we showed in gestational protein-restricted offspring unchanged CRF expression in BNST. We may hypothesized that involvement of glucocorticoid in the mechanisms by which nutritional early-life stress causes BNST defects could be related to MR and GR expression. Studies have shown that gestational exposure to dexamethasone upregulates GR mRNA in the amygdale (Nyirenda et al. 1998) and permanently influence developing monoaminergic and other neurotransmitter systems (Muneoka et al. 1997). These in turn regulate brain GR and MR expression (Maccari et al. 1992; Kabbaj et al. 1995; Kabbaj et al. 1996) as well as a host of other systems. It has been defined that the expression of mRNA for MR and GR is tissue specific (Diaz 1998). Noticeably, the increased levels of systemic and local (by decreased 11-HSD2 observed) corticosterone, along with an altered GR/MR ratio, in favor of the former, is likely to be of relevance for the increase in anxiety behavior observed in LP group when compared to NP offspring. Our protein analysis has also revealed an increase in the levels of AT1 receptors in the BNST. These findings are in accordance with studies demonstrating AT1 receptor increase in response to repeated immobilization stress (Aguilera et al. 1995a; Kiss 2001). Importantly, AT1 receptor stimulation increases CRF synthesis and release into the hypothalamic portal system leading to stimulation of pituitary ACTH and increased corticosterone production (Jezova 1998; Aguilera et al. 1995b). In turn, increased corticosterone plasma levels are known to promote AT1 receptor expression through stimulation of GC response elements in the receptor promoter region (Aguilera et al. 1995a), thus closing a relevant vicious cycle in adult LP offspring.

A note to mention that in parallel with the increased activity of signaling cascades that trigger anxiety behavior, there is a parallel reduction in the activity of cascades that induce anxiolytic behavior, namely through the decreased levels of MR and 5HT_{1A}. Hammack et al. (2009) showed that 49% of BNST neurons respond to exogenous serotonin (5-HT) with a mixed inhibitory/excitatory response, being the former predominant. Serotonin and the CRF have been implicated in the molecular underpinnings of anxiety disorders. In our study, the BNST expression of 5-HT_{1A} receptor was downregulated (about 27%) in LP offspring when compared to NP group. Serotonin modulates behavioral responses to novelty and threat (Aloyo and Dave 2007). Drugs with anxiolytic properties, act, at least in part, by blocking the activation of the serotonin 5-HT_{2A} receptor (Marek 2008), have reduced anxiety-like behaviors. These observations suggest that serotonin, particularly by the 5-HT_{2A} receptor, is important in the etiology of anxiety, conversely, the 5-HT_{1A} receptors has anxiolytic effect. Thus, the gestational protein restriction could promote reduced dendritic length and arborization presumably associated to loss of dendritic-ends and excitatory synapses.

In the present study, the LP as well as NP rats spent more time exploring the novelty of the center area demonstrating usual and similar anxiety-like behavior. However, in the elevated plus-maze, LP offspring tend to avoid the open areas, especially when they are brightly lit. The increased in protect-arm activity reflects more anxiety-like behavior. The present study also found that the latency to enter open arms, in the plus-maze test, suggested an exacerbate anxiety related behaviors. Together, we may hypothesize that BNST neurons of maternal undernourished LP offspring, throughout fetal life, could be exposed to high levels of CRF, and these levels might suffice to stunt dendritic arborization in association with observed adult anxiety-like behavior. Conversely, the high fetal levels

of CRF may promotes, in adult life, counterregulatory downregulation of the CRF receptors, looking to mitigate the dendritic atrophy and anxiogenic response in LP offspring. In this scenario, decreasing CRF receptor occupancy might interfere with the mechanisms of corticosterone overstimuli, consistent with previously demonstrated cross-regulation of CRF and its receptors (e.g., Bale et al. 2000; Brunson et al. 2002).

This work represents the first demonstration that BNST is programmed by gestational protein restriction indicating fine structural changes and neurochemical adaptations as potential underlying causes of the altered behavioral states. A better knowledge of these events is of paramount importance to determine therapeutic interventions that might mitigate, at least in part, such behavioral impairments.

Acknowledgments: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. 05/54362-4 and 10/52696-0), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual Paulista.

5. REFERENCES

- Aguilera G, Kiss A, Luo X (1995a) Increased expression of type 1 angiotensin II receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus following stress and glucocorticoid administration. *J Neuroendocrinol* 7(10):775-783.
- Aguilera G, Young WS, Kiss A, Bathia A (1995b) Direct regulation of hypothalamic corticotropin-releasing-hormone neurons by angiotensin II. *Neuroendocrinology* 61(4):437-444.
- Allen GV, Cechetto DF (1993) Functional and anatomical organization of cardiovascular pressor and depressor sites in the lateral hypothalamic area. II. Ascending projections. *J Comp Neurol* 330:421–438.
- Aloyo VJ, Dave KD (2007) Behavioral response to emotional stress in rabbits: role of serotonin and serotonin2A receptors. *Behav Pharmacol* 18(7):651-659.
- Ashton N (2000) Perinatal development and adult blood pressure. *Braz J Med Biol Res* 33(7):731-40.
- Avishai-Eliner S, Eghbal-Ahmadi M, Tabachnik E, Brunson KL, Baram TZ (2001) Down-regulation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid (mRNA) precedes early-life experience-induced changes in hippocampal glucocorticoid receptor mRNA. *Endocrinology* 142(1):89-97.
- Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, Koob GF, Vale WW, Lee KF (2000) Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 24(4):410-4.
- Barker DJP (1998) In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* 95:115–128.

- Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR (1993) Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 341: 339-341.
- Brunson KL, Grigoriadis DE, Lorang MT, Baram TZ (2002) Corticotropin-releasing hormone (CRH) downregulates the function of its receptor (CRF1) and induces CRF1 expression in hippocampal and cortical regions of the immature rat brain. *Exp Neurol* 176(1):75-86.
- Chen Y, Dubé CM, Rice CJ, Baram TZ (2008) Rapid loss of dendritic spines after stress involves derangement of spine dynamics by corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 28(11):2903-11.
- Darnaudéry M, Maccari S (2007) Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Res Rev* 57(2):571-85.
- Davis M, Walker DL, Lee Y (1997) Roles of the amygdale and bed nucleus of the stria terminalis in fear and anxiety measured with the acoustic startle reflex. Possible relevance to PTSD. *Ann NY Acad Sci* 821:305–331.
- Diaz R, Brown RW, Seckl JR (1998) Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J Neurosci* 18(7):2570-2580.
- Dunn JD (1987) Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res* 407(2):327-31.
- Duvarci S, Bauer EP, Paré D (2009) The bed nucleus of the stria terminalis mediates inter-individual variations in anxiety and fear. *J Neurosci* 29(33):10357-61.

- Fameli M, Kittraki E, Stylianopoulou F (1994) Effects of hyperactivity of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during pregnancy on the development of the HPA axis and brain monoamines of the offspring. *Int J Dev Neurosci* 12(7):651-9.
- Fride E, Dan Y, Feldon J, Halevy G, Weinstock M (1986) Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. *Physiol Behav* 37(5):681-7.
- Gibb R, Kolb B (1998) A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain. *J Neurosci Methods* 31;79(1):1-4.
- Glaser EM, Van der Loos H (1981) Analysis of thick brain sections by obverse-reverse computer microscopy: application of a new, high clarity Golgi-Nissl stain. *J Neurosci Methods* 4(2):117-25.
- Godfrey K, Robinson S, Barker DJ, Osmond C, Cox V (1996) Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *BMJ* 312(7028):410-4.
- Hammack SE, Roman CW, Lezak KR, Kocho-Shellenberg M, Grimmig B, Falls WA, Braas K, May V (2010) Roles for pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) expression and signaling in the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) in mediating the behavioral consequences of chronic stress. *J Mol Neurosci* 42(3):327-40.
- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S (1994) Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol* 6(3):341-5.
- Herman JP, Cullinan WE, Watson SJ (1994) Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol* 6:433-442.

- Jezova D, Ochedalski T, Kiss A, Aguilera G (1998) Brain angiotensin II modulates sympathoadrenal and hypothalamic pituitary adrenocortical activation during stress. *J Neuroendocrinol* 10(1):67-72.
- Kabbaj M, Le Moal M, Maccari S (1996) Hippocampal type I and type II corticosteroid receptors are differentially regulated by chronic prazosin treatment. *Neuroscience* 73(4):963-70.
- Kabbaj M, Piazza PV, Simon H, Le Moal M, Maccari S (1995) Opposite effects on hippocampal corticosteroid receptors induced by stimulation of beta and alpha 1 noradrenergic receptors. *Neuroscience* 66(3):539-45.
- Kapoor A, Dunn E, Kostaki A, Andrews MH, Matthews SG (2006) Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J Physiol* 572(Pt 1):31-44.
- Kiss A, Jurkovicova D, Jezova D, Krizanova O (2001) Changes in angiotensin AT1 receptor mRNA levels in the rat brain after immobilization stress and inhibition of central nitric oxide synthase. *Endocr Regul* 35(2):65-70.
- Langley-Evans SC (1997) Maternal carbenoxolone treatment lowers birthweight and induces hypertension in the offspring of rats fed a protein-replete diet. *Clin Sci (Lond)* 93(5):423-9.
- Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA et al. (1996) Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* 17: 169-172.
- Lesage J, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, Vieau D (2006) Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal axis in mammals. *Stress* 9:183–198.

- Maccari S, Piazza PV, Rouge-Pont F, Angelucci L, Simon H, le Moal M (1992) Noradrenergic regulation of type-I and type-II corticosteroid receptors in amygdala and hypothalamus. *Brain Res* 587(2):313-8.
- Marek GJ (2008) Cortical 5-hydroxytryptamine_{2A}-receptor mediated excitatory synaptic currents in the rat following repeated daily fluoxetine administration. *Neurosci Lett* 438(3):312-316.
- Markham JA, Koenig JJ (2011) Prenatal stress: role in psychotic and depressive diseases. *Psychopharmacology (Berl)* 214(1):89-106.
- Matsumoto A (1991) Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain. *Psychoneuroendocrinology*. 16(1-3):25-40.
- Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA (2010a) Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* 25(2):380-8.
- Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA (2010b) Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res* Nov;43(11):1010-8.
- Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR (1993) Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 17(1):91-128.
- Morgane PJ, Mokler DJ, Galler JR (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neurosci Biobehav Rev* 26(4):471-83.
- Muneoka K, Ogawa T, Kamei K, Muraoka S, Tomiyoshi R, Mimura Y, Kato H, Suzuki MR, Takigawa M (1997) Prenatal nicotine exposure affects the development of the central serotonergic system as well as the dopaminergic system in rat offspring:

- involvement of route of drug administrations. *Brain Res Dev Brain Res* 18;102(1):117-26.
- Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A, Seckl JR (1998) Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest* 101(10):2174-81.
- O'Regan D, Kenyon JC, Seckl JR, Holmes MC (2004) Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am J Physiol* 287: 863–870.
- Oliveira M, Rodrigues AJ, Leão P, Cardona D, Pêgo JM, Sousa N (2011) The bed nucleus of stria terminalis and the amygdala as targets of antenatal glucocorticoids: implications for fear and anxiety responses. *Psychopharmacology (Berl)* 2011 Sep 21 (in press)
- Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS (1995) Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: In vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol* 16:89–150.
- Pêgo JM, Morgado P, Pinto LG, Cerqueira JJ, Almeida OF, Sousa N (2008) Dissociation of the morphological correlates of stress-induced anxiety and fear. *Eur J Neurosci* 27(6):1503-16.
- Peters DA (1982) Prenatal stress: effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone levels. *Pharmacol Biochem Behav* 17(4):721-5.
- Plagemann A (2004) 'Fetal programming' and 'functional teratogenesis': on epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *J Perinat Med* 32:297–305.

- Rodrigues AJ, Leão P, Pêgo JM, Cardona D, Carvalho MM, Oliveira M, Costa BM, Carvalho AF, Morgado P, Araújo D, Palha JA, Almeida OF, Sousa N (2011) Mechanisms of initiation and reversal of drug-seeking behavior induced by prenatal exposure to glucocorticoids. *Mol Psychiatry* Oct 4. doi: 10.1038/mp.2011.126.
- Seckl JR (2004) Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinology* 151:49–62.
- Shepard JD, Chambers CO, Busch C, Mount A, Schulkin J (2009) Chronically elevated corticosterone in the dorsolateral bed nuclei of stria terminalis increases anxiety-like behavior. *Behav Brain Res* 203(1):146-149.
- Stewart PM, Whorwood CB, Mason JI (1995) Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55(5-6):465-71.
- Stoddard SL, Bergdall VK, Townsend DW, Levin BE (1986a) Plasma catecholamines associated with hypothalamically- elicited defense behavior. *Physiol Behav* 36:867–873.
- Stoddard SL, Bergdall VK, Townsend DW, Levin BE (1986b): Plasma catecholamines associated with hypothalamically- elicited flight behavior. *Physiol Behav* 37:709–715.
- Stöhr T, Schulte Wermeling D, Szuran T, Pliska V, Domeney A, Welzl H, Weiner I, Feldon J (1998) Differential effects of prenatal stress in two inbred strains of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 59(4):799-805.
- Straube T, Mentzel HJ, Miltner WH (2007) Waiting for spiders: brain activation during anticipatory anxiety in spider phobics. *Neuroimage* 37(4):1427-36.
- Strupp BJ, Levitsky DA (1995) Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal. *J Nutr* 125(8):2221S-2232S.

- Takahashi LK, Turner JG, Kalin NH (1998) Prolonged stress-induced elevation in plasma corticosterone during pregnancy in the rat: implications for prenatal stress studies. *Psychoneuroendocrinology* 23(6):571-81.
- Vyas A, Bernal S, Chattarji S (2003) Effects of chronic stress on dendritic arborization in the central and extended amygdala. *Brain Res* 965(1-2):290-4.
- Vyas A, Mitra R, Shankaranarayana Rao BS, Chattarji S (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 22(15):6810-8.
- Walker DL, Davis M (2008) Role of the extended amygdala in short-duration versus sustained fear: a tribute to Dr. Lennart Heimer. *Brain Struct Funct.* 213(1-2):29-42.
- Welberg LA, Seckl JR (2001) Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of the brain. *J Neuroendocrinol* 13(2):113-28.
- Wellman CL (2001) Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol* 49(3):245-53.
- Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD (1996) Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* 40(3):438-43.

FIGURE LEGENDS

Table 1. Open field results of NP (n=13) vs. LP (n=12) (test t)

Fig. 1: Birth (a) and from 6th to 16th weeks (b) body weight.

Fig. 2: Elevated plus maze data. **a:** Number of open and closed arm entries. **b:** Ratio of time spent in open arm over total time. Data presented as mean $\pm$ SEM. **Different from NP, $p=0.02$.

Fig. 3: **a:** Dendritic length of BNST neurons. Data presented as mean $\pm$ SEM. *Different from NP, $p=0.04$. **b:** Sholl analysis. Data presented as mean.

Fig. 4: Basal corticosterone levels. Data presented as mean $\pm$ SEM. *Different from NP, $p=0.02$.

Fig. 5: Proteins expression pattern in isolated BNST. Western blot bands densitometry quantification graphics. Columns and bars indicate means $\pm$ SEM. *Different from NP, $p<0.05$.

BRAIN STRUCTURE AND FUNCTION

GESTACIONAL PROTEIN RESTRICTION TRIGGERS HYPERANXIETY IN ADULTHOOD DUE TO CHANGES IN THE BED NUCLEUS OF STRIA THE TERMINALIS (BNST)

D. B. Torres¹, A. Lopes¹, A.J. Rodrigues⁴, J.J. Cerqueira⁴, J.M. Pêgo⁴, A.F. Godinho², J.A.R. Gontijo³, N. Sousa⁴ and P.A. Boer¹

¹Fetal Programming Laboratory, Department of Morphology and ²Toxicology Centre of Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil; ³Hydro-saline Metabolism Laboratory, Nucleus of Medicine and Experimental Surgery, Medicine Clinic Department, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ⁴Life and Health Sciences Research Institute, School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal.

Correspondence address:

Patrícia Aline Boer, BSC, PhD, Department of Morphology, Botucatu Bioscience Institute, UNESP- São Paulo State University, 18600-000 Botucatu, SP, Brazil

Phone: +55 14 3811-6264 R118, Fax: +55 19 3521-7414

E-mail: alineboer@yahoo.com.br

Table 1

Parameter	NP	LP	<i>p</i>
Rise	19.15 ± 2.5	19 ± 0.95	0.95
Locomotion	59.15 ± 2.8	60.92 ± 2.9	0.67
Freeze	0.97 ± 0.76	0.19 ± 0.14	0.32
Cleaning	0.71 ± 0.56	0.89 ± 0.59	0.82
Crossing	1.25 ± 0.28	1.00 ± 0.28	0.53

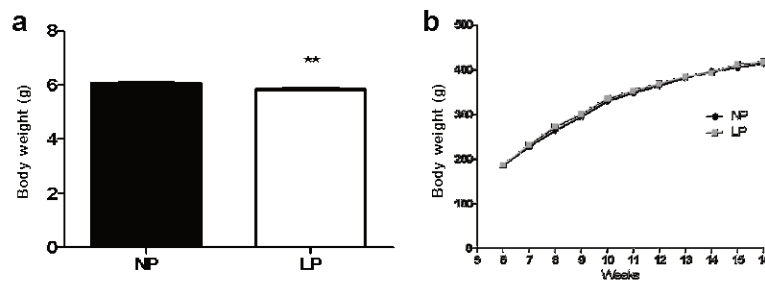


Fig. 1

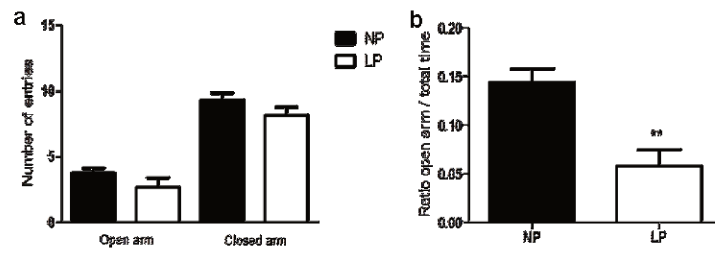


Fig. 2

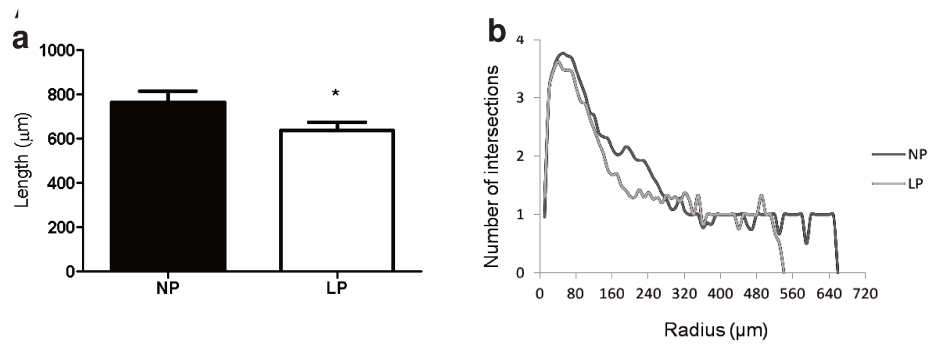


Fig. 3

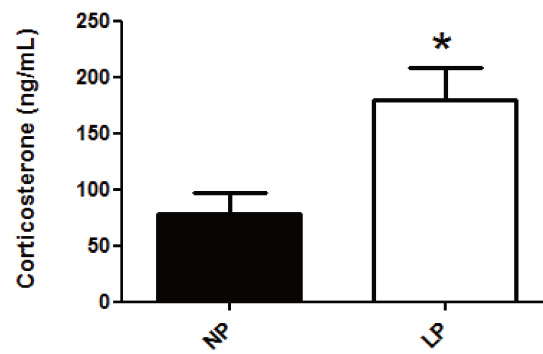


Fig. 4

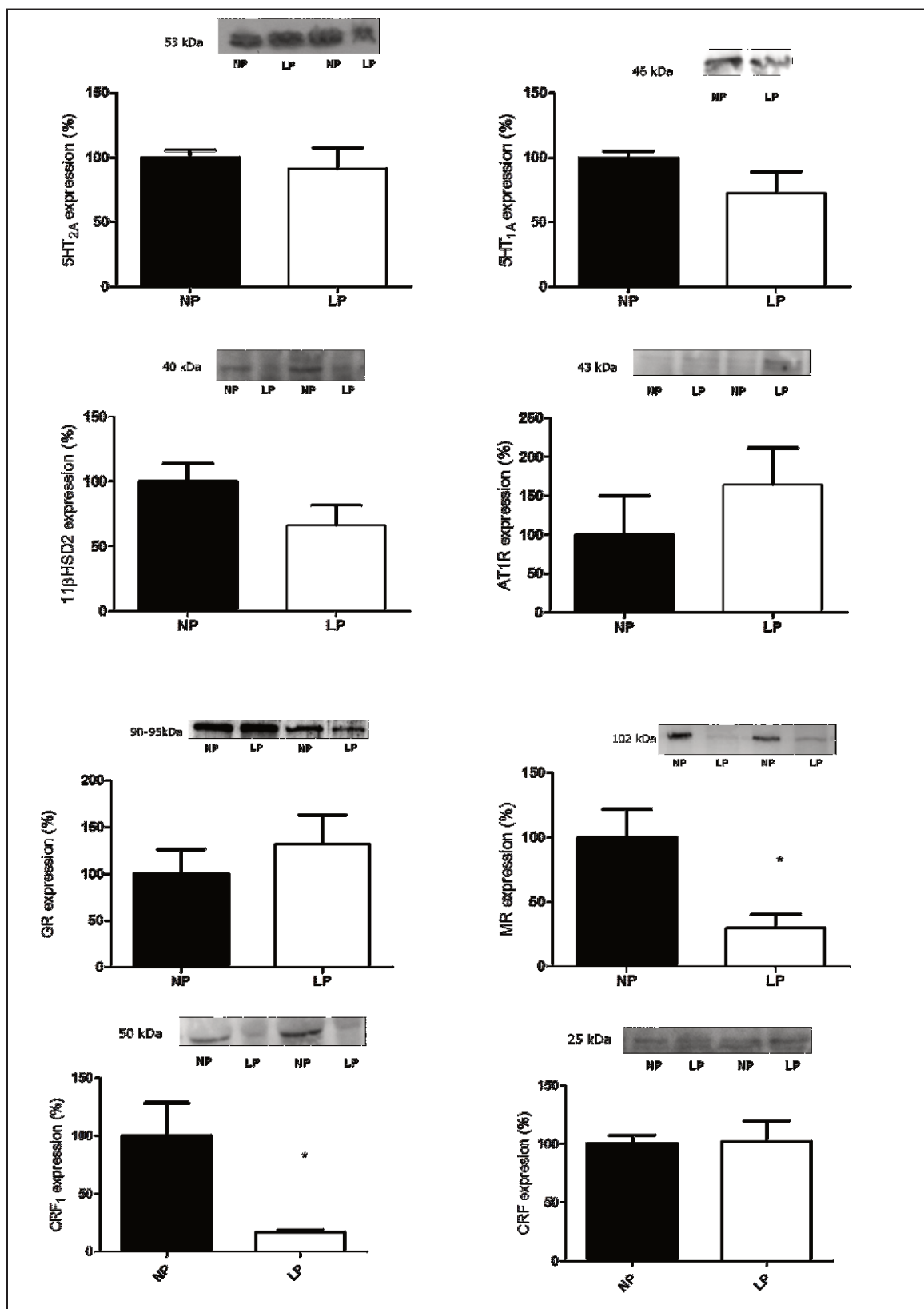


Fig. 5