



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Agnes da Silva Lopes Oliveira

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA GESTACIONAL NO
HIPOCAMPO DE RATOS MACHOS ADULTOS: AVALIAÇÃO DA
ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DENDRÍTICA DOS NEURÔNIOS
HIPOCAMPAIS, DO COMPORTAMENTO E DE COMPONENTES
NEUROQUÍMICOS.**

***EFFECTS OF GESTATIONAL PROTEIN RESTRICTION IN
HIPPOCAMPUS OF ADULT MALE RATS: EVALUATION OF
THREE-DIMENSIONAL DENDRITIC STRUCTURE OF
HIPPOCAMPAL NEURONS, BEHAVIOUR AND
NEUROCHEMICAL COMPONENTS***

Campinas

2012

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Agnes da Silva Lopes Oliveira

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA GESTACIONAL NO
HIPOCAMPO DE RATOS MACHOS ADULTOS: AVALIAÇÃO DA
ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DENDRÍTICA DOS NEURÔNIOS
HIPOCAMPAIS, DO COMPORTAMENTO E DE COMPONENTES
NEUROQUÍMICOS**

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

Co-Orientador: Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo

***EFFECTS OF GESTATIONAL PROTEIN RESTRICTION IN
HIPPOCAMPUS OF ADULT MALE RATS: EVALUATION OF
THREE-DIMENSIONAL DENDRITIC STRUCTURE OF
HIPPOCAMPAL NEURONS, BEHAVIOUR AND
NEUROCHEMICAL COMPONENTS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica

Master Dissertation presented to Clinical Medicine Postgraduation Programm of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the MS grade in Medical Clinic.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA AGNES DA SILVA LOPES OLIVEIRA E ORIENTADO PELA PROF. DR. PATRICIA ALINE BOER.

Assinatura do Orientador

Campinas

2012

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

OL4e Oliveira, Agnes da Silva Lopes, 1985-
Efeitos da restrição proteica gestacional no
hipocampo de ratos machos adultos : avaliação da
estrutura tridimensional dendrítica dos neurônios
hipocámpais, do comportamento e de componentes
neuroquímicos / Agnes da Silva Lopes Oliveira. –
Campinas, SP : [s.n.], 2012.

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

1. Feto - Desenvolvimento. 2. Glucocorticóides. 3.
Hipocampo. I. Boer, Patrícia Aline. II. Gontijo, José
Antonio Rocha, 1956-. III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effects of gestational protein restriction in hippocampus of adult male rats : evaluation of three-dimensional dendritic structure of hippocampal neurons, behaviour and neurochemical components.

Palavras-chave em inglês:

Fetal development

Glucocorticoids

Hippocampus

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

Patrícia Aline Boer [Orientador]

Sylvia Maria Ciasca

Luciana Le Sueur Maluf

Data da defesa: 30-07-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

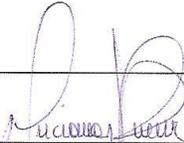
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Agnes da Silva Lopes Oliveira

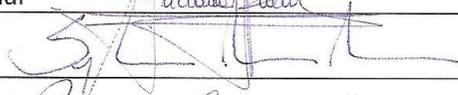
Orientador: Profa. Dra. Patrícia Aline Boer

Membros:

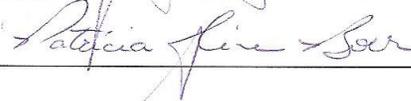
1. Profa. Dra. Luciana Le Sueur Maluf



2. Profa. Dra. Sylvia Maria Ciasca



3. Profa. Dra. Patrícia Aline Boer



Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/07/2012

“A Ciência Humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.” (Galileu Galilei)

Assim, eu te bendirei enquanto eu viver...

... A sua destra me sustenta. Salmos 63: 4,8.

Aos meus queridos pais Abel e Celina, meus exemplos de vida, com quem eu aprendi a ser perseverante e sempre lutar pelos meus sonhos.

Ao meu amado esposo Marco Aurélio, minha eterna inspiração, por ter sonhado comigo este grande sonho e ser sempre tão presente, amigo e companheiro.

Agradecimentos

Ao meu Deus, por ter me concedido esta incrível oportunidade e pelo seu precioso sustento durante esta jornada... A Ti minha eterna gratidão.

Á minha orientadora Prof. Dr^a Patrícia Aline Boer, por ter acreditado em mim, mesmo sem me conhecer e por ter concedido esta incrível experiência. Obrigada, por sua dedicação, apoio, confiança e amizade. Ao professor Dr. Gontijo pelas grandes colaborações neste trabalho.

Á equipe do Prof. Nuno Sousa da Universidade do Minho, que nos recebeu com tanto carinho e dedicação. Ao prof. Godinho pelo auxílio na padronização dos testes comportamentais.

Ao professor Wellerson Rodrigo Scarano por todos os esclarecimentos e pela disposição em sempre nos ajudar.

Aos alunos do LPF, Dani, Carol, Letícia, Heloísa, Carla e Victor, convier com vocês durante este período foi uma experiência maravilhosa. Vocês são muito especiais. Vou sentir muitas saudades! Á Carol por todas as caronas, obrigada por sempre ser muito disposta e pronta!

A minha amiga Dani, pela companhia nas inúmeras viagens, nos experimentos, nas técnicas... Dani, muito obrigada pela enorme contribuição, pela amizade e por ser esta pessoa sempre pronta a ajudar!

A Flávia Mesquita pelo auxílio em diversas dúvidas, e por sempre nos receber em sua casa com tanta alegria.

Aos funcionários e técnicos do departamento de morfologia. A dona Tera, pelos essenciais cafezinhos.

Ao meu querido esposo pelo seu amor e companheirismo sempre! Por ter sonhado este sonho comigo, por depositar tudo o que tinha para que este sonho pudesse se concretizar e por ter suportado a distância durante este período.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, por ter anulado suas próprias vidas para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelos grandes ensinamentos os quais eu levarei por toda minha vida. Ao meu amado irmão, por ter sido por muitas vezes meu protetor, e meu exemplo de força de vontade e perseverança. Vocês são meus exemplos e minha inspiração.

Ao meu sogro Marco e minha sogra Rosângela, que me adotaram como filha, obrigada pelo apoio e por sempre me encorajarem nos momentos mais difíceis.

Às minhas cunhadas e cunhados, que são como irmãos, muito obrigada pelo carinho.

Aos meus maravilhosos sobrinhos: Yasmin, Pedro Henrique e João Guilherme, vocês são as pedrinhas preciosas em minha vida.

Ao CNPQ e FAPESP pelo auxílio financeiro.

À todos os demais amigos, colegas e parentes aqui não mencionados, mas que foram de grande importância ao me apoiarem nesta jornada.

Resumo

Estudos têm demonstrado que a deficiência de nutrientes durante a gravidez ou nos primeiros anos de vida pós-natal resultam em anormalidades estruturais no hipocampo da prole, bem como comprometimento cognitivo em animais com 16 semanas de vida. Na tentativa de analisar se a restrição protéica gestacional pode induzir a déficits de aprendizagem e perda de memória associada a alterações estruturais no hipocampo, realizou-se teste de water maze (MWM) e uma análise detalhada morfométrica da citoarquitetura dendrítica do hipocampo de ratos machos adultos. Além disso, analisamos no hipocampo dorsal e ventral a expressão e localização de receptores de mineralocorticóides (MR) e glicocorticóides (GR), angiotensina II receptor tipo 1 (AT1) e receptores específicos de serotonina (5HT_{1A} e 5HT_{2A}). No MWM não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos LP e NP, em qualquer um dos parâmetros analisados no teste de memória espacial, sugerindo que tais funções de hipocampo não foram alteradas com a restrição proteica gestacional. No entanto, através da aplicação da técnica de Gogji-Cox realizamos a reconstrução dendrítica nos neurônios do hipocampo dorsal. Nossos resultados demonstram que a restrição proteica gestacional leva a uma diminuição do comprimento dos dendritos basais e no número de intersecções dos dendritos apicais de CA3. A citoarquitetura de CA1 e do giro denteado não foi alterada. O presente estudo revelou uma clara dissociação entre a resposta do teste comportamental e alterações de neurônios do hipocampo, como consequência da programação fetal. Encontramos diferentes padrões de expressão dos receptores analisados no hipocampo dorsal e ventral o que sugere que redução na expressão de GR e 5HT_{1A} paralelamente a maior expressão de 5HT_{2A} estão envolvidos no comportamento ansioso e que a significativa diminuição na expressão de AT1 pode ter um efeito protetor. Essas alterações neuroquímicas podem ter consequências importantes para comportamento de ansiedade e depressão. Nosso estudo não é capaz de responder se as alterações encontradas estão relacionadas com subdesenvolvimento no útero ou resulta de uma adaptação pós-natal para a fisiologia programada na vida adulta. Outros estudos devem ser feitos para responder essas questões.

Palavras-chave: Programação fetal, glicocorticoides, hipocampo.

Abstract

Studies have demonstrated that maternal nutritional restriction during pregnancy or in early postnatal life results in hippocampus cognitive impairment and structural abnormalities in the 16-wk-old offspring. In an attempt to analyze whether gestational protein restriction might induce learning and memory impairment associated with structural changes in the hippocampus we carried out MWM test and a detailed morphometric analysis of dendritic cytoarchitecture of the hippocampus from male adult rats. In addition, we analyzed the dorsal and ventral hippocampal expression and localization of mineralo- (MR) and glucocorticoid (GR), type 1 angiotensina II receptor (AT1) and serotonin specific receptors (5HT_{1A} and 5HT_{2A}). By MWM we did not found significant differences between LP and NP groups, in any of the parameters analyzed, suggesting that such functions of hippocampus were not altered by gestational protein restriction. However, by applying 3-dimensional analysis of dendrites from the dorsal hippocampus, this study demonstrates that gestational protein restriction leads to decreases in total basal dendritic length and inapical intersections of CA3 pyramidal neurons. The dendritic architecture of CA1 and dentate gyros was unchanged. The current study revealed a clear dissociation between behavioral test response and hippocampal neuron changes as consequence of fetal programming. We found different patterns of dorsal and ventral expression of analyzed receptors and we suggests that reduced GR and 5HT_{1A} and enhanced 5HT_{2A} expression are involved in anxious behavior and that AT1 down regulation may has a protective effect. These neurochemical alterations may have important consequences for anxiety- and depressive-like behavior. Our study is not able to answer the question whether these alterations are related to *in uteri* underdevelopment or results from a postnatal adaptation to programmed physiology in adult life. Further time-course studies should be done to answer this question.

Key Words: Fetal programming, glucocorticoids, hippocampus

- 11 β HSD₂**- 11 beta-hidroxiesteróide- desidrogenase tipo 2
- 5-HT**- Serotonina
- ACTH**- Hormônio adrenocorticotrófico
- AT1R**- Receptor de angiotensina II
- AT2R**- Receptor de angiotensina II
- BHE**- Barreira hematoencefálica
- BNST**- Núcleo da Estria Terminal
- CA1**- Corno de Amon 1
- CA2**- Corno de Amon 2
- CA3**- Corno de Amon 3
- CEEA**- Comissão de ética na experimentação animal
- CEMIB**- Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas
- CRF**- Hormônio liberador de corticotrofina
- DAG**- Distância ano-genital
- DEX**- Dexametasona
- DOHaD**- Origem desenvolvimentista da saúde e da doença
- GC**- Glicocorticóides
- GD**- Giro denteado
- GR**- Receptores de glicocorticóides
- HHPA**- Eixo hipocampo-hipotálamo-pituitária-adrenal
- IUGR**- Restrição do crescimento intra-uterino
- LP**- Low protein
- MR**- Receptores de mineralocorticóides
- MWM**- Morris Water Maze
- NP**- Normal protein
- PBS**- *Phosphate buffered saline*
- PFC**- Cortex pré-frontal
- PVN**- Núcleo paraventricular

Figura 1 Esquema representativo da função da 11BHS2 placentária.....	34
Figura 2 Representação esquemática do eixo HHPA.	25
Figura 3 Curva de desenvolvimento do SNC.	38
Figura 4 Divisão funcional do hipocampo.....	39
Figura 5 Divisão do tanque em linhas imaginárias.....	54
Figura 6 Peso ao nascer machos e fêmeas.....	63
Figura 7 Distância ano-genital dos machos e fêmeas.....	64
Figura 8 Peso do cérebro.....	64
Figura 9 Tempo gasto para encontrar a plataforma (memória de trabalho)	65
Figura 10 Distância percorrida (memória de trabalho).....	66
Figura 11 Tempo gasto para encontrar a plataforma (memória de referência). 66	
Figura 12 Distância percorrida (memória de referência).	67
Figura 13 Comprimento dos dendritos apicais e basais de CA1.....	67
Figura 14 Comprimento dos dendritos apicais e basais de CA3.....	68
Figura 15 Comprimento dos dendritos do giro denteado.....	68
Figura 16 Número de intersecções dos dendritos apicais de CA3.....	69
Figura 17 Expressão de GR no hipocampo dorsal e ventral.....	70
Figura 18 Imunolocalização de GR no hipocampo dorsal e ventral.....	71
Figura 19 Expressão de MR no hipocampo total.....	72
Figura 20 Imunolocalização de MR no hipocampo dorsal e ventral.....	72
Figura 21 Expressão de AT1 no hipocampo total.....	73

Figura 22 Expressão de AT1 no hipocampo dorsal e ventral	74
Figura 23 Imunolocalização de AT1 no hipocampo dorsal e ventral	74
Figura 24 Expressão de 5HT _{1A} no hipocampo dorsal e ventral	75
Figura 25 Imunolocalização de 5HT _{1A} no hipocampo dorsal e ventral	76
Figura 26 Imunolocalização de 5HT _{2A} no hipocampo dorsal e ventral	77

Quadro 1 Itens correspondentes para 1Kg de da dieta.....	52
Quadro 2 Protocolo do teste de memória de trabalho.....	55
Quadro 3 Protocolo do teste de memória de referência.....	55
Quadro 4 Esquema representando o número de neurônios reconstruídos.....	56

Resumo	xiii
Abstract	xvii
Introdução	29
1.1. Mecanismos envolvidos na gênese da programação fetal	33
1.2. Corticosteróides e seus receptores neurais	35
1.3. Programação fetal e o eixo HHPA.....	36
1.4. Formação hipocampal e programação fetal	37
1.5. Atuação do sistema angiotensinérgico no eixo HHPA.....	41
1.6. Atuação do sistema serotoninérgico no eixo HHPA	42
2. Justificativa e Objetivos	45
3. Métodos.....	49
3.1. Animais.....	51
3.2. Composição dos grupos.....	51
3.3. Estudo comportamental no labirinto aquático de Morris.....	53
3.4. Coloração de Golgi-cox	55
3.5. Análise dendrítica.....	56
3.6. Western Blotting	57
3.6.1. Quantificação de proteínas.....	57
3.7. Imunoistoquímica	58
3.8. Análise Estatística	59
4. Resultados	61
4.1. Peso ao nascer	63
4.2. Distância ano-genital	63
4.3. Peso do cérebro	64
4.4. Estudo comportamental no labirinto aquático de Morris.....	65

4.4.1. Memória de trabalho.....	65
4.4.2. Memória de referência.....	66
4.5. Análise dendrítica.....	67
4.6. Análise de Sholl.....	69
4.7. Western blotting e imunistoquímica.....	69
5. Discussão.....	79
6. Conclusão	91
7. Referências Bibliográficas	95
Apêndices.....	119

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição gestacional caracteriza-se como um sério problema de saúde pública estando implicada na morbidade e mortalidade infantil. Dados da Organização Mundial da Saúde indicam que no Brasil 10% das crianças nascem com baixo peso (<2500g) e em outras regiões do mundo este nível pode chegar a 31%.

Alterações na nutrição do feto resultam em adaptações que podem alterar permanentemente a estrutura e fisiologia de determinados órgãos, predispondo assim o indivíduo a doenças metabólicas e endócrinas na idade adulta (Martin-Gronert & Ozanne, 2006).

Lucas (1991) foi o primeiro a definir o conceito de programação fetal como uma resposta permanente do organismo a um estímulo ou insulto durante um período crítico do desenvolvimento.

Diversas evidências epidemiológicas mostram que há uma forte relação entre eventos na fase pré-natal e doenças na vida adulta. Ainda em 1964, Rose examinando padrões familiares na doença cardíaca isquêmica, observou que os irmãos do sexo masculino que tiveram um infarto cardíaco, tinham uma taxa de mortalidade infantil duas vezes maiores que dos controles. A relação entre mortalidade infantil e doença cardíaca isquêmica posterior, nos sobreviventes da mesma geração, foi também demonstrada por Forsdahl (1977). Ele sugeriu que existia uma relação entre a grande pobreza na infância e adolescência, seguida por períodos de prosperidade. Este achado foi mais uma vez observado na Inglaterra e País de Gales por Barker e Osmond, em 1986, que propuseram que influencias na infância predispõe à doença isquêmica do coração estando relacionada à má nutrição durante a vida pré-natal e início da vida pós-natal.

Barker (1995) foi o primeiro a mostrar em estudo científico que o baixo peso ao nascer pode estar relacionado ao surgimento de diversas doenças na idade

adulta. Seus estudos geraram a “hipótese de Barker” sugerindo que a desnutrição materna promove retardo do crescimento fetal, manifestando baixo peso ao nascimento. Assim, a falta de nutrientes na dieta induziria a adaptações fetais que incluem alterações permanentes no número celular e em órgãos chaves com subsequente modulação da expressão gênica (Langley-Evans, 2001). Este conceito determinou o fenótipo conhecido como “thrifty” o qual propõe que sob condições de escassez ou nutrição desbalanceada, o feto faz adaptações incluindo redução no tamanho somático, a fim maximizar suas chances de sobrevivência. Assim, a nutrição materna pode atuar como uma previsão, para o feto, do ambiente nutricional que ele irá encontrar após o nascimento (Halles, 2001).

O baixo peso ao nascimento pode ocorrer como consequência da restrição do crescimento intra-uterino (IUGR) ou do nascimento prematuro. Assim, a restrição reflete o estresse intra-uterino no período tardio da gestação, opondo-se ao baixo peso da prematuridade, no qual o peso é apropriado para a duração específica da gestação, mas menor quando comparado a gestação de tempo normal. E é este baixo peso relacionado à IUGR que está diretamente associado ao desenvolvimento de doenças na idade adulta (Zandi-Nejad et al, 2006).

Tendo em vista esses aspectos, a má-alimentação materna, seja no período pré-concepção, gestacional ou mesmo durante a lactação, pode gerar carências nutricionais para o feto/embrião. Considerando-se que a capacidade materna em prover nutrientes e oxigênio é um fator crítico para a saúde e sobrevivência fetal, a incapacidade de suprir a quantidade adequada de nutrientes para satisfazer a demanda fetal pode levar a subnutrição precoce da progênie. O feto responde e se adapta à subnutrição, mas ao fazer isso altera, permanentemente, a estrutura e o funcionamento do organismo (Martin-Gronert & Ozanne, 2006).

Além disso, há evidências que os estes efeitos da programação fetal não se restringem a primeira geração (F1), mas podem atingir as gerações subsequentes (Drake, 2005).

Muitos estudos, tanto em seres humanos quanto em animais, demonstraram que a má nutrição durante a gravidez pode ter consequências marcantes para a prole, associando o baixo peso ao nascer ao desenvolvimento de hipertensão, resistência a insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares na idade adulta (Taylor e Poston, 2007; Nijland et al, 2008; Symonds et al, 2009; Solomons, 2009; Nuyt e Alexander, 2009; Bouret, 2010).

As maiores evidências acerca das influências fetais na programação de doenças na idade adulta surgiram a partir de trabalhos que empregaram métodos de restrição proteica gestacional em ratos. 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 à restrição desenvolveram hipertensão arterial, a partir da quarta semana de vida, a qual foi mantida até a idade adulta (Langley-Evans, 1994; 1995).

Em nosso laboratório estudamos os machos da prole de ratas submetidas à restrição proteica gestacional (6% de caseína) comparativamente àqueles cujas mães receberam dieta normoprotéica (17% de caseína). Os ratos programados apresentaram baixo peso ao nascer, redução no número de néfrons e elevação da pressão arterial a partir da 12^a semana de vida (Mesquita et al, 2010)

1.1 Mecanismos envolvidos na gênese da programação fetal

O mecanismo mais estudado envolve a superexposição fetal aos glicocorticóides maternos (Dodic et al, 2002, Seckl, 1997, 2001). Em situação fisiológica a

concentração de glicocorticóides fetal é menor que a materna. Isso ocorre devido a ação de uma enzima placentária 11- β hidróxisteroide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD-2). Esta enzima é responsável por catalisar a conversão do esteróide bioativo (corticosterona) em seu metabólito inativo, 11-deidro corticosterona, evitando assim que o feto fique exposto aos corticóides maternos. Assim, a atividade da 11- β HSD-2 está relacionada positivamente com o peso fetal em ratos e em humanos. Estudos demonstram que animais expostos à restrição protéica pré-natal apresentam uma significativa redução na atividade desta enzima no período final da gestação levando ao aumento da transferência dos glicocorticóides maternos para o feto (Edwards et al, 1993, Seckl, 1994)

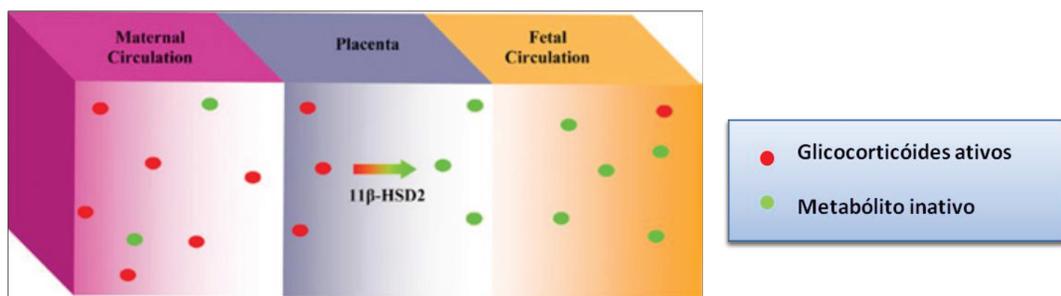


Figura 1. Esquema representativo da função da 11- β HSD-2 placentária inativando os glicocorticóides provenientes da circulação materna, garantindo a proteção do feto dos altos níveis de glicocorticóides (adaptado de Drake et al, 2007)

Em humanos o aumento dos níveis de cortisol durante a gestação está relacionado à elevação na incidência de desordens comportamentais durante a infância. (King e Laplante, 2005; Laplante et al., 2004). Além disso, o baixo peso ao nascer está associado à elevação dos níveis de cortisol no adulto, contribuindo para o aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares bem como hipertensão na vida adulta. (Kajantie et al., 2005; Syddall et al., 2005).

1.2 Corticosteróides e seus receptores neurais

A glândula adrenal é a principal fonte de corticosteróides isto é: cortisol, corticosterona e aldosterona. Como todos os hormônios esteróides, estas moléculas pequenas (~300Da) são derivadas do colesterol e da pregnolona após uma série de conversões enzimáticas (Appelzweig, 1969). A síntese e secreção de cortisol (em humanos) e corticosterona (em roedores) é governada pelo hormônio adenocorticotrófico (ACTH), liberado pela hipófise anterior, e cuja síntese e liberação são controladas pelo fator liberador de corticotrofina (CRF) hipotalâmico (Whitnall, 1993). O controle da liberação de corticosteroide pelo córtex da adrenal é complementado pelo mecanismo de *feedback* negativo via receptores hipofisários, hipotalâmicos (Whitnall, 1993) e hipocampais (Jacobson e Sapolsky, 1991; Knigge e Hays, 1963).

Os corticosteróides acessam facilmente o cérebro (McEwen et al, 1986). Sua ação é mediada por receptores mineralo (MR) e glicocorticóides (GR). Estes receptores são membros da família de receptores nucleares de esteroides. Quando dissociados de seus ligantes podem ser encontrados tanto no citosol quanto no núcleo e, quando associados aos seus ligantes são transportados para o núcleo onde se associam a proteínas coativadoras e liga-se a elementos de resposta a hormônio (HRE) reprimindo ou ativando promotores da transcrição gênica (Galigniana et al, 2010). A afinidade do GR por cortisol e corticosterona é aproximadamente um décimo da afinidade de MR para estes esteroides. Dessa forma, os MR são predominantemente ocupados em períodos de baixa concentração de corticosteroides, enquanto os GR só são ocupados quando ocorre aumento na concentração deste hormônio (durante estresse ou condições patológicas) (de Kloet, 1999; Joels e de Kloet, 1994; Joels et al, 1995; Reul e de Kloet, 1985).

Embora os GRs estejam presentes em diversas estruturas neurais existem, em maior concentração no hipocampo, no hipotálamo e no tronco cerebral (Ahima

e Harlan, 1991; Cintra et al, 1994; Fuxe et al, 1985). Já os MRs ocorrem somente no hipocampo e em outras estruturas límbicas como amígdala medial, núcleos olfatórios e alguns núcleos hipotalâmicos (Ahima et al, 1991; Van Eekelen, 1988).

1.3 Programação fetal e eixo hipocampo-hipotálamo-pituitária-adrenal (HHPA)

Como os sistemas de neurotransmissores e glicocorticóides 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)

A maioria dos estressores exercem seus efeitos no eixo HHPA, através da via do estresse endócrino primário (figura 2). 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 pelas supra-renais - cortisol em humanos e corticosterona nos animais - para a corrente sanguínea. Assim, tem sido proposto que a exposição em excesso à glicocorticóides *in útero* age como programador fetal do eixo HHPA, alterando permanentemente a regulação da atividade basal deste eixo na prole. Essas mudanças podem ocorrer pela modulação na expressão de GR e MR, paralelamente a alterações em diversos neurotransmissores no cérebro.

Não somente o estresse materno nutricional ou psicológico, mas também os tratamentos com glicocorticóides sintéticos podem expor o feto a concentração excessiva de glicocorticóides (Kapoor, 2008). A elevação na concentração de corticosteróides circulantes pode causar estímulo temporário dos MRs, cujo efeito é citoprotetor, já que a ativação destes receptores antes da exposição à fármacos específicos para GRs (dexametosona) pode atenuar a apoptose induzida por este agonista (Almeida et al, 2000; Sousa, 1999).

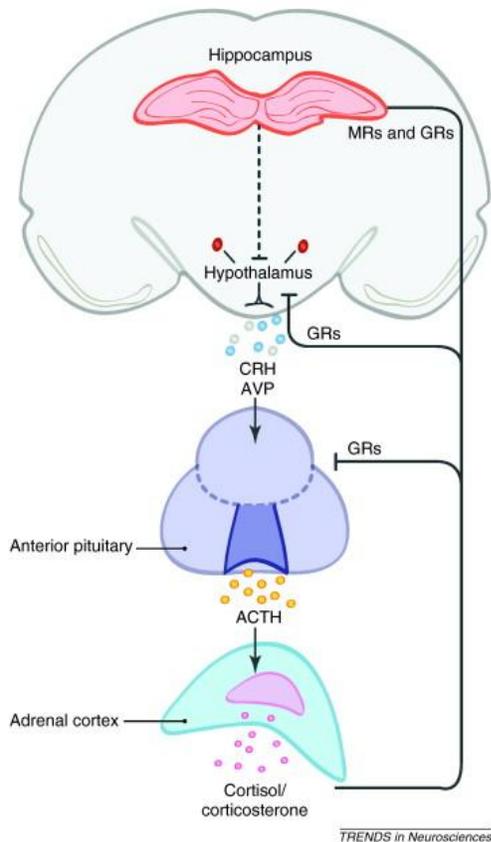


Figura 2. Representação esquemática do eixo HHPA. Os sinais de estresse partem do hipotálamo para a hipófise e, em seguida, para às glândulas supra-renais. As glândulas supra-renais que liberam o hormônio corticosterona (e adrenalina, não mostrada). Quando as células do hipocampo detectam cortisol, que se liga ao receptor GR e MR, geram um sinal para que o hipotálamo desligue o circuito de estresse (extraído de Schloesser et al, 2012).

1.4 Formação hipocampal e programação fetal

Em seres humanos, o período de maior vulnerabilidade do SNC ocorre desde o segundo trimestre de gestação até o segundo ano de vida (Dobbing & Sands, 1971). Em roedores, esta fase compreende desde o nascimento até a terceira semana de vida, quando ocorre o desenvolvimento do hipocampo e cerebelo (Morgane et al., 1993). No entanto, entre os dias 17 a 22 do período embrionário, durante a ontogênese, já ocorre a formação e organização de neurônios hipocampais específicos (Bayer, 1980). Apenas 20% das células granulares hipocampais estão presentes no rato ao nascer e a neurogênese do GD (giro denteado) continua até o período adulto, porém com uma taxa cada vez menor ao longo do tempo (Altman & Das, 1965).

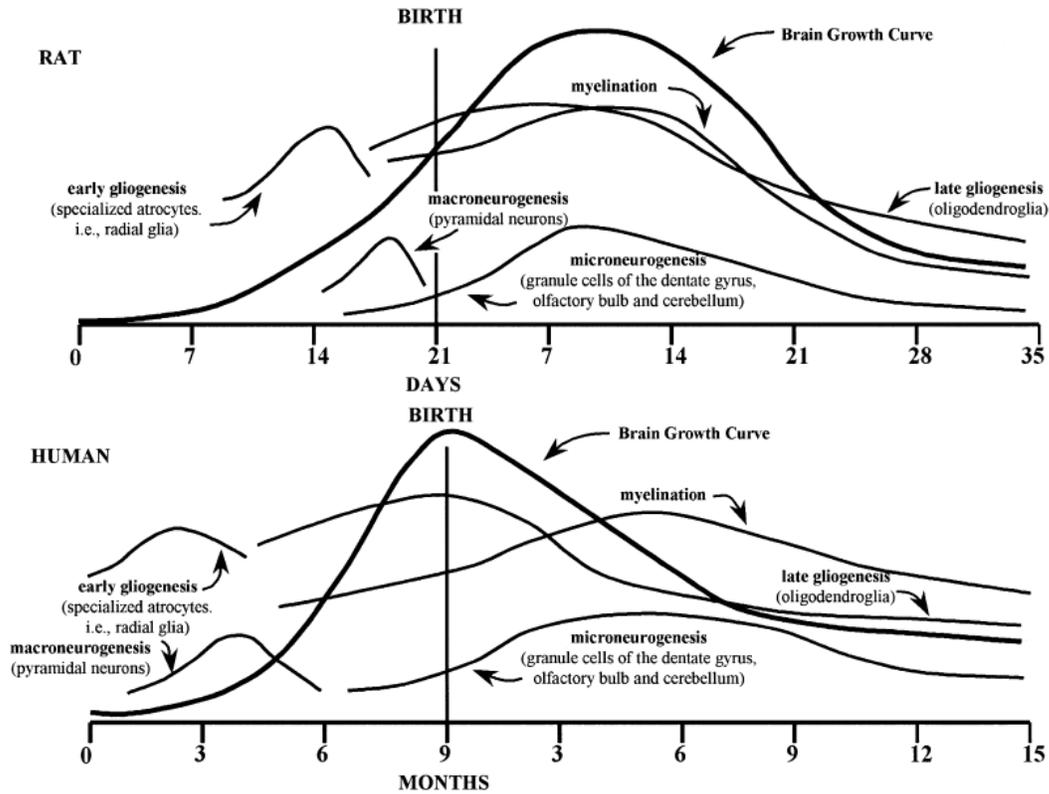


Figura 3. Curvas de desenvolvimento do SNC em humanos e ratos (extraído de Morgane et al, 2002)

Anatomicamente, o hipocampo de mamíferos é dividido em diferentes subcampos: CA1, CA2, CA3 e giro dentado (Scharfman, 2007). Funcionalmente, o hipocampo pode ser dividido em duas regiões diferentes: o hipocampo ventral e o dorsal. Enquanto a porção ventral está implicada primariamente ao processamento emocional, a dorsal está ligada principalmente à memória e ao aprendizado (Bannerman et al., 2004).

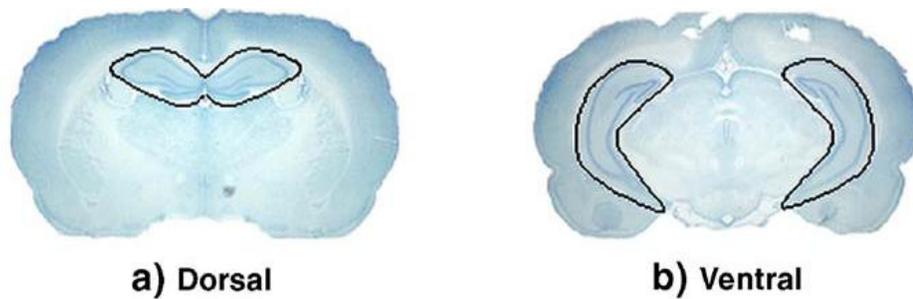


Figura 4. Divisão funcional do hipocampo (a) dorsal e (b) ventral (adaptado de Van den Hove et al, 2006)

A formação hipocampal é um componente essencial do sistema límbico, exercendo papel crucial nos processos de aprendizagem e memória, e apresentando grande capacidade de plasticidade sináptica (Kim & Diamond, 2002).

Experimentos em roedores tem constituído a base para numerosas teorias sobre o processamento da memória no hipocampo devido a notável similaridade estrutural e funcional entre o hipocampo de humanos e roedores. (Nissinem et al, 2000)

Como já citado trata-se de uma região que é alvo preferencial da ação dos hormônios de estresse, e através da sua ação, esta área cerebral é parte integrante do mecanismo de retroalimentação negativa no eixo HHPA. (McEwen, 1999)

Tanto o estresse como a exposição aos glicocorticóides em uma fase inicial da vida, têm sido associados a danos na aprendizagem e na memória (Huot et al., 2002), bem como à atrofia do hipocampo. A plasticidade dos circuitos do hipocampo, necessária para as suas funções na aprendizagem e na memória, pode aumentar a sua vulnerabilidade a várias agressões ambientais, incluindo o estresse (Aisa et al., 2006).

Diversos estudos demonstram que perturbações ocorridas durante o desenvolvimento do SNC causam graves alterações neurais fisiológicas e

morfológicas (Huang *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2004, Hermel *et al.*, 2001; Feoli *et al.*, 2006), além de alterações comportamentais (de Oliveira, 1985; Riul *et al.*, 1999) e atrasos em funções intelectuais e cognitivas (Barnes, 1976; Brozek, 1978, 1983; Wainwright e Colombo, 2006).

Alterações nutricionais durante o período pré-natal tiveram influencia sobre a neoneurogênese no hipocampo imaturo. Além disso, foram observados no hipocampo atrofia de corpos neuronais, remodelamento dendrítico, além de morte neuronal e gliose, especialmente nos dendritos apicais de CA3. Adicionalmente estes animais apresentaram elevação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticosterona circulante (Kehoe *et al.*, 2001).

McEwen (1999) observou que animais expostos ao estresse crônico apresentaram remodelação de dendritos apicais de CA3, via mecanismos que envolvem a participação de esteróides adrenais juntamente com aminoácidos excitatórios, resultando em déficit cognitivo na aprendizagem de tarefas de memória espacial e de curto prazo.

Além disso, diversos estudos demonstram que o hipercortisolismo (farmacológico ou induzido por estresse) induz atrofia dos dendritos das células piramidais de CA3 (Magarinos & McEwen, 1995; Woolley *et al.*, 1990). Alterações neuríticas podem estar relacionadas a déficits no comportamento de aprendizagem e memória (Moser *et al.*, 1994, Rusakov *et al.*, 1997).

Desta forma, a exposição fetal a glicocorticóides tem efeitos generalizados sobre a estrutura neuronal e formação de sinapses (Antonow-Schlorke *et al.*, 2003) podendo alterar permanentemente não somente o hipocampo mas a estrutura do cérebro todo (Matthews, 2000). Macacos *rhesus* tratados com dexametasona no período pré-natal tiveram degeneração dos neurônios do hipocampo e redução do seu volume (Uno *et al.*, 1990). Estudos posteriores em humanos e animais também demonstraram que a estrutura do hipocampo alterada pode estar associada a

desordens comportamentais e cognitivas (Sheline et al, 1996; Stein et al, 1997; Bremner et al, 1995).

Tem sido sugerido que estes efeitos observados no hipocampo são dependentes da ação de GC e da expressão de seus receptores, o que desencadearia efeito em cascata alterando a produção de aminoácidos neuro-moduladores que participam da mediação neural à jusante do remodelamento dendrítico (Radley et al., 2005).

1.5 Atuação do sistema angiotensinérgico no eixo HHPA

A angiotensina II é um neuropeptídeo com múltiplas ações no cérebro. Atua com grande afinidade via 2 tipos de receptores, o tipo 1 (AT1R) e o tipo 2 (AT2R) em humanos e AT1Ra, AT1Rb e AT2R em roedores. A maioria dos efeitos fisiológicos ocorre via AT1R, que são altamente distribuídos em todos os órgãos, incluindo fígado, adrenal, cérebro, pulmões, rins, coração e vasculatura. Composto de 359 aminoácidos, AT1R é um receptor transmembrana 7 passos, pertencente a família dos receptores acoplados a proteína G (Gasc et al, 1994, Chen et al, 1997).

Receptores AT1 estão localizados em partes do sistema límbico como amígdala, núcleo da estria terminal, córtex e hipocampo (Lenkei et al, 1997). Fatores como desidratação, hipertensão e estresse podem influenciar o número de receptores AT1 expressos em regiões particulares do cérebro (Barth & Gerstberger, 1999; Charron et al, 2002; Saavedra et al, 1986).

Através da ativação simpática por beta-adrenérgicos, o estresse contribui para o aumento de formação de renina levando ao aumento de produção e liberação de angiotensina II na circulação sanguínea (Saavedra e Benicky, 2007). Altas concentrações de angiotensina II circulante, atuando através de receptores AT1 cerebrais contribuem para aumento na síntese e liberação de ACTH, corticosterona e catecolaminas (Armando et al., 2001; Leong et al., 2002; Jezova

et al., 2003). Além disso, o estresse no início do desenvolvimento aumenta a formação de angiotensina II na idade adulta (Edwards et al., 1999).

A angiotensina II circulante contribui para estimulação das vias do estresse no cérebro, contribuindo para a superestimulação do eixo HHPA (Saavedra, 1992). Receptores AT1 ativados nos neurônios parvocelulares levam ao aumento da produção e liberação de CRF, e superestimulação do eixo HHPA (Armando et al., 2007).

1.6 Atuação do sistema serotoninérgico no eixo HHPA

A serotonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano nos neurônios do núcleo da rafe mediana mesencefálica. Por suas características hidrofílicas a serotonina não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), sendo então sintetizada no SNC (Blundell, 1992).

Um substancial corpo de evidências na literatura tem implicado o sistema 5-HT (serotonina) na modulação do comportamento (Graeff et al, 1996; Handley et al 1993,1995; 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.

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). Além disso, o estresse pode afetar as células da rafe através dos receptores de glicocorticóides, os quais estão presentes em células serotoninérgicas (Laaris et al., 1995) além de alterar o tipo e a quantidade de proteínas produzidas por estas células.

O 5-HT tem papel proeminente no desenvolvimento normal do SNC (Whitaker-Azmitia, 2001). Diversos estudos tem evidenciado que o receptor 5-HT_{1A} é muito sensível ao ambiente pré-natal (Johns et al., 2002; Lauder et al., 2000; Whitaker-Azmitia et al., 1987) e que o estresse gestacional altera o sistema serotoninérgico no hipocampo da prole (Hayashi et al., 1998; Peters, 1990).

Além disso, estudos demonstram que o 5-HT é necessário para manutenção do número de sinapses hipocâmpais (Matsukawa et al, 1997). Animais adultos que sofreram estresse prenatal demonstraram diminuição na densidade de sinapses hipocâmpais, um parâmetro modulado pelo 5-HT e outros neurotransmissores (Hayashi et al, 1998).

Justificativa e Objetivos

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Tendo em vista a fundamentação apresentada acima o desenvolvimento do presente projeto se **JUSTIFICA** pela:

- 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 seus efeitos 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;
- Importância social de possíveis déficits na memória e aprendizado gerado pela programação fetal;
- 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;
- Evidência de que alterações nutricionais durante o período pré-natal levam a alterações na neurogênese, bem como na morfologia dendrítica hipocampal.
- Já estabelecida função da estrutura hipocampal com processos de memória e aprendizado.
- Modulação, via corticosteróides, de alterações estruturais no hipocampo.

Assim, foram **OBJETIVOS** do presente projeto estudar, em ratos adultos submetidos *in útero* a restrição protéica comparativamente aos seus controles:

- 1) Estrutura dendrítica de neurônios do hipocampo dorsal;
- 2) A capacidade de aprendizado e memória;
- 3) A Expressão e localização hipocampal de receptores corticosteroides (MR e GR), angiotensinérgicos (AT1R) e serotoninérgicos (5HT_{1A} e 5HT_{2A}).

Métodos

3. MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar-Hannover machos e fêmeas provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, SP (CEMIB). Os experimentos foram na maioria realizada no laboratório de programação fetal na Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Botucatu.

A análise dendrítica (item 3.5) foi realizada no Instituto de Ciências da Vida (ICVS) da Universidade do Minho (Braga, Portugal) em colaboração com a equipe do Professor Nuno Sousa.

Todo o estudo foi aprovado pela comissão de ética em experimentação animal da Universidade Estadual Paulista (CEEA) protocolo 29/08-CEEA.

Os animais foram mantidos no biotério com temperatura e umidade controlada e sistema de luz 12h/12h, permanecendo com água e ração padrão para roedores *ad libitum* até completarem onze semanas, quando se iniciou o período de acasalamento. Os mesmos foram acasalados em sistema de harem (2 ou 3 fêmeas para cada macho) por 12 horas em ambiente escuro, e depois separados. A presença de espermatozóide no lavado vaginal foi utilizada como indicativo de prenhez.

3.2 Composição dos grupos

Após a confirmação da prenhez as fêmeas foram divididas em dois grupos que receberam 30 gramas/dia das seguintes rações: normoproteica (NP – Normal protein), contendo 17% de caseína (n=9) e hipoproteica (LP – Low protein) contendo 6% e caseína (n=9). As fêmeas foram alocadas em caixas individuais. As dietas foram produzidas pela *Pragsoluções Biociências* sendo compostas pelos seguintes itens:

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

Quadro 1: Itens correspondentes para 1Kg da dieta

Durante toda prenhez foi verificado o peso dos animais bem como o consumo de ração diário 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 libitun*. Neste momento também foi mensurada a distância ano-genital e a pesagem dos filhotes. A prole composta por mais de oito animais foi reduzida imediatamente. Quando os animais atingiram vinte e três dias realizou-se o desmame, onde se retirava a mãe e as fêmeas, e os machos da prole foram realocados para continuidade do estudo.

Todos os animais utilizados para o acasalamento bem como as fêmeas da prole foram sacrificados em câmara de CO₂.

3.3 Estudo Comportamental no labirinto aquático de Morris

Descrito há 20 anos, o *Morris water maze (MWM)*, é o teste mais utilizado para verificar a aprendizagem espacial e a memória em roedores (Morris, 1981). Este teste foi originalmente utilizado para investigar, anatomicamente, estruturas cerebrais importantes para a aprendizagem espacial e memória em ratos (Morris et al., 1982). O teste consiste em o animal nadar para encontrar uma plataforma escondida, utilizando marcas visuais do ambiente, considerando que roedores são altamente motivados para escapar do ambiente aquático, pelo caminho mais rápido e curto (Wenk, 1998)

Ao completarem 15 semanas os animais foram submetidos ao teste comportamental. Para a realização do teste, usamos um animal de cada prole de forma aleatória (NP, n=9 e LP, n=9) os quais foram realocados até a sala de testes, onde permaneceram por no mínimo uma hora antes do teste para ambientação com o local. Após este período iniciava-se então o teste. Todos os testes foram realizados sempre no período matutino.

O teste foi realizado em um tanque circular preto (170 cm de diâmetro) cheio de água com profundidade de 31cm a 22°C. Dentro do tanque havia uma plataforma transparente submersa (1cm). O tanque foi dividido através de linhas imaginárias em quatro quadrantes (1,2,3,4), com quatro pontos de largada (figura 5). A plataforma de escape foi colocada em um dos quadrantes a uma certa distância entre o centro e a parede do tanque.

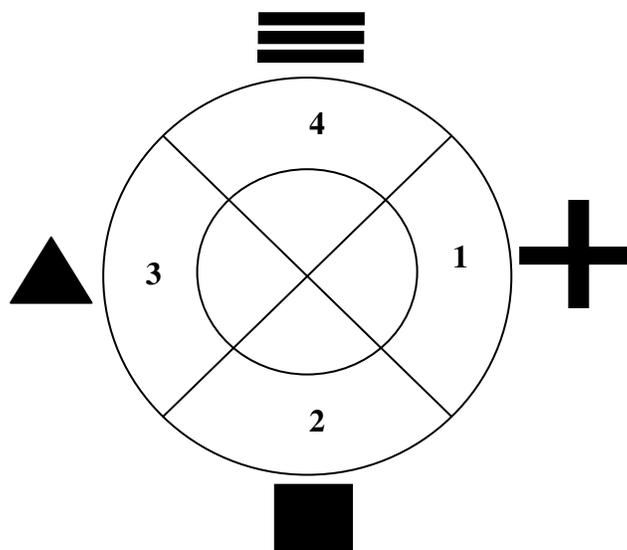


Figura 5. Divisão do tanque em linhas imaginárias

Os animais foram colocados no tanque, com a face voltada para a parede, em um dos quatro quadrantes (1,2,3,4). Em cada quadrante havia uma pista visual na parede para possibilitar a localização espacial (figura 5). O tempo gasto pelo animal para encontrar a plataforma (latência) foi cronometrado, e ao final de 120 segundos caso o animal não encontrasse a plataforma, este foi então conduzido pela água até a mesma, permitindo que ali ficasse por 30 segundos para sua localização. Além disso, foi verificada também a distância percorrida por estes animais, considerando o número de quadrantes em que o animal percorria até encontrar a plataforma. A cada dia de teste foram realizadas quatro largadas, uma em cada ponto. Ao final das quatro largadas o animal foi enxugado com uma toalha e recolocado em sua caixa. O teste avaliou dois tipos de memória:

Memória de Trabalho: Foi descrita por Kesner (2000) como um teste para avaliar a função do cortex pré-frontal. Esta etapa compreende quatro dias (1-4), nos quais foi mudada a posição da plataforma sendo que, durante os quatro dias, a plataforma passou por todos os quadrantes conforme o quadro abaixo:

Dia	Plataforma	Ordem de exposição do animal
1	1	2,4,1,3
2	2	1,2,4,3
3	3	3,4,2,1
4	4	3,1,2,4

Quadro 2: Protocolo do teste de memória de trabalho

Memória de Referência: Avalia a função do hipocampo, e compreende quatro dias de teste (4-6 extra). Nesta etapa a plataforma ficou sempre no mesmo quadrante durante todos os dias sendo que, em cada largada, o animal partiu de quadrantes diferentes.

Dia	Plataforma	Ordem de exposição do animal
4	4	3,1,2,4
5	4	2,4,3,1
6	4	4,2,1,3
6 extra	4	1,3,4,2

Quadro 3: Protocolo do teste de Memória de Referência

3.4 Coloração de 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 os cérebros coletados, pesados e processados de acordo com o protocolo descrito por GIBB & KOLB (1998).

Os cérebros foram removidos e imersos em solução de Golgi-Cox (1:1 de dicromato de potássio 5% e cloreto de mercúrio 5% diluído 4:10 com cromato de

potássio 5%) (Glaser & Van Der Loos, 1981) durante 14 dias; os cérebros foram então transferidos para uma solução de sacarose 30% (mínimo 3 dias), antes de serem cortados em um vibratomo. Secções coronais (200 µm de espessura) foram coletadas em lâminas. Posteriormente 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 série etanólica crescente, diafanizadas em xilol e montadas.

3.5 Análise Dendrítica

A reconstrução foi realizada em quatro animais de cada grupo experimental (de mães diferentes), sendo que foram selecionados cinco neurônios de cada região do hipocampo (CA1, CA3 e GD) totalizando vinte neurônios reconstruídos de cada uma das regiões para cada grupo experimental (quadro 4). Para cada neurônio selecionado 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 câmara (DXC-390, Sony Corporation, Tóquio, Japão).

NP	CA1	CA3	GD	LP	CA1	CA3	GD
Animal 1	5	5	5	Animal 1	5	5	5
Animal 2	5	5	5	Animal 2	5	5	5
Animal 3	5	5	5	Animal 3	5	5	5
Animal 4	5	5	5	Animal 4	5	5	5
Total	20	20	20	Total	20	20	20

Quadro 4. Esquema representando o número de neurônios reconstruídos em cada região do hipocampo.

A análise 3D dos neurônios reconstruídos foi realizada utilizando software Neurolucida (Microbrightfield). Foram avaliadas tanto as mudanças globais quanto o comprimento total das árvores dendríticas (basal e apical) (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 dos dendritos com esferas concêntricas posicionados em intervalos radiais de 20 μm e, além disso, foi medido o comprimento da árvore dendrítica localizada entre duas esferas consecutivas.

3.6 Western Blotting

Ao completarem 16 semanas os animais (NP, n=5 e LP n=5) foram sacrificados por decapitação os encéfalos dissecados e pesados. Os hipocampus foram imediatamente removidos sendo processados na sua totalidade e/ou dividido em hipocampo dorsal e ventral (o hipocampo foi dividido em três partes e coletado o terço superior como dorsal e o terço inferior como ventral), pesados e homogenizados separadamente 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 centrifugação o sobrenadante foi coletado, a solução obtida foi conservada em freezer a -80°C .

3.6.1 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 μg de proteína foi aplicada em gel SDS-PAGE o qual foi colocado em aparelho de eletroforese Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad). A eletroforese das proteínas no gel foi feita a 120 V. Depois da separação eletroforética as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo primário a 4°C durante a noite. Os anticorpos utilizados foram AT1 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:1000, GR rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:500, MR rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:500, 5HT_{1A} goat polyclonal IgG (abcam) com

diluição de 1:300 e 5HT2A rabbit polyclonal IgG (abcam) com diluição de 1:1000. 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. 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 Imunoistoquímica

Os animais (NP, n=5 e LP, n=5) foram anestesiados com ketamina (75mg/kg) e xilasina (10mg/kg) intraperitoneal e o nível de anestesia controlado pelo monitoramento do reflexo corneal. A perfusão foi realizada com o auxílio de uma bomba de perfusão mantendo-se a pressão média de 120 mmHg, sendo cada animal perfundido 15 minutos com solução salina heparinizada a 5% em temperatura ambiente e 20 minutos com solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4.

Após perfusão, os encéfalos foram fixados por imersão na mesma solução por 2 horas. Após a fixação, o material foi lavado e colocado em solução de sacarose 30% por 24 horas. Os cérebros foram então cortados em criostato obtendo-se cortes com 45 µm de espessura que ficaram submersos em PBS por não mais que 24hs. Todo o processo de imunoistoquímica foi realizado com os cortes em suspensão e em agitação. Primeiramente realizaram-se lavagens com PBS, seguido pela inibição da peroxidase endógena e bloqueio com solução bloqueadora (leite em pó desnatado 5% em PBS). Os cortes foram, então, incubados com os seguintes anticorpos primários AT1 rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:5000, GR rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:1000, MCR rabbit polyclonal IgG (Santa Cruz) com diluição de 1:1000, 5HT1A goat polyclonal IgG (abcam) com diluição de 1:1000 e 5HT2A rabbit polyclonal IgG (abcam) com diluição de 1:500. Os anticorpos foram diluídos em

BSA 1% e os cortes permaneceram incubados nesta solução *overnight*, sob refrigeração e agitação. Os cortes foram então lavados com PBS (4 vezes com intervalos de 5 minutos) e expostos ao anticorpo secundário específico, conjugado com peroxidase, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após lavagens sucessivas com PBS, a revelação foi feita com DAB, os cortes montados em lâminas gelatinizadas, contra-corados com hematoxilina e, após secarem, foi realizada desidratação e montagem com lamínula.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico e fotodocumentados com auxílio de câmera CCD-IRIS (Sony).

3.8 Análise Estatística

Os dados do peso ao nascer, distância ano-genital, peso do cérebro e hipocampo, análise dendrítica e western blotting foram submetidos ao teste *t student*. Para as análises comportamentais foi utilizado ANOVA two-way-*Repeated measures*. Os resultados foram expressos como média \pm Desvio Padrão e considerado significativo quando $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Peso ao Nascer

O peso ao nascer dos animais do grupo LP foi significativamente reduzido nos machos (figura 6 A) (NP, 6.49 ± 0.0678 n=45 vs LP, 5.53 ± 0.11 n=47 $p < 0.0001$) e fêmeas (figura 6 B) (NP, 6.00 ± 0.073 n=50 vs LP, 5.18 ± 0.082 n=51 $p < 0.0001$), quando comparado com os animais do grupo NP.

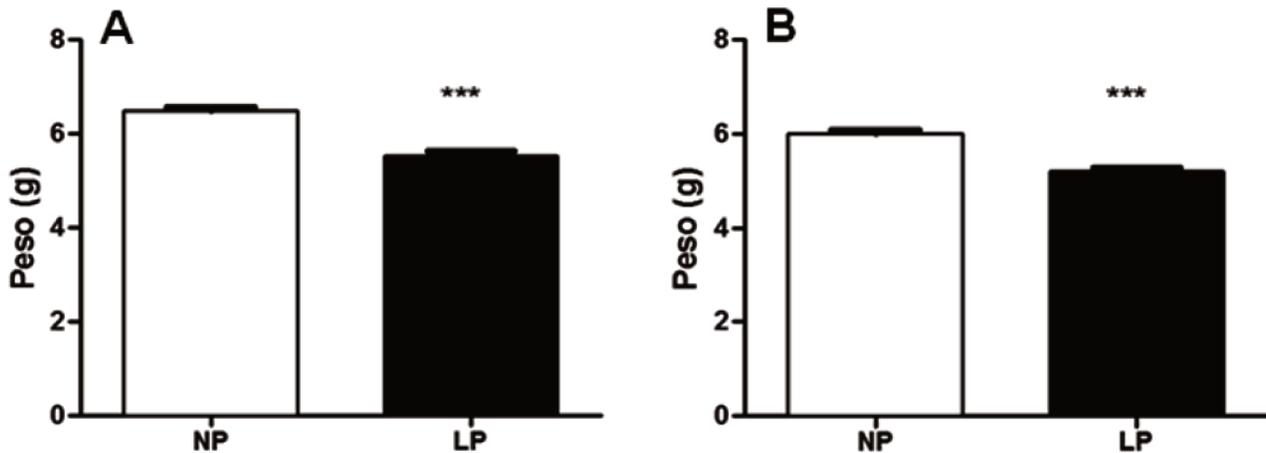


Figura 6. Peso ao nascer dos Machos (A). Peso ao nascer fêmeas (B).

4.2 Distância Ano-genital

Em relação à distância ano-genital, os machos do grupo LP apresentaram aumento na distância, quando comparados com o grupo NP (figura 7 A) (NP, 1.40 ± 0.027 vs LP, 1.51 ± 0.025 n=43 $p = 0,007$), já as fêmeas do grupo LP apresentaram significativa diminuição da distância quando comparados com o grupo NP (NP, 0.72 ± 0.018 n=47 vs LP, 0.65 ± 0.014 n=46 $p=0,004$) (figura 7 B).

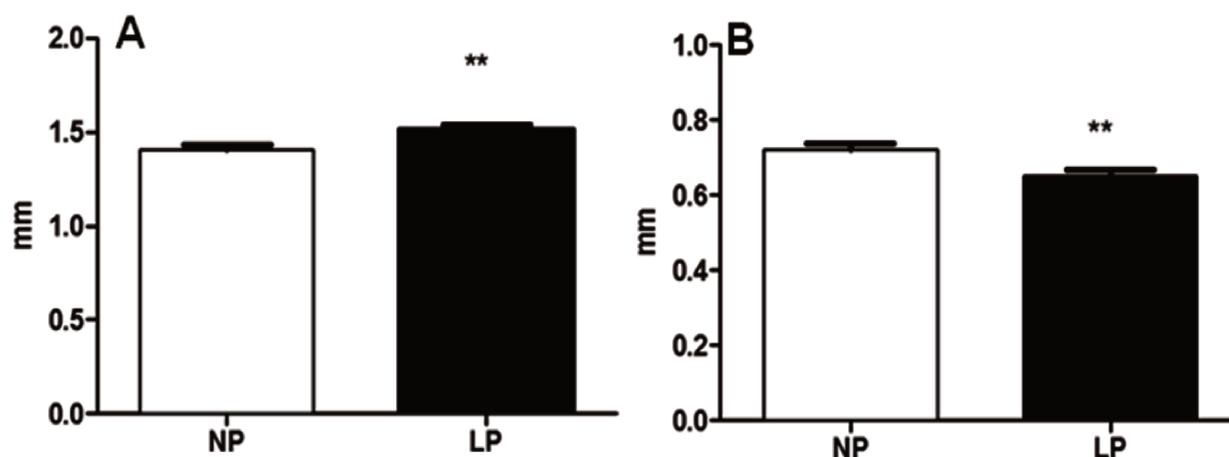


Figura 7. Distância ano-genital dos machos (A) e fêmeas (B).

4.3 Peso do cérebro

Em relação ao peso do cérebro não obtivemos diferenças significativas (NP, 0.0056 ± 0.00012 n=15 vs LP, 0.0059 ± 0.00012 n=24 p= 0,15) (figura 8).

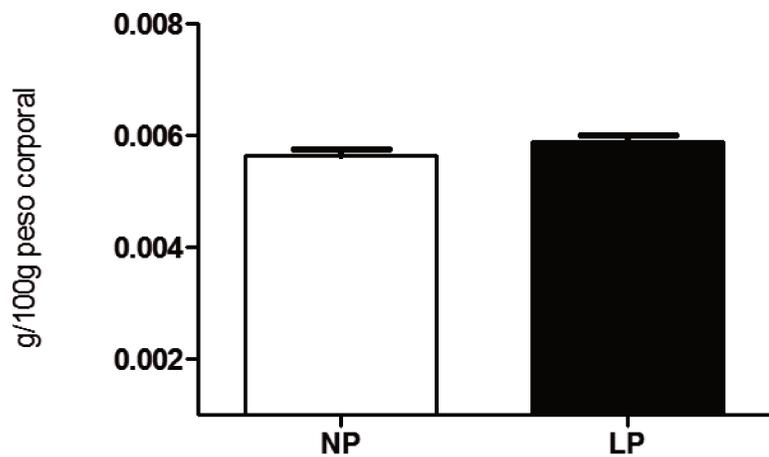


Figura 8. Peso do cérebro

4.4 Estudo comportamental no labirinto aquático de Morris

4.4.1 Memória de trabalho

Em relação aos resultados do labirinto aquático de Morris, quando observados os parâmetros de memória de trabalho, não encontramos diferenças significativas entre os grupos experimentais na latência de escape ($F=1,21$, $p=0,28$), (figura 9) e na distância percorrida ($F=0,19$, $p=0,8$), (figura 10). No entanto, quando comparados ao longo dos *trials* encontramos diferenças significativas, demonstrando assim que houve aprendizado do animal ($F=29,41$, $p<0,0001$).

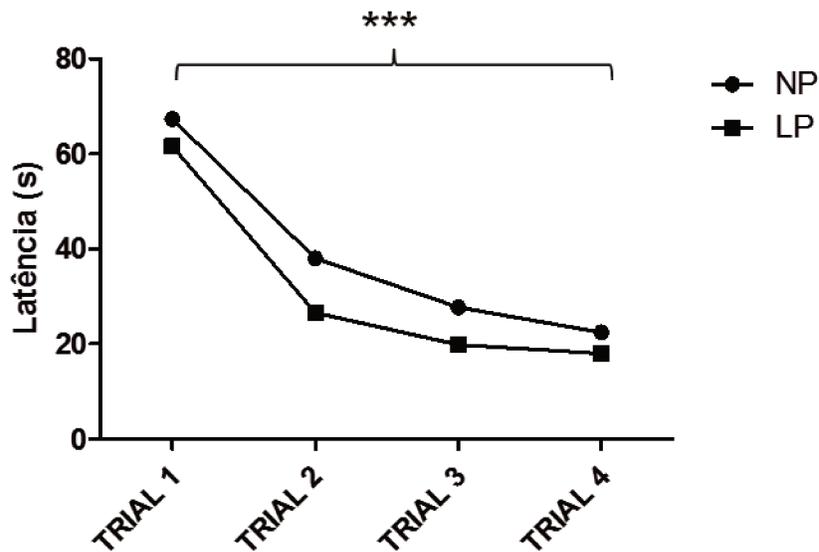


Figura 9. Tempo (seg) gasto pelo animal para encontrar a plataforma

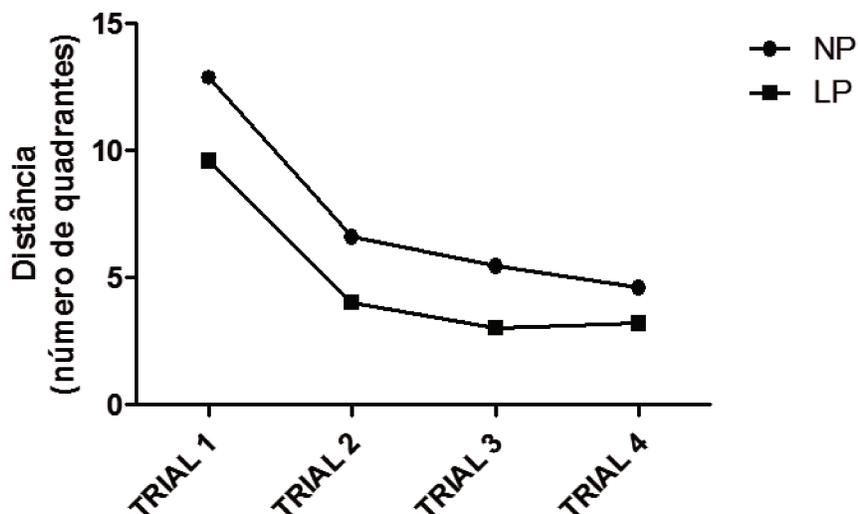


Figura 10. Distância percorrida para encontrar a plataforma

4.4.2 Memória de Referência

Em relação à memória de referência, não verificamos diferenças significativas entre os grupos experimentais na latência de escape ($F=0,76$, $p=0,39$), (figura 11), e na distância percorrida ($F=0,03$, $p=0,9$), (figura 12). No entanto, podemos confirmar a eficiência do teste quando analisado ao longo dos dias demonstrando que houve aprendizado do animal ($F=13,43$, $p<0,0001$).

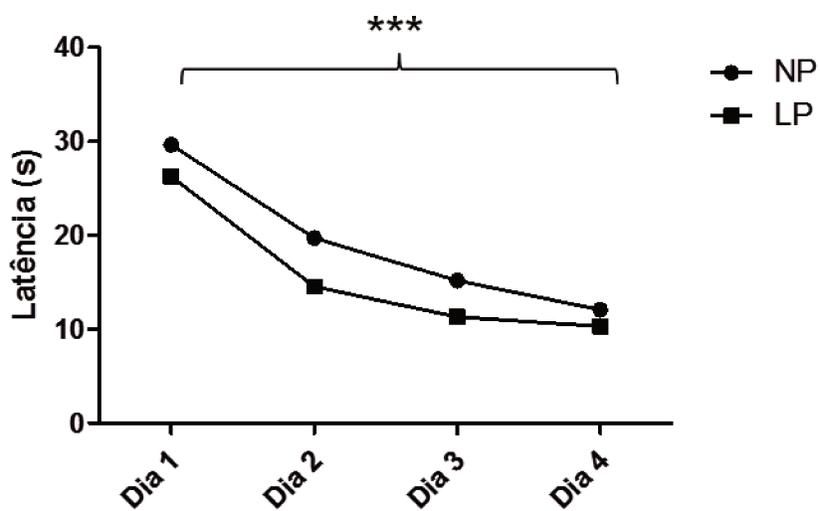


Figura 11. Tempo (seg) gasto pelo animal para encontrar a plataforma

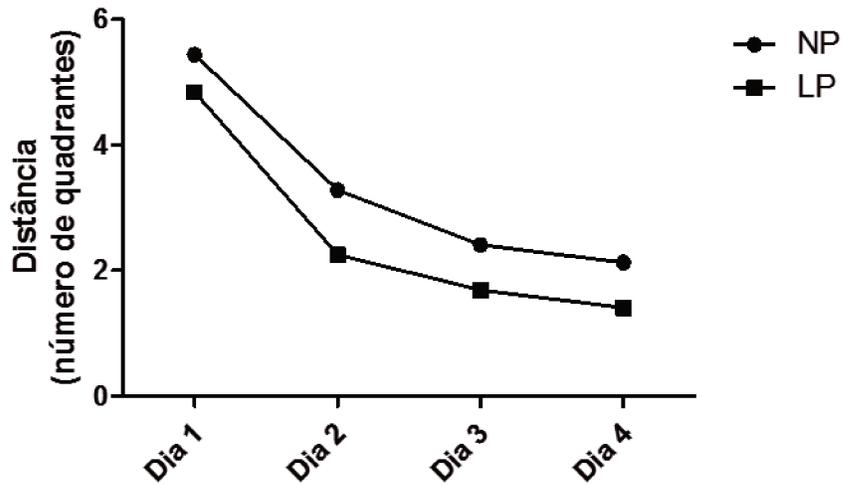


Figura 12. Distância percorrida para encontrar a plataforma.

4.5 Análise Dendrítica

Através da morfologia dendrítica, analisamos os dendritos de neurônios do giro denteado e os dendritos apicais e basais de CA1 e CA3. Em neurônios piramidais de CA1 não encontramos diferenças significativas no comprimento dos dendritos apicais (NP, 1450 ± 101.9 n=22 vs LP, 1638 ± 99.52 n=20 $p= 0,194$), (figura 13 A) e nem nos basais (NP, 1024 ± 77.90 n=22 vs LP, 1175 ± 93.99 n=21 $p= 0,221$), (figura 13 B).

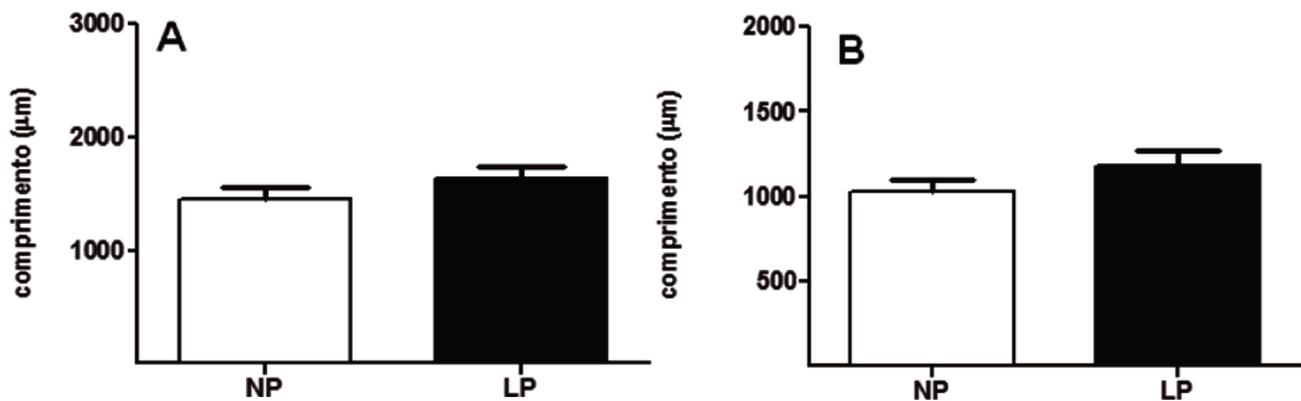


Figura 13. Comprimento dos dendritos apicais (A) e basais (B) de CA1.

Nos neurônios piramidais de CA3, observamos significativa diminuição do comprimento dos dendritos basais no grupo LP (NP, 1265 ± 102.3 n=19 vs LP, 920.5 ± 72.49 n=18 p= 0,01), (figura 14 B), já nos dendritos apicais não encontramos diferenças (NP, 1621 ± 131.8 n=20 vs LP, 1360 ± 120.0 n=19 p= 0,15).

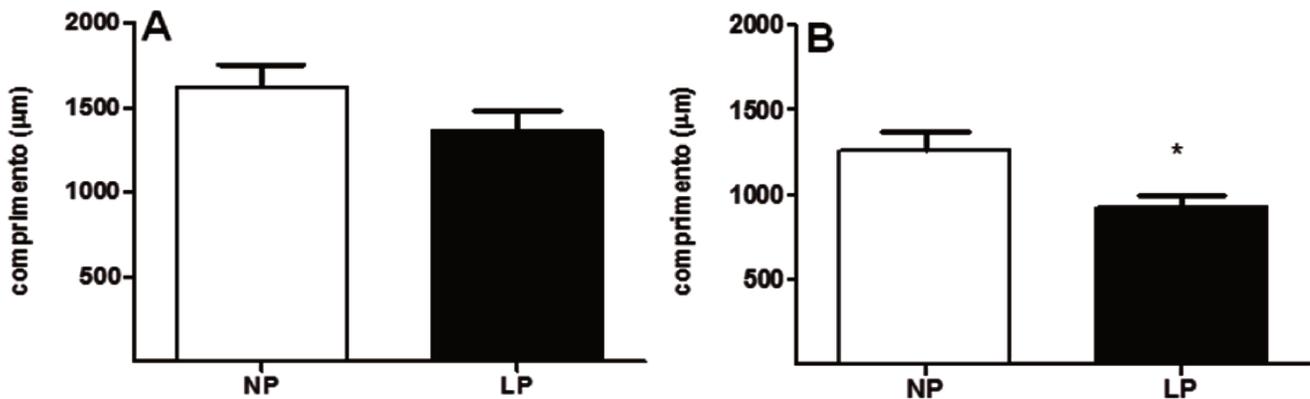


Figura 14. Comprimento dos dendritos apicais (A) e basais (B) de CA3.

Quanto ao comprimento dendrítico dos neurônios granulares do giro denteado não observamos diferenças entre os grupos (NP, 1841 ± 146.2 n=25 vs LP, 1794 ± 126.7 n=22 p=0,81), (figura 15).

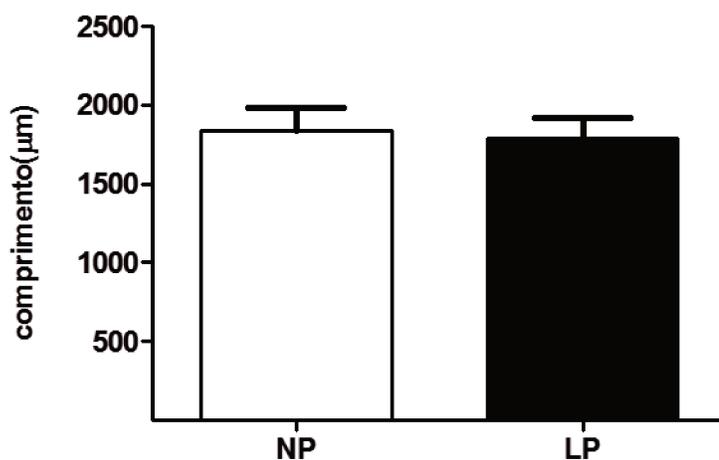


Figura 15. Comprimento dos dendritos de neurônios do giro denteado

4.6 Análise de Sholl

Através da análise de Sholl, observou-se que os animais do grupo LP apresentaram diminuição significativa das ramificações dendríticas apicais, dos neurônios piramidais de CA3. Esta redução ocorreu em um raio entre 50 e 120 μ m do pericário (figura 16).

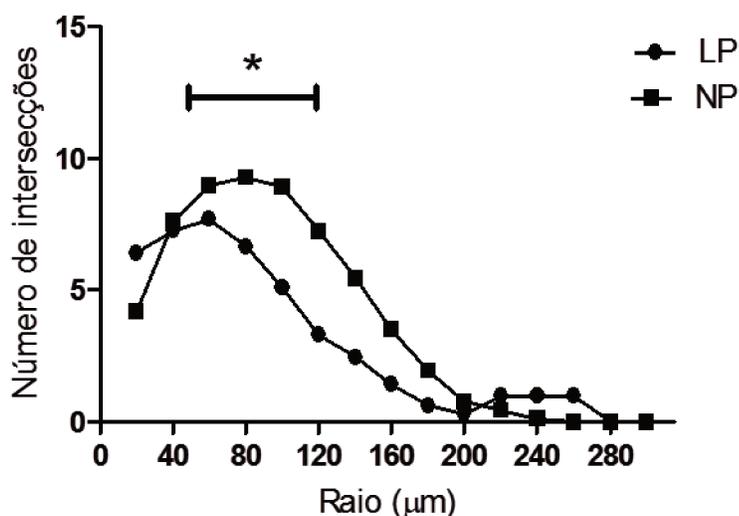


Figura 16. Número de intersecções dos dendritos apicais de CA3

4.7 Western Blotting e Imunoistoquímica

Na análise por western blotting no hipocampo dorsal e ventral isolados, embora não tenhamos obtido valores com diferença estatisticamente significativa, nós verificamos que os animais do grupo LP apresentaram diminuição de 45% na expressão de GR no hipocampo dorsal (NP, 100.0 ± 20.11 n=4 vs LP, 55.56 ± 45.40 n=3 p=0,3) (figura17 A), e 61% no hipocampo ventral (NP, 100.0 ± 39.16 n=3 vs LP, 66.52 ± 30.00 n=4 p=0,5) (figura 17 B).

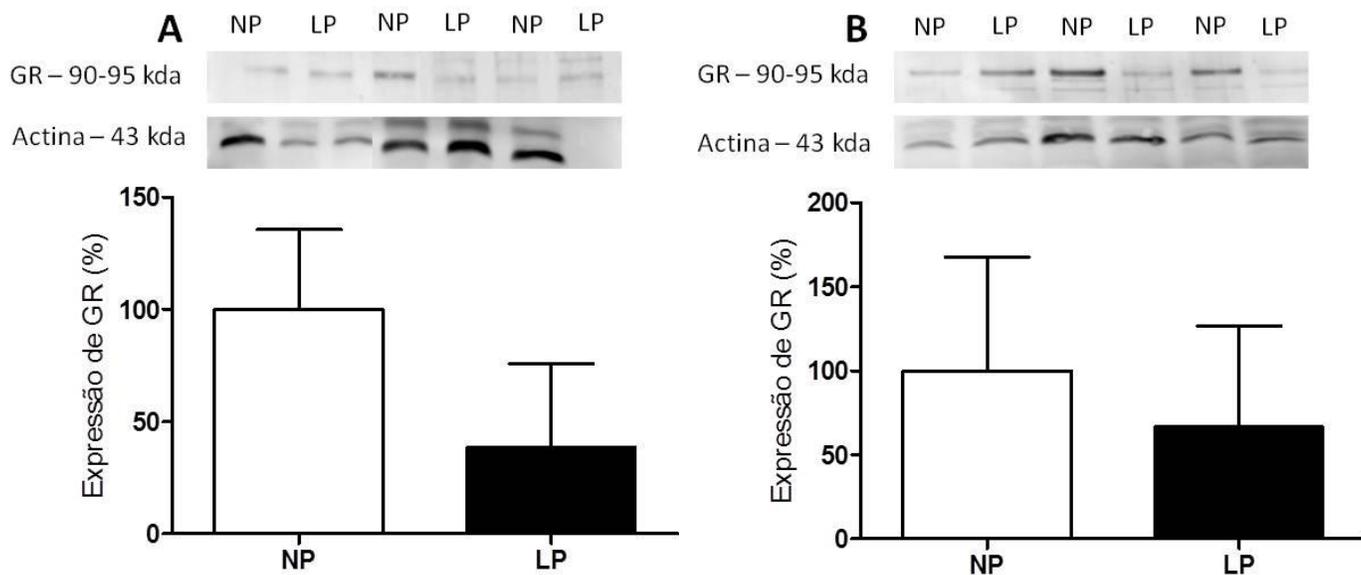


Figura 17. Expressão de GR no hipocampo dorsal (A) e ventral (B) (Valores normalizados com actina).

Pela análise imunoistoquímica verificamos que no hipocampo dorsal a redução da imunoreatividade de GR é evidente nas três regiões estudadas, já no hipocampo ventral parece não haver diferenças evidentes (figura 18).

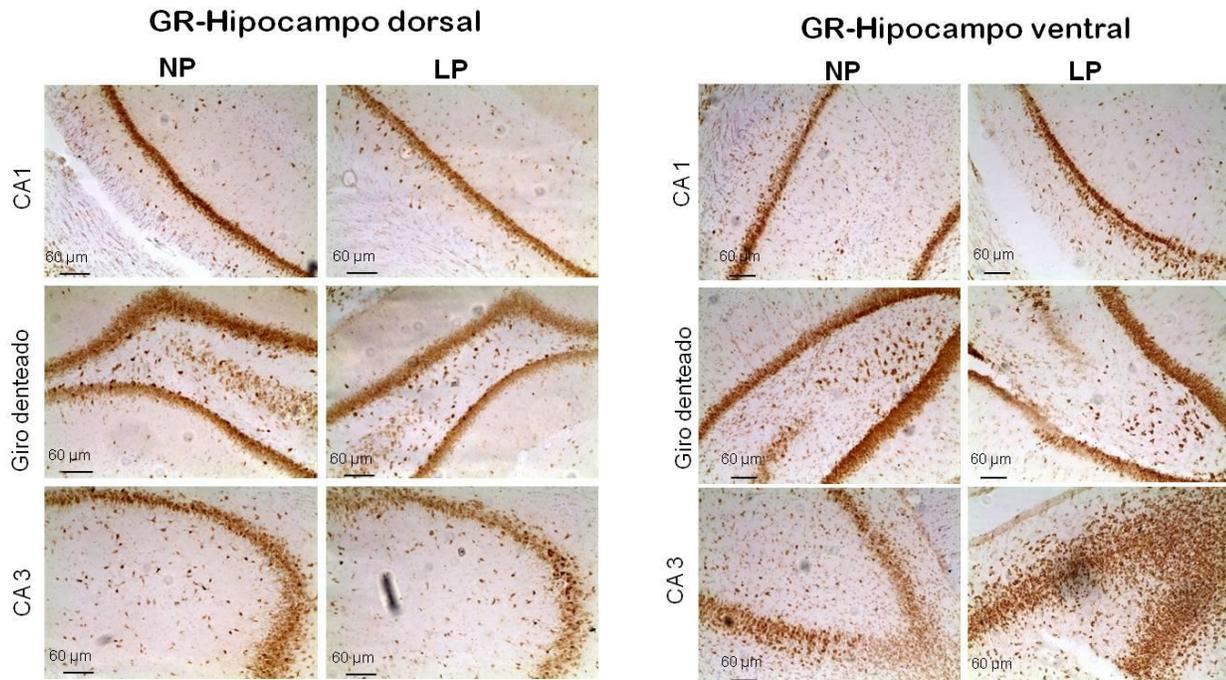


Figura 18. Imunolocalização de GR no hipocampo dorsal e ventral

Quanto aos receptores MR, não obtivemos resultados satisfatórios pela técnica de Western blotting em hipocampo dorsal e ventral. Entretanto, a análise por Western blotting de hipocampo total não revelou diferença significativa na expressão deste receptor (NP, 100.0 ± 30.48 n=3 vs LP, 98.41 ± 23.32 n=3 p=0,9), (figura 19).

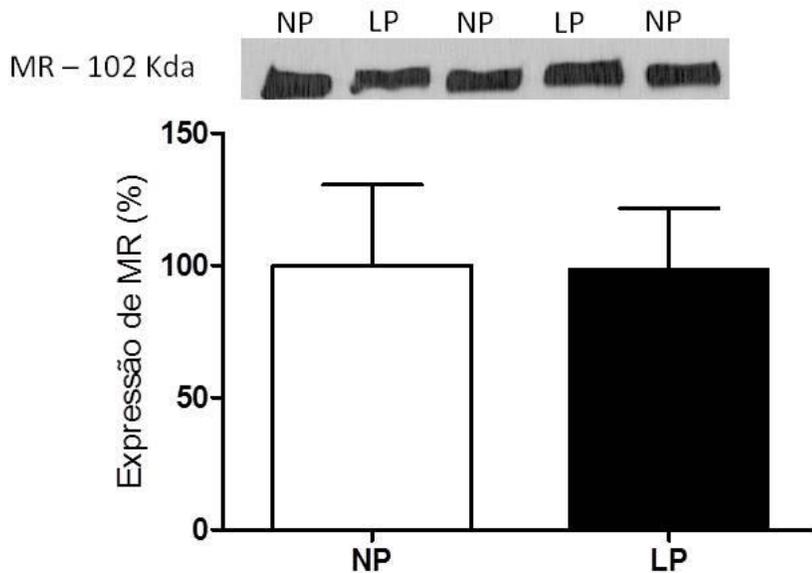


Figura 19. Expressão de MR no hipocampo total

A imunistoquímica revelou que tanto no hipocampo dorsal quanto no ventral ocorreu redução na imunorreatividade em CA1 e aumento em CA3, já no giro denteado não foi observado alteração (figura 20).

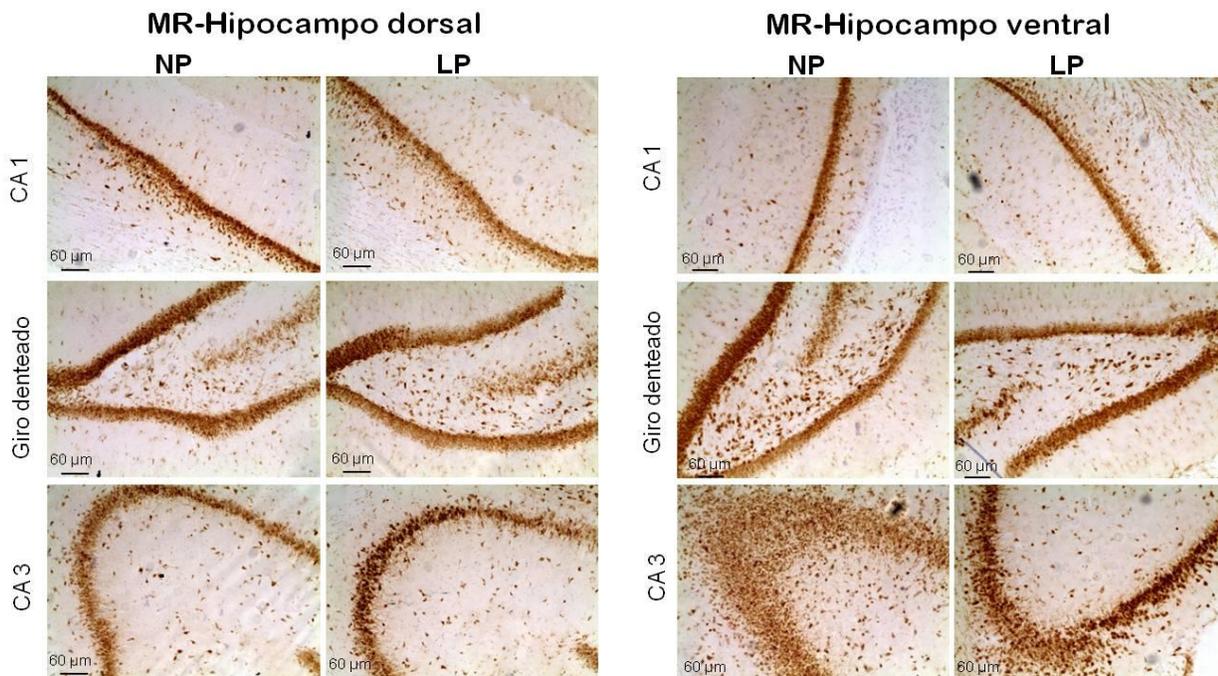


Figura 20. Imunolocalização de MR no hipocampo dorsal e ventral

Em relação aos receptores AT1 no hipocampo total observamos redução significativa de 91% em animais do grupo LP (NP, 100.0 ± 18.26 n=3 vs LP, 9.790 ± 4.375 n=3 p=0.003), (figura 21)

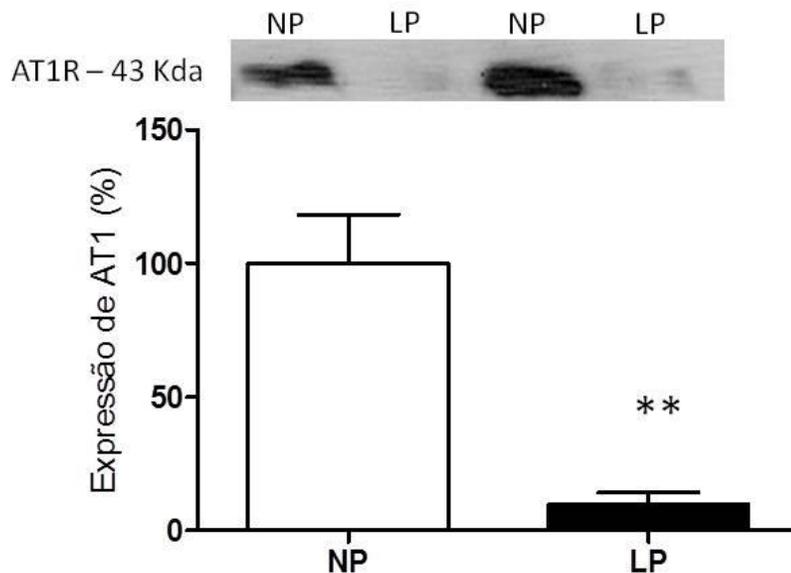


Figura 21. Expressão de AT1 no hipocampo total

No entanto, na análise do hipocampo separado em dorsal e ventral, o receptor AT1 apresentou expressão diminuída, embora não estatisticamente significativa, no hipocampo dorsal em 35% (NP, 100.0 ± 33.34 n=3 vs LP, 65.37 ± 20.47 n=4), (figura 22 A) e de 50% no hipocampo ventral (NP, 100.0 ± 52.56 n=4 vs LP, 50.08 ± 30.63 n=5), (figura 22 B). A figura 23 mostra que pela imunolocalização os receptores AT1 estão diminuídos em todas as subregiões hipocampais.

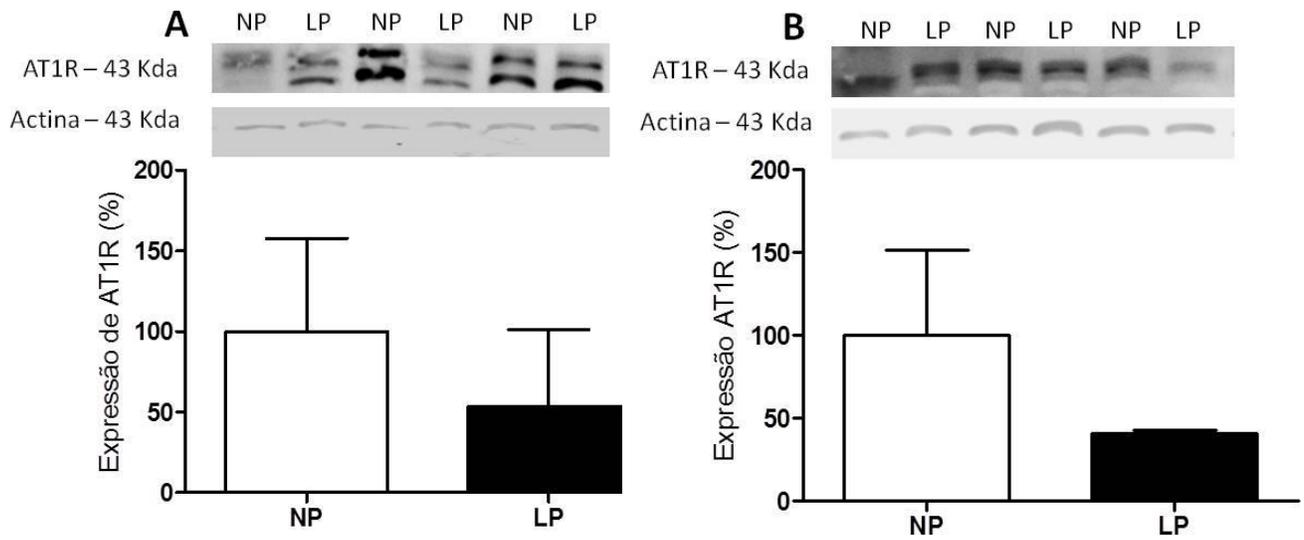


Figura 22. Expressão de AT1 no hipocampo dorsal (A) e ventral (B) (Valores normalizados com actina)

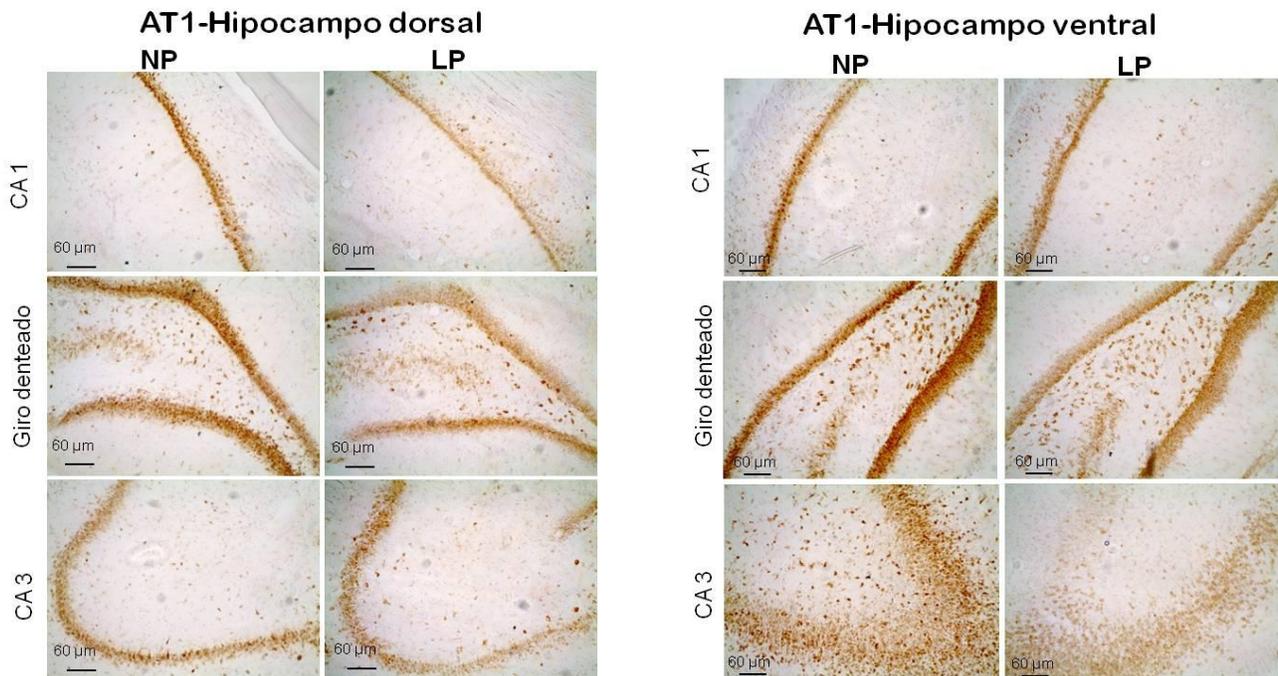


Figura 23. Imunolocalização de AT1 no hipocampo dorsal e ventral.

Houve, embora sem significância estatística, diminuição de 40% na expressão de 5HT_{1A} no hipocampo dorsal (NP, 100.0 ± 9.679 n=3 vs LP, 60.25 ± 29.24 n=3 p= 0,2), (figura 24 A) e no ventral de 20% (NP, 100.0 ± 21.43 n=3 vs LP, 80.90 ± 28.95 n=3 p=0,6), (figura 24).

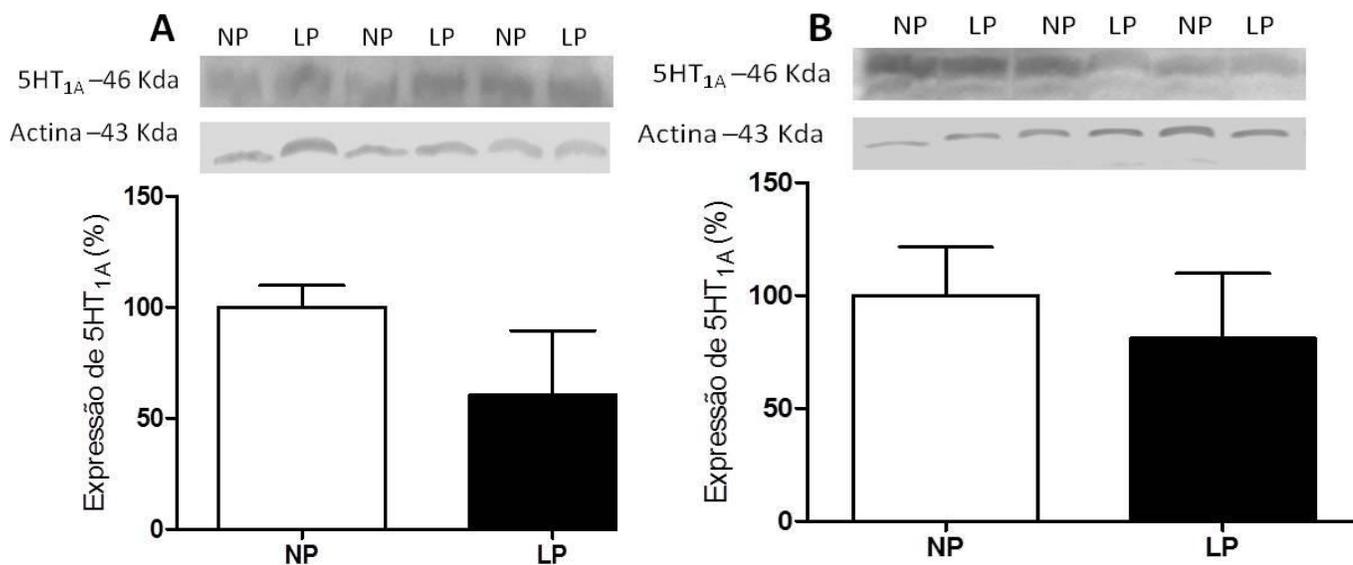


Figura 24. Expressão de 5HT_{1A} no hipocampo dorsal (A) e ventral (B) (Valores normalizados com actina)

A análise imunoistoquímica também revelou redução de 5HT_{1A} nos animais do grupo LP, tanto no hipocampo dorsal como no ventral nas três subregiões (figura 25).

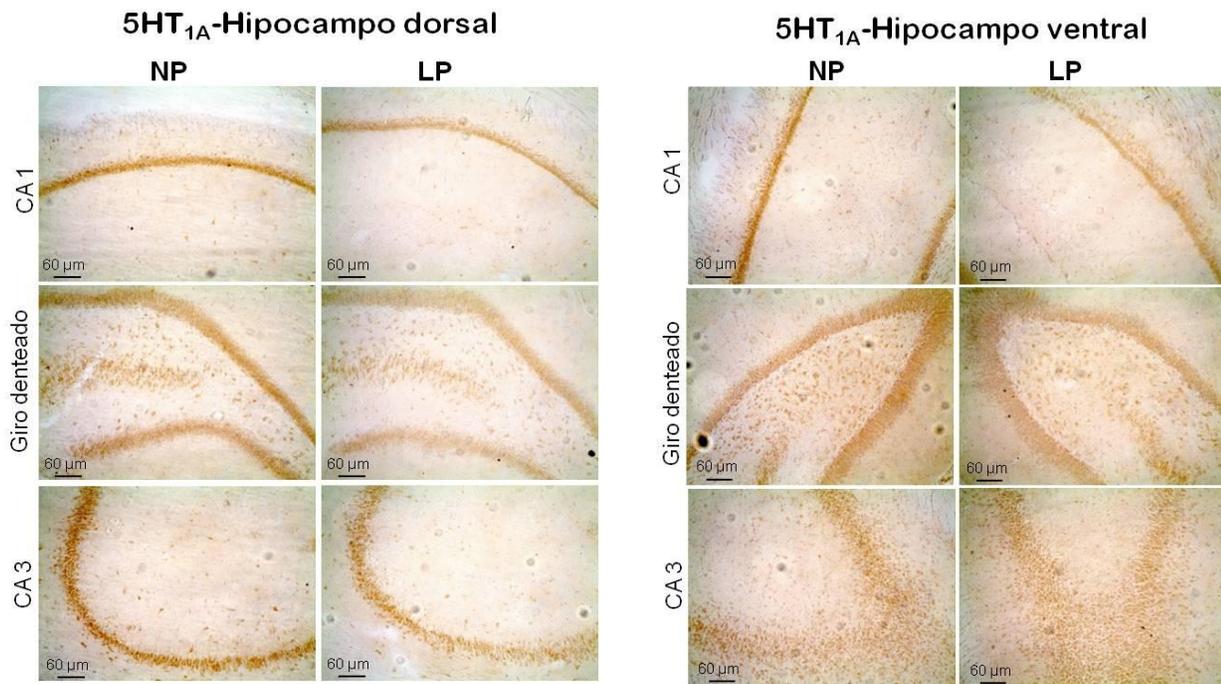


Figura 25. Imunolocalização de 5HT_{1A} no hipocampo dorsal e ventral.

Os resultados obtidos por western blotting para o receptor 5HT_{2A} não foram satisfatórios, sendo necessária realizar repetições. Já a análise imunoistoquímica demonstrou aumento na imunorreatividade deste receptor tanto no hipocampo dorsal quanto no ventral em todas as subregiões, exceto na CA3 do hipocampo ventral (figura 26).

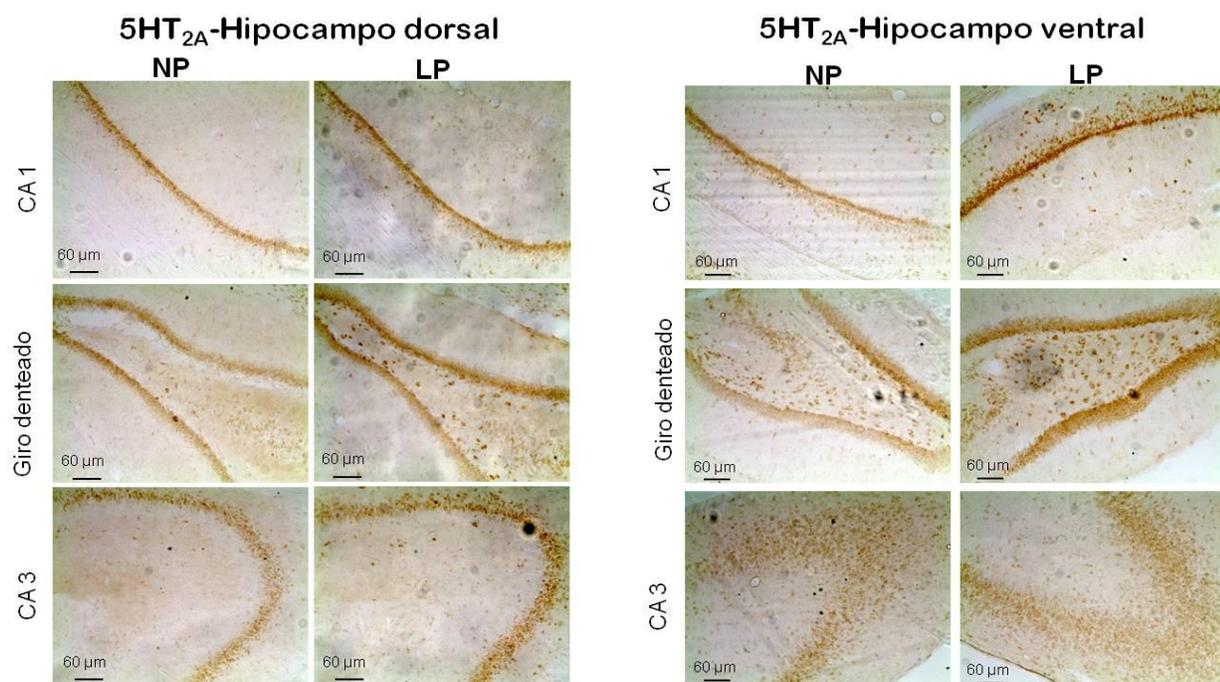


Figura 26. Imunolocalização de 5HT_{2A} no hipocampo dorsal e ventral.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Em países desenvolvidos e em desenvolvimento a desnutrição materno-infantil tem repercussões evidentes sobre a saúde de populações. O déficit de nutrientes em diferentes graus e períodos da vida pré-natal, ou mesmo no período pós-natal, prejudica consideravelmente o desenvolvimento e a maturação de órgãos chave (Tonkiss et al, 1988). A organogênese em diferentes espécies é controlada por diversos fatores que podem alterar o desenvolvimento dos órgãos e sistemas gerando consequências na saúde do indivíduo adulto. Assim, as alterações impostas pelo ambiente durante a ontogênese podem ter efeitos, deletérios ou adaptativos, permanentes que em situações específicas aumentam o risco de doenças na idade adulta (Barker, 2005; Gluckman, 2006).

O desenvolvimento do sistema nervoso em mamíferos é dependente de fatores internos e externos ao próprio sistema. No entanto os fatores externos têm recebido cada vez mais atenção, devido a sua grande influência na neuroplasticidade. Assim, a deficiência de nutrientes durante a gestação pode resultar em anormalidades estruturais no sistema nervoso central bem como em déficits cognitivos na prole (Reyes-Castro et al., 2010, Diaz-Cintra et al., 1991).

A formação hipocampal tem sido alvo de diversos estudos devido a sua importância na plasticidade neural e na regulação de processos cognitivos. Dessa forma, este estudo buscou avaliar os efeitos da restrição proteica gestacional sobre a estrutura hipocampal, as funções de memória e aprendizado bem como a expressão e localização de receptores esteróides, angiotensinérgico e serotoninérgicos em ratos machos adultos.

Os resultados do presente estudo confirmaram a significativa redução do peso ao nascer dos animais do grupo LP, já descrito pelo nosso grupo neste modelo de restrição proteica gestacional (Mesquita et al, 2010). Além disso, nós também observamos aumento na distância ano-genital nos machos da prole que sofreu restrição proteica gestacional. Zambrano et al (2005) observou aumento da

distância ano-genital na prole de fêmeas que sofreram restrição proteica gestacional. No entanto, essas fêmeas com 19 dias de gestação apresentaram aumento na concentração plasmática de progesterona, corticosterona, estradiol e testosterona. A exposição à esteroides maternos pode aumentar a distância ano-genital (Hotchkiss et al., 2007). Além disso, os efeitos destes esteroides no desenvolvimento fetal podem influenciar parâmetros comportamentais da prole (Puts et al., 2008).

Sabe-se que o sistema límbico, particularmente o hipocampo e o córtex pré-frontal exercem papel central na cognição (Squire and Zola, 1996). Para avaliar as funções de aprendizado e memória espacial de referência hipocampo-dependente realizamos o teste do labirinto aquático de Morris. Este teste foi adaptado para verificar também a memória de trabalho por usar o mesmo modelo experimental e por recrutar as mesmas habilidades para a execução do teste (Kesner, 2000). Tanto o hipocampo quanto o córtex pré-frontal estão envolvidos no processamento da memória espacial (Lee and Kesner, 2003). A aquisição da memória de referência requer estrutura e funções hipocampais para formar associações espaciais que permanecem constantes, enquanto que a memória de trabalho pode ser descrita como um sistema de capacidade limitada que permite processar e armazenar informações temporariamente (Goldman-Rakic, 1995) pelo PFC. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos LP e NP, em qualquer um dos parâmetros analisados, sugerindo que tais funções do hipocampo não foram alteradas com a restrição de proteína gestacional. Em um modelo similar de restrição proteica gestacional Tonkiss et al., (1994; 1997), também não encontraram alterações na memória e aprendizado espacial, nem tampouco na memória de trabalho (Tonkiss e Galler, 1990). Entretanto não podemos descartar a hipótese de que, em outros tipos de testes comportamentais, possamos encontrar alterações nestes parâmetros.

No entanto, através da aplicação da análise tridimensional por coloração de Golgi-Cox no hipocampo dorsal, região que está relacionada ao aprendizado e à memória, demonstramos que a restrição proteica gestacional leva a diminuição em

cerca de 27% no comprimento total dendrítico basal e no número de intersecções dos dendritos apicais, em um raio entre 50-120 μm do pericário, de neurônios piramidais de CA3. A citoarquitetura dendrítica dos neurônios do giro denteado e de CA1 manteve-se inalterada.

Estudos demonstram que a exposição gestacional ao estresse (Weinstock et al., 1992), ou a administração de hormônios do estresse (Fameli et al, 1994), durante a gestação levam ao aumento na concentração plasmática de corticosterona na prole. Além disso, diversos estudos vêm demonstrando que o estresse pré-natal está associado às alterações do eixo HHPA da prole (para revisão ver Charil et al, 2010).

Wellman (2001) verificou que a injeção de corticosterona em ratos adultos, diariamente durante 3 semanas, provocou reorganização da arborização dendrítica e redução no comprimento dos dendritos distais de neurônios do córtex pré-frontal.

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 á estressores durante a gestação, já que a maioria dos estudos com animais sobre efeitos do estresse gestacional no desenvolvimento do cérebro envolve roedores e o estresse de fêmeas prenhas durante a última semana gestacional, que é um período de desenvolvimento ativo de várias regiões do cérebro de roedores. Além disso, estudos em macacos *Rhesus* feitos por Col e colaboradores (2003) sugerem que o estresse gestacional pode ter efeitos neurais similares aos obtidos em roedores. Assim, Estes resultados sugerem que se a proliferação é afetada e os eventos subseqüentes como migração podem ser afetados. Finalmente, a diferenciação celular também pode ser afetada (Rice e Barone, 2000).

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

Quanto à formação hipocampal, a literatura tem mostrado que tanto o estresse crônico quanto o tratamento farmacológico com corticosteroides (ex. dexametasona) induzem a atrofia de dendritos dos neurônios piramidais de CA3 (Fuchs et al, 1995; Magarinos e McEwen, 1995; Woolley et al, 1990). Mais especificamente, as alterações estruturais na região CA3 do hipocampo dorsal têm sido relatadas como consequência neural de estresse crônico (Watanabe et al, 1992b;. Magariños et al 1996; McEwen e Magariños, 1997; Lambert et al, 1998; Vyas et al, 2002; Christian et al, 2011). No entanto, existem poucos estudos demonstrando alterações em dendritos basais de CA3. Por outro lado, diversos estudos têm relatado que quando estas condições são impostas no início da vida pós-natal, ocorre diminuição no comprimento e nos pontos de ramificação dos neurônios apicais de CA1 e CA3 (Sousa et al, 2000; Watanabe et al, 1992). Estes efeitos podem ser suprimidos por inibidores químicos (Magarinos e McEwen, 1995a,b; Woolley et al., 1990) sugerindo que os hormônios do eixo HHPA podem modular a morfologia dendrítica no hipocampo (Sousa et al., 2000).

Os esteróides adrenais parecem ser fator crucial na remodelação estrutural do hipocampo (McEwen, 1999). Os receptores de mineralocorticóides hipocampais medeiam a neurogênese do hipocampo enquanto que os receptores de glicocorticoides estão envolvidos na supressão da sua morfologia (Fujioka et al., 2006). O estresse induz a retração dendrítica de CA3, no entanto estes efeitos podem ser prevenidos bloqueando a síntese de esteroides (Magariños e McEwen, 1995). Em nosso modelo observamos aumento significativo, de cerca de 132%, na concentração sérica de corticosterona em ratos com 16 semanas de idade que sofreram restrição proteica gestacional (Torres et al., 2012) e este pode ser um fator crucial envolvido na remodelação estrutural do hipocampo, como observado neste estudo. No entanto, nosso estudo não é capaz de responder se atrofia dendrítica de CA3 está relacionada com subdesenvolvimento *in utero* ou é

resultante de uma adaptação pós-natal para a fisiologia programada na vida adulta. Estudos posteriores devem ser realizados para avaliar a ação da corticosterona sobre a formação hipocampal em diferentes fases do desenvolvimento.

Não somente a morfologia, mas também a neuroquímica pode ser afetada por fatores pré-natais. A maioria dos estudos que investiga a expressão de proteínas hipocampais considera resultados obtidos em hipocampo total. Aqui nós verificamos grande variação entre os resultados obtidos em hipocampo total e em amostras isoladas de hipocampo dorsal e ventral. Além disso, mesmo separando as regiões dorsal e ventral, a análise por imunoblotting não permite diferenciar a expressão em CA1, CA3 e giro dentado separadamente e a imunohistoquímica nos revelou padrões distintos de alterações nestas regiões.

Como já citado os corticosteróides desempenham papel central na gênese das alterações neurais quer seja por estresse psicológico ou nutricional ou por administração de DEX durante a gestação. Nossos resultados demonstraram padrões de alteração específicos na expressão de GR no hipocampo dorsal e ventral dos animais LP. Na porção dorsal observamos redução de cerca de 45% na expressão destes receptores e na ventral a redução foi de 61%. Como a porção ventral está implicada primariamente no processamento das emoções (Bannerman et al., 2004) esta redução pode ter implicações importantes no comportamento de ansiedade e depressão nos animais adultos que sofreram restrição proteica gestacional. Além disso, os GR hipocampais participam do *feedback* negativo na resposta ao estresse (McEwen, 1999) e esta redução pode estar relacionada a atividade aumentada do eixo HHPA, com aumento no tempo de resposta ao estresse, em animais programados (Jankord e Herman, 2008).

Em ratos, existem evidências de que a função pós-natal do eixo HHPA pode ser alterada por eventos pré-natais. Tais alterações podem ocasionar, no adulto, exposição cronicamente aumentada a glicocorticóides 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 glicocorticóides (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 ACTH e de glicocorticóides. Em fetos de porcos, 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 os glicocorticóides neurais interagem para modular tanto o comportamento quanto a atividade do eixo HHPA (Mcewen, 1987) é possível que os efeitos do estresse pré-natal, psicológico ou nutricional, sejam mediados por alterações permanentes nestes sistemas (Welberg e Seckl, 2001).

Alterações na regulação do eixo HHPA são componentes consistentes em vários tipos de transtornos afetivos, como depressão, transtornos de pânico e transtorno obsessivo-compulsivo (Green et al., 2011).

Com relação aos MR a expressão hipocampal em ratos do grupo LP foi menor em CA1 e maior em CA3 quando comparada àquela verificada nos animais LP, tanto na porção dorsal quanto na ventral.

As concentrações de cortisol ou corticosterona circulantes são, respectivamente, 100x 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 (Gomez-Sanchez, 2011).

Como em nosso modelo existe elevação crônica dos níveis de corticosteroide, este estaria ligado, preferencialmente, aos MR que se apresentam mais expressos no CA3 dorsal e ventral dos animais LP paralelamente à redução de GR.

Não somente os receptores esteróides podem estar envolvidos nas alterações neuroquímicas provocadas pela programação fetal. 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; Paol et al, 2006). 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 (para revisão ver Saavedra et al, 2011).

Sabendo que o bloqueio do receptor AT1 afeta significativamente a concentração de CRF e que este está envolvido no controle regulatório cognitivo e comportamental nós avaliamos a expressão dos AT1R no hipocampo de animais

do nosso modelo. Nossos resultados demonstraram significativo decréscimo (~90%) na expressão de receptores AT1 hipocampais.

Usando o teste comportamental do labirinto em cruz elevado nós demonstramos, recentemente, significativo decréscimo no tempo de permanência dos animais do grupo LP nos braços abertos indicando aumento da ansiedade em animais de 16 semanas de vida (Torres et al 2012). O núcleo da estria terminal (BNST) medeia resposta ao estresse estando envolvido no comportamento afetivo, de medo e de ansiedade. 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. Assim, nós investigamos a expressão de receptores MR, GR, AT1 e 5HT_{1A} nesta região e verificamos que ocorre redução na expressão de MR e 5HT_{1A} associada a elevação na expressão de GR, MR e AT1, aumentando as vias ansiogênicas e reduzindo as vias ansiolíticas, em LP, além de atrofia de neurônios do BNST (Torres et al, 2012).

Assim, podemos supor que a reduzida expressão de AT1 no hipocampo tenha efeito protetor à ativação exacerbada de vias ansiogênicas (no BNST e no hipocampo) e à resposta exacerbada ao estresse.

Os receptores 5HT_{1A} e 5HT_{2A} estão implicados na modulação do comportamento de ansiedade e desordens de humor (Van den Hove et al, 2006) demonstraram que ratos submetidos ao estresse pré-natal apresentam redução de 5HT_{1A} no hipocampo ventral podendo ter conseqüências importantes no comportamento de ansiedade e depressão no adulto. 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 a dexametasona e esta decresce tanto a concentração quanto a retroalimentação do 5-HT cerebral e também a densidade de recaptção de 5-HT nos locais de sinapses. Nossos resultados demonstram que em ratos LP ocorreu redução de cerca de 35% dos receptores 5-HT_{1A} no hipocampo dorsal e 20% no ventral. Paralelamente, encontramos aumento na expressão de 5HT_{2A} no hipocampo de

animais do grupo LP. Existe uma associação direta entre a atividade e resposta do eixo HHPA e os receptores 5HT_{1A} hipocampais que são inibidos tonicamente pela corticosterona (Chalmers et al., 1994) cuja concentração basal é aumentada em nosso modelo. Além disso, a ativação dos receptores 5HT_{1A} medeia a resposta inibitória, frente ao 5-HT levando à resposta ansiolítica, isto é, reduzindo o comportamento de ansiedade (Levita et al, 2004) e, contrariamente, o receptor 5HT_{2A} medeia a resposta excitatória, isto é, ansiogênica (para revisão ver Hammack et al 2009). Assim, estes resultados reforçam o aumento dos mediadores do comportamento de ansiedade. Vyas et al (2002) sugerem que o estresse crônico pode levar à alterações na função do eixo HHPA pela perda gradual do controle inibitório hipocampal e ganho no controle excitatório exercido pela amígdala.

O presente estudo revelou clara dissociação entre a resposta do teste comportamental no labirinto aquático de Morris e alterações na morfologia e neuroquímica de neurônios hipocampais, como consequência da programação fetal. Assim o significado funcional destas alterações em termos de impacto absoluto sobre o hipocampo permanece uma incógnita.

Recentemente Koubeissi et al. (2011) demonstraram que a transecção bilateral da camada CA3 do hipocampo dorsal não afetou o desempenho no labirinto aquático de Morris em ratos. Nós também não encontramos diferenças significativas no desempenho dos animais neste teste, a despeito de redução no comprimento e na arborização dendrítica e diferenças na expressão de receptores nesta camada de células piramidais. Vários autores têm sugerido que a atrofia observada em dendritos de neurônios do hipocampo pode ser uma resposta compensatória para proteger o hipocampo de danos adicionais (Ohl e Fuchs, 1999; McEwen, 2001; Bartolomucci et al, 2002; de Quervain et al, 2009).

Curiosamente, apesar de estudos anteriores relatarem atrofia apenas nos dendritos apicais, nossos resultados indicam que a programação fetal causa significativa diminuição no comprimento dos dendritos basais dos neurônios piramidais de CA3. Vyas et al (2002) mostraram que o estresse de imobilização

crônica induz diminuição no comprimento dendrítico total e no número de pontos de ramificação nos dendritos apicais, bem como nos dendritos basais de CA3.

Os achados do presente estudo representam o impacto pré natal da desnutrição protéica correspondente a situação de estresse nutricional, no hipocampo que está envolvido no comportamento emocional bem como na memória e no aprendizado. 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 hipocampo podendo tornar estes animais vulneráveis a distúrbios neurais na idade adulta.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitem concluir que em ratos machos submetidos à restrição protéica gestacional ocorre:

No nascimento:

- Redução significativa de cerca de 15% do peso ao nascer e aumento de cerca de 7% da DAG, comparativamente aos animais do grupo controle;

Na 16^a semana de vida:

- Manutenção do peso do encéfalo comparativamente àquele encontrado em animais do grupo controle;
- Manutenção da capacidade de memória de trabalho e de referência testadas pelo MWM;
- Redução de cerca de 27% no comprimento dos dendritos basais e no número de ramificações dendríticas apicais nos neurônios de CA3 do hipocampo dorsal. Os dendritos de neurônios de CA1 e giro denteado da formação hipocampal dorsal não são alterados;
- Redução de 45% na expressão de GR dorsal e de 61% ventral em amostras totais destas regiões. Pela imunohistoquímica, esta redução foi evidente nas subregiões hipocampais dorsais, mas não nas ventrais;
- Manutenção na expressão de MR em amostra total de hipocampo com redução na expressão em CA1 e aumento em CA3 tanto dorsal quanto ventral, quando analisados separadamente;
- Redução significativa de 90% na expressão de AT1 em hipocampo total e de 35% dorsal e 50% ventral. Esta redução foi observada em todas subregiões hipocampais exceto no giro denteado dorsal;
- Redução de 40% na expressão de 5HT_{1A} dorsal e 30% na região ventral. Somente em CA3 ventral houve manutenção da expressão;

- Aumento na expressão de 5HT_{2A} ventral e dorsal exceto em CA3 ventral.

Desta forma podemos concluir que a restrição protéica gestacional provoca alterações na morfologia dendrítica dos neurônios piramidas da subregião CA3 na porção dorsal hipocampal sem comprometimento no comportamento de memória e aprendizado testados pelo MWM. Concluimos ainda que a complexidade estrutural e funcional da formação hipocampal exige análise detalhada das suas porções dorsal e ventral e das subregiões. As alterações na expressão de GR e MR, somadas ao aumento da concentração sérica de corticosterona, nos leva a concluir que estes estão envolvidos na resposta exacerbada do eixo HHPA observada neste modelo. A redução na expressão de 5HT_{1A} e o aumento na expressão de 5HT_{2A} demonstram o envolvimento do hipocampo no aumento do comportamento de ansiedade, observado anteriormente neste modelo. A significativa redução dos receptores AT1 nos leva a supor que ocorre uma adaptação no sentido de atenuar a resposta exacerbada ao estresse verificada neste modelo.

Estas alterações estruturais e neuroquímicas encontradas podem ter conseqüências importantes na gênese de distúrbios de ansiedade e humor bem como na depressão na idade adulta. Nosso estudo não nos permite responder se as alterações observadas são geradas *in útero* ou se ocorrem como resposta adaptativa a outros fatores para adaptação à fisiologia na vida adulta. Assim são necessários estudos em períodos gestacionais e no início da vida pré-natal para elucidar esta questão.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R.S.; HARLAN, R.E. Differential corticosteroid regulation of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system: topography and implications. **Endocrinol.** 1991;129:226-236.

ALMEIDA, S.S.; TONKISS, J.; GALLER, J.R. Malnutrition and reactivity to drugs acting in the central nervous system. **Neurosci Biobehav Rev.** 1996; 20:389-402.

ALTMAN, J.; DAS, G.D. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. **Nature.** 1965;207:953-956.

ANTONOW-SCHLORKE, I.; SCHWAB, M.; LI, C.; NATHANIELSZ, P.W. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. **J Physiol.** 2003; 547:117-123.

APPLEZWEIG, N. Steroids. **Chem Week.** 1969;104:57-72.

ARMANDO, I.; CARRANZA, A.; NISHIMURA, Y.; HOE, K.L.; BARONTINI, M.; TERRO´N, J.A.; FALCO´N-NERI, A.; ITO, T., JUORIO, A.V.; SAAVEDRA, J.M.; Peripheral administration of an angiotensin II AT(1) receptor antagonist decreases the hypothalamic-pituitary-adrenal response to isolation Stress. 2001. **Endocrinol.** 142:3880-3889.

BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.; YEE, B.K.; BAST, T., ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus-Memory and anxiety. **Neurosci Biobehav. Rev.** 2004;28:273-283.

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; 40:37-44.

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

BARKER, D.J.E.; BAGBY, S.P. Developmental antecedents of cardiovascular disease: a historical perspective. **J Am Soc Nephrol**. 2005;16:2437-2544.

BARNES, R.H. Dual role of environmental deprivation and malnutrition in retarding intellectual development. A.G. Hogan Memorial Lecture. **Am J Clin Nutr**. 1976;29:912-917.

BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R. Differential regulation of angiotensinogen and AT1A receptor mRNA within the rat subfornical organ during dehydration. **Brain Res Mol Brain Res**. 1999;64:151-164.

BARTOLOMUCCI, A.; DE BIURRUN, G.; CZECH, B.; VAN KAMPEN, M.; FUCHS, E. Selective enhancement of spatial learning under chronic psychosocial stress. **Eur. J. Neurosci**. 2002;15:1863-1866.

BAYER, S.A. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. **J Comp Neurol**. 1980;190:115-134.

BENÍTEZ-BRIBIESCA, L.; DE LA ROSA-ALVAREZ, I.; MANSILLA-OLIVARES, A. Dendritic spine pathology in infants with severe protein-calorie malnutrition. **Pediatrics**. 1999;104:121.

BLUNDELL, J.E. Serotonin and the biology of feeding. **Am J Clin Nutr.** 1992;55:155-159.

BOURET, S.G. Leptin, nutrition, and the programming of hypothalamic feeding circuits. **Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program.** 2010;65:25-35.

BREMNER, J.D.; RANDALL, P.; SCOTT, T.M.; BRONEN, R.A.; SEIBYL, J.P.; SOUTHWICK, S.M.; DELANEY, R.C.; MCCARTHY, G.; CHARNEY, D.S.; INNIS, R.B. MRI-based measurement of hippocampal volume in patients with combat-related posttraumatic stress disorder. **Am J Psychiatry.** 1995;152:973- 981.

BROZEK, J. Nutrition, malnutrition and behavior. **Bol Oficina Sanit Panam.** 1978;85:506-529.

CINTRA, A.; BHATNAGAR, M.; CHADI, G.; TINNER, B.; LINDBERG, J.; GUSTAFSSON, J.A.; AGNATI, L.F.; FUXE, K. Glial and neuronal glucocorticoid receptor immunoreactive cell populations in developing, adult, and aging brain. **Ann N Y Acad sci.** 1994;746:42-61.

CHALMERS DT, LÓPEZ JF, VÁZQUEZ DM, AKIL H, WATSON SJ. Regulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptor gene expression by dexamethasone. **Neuropsychopharmacology.** 1994;10:215-222.

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

CHARRON, G.; LAFOREST, S.; GAGNON, C.; DROLET, G.; MOUGINOT, D. Acute sodium deficit triggers plasticity of the brain angiotensin type 1 receptors. **FASEB J.** 2002;16:610-602.

CHEN, X.; LI, W.; YOSHIDA, H.; TSUCHIDA, S.; NISHIMURA, H.; TAKEMOTO F. Targeting deletion of angiotensin type 1B receptor gene in the mouse. **Am J Physiol Renal Physiol.** 1997;272:299-304.

CHRISTIAN, K.M.; MIRACLE, A.D.; WELLMAN, C.L.; NAKAZAWA, K. Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. **Neuroscience.** 2011;17:26-36.

DE KLOET, E.R.; OITZL, M.S.; JOËLS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys?. **Trends Neurosci.** 1999;22:422-426.

DE OLIVEIRA, L.M. Malnutrition and environment: interaction effects upon animal behavior. **Child. Nutr. Rev.** 1985;13:99-108.

DE QUERVAIN, D.J.; AERNI, A.; SCHELLING, G.; ROOZENDAAL, B. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. **Front. Neuroendocrinol.** 2009;30:358-370.

DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; GALVÁN, A.; AGUILAR, A.; KEMPER, T.; MORGANE, P.J., Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. **J. Comp. Neurol.** 1991;310: 356-364.

DOBBING, J.; SANDS, E.J. Comparative aspects of the brain growth spurt. **Early Hum. Dev.** 1979; 3:79–83.

DOBBING, J.; SANDS, J. Vulnerability of developing brain not explained by cell number/cell size hypothesis. **Early Hum Dev.** 1981;5:227-231.

DODIC, M.; HANTZIS, V.; DUNCAN, J.; REES, S.; KOUKOULAS, I.; JOHNSON, K.; WINTOUR, E.; MORITZ, K. Programming effects of short prenatal exposure to cortisol. **FASEB J.** 2002;16:1017-1026.

DRAKE, A.J.; WALKER, B.R.; SECKL, J.R. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 2005; 288:34-38.

DRAKE, A.J.; TANG, J.I.; NYIRENDA, M.J. Mechanisms underlying the role of glucocorticoids in the early life programming of adult disease. **Clin Sci (Lond).** 2007;113:219-232.

EDWARDS, C.R.; BENEDIKTSSON, R.; LINDSAY, R.S.; SECKL, J.R. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? **Lancet.** 1993;341:355-357.

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;12:651-659.

FEOLI, A.M.; SIQUEIRA, I.R.; ALMEIDA, L.; TRAMONTINA, A.C.; VANZELLA, C.; SBARAINI, S.; SCHWEIGERT, I.D.; NETTO, C.A.; PERRY, M.L.; GONÇALVES, C.A. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. **Nutrition.** 2006; 22:160-165.

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

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 and Soc Med.** 1977;31:91-95.

FUCHS, E.; UNO, H.; FLÜGGE, G. Chronic psychosocial stress induces morphological alterations in hippocampal pyramidal neurons of the tree shrew. **Brain Res.** 1995. 673:275-82.

FUJIOKA, A.; FUJIOKA, T.; ISHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; NAKAMURA, S. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. **Neuroscience.** 2006;141:907-915.

FUXE, K.; WIKSTRÖM, A.C.; OKRET, S.; AGNATI, L.F.; HÄRFSTRAND, A.; YU, Z.Y.; GRANHOLM, L.; ZOLI, M.; VALE, W.; GUSTAFSSON, J.A. Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. **Endocrinol.** 1985;117:1803-1812.

GALIGNIANA, M.D.; ERLEJMAN, A.G.; MONTE, M.; GOMEZ-SANCHEZ, C.; PIWIEN-PILIPUK, G. The hsp90-FKBP52 complex links the mineralocorticoid receptor to motor proteins and persists bound to the receptor in early nuclear events. **Mol Cell Biol.** 2010;30:1285-198.

GASC, J.M.; SHANMUGAM, S.; SIBONY, M.; CORVOL, P. Tissue specific expression of type 1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. **Hypertension.**1994; 24: 531-537.

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, D.E.R.; 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.

GLUCKMAN, P.D. E.; HANSON, M.A. The developmental origins of health and disease: an overview. In: Gluckman PD and Hanson MA. **Developmental origins of health and disease**. Cambridge University Press, Cambridge. 2006; 1-5.

GOLDMAN-RAKIC, P.S. Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. **Ann. N.Y. Acad. Sci**. 1995;769:71– 83.

GOMEZ-SANCHEZ, E.P. Mineralocorticoid receptors in the brain and cardiovascular regulation: minority rule? **Trends Endocrinol Metab**. 2011; 22:179-187.

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; 54:129-41.

GREEN, J.T.; CHESS, A.C.; CONQUEST, C.J.; YEGLA, B.A. Conditioned inhibition in a rodent model of attention-deficit/hyperactivity disorder. **Behav Neurosci**. 2011;125:979-987.

HALES, C.N.; BARKER, D.J.P. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull**. 2001;60:5-20.

HAMMACK, S.E.; GUO, J.D.; HAZRA, R.; DABROWSKA, J.; MYERS, K.M.; RAINNIE, D.G. The response of neurons in the bed nucleus of the stria terminalis to serotonin: implications for anxiety. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**. 2009; 13;33:1309-1320.

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;58:203-210.

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

HERMEL, E.E.; SEVERINO, G.S.; CECCONELLO, A.L.; PEREIRA, F.M.; SANVITTO, G.L.; LUCION, A.B. Neonatal handling and the expression of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase in the hypothalamus of adult male rats. **Braz J Med Biol Res**. 2001;34: 1191-1195.

HOFFMANN, M.; SCHMITT, F. Cognitive impairment in isolated subtentorial stroke. **Acta Neurol Scand**. 2004;109:14-24.

HOTCHKISS, A.K.; FURR, J.; MAKYNEN, E.A.; ANKLEY, G.T.; GRAY, L.E. In utero exposure to the environmental androgen trenbolone masculinizes female Sprague-Dawley rats. **Toxicol. Lett**. 2007;174:31-41.

HUOT, R.L.; PLOTSKY, P.M.; LENOX, R.H.; MCNAMARA, R.K. Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. **Brain Res**. 2002;950:52-63.

HUANG, L.T.; LAI, M.C.; WANG, C.L.; WANG, C.A.; YANG, C.H.; HSIEH, C.S.; LIOU, C.W.; YANG, S.N. Long-term effects of early-life malnutrition and status

epilepticus: assessment by spatial navigation and CREB(Serine-133) phosphorylation. **Brain Res Dev Brain Res.** 2003;145:213-218.

JACOBSON, L.; SAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis. **Endocr. Rev.** 1991;12:118-134.

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

JEZOVA, M.; ARMANDO, I.; BREGONZIO, C.; YU, Z.X.; QIAN, S.; FERRANS, V.J.; IMBODEN, H.; SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II AT(1) and AT(2) receptors contribute to maintain basal adrenomedullary norepinephrine synthesis and tyrosine hydroxylase transcription. **Endocrinol.** 2003;144:2092-20101.

JOËLS, M.; DE KLOET, ER. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in the brain. Implications for ion permeability and transmitter systems. **Prog. Neurobiol.** 1994;43:1-36.

JOËLS, M.; HESEN, W.; DE KLOET, E.R. Long-term control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 1995;53:315-323.

JOHNS, J.M.; LUBIN, D.A.; LIEBERMAN, J.A.; LAUDER, J.M. Developmental effects of prenatal cocaine exposure on 5-HT_{1A} receptors in male and female rat offspring. **Dev Neurosci.** 2002;24:522-530.

KAJANTIE, E.; OSMOND, C.; BARKER, D.J.; FORSÉN, T.; PHILLIPS, D.I.; ERIKSSON, J.G. Size at birth as a predictor of mortality in adulthood: a follow-up of 350 000 person-years. **Int J Epidemiol.** 2005;34:655-663.

KAPOOR, A.; PETROPOULOS, S.; MATTHEWS, S.G. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. **Brain Res Rev.** 2008;57:586-595.

KEHOE, P.; MALLINSON, K.; BRONZINO, J.; MCCORMICK, C.M. Effects of prenatal protein malnutrition and neonatal stress on CNS responsiveness. **Brain Res Dev.** 2001;132:23-31.

KESNER, R.P. Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat. **Psychobiology.** 2000;28:219-228.

KIM, J.J.; DIAMOND, D.M. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nat Rev Neurosci.** 2002;3:453-462.

KING, S; LAPLANTE, D.P. The effects of prenatal maternal stress on children's cognitive development: Project Ice Storm. **Stress.** 2005;8:35-45.

KNIGGE, K.M.; HAYS, M. Evidence of inhibitive role of hippocampus in neural regulation of acth release. **Proc Soc Exp Biol Med.** 1963; 114:67-69.

KOUBEISSI, M.Z.; RASHID, S.; CASADESUS, G.; XU, K.; SYED, T.U.; LÜDERS, H.; DURAND, D. Transection of CA3 does not affect memory performance in rats. **Epilepsy Behav.** 2011;21:267-270.

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; 34:1201-121.

LAMBERT, K.G.; BUCKELEW, S.K.; STAFFISO-SANDOZ, G.; GAFFGA, S.; CARPENTER, W.; FISHER, J.; KINSLEY, C.H. Activity-stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats. **Physiol. Behav.** 1998;65:43–49.

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**. 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**. 1996;91:607-615.

LANGLEY-EVANS, S. Fetal growth markers may show nutritionally mediated effect. **BMJ**. 2001;323:352.

LAPLANTE, D.P.; BARR, R.G.; BRUNET, A.; GALBAUD DU FORT, G.; MEANEY, M.L.; SAUCIER, J.F.; ZELAZO, P.R.; KING, S. Stress during pregnancy affects general intellectual and language functioning in human toddlers. **Pediatr Res**. 2004; 56:400-410.

LAUDER, J.M.; WILKIE, M.B.; WU, C.; SINGH, S. Expression of 5-HT(2A), 5-HT(2B) and 5-HT(2C) receptors in the mouse embryo. **Int J Dev Neurosci.** 2000;18:653-662.

LEE, I.; KESNER, R.P. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. **J. Neurosci.** 2003; 23:1517–1523.

LENKEI, Z.; PALKOVITS, M.; CORVOL, P.; LLORENS-CORTÈS, C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. **Front Neuroendocrinol.** 1997;18:383-439.

LEONG, D.S.; TERRÓN, J.A.; FALCÓN-NERI, A.; ARMANDO, I.; ITO, T.; JÖHREN, O.; TONELLI, L.H.; HOE, K.L.; SAAVEDRA, J.M. Restraint stress modulates brain, pituitary and adrenal expression of angiotensin II AT(1A), AT(1B) and AT(2) receptors. **Neuroendocrinology.** 2002;75:227-240.

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;128:583-596.

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.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found Symp.** 1991;156:138.

MAGARIÑOS, A.M.; MCEWEN, B.S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. **Neuroscience.** 1995;69:83-88.

MAGARIÑOS, A.M.; MCEWEN, B.S.; FLUGGE, G.; FUCHS, E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. **J. Neurosci.** 1996;16:534–3540.

MARTIN-GRONERT, M.S.; OZANNE, S.E. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. **Biochem Soc Trans.** 2006; 34:779-782.

MATTHEWS, S.G. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. **Pediatr Res.** 2000;47:291-300.

MATSUKAWA, M.; OGAWA, M.; NAKADATE, K.; MAESHIMA, T.; ICHITANI, Y.; KAWAI, N.; OKADO, N. Serotonin and acetylcholine are crucial to maintain hippocampal synapses and memory acquisition in rats. **Neurosci Lett.** 1997; 23:13-16.

MCEWEN, B.S.; MAGARIÑOS, A.M. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 1997; 821: 271–284.

MCEWEN, B.S.; DE KLOET, E.R.; ROSTENE, W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. **Physiol Rev.** 1986;66:1121-1188.

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

MCEWEN, B.S. Stress and hippocampal plasticity. (Review). **Annu Rev Neurosci.** 1999;22:105-122.

MCMULLEN, S.; LANGLEY-EVANS, S.C.; GAMBLING, L.; LANG, C.; SWALI, A.; MCARDLE, H.J. A common cause for a common phenotype: the gatekeeper hypothesis in fetal programming. **Med Hypotheses.** 2012;78:88-94.

MESQUITA, F.F.; GONTIJO, J.A.; BOER P.A. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. **Braz J Med Biol Res.** 2010b; 43:1010-1018.

MORGANE, P.J.; AUSTIN-LAFRANCE, R.; BRONZINO, J.; TONKISS, J.; DÍAZ-CINTRA, S.; CINTRA, L.; KEMPER, T.; GALLER, J.R. Prenatal malnutrition and development of the brain. **Neurosci Biobehav Rev.** 1993;17:91-128.

MORGANE, P.J.; MOKLER, D.J.; GALLER, J.R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neurosci Biobehav Rev.** 2002; 26:471-483.

MORRIS, R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learn Motiv.** 1981;12:239-261.

MORRIS, R.G.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N. & O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature.** 1982;297:681-683.

MOSER, M.B.; TROMMALD, M.; ANDERSEN, P. An increase in dendritic spine density on hippocampal CA1 pyramidal cells following spatial learning in adult rats suggests the formation of new synapses. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1994;91:12673-12675.

NIJLAND, M.J.; FORD, S.P.; NATHANIEL, S.Z. Prenatal origins of adult disease. **Curr Opin Obstet Gynecol.** 2008;20:132-138.

NISSINEN, J.; HALONEN, T.; KOIVISTO, E.; PITKÄNEN, A. A new model of chronic temporal lobe epilepsy induced by electrical stimulation of the amygdala in rat. **Epilepsy Res.** 2000;38:177-205.

NUYT, A.M.; ALEXANDER, B.T. Developmental programming and hypertension. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 2009;18:144-152.

OHL, F.; FUCHS, E. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. **Brain Res. Cogn Brain Res.** 1999;7:379–387.

PUTS, D.A.; MCDANIEL, M.A.; JORDAN, C.L.; BREEDLOVE, S.M. Spatial ability and prenatal androgens: metaanalyses of congenital adrenal hyperplasia and digit ratio (2D:4D) studies. **Arch. Sex. Behav.** 2008;37:100–111.

RADLEY, J.J.; ROCHER, A.B.; JANSSEN, W.G.; HOF, P.R.; MCEWEN, B.S.; MORRISON, J.H. Reversibility of apical dendritic retraction in the rat medial prefrontal cortex following repeated stress. **Exp Neurol.** 2005;196:199-203.

REUL, J.M.; DE KLOET, E.R. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. **Endocrinol.** 1985; 117:2505-2511.

REYES-CASTRO, L.A.; RODRIGUEZ, J.S.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G.L.; WIMMER, R.D.; MCDONALD, T.J.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P.W.;

RIUL, T.R.; CARVALHO, A.F.; ALMEIDA, P.S.; DE-OLIVEIRA, L.M.; ALMEIDA, S.S. Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. **Braz. J Med Biol Res.** 1999;32:975-983.

ROSE, G. Familial patterns in ischaemic heart disease **Br J Prev and Soc Med.** 1964;18:75-80.

RUSAKOV, D.A.; DAVIES, H.A.; HARRISON, E.; DIANA, G.; RICHTER-LEVIN, G.; BLISS, T.V.; STEWART, M.G. Ultrastructural synaptic correlates of spatial learning in rat hippocampus. **Neuroscience.** 1997;80:69-77.

SAAVEDRA, J.M.; CORREA, F.M.; KURIHARA, M.; SHIGEMATSU, K. Increased number of angiotensin II receptors in the subfornical organ of spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens Suppl.** 1986;4:27-30.

SAAVEDRA, J.M.; BENICKY, J. Brain and peripheral angiotensin II play a major role in stress. **Stress.** 2007;10:185-193.

SAAVEDRA, J.M.; SÁNCHEZ-LEMUS, E.; BENICKY, J. Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia:Therapeutic implications. **Psychoneuroendocrinology.** 2011;36:118.

SCHARFMAN, H.E. The CA3 "backprojection" to the dentate gyrus. **Prog Brain Res.** 2007;163:627-637.

SCHLOESSER, R.J.; MARTINOWICH, K.; MANJI, H.K. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. **Trends Neurosci.** 2012;35:36-46.

SECKL, J.R.; BROWN, R.W. 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase: on several roads to hypertension. **J Hypertens.** 1994;12:105-112.

SECKL, J.R. Glucocorticoids, feto-placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. **Steroids.** 1997;62:89-94.

SECKL, J.R. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. **Mol Cell Endocrinol.** 2001;185:61-71.

SHELINE, Y.I.; WANG, P.W.; GADO, M.H.; CSERNANSKY, J.G.; VANNIER, M.W. Hippocampal atrophy in recurrent major depression. **Proc Natl Acad Sci.** 1996; 93:3908-3913.

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

SOLOMONS N.W. Developmental origins of health and disease: concepts, caveats, and consequences for public health nutrition. **Nutr Rev.** 2009;67:12-16.

SOUSA, N.; MADEIRA, M.D.; PAULA-BARBOSA, M.M. Corticosterone replacement restores normal morphological features to the hippocampal dendrites, axons and synapses of adrenalectomized rats. **J Neurocytol.** 1999;28:541-558.

SOUSA, N.; LUKOYANOV, N.V.; MADEIRA, M.D.; ALMEIDA, O.F.; PAULA-BARBOSA M.M. Erratum to "Reorganization of the morphology of hippocampal

neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement". **Neuroscience**. 2000;101:483.

SQUIRE, L.R.; ZOLA, S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 1996;93:13515-13522.

STEIN, M.B.; KOVEROLA, C.; HANNA, C.; TORCHIA, M.G.; MCCLARTY, B. Hippocampal volume in women victimized by childhood sexual abuse. **Psychol Med.** 199;27:951-959.

SYDDALL, H.E.; SAYER, A.A.; SIMMONDS, S.J.; OSMOND, C.; COX, V.; DENNISON, E.M.; BARKER, D.J.; COOPER, C. Birth weight, infant weight gain, and cause-specific mortality: the Hertfordshire Cohort Study. **Am J Epidemiol.** 2005;161:1074-1080.

SYMONDS, M.E.; SEBERT, S.P.; HYATT, M.A.; BUDGE, H. Nutritional programming of the metabolic syndrome. **Nat Rev Endocrinol.** 2009;5:604-610.

TAYLOR, P.D.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Exp Physiol.** 2007;92:287-298.

TONKISS, J.; COHEN, C.A.; SPARBER, S.B. Different methods for producing neonatal undernutrition in rats cause different brain changes in the face of equivalent somatic growth parameters. **Dev Neurosci.** 1988;10:141-51.

TONKISS, J.; GALLER, J.R. Prenatal protein malnutrition and working memory performance in adult rats. **Behav Brain Res.** 1990;40:95-107.

TONKISS, J.; SHULTZ, P.; GALLER, J.R. An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. **Physiol. Behav.** 1994;55: 217–224.

TONKISS, J.; SHULTZ, P.L.; SHUMSKY, J.S.; GALLER, J.R. Development of spatial navigation following prenatal cocaine and malnutrition in rats: lack of additive effects. **Neurotoxicol. Teratol.** 1997;19:363–372.

TORRES, D.B.; LOPES, A.; RODRIGUES, A.J.; CERQUEIRA, J.J.; PÊGO, J.M.; GODINHO, A.F.; GONTIJO, J.A.R.; SOUSA, N.; BOER, P.A. Gestacional protein restriction triggers hyperanxiety in adulthood due to changes in the bed nucleus of stria the terminalis (BNST). **Brain Res.** (article submetid in, 2012).

UNO, H.; LOHMILLER, L.; THIEME, C.; KEMNITZ, J.W.; ENGLE, M.J.; ROECKER, E.B.; FARREL, P.M. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. **Brain Res Dev.** 1990;53:157-167.

UYLINGS, H.B.; VAN PELT, J. Measures for quantifying dendritic arborizations. **Network.** 2002;13:397-414.

VAN DEN HOVE, D.L.; LAUDER, J.M.; SCHEEPENS, A.; PRICKAERTS, J.; BLANCO, C.E.; STEINBUSCH, H.W. Prenatal stress in the rat alters 5-HT_{1A} receptor binding in the ventral hippocampus. **Brain Res.** 2006;23:29-34.

VAN EEKELEN, J.A.; JIANG, W.; DE KLOET, E.R.; BOHN, M.C. Distribution of the mineralocorticoid and the glucocorticoid receptor mRNAs in the rat hippocampus. **J Neurosci Res.** 1988;21:88-94.

VYAS, A.; MITRA, R.; SHANKARANARAYANA RAO, B.S.; CHATTARJI, S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. **J. Neurosci.** 2002;22:6810-6818.

WAINWRIGHT, P.E.; COLOMBO, J. Nutrition and the development of cognitive functions: interpretation of behavioral studies in animals and human infants. **Am J Clin Nutr.** 2006; 84:961-970.

WATANABE, Y.; GOULD, E.; MCEWEN, B.S. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. **Brain Res.** 1992;588:341-345.

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;595:195-200.

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

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

WENK, G.L. Assessment of spatial memory using radial arm and Morris water maze. **Curr Protoc Neurosci.** 2004;8:8.

WHITAKER-AZMITIA, P.M.; LAUDER, J.M.; SHEMMER, A.; AZMITIA, E.C. Postnatal changes in serotonin receptors following prenatal alterations in serotonin levels: further evidence for functional fetal serotonin receptors. **Brain Res.** 1987;430:285-289.

WHITAKER-AZMITIA, P.M. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. **Brain Res Bull.** 2001; 56:479-485.

WHITNALL, M.H. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. **Prog Neurobiol.**1993;40:573-629.

WOOLLEY, C.S.; GOULD, E.; FRANKFURT, M.; MCEWEN, B.S. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. **J Neurosci.** 1990;10:4035-4039.

WOOLLEY, C.S.; GOULD, E.; MCEWEN, B.S. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. **Brain Res.** 1990;531:225–231.

ZAMBRANO, E.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, G.L.; GUZMAN, C.; GARCIA-BECERRA, R.; BOECK, L.; DIAZ, L.; MENJIVAR, M.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P.W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. **J. Physiol.** 2005;563:275–284.

ZAMBRANO, E. Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. **Int. J. Dev. Neurosci.** 2011.29;177-182.

ZANDI-NEJAD, K.; LUYCKX, V.A.; BRENNER, B.M. Adult hypertension and Kidney Disease: the role of fetal programming. **Hypertension.** 2006;77:502-508.

Apêndices

Manuscript Number: DN-D-12-00076

Title: GESTACIONAL PROTEIN RESTRICTION INDUCES DENDRITIC ATROPHY IN DORSAL HIPPOCAMPAL NEURONS BUT DOES NOT ALTER LEARNING AND MEMORY PERFORMANCE IN ADULT OFFSPRING

Article Type: Review Article

Keywords: fetal programming, hippocampus, dendritic remodeling, behavior, protein restriction

Corresponding Author: Professor Patricia Boer,

Corresponding Author's Institution:

First Author: Agnes Lopes

Order of Authors: Agnes Lopes; Daniele Torres; João Cerqueira; Ana João Rodrigues; José Miguel Pêgo; José Gontijo; Nuno Sousa; Patricia Boer

Abstract: Studies have demonstrated that nutrient deficiency during pregnancy or in early postnatal life results in structural abnormalities in the offspring hippocampus and with cognitive impairment. In an attempt to analyze whether gestational protein restriction might induce learning and memory impairments associated with structural changes in the hippocampus, we carried out a detailed morphometric analysis of the hippocampus of male adult rats together with the behavioral characterization of these animals in the Morris Water Maze (MWM). Our results demonstrate that gestational protein restriction leads to a decrease in total basal dendritic length and intersections of CA3 pyramidal neurons whereas the cytoarchitecture of CA1 and dentate gyrus remained unchanged. Despite presenting significant structural rearrangements, we did not observe impairments in the MWM test. Considering the clear dissociation between the behavioral profile and the hippocampal neuronal changes, the functional significance of dendritic remodeling in hippocampal processing remains undisclosed.

GESTACIONAL PROTEIN RESTRICTION INDUCES DENDRITIC ATROPHY IN DORSAL HIPPOCAMPAL NEURONS BUT DOES NOT ALTER LEARNING AND MEMORY PERFORMANCE IN ADULT OFFSPRING

A. Lopes¹, D. B. Torres¹, A.J. Rodrigues^{3,4}, J.J. Cerqueira^{3,4}, J.M. Pêgo^{3,4}, J.A.R. Gontijo², N. Sousa^{3,4} and P.A. Boer¹

¹Fetal Programming Laboratory, Department of Morphology of Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil; ²Hydro-saline Metabolism Laboratory, Nucleus of Medicine and Experimental Surgery, Medicine Clinic Department, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil; ³Life and Health Sciences Research Institute, School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal; ⁴ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, 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

Abstract

Studies have demonstrated that nutrient deficiency during pregnancy or in early postnatal life results in structural abnormalities in the offspring hippocampus and with cognitive impairment. In an attempt to analyze whether gestational protein restriction might induce learning and memory impairments associated with structural changes in the hippocampus, we carried out a detailed morphometric analysis of the hippocampus of male adult rats together with the behavioral characterization of these animals in the Morris Water Maze (MWM). Our results demonstrate that gestational protein restriction leads to a decrease in total basal dendritic length and intersections of CA3 pyramidal neurons whereas the cytoarchitecture of CA1 and dentate gyrus remained unchanged. Despite presenting significant structural rearrangements, we did not observe impairments in the MWM test. Considering the clear dissociation between the behavioral profile and the hippocampal neuronal changes, the functional significance of dendritic remodeling in hippocampal processing remains undisclosed.

1. Introduction

The implications of early life events in the programming of disease are of great interest for public health, in both developed and underdeveloped countries. 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 in fetal programming as shown in several experimental models (Person and Jansson, 1992; Woodall et al., 1996; Godfrey et al., 1996; Langley-Evans et al, 1996; Mesquita et al., 2010a, 2010b). Although the precise underlying mechanisms kept unclear, association between maternal undernutrition and hormonal dysfunction have 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 the maternal steroids (Benediktsson et al., 1993; Stewart et al., 1995; Langley-Evans et al 1996; Langley-Evans, 1997). The excessive levels of fetal glucocorticoids *can* impair brain development and affect behavior later in life both in humans and animal models (Johnson et al, 1981; Uno et al., 1990; Uno et al., 1994; Szuran et al., 2000; Antonow-Schlorke et al., 2001; Matthews, 2001; Antonow-Schlorke et al., 2003; French et al., 2004; Karemaker et al., 2008; Weinstock, 2008; Seckl, 2008, Oliveira 2006, 2007; Rodrigues 2011).

The brain is extremely sensitive to gestational programming. Studies have demonstrated that the gestational protein restriction leads to severe neuron physiological and morphological changes (Huang et al., 2003; Hoffmann et al., 2004, Hermel et al., 2001;

Feoli et al., 2006), in addition to behavioral changes (de Oliveira, 1985; Riul et al, 1999) and delays in cognitive and intellectual functions (Barnes, 1976; Wainwright and Colombo, 2006). Neuroanatomical studies that have investigated the effects of prenatal malnutrition have found deficits how loss of neurons (Lister et al., 2005) decreases of somal size, length of apical dendrites and branching and spine density in the CA3 pyramidal cells layer (Diaz-cintra et al., 1994). In CA 1, it has been observed deficits in spine density of pyramidal cells in the stratum molecular (Cintra et al., 1997). On the dentate gyrus, studies have found reductions in somata axis, in the number of dendrites branching and spines (Cintra et al., 1990).

It is known that the hippocampus is a brain area crucial for learning and memorizes processes and has synaptic plasticity, but the details of this fine modulation are not completely understood. The hippocampus can be divided into two functionally different regions, the dorsal, which is mainly linked to learning and memory, and the ventral that is primarily implicated in emotional processing (Bannerman et al., 2004), albeit most of the studies do not distinguish between both regions. Regarding the cellular and molecular mechanisms underlying structural remodeling in the hippocampus, the role of adrenal steroids appears to be most crucial (McEwen, 1999), since repeated corticosterone administration induces retraction of apical dendrites in the CA3 sub region of the hippocampus in adult male rats.

Considering the paucity of evidence, in the present study, we aim to analyze the effects of gestational protein restriction on learning and memory functions and correlate these with the cytoarchitecture dorsal hippocampus of adult male rats

2. Experimental Procedures

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=9 rats from different mothers) and LP (n=9 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 monitoring the corneal reflex controlled the level of anesthesia. The rats were perfused transcardially with either saline containing heparin (5%) for 15 min, under constant pressure, followed by 0.1M phosphate buffer (PB; pH 7.4) containing 4% (w/v) paraformaldehyde, or saline for Golgi-Cox staining.

2.2. Behavioral analysis

2.2.1. Morris water maze (MWM)

Possibly the most widely used test of spatial learning in rats is the Morris water maze (Morris, 1984). Behavioral tests were conducted in a circular black tank (170 cm diameter) filled to a depth of 31 cm (at 22°C) and placed in a dimly lit room with extrinsic clues. The tank was divided into imaginary quadrants and had a black platform (12 cm diameter, 30 cm height placed in one of them).

Working memory task. The test used described by Kesner (2000) as a test of PFC function: its goal is to assess the ability of rats to learn the position of the hidden platform and to keep this information on-line during four consecutive trials. The working memory test

consisted of 4 d of acquisition (4 trials/d). One each trial day, the position of the platform was kept constant, but the position was varied on each successive day such that all four quadrants were used. Rats were placed, facing the wall of the maze, at a different starting point north (N), east (E), south (S), or west (W) at the start of each of the four daily trials. A trial was considered ended when the rat escaped onto the platform; when this escape failed to occur within 120 s, the animal was gently guided to the platform, and an escape latency of 120 s was recorded for that trial. Rats were allowed to spend 30 s on the escape platform before being positioned at a new starting point. Length of the path described and time spent to reach the platform (escape latency) were recorded in the consecutive trials.

Reference memory Task. The reference memory test was described by Morris (1984) and assesses the function of the hippocampus: its goal is to assess the ability of rats to learn the position of the hidden platform and to keep this information during all test days. The test consisted of 4d of acquisition (4trials/day). During the four days the platform remained in the same quadrant. Rats were placed, facing the wall of the maze, at a different starting point north (N), east (E), south (S), or west (W) at the start of each of the four daily trials. A trial was considered ended when the rat escaped onto the platform; when this escape failed to occur within 120 s, the animal was gently guided to the platform, and an escape latency of 120 s was recorded for that trial. Rats were allowed to spend 30 s on the escape platform before being positioned at a new starting point. Length of the path described and time spent to reach the platform (escape latency) were recorded in the consecutive trials

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 & 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 & 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 μ m thick) were collected in 6% sucrose and blotted dry onto gelatin-coated microscope slides. They were subsequently alkalized 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.

2.4. Dendritic tree analysis

Three-dimensional reconstructions of representative Golgi-impregnated neurons from the dorsal hippocampus 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). For the dendritic analysis (NP=4, LP=4), the hippocampus was divided into three areas CA1, CA3 and dentate gyros. For each region of the hippocampus five neurons per animal were reconstructed, a total of twenty neurons per region of each experimental group. As a result in this study we have analyzed 120 neurons of hippocampus. Several aspects of dendritic morphology were examined.

2.5. 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.

3. Results

3.1. Birth weight and brain weight

The birth weight of the LP male pups was significantly reduced when compared to NP male pups ($p < 0.0001$). Anogenital distance relative to body weight was significantly increased in LP group. The weight of brains, corrected for total body weight, was not different in 16-wk old LP rats when compared to NP (Table 1).

3.2. Behavior analysis – Morris water maze

3.2.1. Working memory

For the working memory, repeated-measures ANOVA for escape latency showed no significant difference across our experimental groups ($F=1.21$, $p=0.28$). A significant difference across days was found, suggestive of learning ($p < 0.0001$; Figure 1 A). The swimming distance is not different between groups ($F=0.19$, $p=0.8$; Figure 1 C).

3.2.2. Reference memory

For the reference memory, repeated-measures ANOVA for escape latency showed no changes in the LP group when compared to NP animals ($F=0.76$, $p=0.39$). Again, both groups learned the task across the days ($p < 0.0001$; Figure 1B). The swimming distance is not different between groups ($F=0.03$, $p=0.9$; Figure 1 D).

3.3. Dendritic tree analysis

We analyzed the apical and basal dendrites of CA1, CA3 and dentate gyrus of NP and LP animals. In CA1 we found no significant differences between groups (NP, 1450 ± 101.9 vs LP, 1638 ± 99.52 $p=0.1$; Figure 2 A), (NP, 1024 ± 77.90 vs LP, 1175 ± 93.99 $p=0.2$; Figure 2 B).

In CA3 pyramidal neurons, we observed a significant decrease in length of basal dendrites in the LP group (NP, 1265 ± 102.3 vs LP, 920.5 ± 72.49 $p=0.01$; Figure 3 A), but no differences in apical dendrites (NP, 1621 ± 131.8 vs LP, 1360 ± 120.0 $p=0.15$; Figure 3 B). Sholl analysis revealed a reduction of dendritic intersections (between 40 and 120 μm from the perikarya) in LP when compared with that observed in NP (Figure 3C). In granule

neurons of the dentate gyrus, we did not observe any differences between groups (NP, 1841 \pm 146.2 vs LP, 1794 \pm 126.7 $p=0.81$; Figure 4).

4. Discussion

The hippocampal formation has been the focus of a large number of studies due to its prominent role in brain plasticity and in the regulation of cognitive processes. Studies have demonstrated that nutrient deficiency during pregnancy or in early postnatal life results in structural abnormalities in the hippocampus of the offspring as well as cognitive impairment (Reyes-Castro et al., 2010, Diaz-Cintra et al., 1991). In an attempt to analyze whether gestational protein restriction might induce learning and memory impairment associated with structural changes in the hippocampus we carried out MWM test and a detailed morphometric analysis of dendritic cytoarchitecture in Golgi-Cox-stained preparations of hippocampus of male adult rats.

We observed that the maternal protein restriction reduced the birth weight of pups, which directly reflects the importance of proper protein intake during pregnancy for fetal maturation. This outcome is consistent with models of intra-uterine growth retardation and fetal programming found by our group (Mesquita et al, 2010). We also observed an increase of ano-genital distance in prenatal protein restricted male offspring. Zambrano et al (2005) observed increased in ano-genital distance in offspring of females with gestational protein restriction, which had enhanced levels of progesterone, corticosterone, estradiol and testosterone at 19th days of gestation. The precocious fetal exposure to higher maternal steroids increased ano-genital distance (Hotchkiss et al., 2007).

It is also known that the limbic system, particularly the hippocampus and the prefrontal cortex play a central role in cognition (Squire and Zola, 1996). Cognitive deficits have been reported in both protein restriction and global undernutrition during gestation models leading to impairing learning in adult age rat offspring (Landon et al., 2007; Reyes-Castro et al., 2010). In this case, the effects of maternal steroids on fetal development may also play an important role on behavioral parameters of the offspring (Puts et al., 2008).

In the present study, we performed the MWM test to assess memory function. It is a classic test to study the spatial, hippocampal-dependent, reference memory . However, in

this study it was adapted to analysis also spatial working memory behavior, because it is able to use the same experimental model and recruits a similar range of skills (Kesner, 2000). Both the hippocampus and prefrontal cortex (PFC) are involved in processing spatial information (Lee and Kesner, 2003). The acquisition of reference memory requires the hippocampus structure and function to form spatial associations that. While working memory can be described as a system of limited capacity that allows to process and store information temporarily (Goldman-Rakic, 1995) by PFC. We did not find significant differences between LP and NP groups, in any of the parameters analyzed, suggesting that such functions of hippocampus were not altered with gestational protein restriction. Additionally, spatial learning (MWM) results, confirming previous study (Tonkiss et al., 1994) has showed no effect or impairment of performance in rats prenatally protein restricted (Tonkiss et al., 1997).

However, by applying 3-dimensional analysis of Golgi-Cox-stained dorsal hippocampus we demonstrate that gestational protein restriction leads to decreases in total basal dendritic length and intersections of CA3 pyramidal neurons. In a similar model Díaz-Cintra et al. (1994) have found significant decreases in apical dendrites length, and in the branching of apical and basal dendrites of CA3 pyramidal cells. The architecture of dendrites from CA1 and dentate gyrus was unchanged. The timing of nutritional insult can differentially affect neurons and in the other models the protein restriction starts five weeks before breeding. The current study revealed a clear dissociation between behavioral test response and hippocampal neuron changes as consequence of fetal programming. The functional significance of dendritic remodeling in terms of absolute impact on hippocampal processing has remained elusive. Our study is not able to answer the question whether CA3 dendritic atrophy is related to *in uteri* underdevelopment or results from a postnatal adaptation to programmed physiology in adult life. Further time-course studies should be done to assess both, the corticosterone levels and action over hippocampal dendritic 3-dimensional analyze in embryos and early postnatal age of the gestational protein restricted animals. On the other hand, the architecture of CA1 and dentate gyrus was not influenced.

The current study revealed a clear dissociation between behavioral test response and hippocampal neuron changes as consequence of fetal programming. The functional

significance of dendritic remodeling in terms of absolute impact on hippocampal processing has remained elusive (Christian et al., 2011). Recently Koubeissi et al. (2011) demonstrated that bilateral cuts of the dorsal hippocampal CA3 layer did not affect MWM scores in rats. We also did not find significant MWM scores differences despite of reduced dendritic arborization in this pyramidal cell layer. As well as observed in the current work, many authors have hypothesized that the atrophy observed in dendrites of hippocampal neurons may be a compensatory response to protect the hippocampus from further damage (Ohl and Fuchs, 1999; McEwen, 2001; Bartolomucci et al., 2002; de Quervain et al., 2009)

Interestingly, although earlier studies have reported atrophy only in apical dendrites, our results indicate that fetal programming caused significant atrophy in basal dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. Vyas et al (2002) showed that chronic immobilization stress induced decrease in total dendritic length and number of branch points in both apical as well as basal dendrites of CA3 pyramidal cells.

Many studies have shown that both chronic exposure to stressors and pharmacological treatments (e.g .dexamethasone) induce atrophy of dendrites of CA3 pyramidal cells (Fuchs et al, 1995; Magarinos and McEwen, 1995; Woolley et al, 1990). More specifically, structural changes in dorsal CA3 region have been reported as a neural consequence of chronic stress (Watanabe et al., 1992b; Magariños et al 1996; McEwen and Magariños, 1997; Lambert et al., 1998; Vyas et al., 2002; McLaughlin et al., 2009; Christian et al, 2011).

Adrenal steroids appear to be most crucial factor underlying structural remodeling in the hippocampus (McEwen, 1999). Mineralocorticoid receptors in the hippocampus mediate the enhancement of neurogenesis and differentiation of processes of cultured hippocampal neurons whereas glucocorticoid receptors are involved in the suppression of their morphology (Fujioka et al., 2006). Repeated corticosterone administration induces retraction of apical dendrites in the CA3 sub region of the hippocampus in adult male rats (Woolley et al, 1990). Stress-induced CA3 dendritic retraction is prevented by steroid synthesis blocker (Magariños and McEwen, 1995). In our model we have demonstrate an enhanced plasmatic corticosterone levels in 16 wk-old LP programmed rats (data not published), thus we may hypothesized that higher steroid levels may be a crucial factor

involved in structural remodeling hippocampus as observed herein. However, our study is not able to answer the question whether CA3 dendritic atrophy is related to *in uteri* underdevelopment or results from a postnatal adaptation to programmed physiology in adult life. Further time-course studies should be done to assess both the corticosterone levels and action over hippocampal dendritic 3-dimensional analyze in embryos and early postnatal age of the gestational protein restricted animals.

References

Antonow-Schlorke, I., Kuhn, B., Muller, T., Schubert, H., Sliwka, U., Nathanielsz P.W., Schwab, M., 2001. Antenatal betamethasone treatment reduces synaptophysin immunoreactivity in presynaptic terminals in the fetal sheep brain. *Neurosci. Lett.* 297, 147–150.

Antonow-Schlorke, I., Schwab, M., LI, C., Nathanielsz, P.W., 2003. Glucocorticoid exposure at the dose used clinically alters cytoskeletal proteins and presynaptic terminals in the fetal baboon brain. *J. Physiol.* 547, 117–123.

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

Bannerman, D.M., Rawlins, J.N., McHugh, S.B., Deacon, R.M., Yee, B.K., Bast, T., Zhang, W.N., Pothuizen, H.H., Feldon, J., 2004. Regional dissociations within the hippocampus—Memory and anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 273–283

Barker, D.J., 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin. Sci.* 95, 115-128.

Barnes, R.H., 1976. Dual role of environmental deprivation and malnutrition in retarding intellectual development. *Am. J. Clin. Nutr.* 29, 912-917.

- Bartolomucci, A., de Biurrun, G., Czeh, B., van Kampen, M., Fuchs, E., 2002. Selective enhancement of spatial learning under chronic psychosocial stress. *Eur. J. Neurosci.* 15,1863–1866.
- Benediktsson, R., Lindsay, R.S., Noble, J., Seckl, J.R., Edwards, C.R., 1993. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet.* 34, 339-341.
- Brozek, J., 1978. Nutrition, malnutrition and behavior. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* 85, 506-529.
- Christian, K.M., Miracle, A.D., Wellman, C.L., Nakazawa, K., 2011. Chronic stress-induced hippocampal dendritic retraction requires CA3 NMDA receptors. *Neuroscience* 17, 26-36.
- de Quervain, D.J., Aerni, A., Schelling, G., Roozendaal, B., 2009. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front.Neuroendocrinol.* 30,358 –370.
- De Oliveira, L.M., 1985. Malnutrition and environment: interaction effects upon animal behavior. *Rev. Child. Nutr.* 13, 99-108.
- Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Galván, A., Aguilar, A., Kemper, T., Morgane, P.J., 1991. Effects of prenatal protein deprivation on postnatal development of granule cells in the fascia dentata. *J. Comp. Neurol.* 310, 356-64.
- Feoli, A.M., Siqueira, I.R., Almeida, L., Tramontina, A.C., Vanzella, C., Sbaraini, S., Schweigert, I.D., Netto, C.A., Perry, M.L., Gonçalves, C.A., 2006. Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition.* 22, 160-165.
- French, N.P., Hagan, R., Evans, S.F., Mullan, A., Newnham, J.P., 2004. Repeated antenatal corticosteroids: effects on cerebral palsy and childhood behavior. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 190, 588–595.
- Fujioka, A., Fujioka, T., Ishida, Y., Maekawa, T., Nakamura, S., 2006. Differential effects of prenatal stress on the morphological maturation of hippocampal neurons. *Neuroscience* 141, 907-915.
- Fuchs, E., Uno, H., Flügge, G., 1995. Chronic psychosocial stress induces morphological alterations in hippocampal pyramidal neurons of the tree shrew. *Brain Res.* 673, 275-82.

Glaser, E.M., 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*, 4,117–125.

Godfrey, K., Robinson, S., Barker, D.J., Osmond C., Cox V., 1996. Maternal nutrition in early and late pregnancy in relation to placental and fetal growth. *BMJ*.17, 410-414.

Goldman-Rakic, P.S., 1995. Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 769, 71– 83.

Hermel, E.E., Severino, G.S., Ceconello, A.L., Pereira, F.M., Sanvitto, G.L., Lucion, A.B., 2001. Neonatal handling and the expression of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase in the hypothalamus of adult male rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 1191-1195.

Hoffmann, M., Schmitt, F., 2004. Cognitive impairment in isolated subtentorial stroke. *Acta. Neurol. Scand.* 109, 14-24

Hotchkiss, A.K., Furr, J., Makynen, E.A., Ankley, G.T., Gray. L.E., 2007. In utero exposure to the environmental androgen trenbolone masculinizes female Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Lett.* 174, 31-41.

Huang, L.T., Lai, M.C., Wang, C.L., Wang, C.A., Yang, C.H., Hsieh, C.S., Liou, C.W., Yang, S.N., 2003. Long-term effects of early-life malnutrition and status epilepticus assessment by spatial navigation and CREB(Serine-133) phosphorylation. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 145, 213-218.

Johnson, J.W., Mitzner, W., Beck, J.C., London, W.T., Sly, D.L., Lee, P.A., Khouzami, V.A., Cavalieri, R.L., 1981. Longterm effects of betamethasone on fetal development. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 141, 1053–1064.

Karemaker, R., Kavelaars, A., ter, W.M., Tersteeg-Kamperman, M., Baerts, W., Veen, S., Samsom, J.F., Visser, G.H., van, B.F., Heijnen, C.J., 2008. Neonatal dexamethasone treatment for chronic lung disease of prematurity alters the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and immune system activity at school age. *Pediatrics.* 121, 870–878.

- Kesner, R.P., 2000. Subregional analysis of mnemonic functions of the prefrontal cortex in the rat. *Psychobiology* 28, 219–228.
- Koubeissi, M.Z., Rashid, S., Casadesus, G., Xu, K., Syed, T.U., Lüders, H., Durand, D., 2011. Transection of CA3 does not affect memory performance in rats *Epilepsy Behav.* 21, 267-270.
- Lambert, K.G., Buckelew, S.K., Staffiso-Sandoz, G., Gaffga, S., Carpenter, W., Fisher, J., Kinsley, C.H., 1998. Activity-stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats. *Physiol. Behav.* 65, 43–49.
- Landon, J., Davison, M., Krageloh, C.U., Thompson, N.M., Miles, J.L., Vickers, M.H., Fraser, M., Breier, B.H., 2007. Global undernutrition during gestation influences learning during adult life. *Learn. Behav.* 35, 79–86.
- Langley- Evans, S.C., Welham, S. J., Sherman, R.C., Jackson, A. A., 1996. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin. Sci.* 91, 607-615.
- Langley- Evans, S.C., 1997. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. *Life Sci.* 60, 1213-21.
- Lee, I., Kesner, R.P., 2003. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J. Neurosci.* 23,1517–1523.
- 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 (HPA) axis. *Stress.* 9,183-98.
- Magariños, A.M., McEwen, B.S., 1995. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience* 69,89–98.
- Magariños, A.M., McEwen, B.S., Flugge, G., Fuchs, E., 1996. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. *J. Neurosci.* 16, 534–540

- Matthews, S.G., 2001. Antenatal glucocorticoids and the developing brain: mechanisms of action. *Semin. Neonatol.* 6, 309–317.
- McEwen, B.S., Gould, E., 1990. Adrenal steroid influences on the survival of hippocampal neurons. *Biochem. Pharmacol.* 4, 2393-402.
- McEwen, B.S., Magariños, A.M., 1997. Stress effects on morphology and function of the hippocampus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 821, 271–284.
- McEwen, B.S., 1999. Stress and hippocampal plasticity (Review). *Annu. Rev. Neurosci.* 22:105–122.
- McEwen, B.S., 2001. Plasticity of the hippocampus: adaptation to chronic stress and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 933, 265–277.
- McLaughlin, K.J., Baran, S.E., Conrad, C.D., 2009. Chronic stress- and sex-specific neuromorphological and functional changes in limbic structures. *Mol. Neurobiol.* 40, 166 – 182.
- Mesquita, F.F., Gontijo, J.A.R., Boer, P.A., 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, 380-388.
- Mesquita, F.F., Gontijo, J.A.R., Boer, P.A., 2010b. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life (Review). *Braz J Med. Biol. Res.* (in press).
- Morris, R., 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods* 11, 47– 60.
- Ohl, F., Fuchs, E., 1999. Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 7, 379 –387
- O'Regan, D., Kenyon, C.J., Seckl, J.R., Holmes, M.C., 2004. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 287, 863-70.
- Persson, E., Jansson, T., 1992. Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. *Acta Physiol. Scand.* 145, 195-196.

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.

Puts, D.A., McDaniel, M.A., Jordan, C.L., Breedlove, S.M., 2008. Spatial ability and prenatal androgens: metaanalyses of congenital adrenal hyperplasia and digit ratio (2D:4D) studies. *Arch. Sex. Behav.* 37,100–111.

Reyes-Castro, L.A., Rodriguez, J.S., Rodríguez-González, G.L., Wimmer, R.D., McDonald, T.J., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., Zambrano, E., 2011. Pre- and/or postnatal protein restriction in rats impairs learning and motivation in male offspring. *Int. J. Dev. Neurosci.* 29,177-182.

Riul, T.R., Carvalho, A.F., Almeida, P.S., De-Oliveira, L.M., Almeida, S.S., 1999. Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: effects of malnutrition and tactile stimulation of the pups. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 975-983.

Seckl, J.R., Meaney, M.J., 2004. Glucocorticoid programming. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1032, 63-84.

Seckl, J.R., 2008. Glucocorticoids, developmental programming and the risk of affective dysfunction. *Prog. Brain Res.* 167, 17–34.

Squire, L.R., Zola, S.M., 1996. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Nat.l Acad. Sci. USA.* 93,13515-13522

Stewart, P.M., Whorwood, C.B., Mason, J.I., 1995. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 55, 465-471.

Szuran, T.F., Pliska, V., Pokorny, J., Welzl, H., 2000. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. *Physiol. Behav.* 71, 353–362.

Tonkiss, J., Shukitt-Hale, B., Formica, R.N., Rocco, F.J., Galler, J.R., 1990. Prenatal protein malnutrition alters response to reward in adult rats. *Physiol. Behav.* 48, 675–680.

Tonkiss, J., Shultz, P., Galler, J.R., 1994. An analysis of spatial navigation in prenatally protein malnourished rats. *Physiol. Behav.* 55, 217–224.

Tonkiss, J., Shultz, P.L., Shumsky, J.S., Galler, J.R., 1997. Development of spatial navigation following prenatal cocaine and malnutrition in rats: lack of additive effects. *Neurotoxicol. Teratol.* 19,363–372.

Torres, N., Bautista, C.J., Tovar, A.R., Ordaz, G., Rodriguez- Cruz, M., Ortiz, V., Granados, O., Nathanielsz, P.W., Larrea, F., Zambrano, E., 2010. Protein restriction during pregnancy affects maternal liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, 270-277.

Uno, H., Lohmiller, L., Thieme, C., Kemnitz, J.W., Engle, M.J., Roecker, E.B., Farrel, P.M., 1990. Brain damage induced by prenatal exposure to dexamethasone in fetal rhesus macaques. I. Hippocampus. *Brain Res.Dev. Brain Res.* 53, 157–167.

Uno, H., Eisele, S., Sakai, A., Shelton, S., Baker, E., DeJesus, O., Holden, J., 1994. Neurotoxicity of glucocorticoids in the primate brain. *Horm. Behav.* 28, 336–348.

Vyas, A., Mitra, R., Shankaranarayana Rao, B.S., Chattarji, S., 2002. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J. Neurosci.* 22, 6810-6818.

Zambrano, E., Rodriguez-Gonzalez, G.L., Guzman, C., Garcia-Becerra, R., Boeck, L., Diaz, L., Menjivar, M., Larrea, F., Nathanielsz, P.W., 2005. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J. Physiol.* 563, 275–284.

Wainwright, P.E., Colombo, J., 2006. Nutrition and the development of cognitive functions: interpretation of behavioral studies in animals and human infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 84, 961-970.

Watanabe, Y., Gould, E., McEwen, B.S., 1992. Stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Brain Res.* 588, 341–345.

Weinstock, M., 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32,1073–1086.

Woodall, S.M., Johnston, B.M., Breier, B.H., Gluckman, P.D., 1996. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatrics Res.* 40, 438-443.

Woolley, C.S., Gould, E., McEwen, B.S., 1990. Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons. *Brain Res.* 531, 225–231.

Table 1

Birth weight, ano genital distance and brain weight o rats fed the normal protein (NP – 17% casein) or low protein (LP – 6% casein) diet during pregnancy. Mean \pm SEM; n refers to litters. Statistically different when $p < 0.05$

	Normal Protein (NP) (n=9)	Low Protein (LP) (n=9)	P
Birth weight (g)	6.5 \pm 0.06	5.5 \pm 0.1	<0.0001
Ano genital distance (mm/g)	1.4 \pm 0.02	1.5 \pm 0.02	0,0075
Brain weight (g)	0.005 \pm 0.0001	0.006 \pm 0.0001	0,1

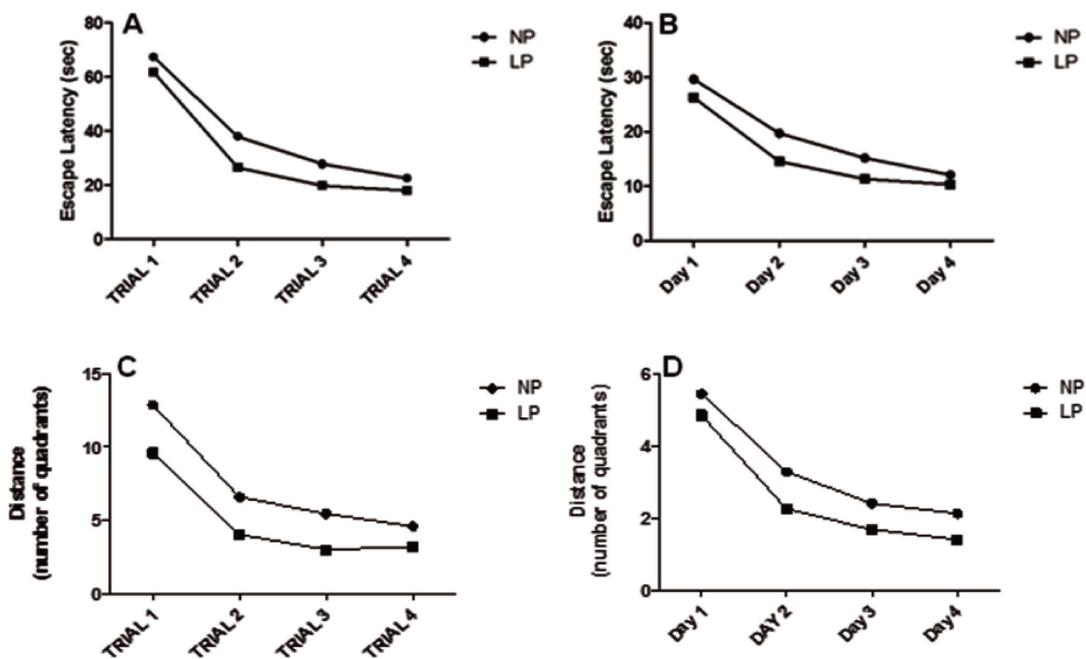


Figure 1. Morris water maze training performance. (A) No differences in working memory between NP and LP groups. (B) No differences in reference memory between NP and LP groups. The swimming distance was not different between groups in both working (1C) and reference (1D) memory tests. The graphics represents the number of quadrants traversed by the animal to find the platform.

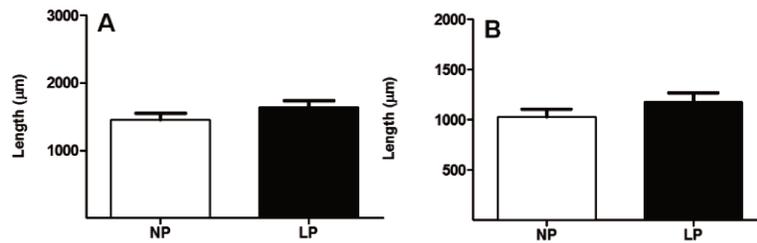


Figure 2. Basal (A) and apical (B) dendrites length of CA1 neurons.

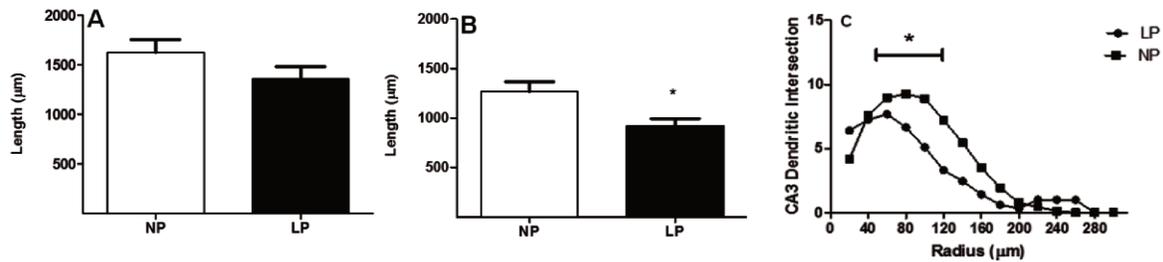


Figure 3. Basal (A) and apical (B) dendrites length of CA3 neurons. The gestational protein restriction led to a decrease in length of basal dendrites of neurons of the CA3 sub region of the dorsal hippocampus. By Sholl analysis we found reduction of dendritic intersections (between 40 and 120 µm from the perikarya) in LP when compared with that observed in NP (C).

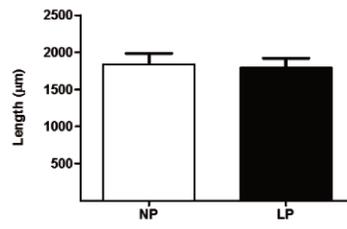


Figure 4. Dendrites length of dentate gyrus neurons.