

Márcia Pereira Bueno

**MODELO EXPERIMENTAL DE RESTRIÇÃO DE
CRESCIMENTO INTRAUTERINO EM RATAS
PRENHES E SUAS REPERCURSSÕES EM
RECEPTORES CELULARES DE INSULINA**

Tese de Doutorado

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Barini
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto**

**Unicamp
2010**

Márcia Pereira Bueno

**MODELO EXPERIMENTAL DE RESTRIÇÃO DE
CRESCIMENTO INTRAUTERINO EM RATAS
PRENHES E SUAS REPERCURSSÕES EM
RECEPTORES CELULARES DE INSULINA**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Tocoginecologia, área de Ciências Biomédicas

ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Barini
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto

Unicamp
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

B862r Bueno, Márcia Pereira
Restrição de crescimento intrauterino em modelo
experimental de ratas prenhes e suas repercussões em
receptores celulares de insulina / Márcia Pereira Bueno.
Campinas, SP [s.n.], 2010.

Orientadores: Ricardo Barini, Lourenço Sbragia Neto
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Modelo experimental. 2. Feto - desenvolvimento .
3. Insulina - receptores. 4. Retardo do crescimento
fetal. I. Barini, Ricardo. II. Sbragia Neto, Lourenço.
III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

C1
R=723

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: MÁRCIA PEREIRA BUENO

Orientador: Prof. Dr. RICARDO BARINI

Co-Orientador: Prof. Dr. LOURENÇO SBRAGIA NETO

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 19/02/2010

201009960

Dedico este trabalho...

*Aos meus filhos, **Bruno e Pedro** motivo de vida e alegria, pelos momentos roubados e apoio incondicional*

*Ao meu marido, **Douglas Bernal Tiago**, pelo amor, incentivo, ajuda e apoio, compartilhando comigo as angústias e ansiedades*

*Aqueles que sempre acreditaram que era possível:
Meus pais **Benedicto Pereira Bueno** "in memoriam" e **Norma Cillo Bueno***

*Minha sogra **Anita Bernal Tiago***

*Meus irmãos– **Marcos, Deborah, Andreia e João Carlos***

*Meus sobrinhos- **Leonardo, Giullia e Enrico***

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ricardo Barini pelo apoio, confiança e liberdade que fizeram com que eu apreendesse muito na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto que permitiu que todo o trabalho fosse realizado em seu laboratório, pela confiança, apoio e idéias novas que possibilitaram o término do estudo.

Ao Prof. Dr. Renato Passini Jr, Prof. Dr. João Luis Pinto e Silva, Dr. Marcelo Nomura e Dr. Fabio Peralta pelas valiosas sugestões e correções

Ao Prof. Dr. Mário José Saad e Dioze Guadagnini pelas sugestões e apoio científico na parte metabólica.

A bióloga Frances Lanhellas que com sua calma e perseverança durante todos os momentos difíceis ajudou a achar uma solução inteligente e de fácil realização.

Ao Dr. Augusto F. Schmidt pela amizade e proficiência em inglês.

Ao Prof. Dr. José Carlos Gama da Silva por sua referência profissional e acadêmica na minha formação como médica e educadora.

A Profa. Dra. Diana Beatriz Filip Raskin e Profa. Dra. Rossana P. V. Francisco pelo apoio e amizade incondicional e verdadeira

A todos os alunos, biólogos, médicos e professores que trabalhavam no Laboratório de Medicina Fetal "Michael Harrison" da UNICAMP pelo apoio durante a realização de todo o trabalho

Aos médicos residentes e acadêmicos responsáveis pelo estímulo e necessidade continua do aprendizado a minha eterna gratidão.

A Faculdade de Medicina da PUC-Campinas, em especial aos Prof Dr José Espin Neto e Prof Dr José Gonzaga Teixeira de Camargo pelo apoio em todos os momentos.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	ix
Resumo	xiii
Summary	xiv
1. Introdução	166
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. Material e Método	30
3.1. Desenho do Estudo.	30
3.2. Tamanho da amostra	30
3.3. Variáveis	33
3.4 Seleção dos Animais	34
3.5 Técnica Cirúrgica	34
3.6 Colheita	37
3.7 Avaliação Morfométrica	38
3.8 Avaliação Histológica	38
3.8.1 Análise Morfométrica das camadas intestinais	40
3.8.2 Análise Morfométrica renal.....	42
3.9 Análise Proteica por <i>Imunobloting</i>	44
4.0 Análise Estatística	46
4.1 Avaliação do Comitê de Ética e Pesquisa	46
4. Publicações	46
4.1. Artigo 1	47
4.2. Artigo 2	73
5. Discussão	106
6. Conclusões	114
7. Referências Bibliográficas.....	115

8. Anexos.....	127
8.1. Anexo 1 –	127
8.2Anexo 2-	132
8.3Anexo 3	136

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

μm	Micrómetro
AKT	<i>Serine Theonine quinase</i>
APS	<i>Adaptor protein</i> com domínio PH e SH ₂
Cbl	Produto do proto-oncogene <i>Casitas B-lineage lymphomal</i>
CE	Controle Externo
CEEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
C-RCIU	Controle da Restrição de Crescimento Intrauterino
Gab-1	<i>Growth factor receptor binding protein 1</i>
GH	Hormônio de Crescimento
GRb2	<i>Growth factor receptor bound 2</i>
H/E	Hematoxilina de Erlich/Eosina
IGF	<i>Insulin like growth factor</i>
IGF-I	<i>Insulin like growth facto</i> do tipo 1
IGF-II	<i>Insulin like growth factor</i> do tipo 2
IGF-IIR	Receptor do tipo 2 <i>do insulin like growth factor</i>
IGF-IR	Receptor do tipo 1 <i>do insulin like growth factor</i>

IGF-IR β	Receptor do tipo beta do <i>Insulin like growth factor</i>
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Receptor de insulina do tipo 1
IRS-2	Receptor de inuslina do tipo 2
IRS-3	Receptor de insulina do tipo 3
IRS-4	Receptor de insulina do tipo 4
JAK2	Sistema enzimático <i>Janus-kinase</i> (tirosina quinase associada a receptores da familia gp130)
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mg	Miligramas
P60 ^{doK}	Proteína sinalizadora da insulina
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PC	Peso Corpóreo
PH	Peso Hepático
PI	Peso Intestinal
PI3-K	Fosfatidil inositol-3-quinase
PP	Peso Placentário
PR	Peso Renal
PTEN	Proteínas citoplasmáticas para modulação da apoptose e ciclo celular
PTH	Paratormônio
Ras	Complexo de adipocitinas
RCIU	Restrição de Crescimento Intrauterino

S6k	S6 quinase
SH2	<i>Src homology 2</i>
Shc	Domínios protéicos com homologia ao proto oncogene Src2.
TOR	<i>Target of rapamicina</i>
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
V _G	Volume glomerular médio
α	Alfa
β	Beta

Resumo

A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) limita o desenvolvimento fetal adequado aumentando a morbidade e mortalidades perinatais. Os mecanismos fetais adaptativos na RCIU podem desencadear alterações endócrinas e metabólicas que explicariam a ocorrência de doenças na idade adulta. O objetivo do estudo foi avaliar na RCIU experimental pela ligadura da artéria uterina se existem alterações na morfometria e histologia do fígado, intestino e rins e se existem diferenças na expressão dos receptores de insulina, IR- β , IRS-1, IRS-2, IGF-IR β no grupo de fetos submetidos à RCIU. O presente experimento foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEa-UNICAMP) e aprovado como projeto de pesquisa Nº 1644-1. Para realização do estudo utilizamos fetos de ratas Sprague Dawley divididos em 3 grupos. Grupo I (RCIU) – 40 fetos submetidos à ligadura da artéria uterina unilateral com 18,5 dias de gestação, Grupo II (Controle-RCIU) – 40 fetos do corno oposto ao da ligadura da artéria uterina e Grupo III (Controle Externo) - 40 fetos sem procedimento cirúrgico ou alimentar. Os resultados mostraram no modelo experimental de RCIU uma diminuição do peso corporal (PC), hepático (PH) e intestinal (PI) ($p < 0,01$) no

grupo RCIU, as relações entre PH/PC, PI/PC, PR/PC foram mantidas, fetos RCIU tem diminuição das camadas submucosas e mucosas intestinais ($p<0,05$); diminuição da camada cortical renal e do número de glomérulos, com aumento do volume glomerular ($p<0,05$). Na RCIU encontramos menor expressão hepática do IR- β , IRS-1 e IRS-2, menor expressão do IRS-2 no intestino e rins e maior expressão do IGF-IR β em todos os tecidos. O modelo experimental estudado causou uma RCIU simétrica com alterações morfométricas e do metabolismo da glicose que poderiam justificar no futuro um maior risco de doenças metabólicas.

Palavras Chaves - restrição de crescimento intrauterino, modelo experimental, receptor de insulina

Summary

Intrauterine growth restriction (IUGR) limits appropriate fetal development increasing morbidity and perinatal mortality. Adaptive mechanisms in fetal IUGR may leave to endocrine and metabolic alterations that could explain the occurrence of diseases in adulthood. The aim of this study was to evaluate whether experimental IUGR by uterine artery ligation causes changes in morphology and histology of the liver, intestines and kidneys. We also evaluated if there were differences in the expression of insulin receptors, IR- β , IRS-1, IRS-2, IGF-IR β of fetuses subjected to IUGR. This experiment was submitted to the Ethics and Animal Experimentation of the Campinas State University (UNICAMP CEEA) and was approved as a research project No. 1644-1. The study used fetuses *Sprague-Dawley* rats divided into 3 groups. Group I (IUGR) - 40 fetuses who underwent uterine artery ligation sided with 18.5 days of pregnancy Group II (Control-IUGR) - 40 fetuses of the horn opposite to the uterine artery ligation, and Group III (External Control) - 40 fetuses without surgery or food. The results showed the experimental model of IUGR, a reduction in body weight (BW), liver (PH) and intestine (PI) ($p < 0.01$) in IUGR, the relationship between PH/PC, PI/PC, PR/PC have been retained, IUGR fetuses have reduced layers of the

intestinal mucosa and submucosa ($p < 0,05$), decreased renal cortical layer and the glomerular number and increased volume rate ($p < 0,05$). In IUGR found lower hepatic expression of IR- β , IRS-1 and IRS-2, reduced expression of IRS-2 in the intestine and kidney and increased expression of IGF-IR β in all tissues. The experimental model studied caused a symmetrical IUGR with histological changes and glucose metabolism that could justify a greater risk of metabolic diseases in the future.

Keywords – intrauterine growth restriction, experimental model, insulin receptor

1. Introdução

O crescimento fetal é um processo complexo e dinâmico que depende das interações entre fatores fetais, maternos e placentários. O equilíbrio entre esses fatores levam a um desenvolvimento fetal adequado ⁽¹⁾.

No início da gravidez, o fator determinante para o crescimento fetal é o genoma. Com o evoluir da gestação outros fatores exercem influência como: oxigenação, nutrição placentária, nutrição materna e ações hormonais ⁽²⁾.

O crescimento fetal normal pode ser dividido didaticamente em duas fases: o primeiro trimestre da gestação e a partir do segundo trimestre. No primeiro trimestre da gestação há preponderância do fator genético, esta fase é caracterizada por rápidas mitoses e pelo aumento do número de células, com proliferação, organização e diferenciação celular. A partir do segundo trimestre da gestação existe um predomínio dos fatores maternos e placentários; ocorrendo hiperplasia e hipertrofia celulares com maturação funcional dos diversos tecidos. Qualquer alteração nessas fases pode levar a alterações do crescimento feta ^(2,3).

Os estudos de crescimento fetal na espécie humana baseiam-se em medidas antropométricas fetais, realizadas em gestações sem doenças, esses estudos provêem uma estimativa razoável do crescimento fetal através de curvas de crescimento ⁽⁴⁾.

Essas curvas de crescimento fetal refletem o crescimento intrauterino adequado para cada população, levando em conta os fatores étnicos, sociais, culturais e ambientais de cada sociedade ⁽⁵⁾.

Até a década de 40, consideravam-se prematuros todos os recém-nascidos de baixo peso. Em 1947, Mc Burney ⁽⁶⁾ observou que alguns deles eram pequenos em decorrência de um crescimento intrauterino inadequado e não por nascerem precocemente.

Após cerca de quinze anos, a Organização Mundial de Saúde desvinculou os conceitos de baixo peso ao nascer e prematuridade, passando a relacioná-los à idade gestacional. Consagrou-se, então, a existência de uma nova entidade nosológica, denominada RC IU.

Em 1967, Battaglia & Lubchenco, elaboraram uma curva relacionando o peso fetal no nascimento com a idade da gravidez. Para esses autores, neonatos que se encontravam abaixo do percentil 10 eram considerados pequenos para a idade gestacional ⁽⁷⁾. Esse constitui o clássico e amplamente conhecido conceito de RC IU.

Com a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no crescimento e desenvolvimento intrauterinos, bem como das adaptações fetais diante da diminuição de nutrição e oxigenação intrauterina há uma tendência atual em modificar o conceito de RCIU.

O termo RCIU significa uma modificação no processo de desenvolvimento fetal capaz de modificar o potencial de crescimento do concepto, em que o desvio das medidas antropométricas constitui apenas um sintoma ⁽⁸⁾.

Nos grupos de fetos com RCIU encontramos maior morbidade e mortalidade neonatal ⁽⁹⁾ e maior riscos de doenças na vida adulta como hipertensão, diabetes e coronariopatias ⁽¹⁰⁾.

A fisiopatologia da RCIU relaciona-se com alterações na disponibilidade, transporte e na utilização de substratos, podendo ocorrer em situações de fornecimento materno fetal diminuído ou, então, em situações em que o potencial fetal para utilização prejudicado.

A falta de nutrientes ou de oxigenação fetal gera uma resposta adaptativa para a sua sobrevivência, essa resposta altera os mecanismos de crescimento e produção de energia celular podendo gerar impactos na vida adulta. ⁽¹¹⁾ A alteração desses mecanismos pode estar relacionada à etiologia e gravidade da RCIU.

Uma das causas mais comuns da RCIU é a diminuição da passagem de nutrientes da mãe para feto decorrente das doenças que diminuem a oxigenação e a circulação materna e, portanto levam à insuficiência útero-placentária. Várias doenças maternas levam a RCIU como: patologias cardíacas, hematológicas, autoimunes, diabetes, hipertensão arterial, malformações uterina, tabagismo, uso de drogas ilícitas e a desnutrição proteico calórica na gestação ⁽¹²⁾.

A RCIU pode ser classificada em dois tipos: simétrica e assimétrica. Na RCIU simétrica ocorre em 20 a 30% dos casos, os fetos apresentam diminuição de nutrientes ou disfunção placentária durante o primeiro ou início do segundo trimestre apresentando um crescimento fetal proporcionalmente diminuído de peso e estatura. Nas RCIU assimétricas a diminuição de nutrientes ou a disfunção placentária inicia - se ao final do segundo e início do terceiro trimestre da gestação e os fetos apresentam um crescimento desproporcional de peso e estatura. ^(13,14).

As causas mais precoces de RCIU simétrica incluem as malformações cromossômicas, doenças infecciosas fetais, abuso no uso de substâncias tóxicas e a utilização ou contato com substâncias teratogênicas. Enquanto que as causas mais comuns de RCIU assimétrica são decorrentes principalmente das doenças maternas citadas anteriormente, causando alterações vasculares que levam à insuficiência placentária. ⁽¹⁵⁾.

Os mecanismos adaptativos causados pela diminuição da nutrição intraútero alteram o crescimento fetal e como consequência desencadeiam alterações endócrinas e metabólicas permanentes que explicam a ocorrência de várias doenças metabólicas na vida adulta. De acordo com esta hipótese, o genótipo fetal pode produzir mais que um fenótipo dependendo das condições de pré e pós-natais do indivíduo ⁽¹⁶⁾.

Os fatores que levam à RCIU influenciam a produção hormonal fetal e o transporte de glicose e aminoácidos e causam uma alteração da diferenciação tecidual em várias fases do seu desenvolvimento. Entre os fatores que podem estar alterados na resposta fetal adaptativa à RCIU, destacam-se os receptores envolvidos tanto no crescimento como no desenvolvimento fetal.

1.1. Fatores hormonais envolvidos no crescimento fetal

1.1.1. Receptores de Insulina

A influência dos hormônios sobre o crescimento fetal pode ser explicada por mecanismos de transporte de glicose e aminoácidos para as células, atuando na diferenciação celular e desenvolvimento fetal ⁽¹⁷⁾.

A insulina, principal hormônio regulador de crescimento fetal é secretada pelas células β das ilhotas pancreáticas, essencial na regulação da glicemia, no crescimento e na diferenciação celular. A homeostase energética é realizada através de vias metabólicas importantes reguladas pela ação da insulina, como a glicogenólise, gliconeogênese, lipólise e proteólise ⁽¹⁸⁾.

A insulina não ultrapassa a barreira placentária e está presente na circulação fetal a partir da décima semana de desenvolvimento. Situações de hipoinsulinemia fetal estão relacionadas à agenesia pancreática e invariavelmente resultam em importante redução de peso e estatura ao nascer ⁽¹⁹⁾.

A ação da insulina ocorre através da sua ligação a um receptor específico de membrana (IR). Este receptor está presente em todos os tecidos dos mamíferos, em maior concentração no fígado e tecido adiposo ⁽²⁰⁾.

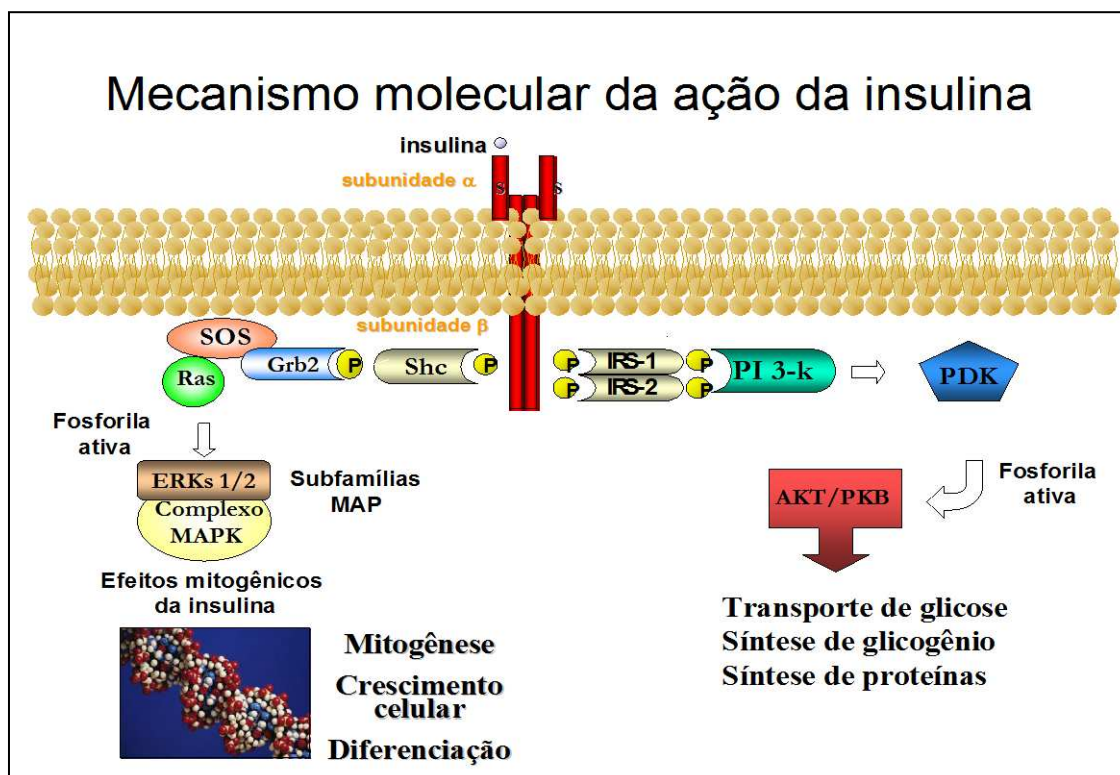
O IR é uma glicoproteína composta por duas subunidades α e duas subunidades β , unidas por ligações dissulfeto. A subunidade α é totalmente extracelular e contém o sítio de ligação com a insulina ⁽²¹⁾.

A ligação da insulina à subunidade α permite que a subunidade β sofra uma alteração conformacional promovendo uma autofosforilação do receptor, aumentando a capacidade de fosforilação dos substratos proteicos intracelulares. A fosforilação dos substratos proteicos intracelulares gera uma série de eventos regulatórios dos efeitos metabólicos e crescimento celular ⁽²²⁾.

O primeiro substrato proteico intracelular descrito recebeu o nome de substrato "um" do receptor de insulina ou IRS-1⁽²³⁾. Atualmente são identificados dez substratos do receptor de insulina, como as proteínas IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4, além de outros substratos que incluem Shc, Gab-1, p60^{dok}, Cbl, JAK2 e APS ^(24,25,26).

Após a fosforilação dos substratos proteicos intracelulares ocorre ativação das vias de sinalização intracelular, como: a via fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-K) e a cascata da *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Essas vias são responsáveis pelos transportes de glicose, síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, além da mitogênese, crescimento e diferenciação celular realizando a coordenação e integração do metabolismo intermediário celular ^(27,28).

Figura 1. Ativação do IR pela insulina e os mecanismos intracelulares envolvidos (esquema original cedido e modificado ⁽²⁹⁾).



As funções fisiológicas do IRS-1/2 foram recentemente estabelecidas através da produção de camundongos sem os genes que codificam o IRS-1 e IRS-2 (camundongos *knockout* para IRS-1 e IRS-2). O camundongo que não expressa IRS-1 apresenta resistência à insulina e retardo de crescimento, mas não é hiperglicêmico ⁽³⁰⁾. O camundongo que não expressa o IRS-2 apresenta um fenótipo diferente do camundongo sem IRS-1: hiperglicemia acentuada devido a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e a falência da atividade secretória das células β com de redução significativa da massa de células β pancreáticas ⁽³⁰⁾.

Em contraste, camundongos *knockout* para o IRS-3 e IRS-4 têm crescimento e metabolismo de glicose quase normal ⁽³¹⁾.

1.1.2. IGF's (*Insulin - like growth factors*)

Outro sistema importante na regulação do crescimento e proliferação celular na vida fetal é o IGF (*insulin - like growth factors*) que inclui os ligantes IGF-I e IGF-II, os receptores IGF-IR e IGF-IIR e as proteínas transportadoras de IGF (IGFBP) (*IGF-binding proteins*) ⁽³²⁾.

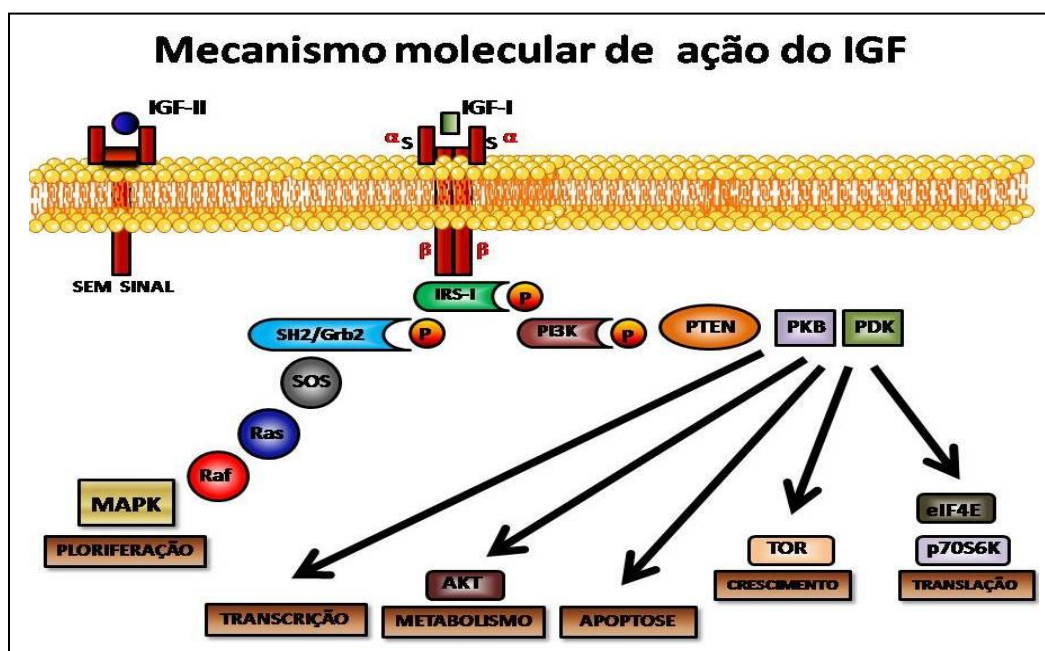
Diferentemente da maioria dos hormônios proteicos, os IGFs são encontrados em associação com uma família de seis proteínas transportadoras (IGFBP -1, -2, -3, -4, -5 e -6) que apresentam elevada afinidade pelos IGFs e modulam suas biodisponibilidades e bioatividades. Cada uma destas proteínas apresenta reguladores distintos que envolvem hormônio de crescimento (GH), insulina, cortisol, citocinas, nutrição, os próprios IGFs, paratormônio, entre outros ⁽³³⁾.

O IGF-I e IGF-II existem nos tecidos fetais desde a formação do zigoto até a fase final de maturação dos tecidos antes do nascimento. O IGF-II tem maior expressão nos tecidos fetais, o IGF-I aumenta sua expressão no final da gestação e após o nascimento ⁽³⁴⁾.

A concentração sérica de IGF-I é correlacionada com o peso fetal, estando aumentada em recém nascidos com peso aumentado e diminuída em recém nascidos com restrição de crescimento ^(35,36).

O receptor de IGF tem estrutura similar ao IR, possuindo também duas subunidades α e duas subunidades β , ligadas por pontes de dissulfeto. Após a ligação da IGF-I ou da IGF-II ao receptor ocorre uma atividade catalítica com domínio tirosina-quinase que desencadeia a fosforilação de substratos proteicos intracelulares com proliferação e crescimento celulares. As proteínas intracelulares sinalizadoras associadas ao IGF-IR, incluem os membros da família do IRS (*insulin-receptor substrate*), AKT (serine/threonine kinase), TOR (*target of rapamicina*) e a S6K (*S6 kinase*) ^(37, 38, 39).

Figura 2. Atuação do IGF e os mecanismos intracelulares envolvidos (esquema modificado ⁽⁴⁰⁾).



Estudos realizados em ratos transgênicos com mutação que anula IGF-I e IGF-II mostram que suas ações ocorrem através do IGF-1 R. Ratos deficientes em IGF-II sobrevivem e têm crescimento pós-natal normal, enquanto os animais sobreviventes deficientes em IGF-I têm crescimento pós - natal diminuído ⁽⁴¹⁾.

As moléculas de IGF guardam grande homologia estrutural com a molécula de insulina, permitindo aos IGFs, exercerem suas ações tanto via IGF-R como nos receptores de insulina. As moléculas de IGFs são produzidas na maioria dos órgãos e tecidos, sendo o fígado a principal fonte dos IGFs circulante ⁽³³⁾.

As interações entre IGF e insulina no desenvolvimento fetal são complexas e não totalmente conhecidas, porém há evidências de que a insulina estimula a produção hepática de IGF, com um efeito pleotrófico final ⁽³³⁾.

1.2. Modelos experimentais

Vários modelos experimentais em diferentes espécies têm sido desenvolvidos para estudar a RCIU. Isso é possível devido a características compartilhadas entre os humanos e outros mamíferos ⁽⁴²⁾.

A grande maioria dos modelos experimentais de RCIU utiliza ratos e camundongos (70%), seguidos de ovelhas (12%), porcos da Índia (4%), macaco (2%), cordeiro (2%) e embriões de galinha (2%) ⁽⁴³⁾.

O uso de animais de espécies menores, como ratos e camundongos, é devido a sua semelhança bioquímica, fisiológica, anatômica e genética com os humanos, e da facilidade de manipulação e menor custo para manutenção do animal ⁽⁴³⁾.

A RCIU em modelos experimentais pode ser provocada através de mudanças no compartimento materno, fetal ou placentário.

A RCIU de causas maternas pode ocorrer por desnutrição crônica, hipoxemia e hipertensão. As RCIU de causas fetais podem ser por alterações genéticas, malformações fetais e infecções. A RCIU de causa placentária pode ser por redução do tamanho placentário, embolização da circulação útero placentária e por ligadura parcial ou total da artéria uterina ⁽⁴⁴⁾.

Em modelos experimentais a má nutrição materna reduz a velocidade do fluxo de sangue para o feto, diminui a síntese de óxido nítrico, potente vasodilatador e fator de angiogênese, e das poliaminas, responsáveis pela regulação de DNA e síntese proteica. A diminuição da glicose nesses modelos diminui o IGF e as respostas intracelulares ⁽⁴⁵⁾.

A interrupção do fluxo sanguíneo placentário, por meio da embolização da artéria uterina ou da sua ligadura, causa uma diminuição do aporte de sangue placentário e crescimento fetal ^(45,46). A diminuição do fluxo sanguíneo fetal nestes modelos mimetiza o quadro de insuficiência placentária e pode ser utilizado com resultados similares a situações que ocorre em humanos com fetos apresentando RCIU.

Até o momento, nada tem sido descrito na literatura em relação ao comportamento do IR e seus receptores como fatores que promovem a RCIU no modelo experimental de RCIU. Os estudos desses fatores podem trazer subsídios para a compreensão da fisiopatologia da RCIU e implicações na síndrome metabólica do adulto

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a RCIU de causa placentária em modelo experimental

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o modelo experimental de RCIU pela ligadura da artéria uterina em modelo experimental de fetos de ratos
- Avaliar a expressão dos receptores IR- β , IRS-1, IRS-2 e IGF-IR β nos fetos de ratas com RCIU de causa placentária, induzida experimentalmente

3. Material e Método

3.1. Desenho do estudo

Estudo experimental realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental Fetal Michael R. Harrison da Universidade Estadual de Campinas, com ratas Sprague Dawley grávidas.

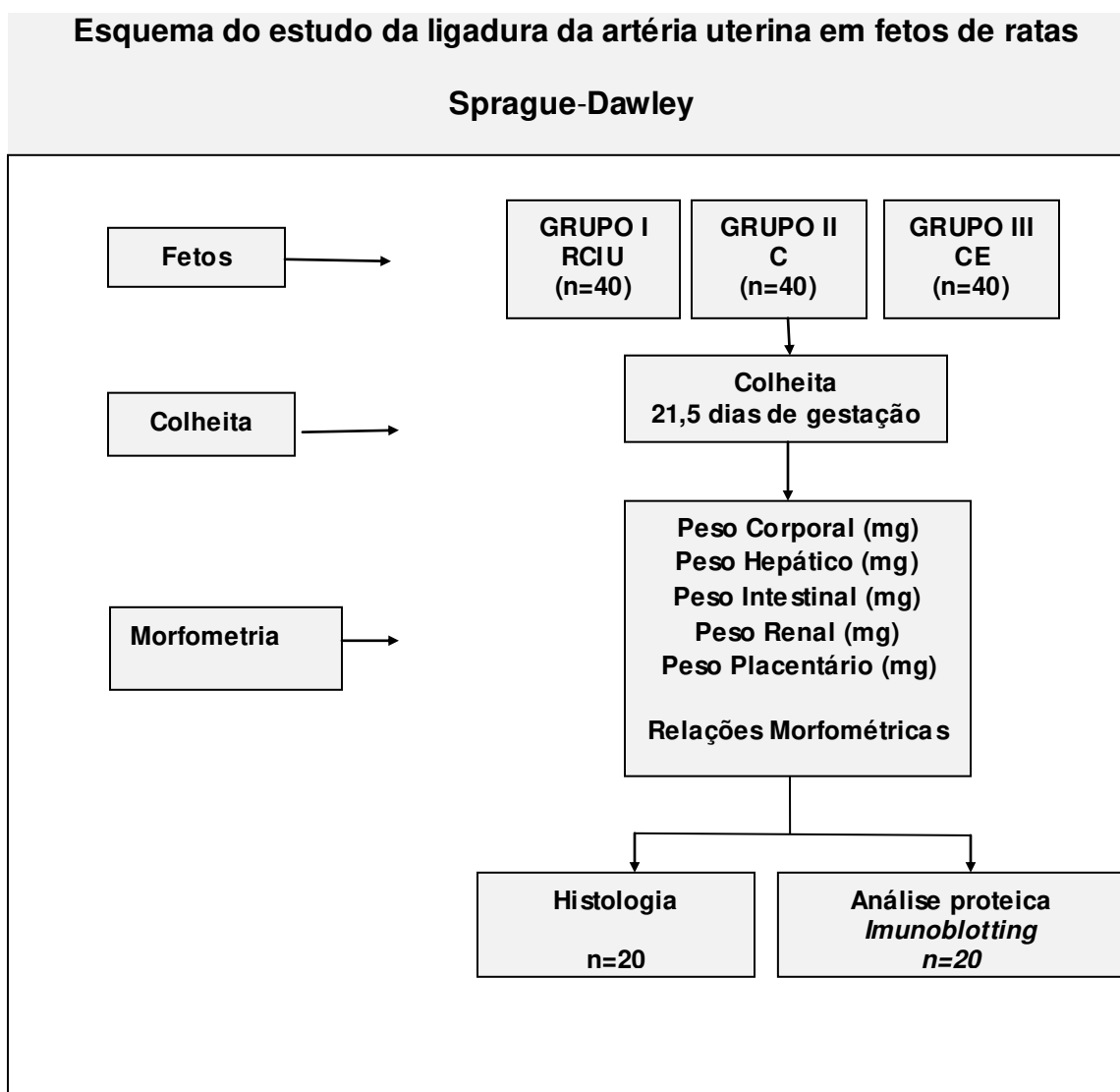
3.2. Tamanho Amostral

Para avaliação da RCIU em fetos de ratas Sprague Dawley foram necessários 120 fetos divididos em três grupos com 40 fetos.

Grupo I - fetos do corno uterino submetido à ligadura da artéria uterina com 18,5 dias, com 40 fetos chamados de RCIU.

Grupo II - fetos do corno oposto a ligadura da artéria uterina, com 40 fetos chamados de Controle da RCIU (C).

Grupo III – ratas sem manipulação cirúrgica em condições ideais de alimentação e ambiente, com 40 fetos chamados de Controle Externo (CE).



3.3. Variáveis

3.3.1 Variável independente

Ligadura da artéria uterina – realizada ligadura com oclusão completa da artéria uterina unilateral.

3.3.2 Variáveis dependentes

Peso Corporal Fetal (PC) – realizado após a retirada do feto do útero com balança de precisão, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) em miligrama (mg).

Peso Hepático Fetal (PH) - realizado após a abertura da parede abdominal do feto com balança de precisão, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) em miligrama (mg).

Peso Intestinal Fetal (PI) - realizado após a abertura da parede abdominal do feto com balança de precisão, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) em miligrama (mg).

Peso Renal Fetal (PR) - realizado após a abertura da parede abdominal do feto com balança de precisão, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) em miligrama (mg).

Peso Placentário (PP) - realizado após a abertura da parede abdominal do feto com com balança de precisão, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) em miligrama (mg).

Diâmetro da Parede Intestinal Fetal - medida em micrômetro (μm) realizada após cortes histológicos com lâminas coradas em H/E fotografadas em aumento de 20x no foto microscópio Nikon Eclipse E800 e analisadas por meio do programa Image Pro Plus[®].

Altura dos Vilos Intestinais Fetais - medida em μm realizada após cortes histológicos com lâminas coradas em H/E fotografadas em aumento de 100x no foto microscópio Nikon Eclipse E800 e analisadas por meio do programa Image Pro Plus[®].

Medidas das Camadas Intestinais Fetais (serosa, muscular longitudinal, muscular circular, submucosa e mucosa) - medida em μm realizada após cortes histológicos com lâminas coradas em H/E fotografadas em aumento de 200x no foto microscópio Nikon Eclipse E800 e analisadas por meio do programa Image Pro Plus[®].

Tamanho Renal Fetal - medida em μm realizada após cortes histológicos com lâminas coradas em H/E fotografadas em aumento de 20x no foto microscópio Nikon Eclipse E800 e analisadas por meio do programa Image Pro Plus[®].

Número de Glomérulos Renais Fetais - contagem realizada após cortes histológicos com lâminas coradas em H/E fotografadas em aumento de 200x no foto microscópio Nikon Eclipse E800 e analisadas por meio do programa Image Pro Plus[®].

Volume Glomerular Renal Fetal - Utilizado o método descrito por Pascale *apud* Weibel ⁽⁴⁷⁾ que envolve a determinação da área do perfil médio glomerular e o cálculo do volume médio glomerular, através da fórmula:

$$V_G = \text{Area}^{1,5} \times 1,38/1,01$$

Onde 1,38 é β , o coeficiente da forma de uma esfera, e 1,01 é o coeficiente de distribuição do tamanho assumindo um coeficiente de variação de 10%.

IR- β – Receptor de Insulina do tipo β - sua presença foi analisada pelo método de *imunoblotting* através de sua expressão visual, as intensidades das bandas foram estimadas por análise densitométrica comparando os grupos de RCIU, C e CE.

IRS-1 - Substrato do Receptor de Insulina do tipo 1 - sua presença foi analisada pelo método de *imunoblotting* através de sua expressão visual, as intensidades das bandas foram estimadas por análise densitométrica comparando os grupos de RCIU, C e CE.

IRS-2 - Substrato do Receptor de Insulina do tipo 2 - sua presença foi analisada pelo método de *imunoblotting* através de sua expressão visual, as intensidades das bandas foram estimadas por análise densitométrica comparando os grupos de RCIU, C e CE

IGF-IR β – Receptor de IGF do tipo β - sua presença foi analisada pelo método de *imunoblotting* através de sua expressão visual, as intensidades das bandas foram estimadas por análise densitométrica comparando os grupos de RCIU, C e CE

3.4 . Seleção de Animais

Fêmeas de ratos Sprague Dawley com peso ao redor de 250g foram submetidas ao acasalamento. O casal foi mantido em conjunto durante uma noite. No dia seguinte ao encontro, a região genital da fêmea foi examinada para verificação de mancha vaginal de esperma (*vaginal smear*). A presença da mancha vaginal configura o acasalamento e foi considerado dia zero de gravidez, o tempo de gestação normal de ratas até o termo é de 22 dias.

3.5. Técnica Cirúrgica

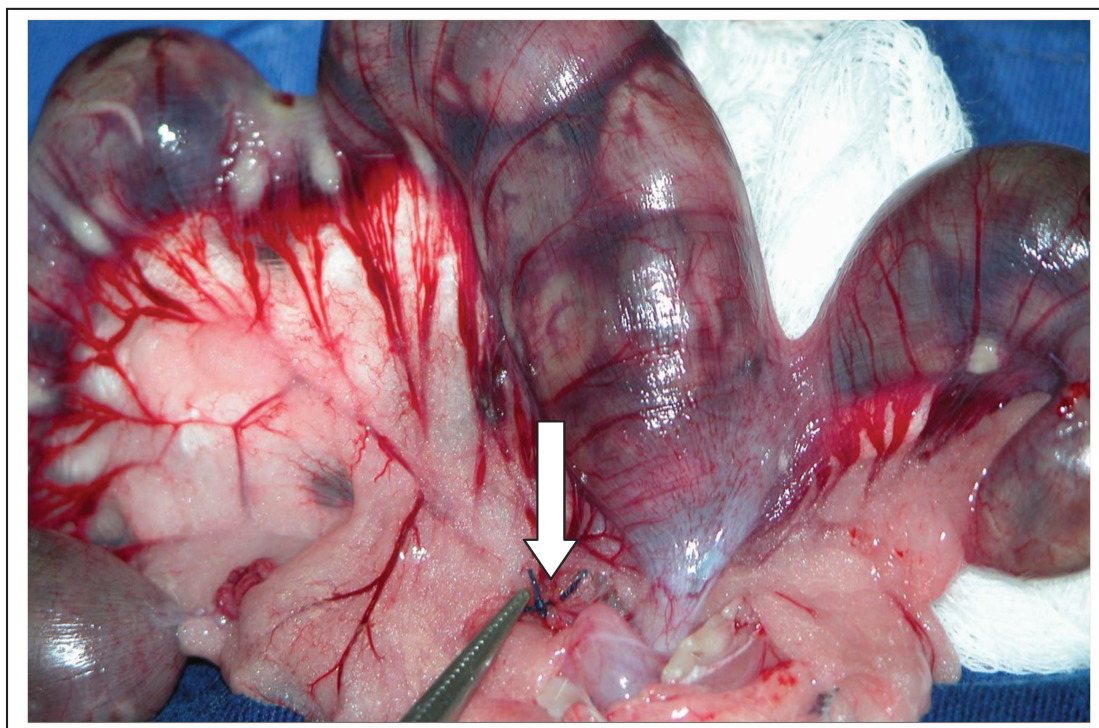
3.5.1. Realização da Ligadura da Artéria Uterina segundo Wigglesworth ⁽⁴⁸⁾

Ratas Sprague Dawley grávidas de 18,5 dias foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de Ketamina base - 50mg/ml (Ketamina[®] - Pfizer do Brasil) associada com Xilazina 10mg/ml (Rompum[®] - Bayer do Brasil) na dose de 0,6 ml por animal via intramuscular aplicado na musculatura lateral da coxa com seringa de insulina e agulha 20G. Esta composição anestésica (175mg/kg de Ketamina / 2,5MG/kg de Xilazina) mantém o animal sob anestesia profunda durante um período de três horas e o pós - operatório indolor durante 6 a 12 horas. O abdome foi submetido à raspagem dos pêlos com tosquiadeira elétrica *Sunbeam*[®] com cuidado para não ferir os mamilos. Os animais foram colocados sobre bancada aquecida por resistência elétrica, marca *Harvard Apparatus*[®], e previamente regulada na temperatura de 37°C.

Após assepsia com clorhexidina (Chlorohex[®]) - solução aquosa e colocação de campos estéreis, o animal foi submetido à laparotomia mediana

em dois planos (pele e aponeurose/peritônio). A região uterina foi exposta com visualização dos cornos uterinos e sua circulação. A artéria uterina unilateral foi ligada bem próxima ao corno uterino por ligadura com fio de algodão 3.0. Após a ligadura da artéria uterina o suprimento sanguíneo é realizado pela artéria ovariana.

Figura 3. Cirurgia realizada com 18,5 dias de gestação, com ligadura da artéria uterina segundo técnica descrita por Wigglesworth ⁽⁴⁸⁾.



Ao final da realização do procedimento, a parede abdominal da rata mãe foi fechada em dois planos, com utilização de fio mononylon 4-0, sutura contínua. As ratas foram recuperadas com oxigênio inalado em máscara apropriadamente adaptada, até estarem completamente acordadas e movimentando-se sem problemas. O período pós - operatório ocorreu em gaiolas de acrílico, com baias individuais, com água e ração oferecidas *ad libitum*.

3.6. Colheita

No dia 21,5 de gestação, as ratas foram novamente anestesiadas e submetidas à operação cesariana, por laparotomia mediana. Os dois primeiros fetos adjacentes a ligadura da artéria uterina geralmente morreram e foram excluídos do estudo. Os fetos submetidos ao hipofluxo e seus respectivos controles do corno contra lateral foram removidos do útero, sacrificados através de injeção letal do mesmo anestésico já descrito e punção occipital.

Os fetos foram pesados em balança de precisão, modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) e obtidos os pesos corporais em mg (PC). O abdome fetal foi aberto por incisão mediana e o fígado, intestino e rins foram dissecados sob foco de luz com auxílio de microscopia óptica, removidos e pesados. As alças intestinais foram removidas da região do piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal. Após remoção do fígado,

intestino, rins e a placenta metade desse material foram fixados em solução de paraformaldeído 4% fresco para estudo histológico e a outra metade foi congelada a - 80°C para análise bioquímica.

3.7. Avaliação Morfométrica

A obtenção do peso corporal (PC), peso intestinal (PI), peso hepático (PH), peso renal (PR) e peso placentário (PP) foi realizado estudo estatístico dessas grandezas nos diversos subgrupos. (Anexo 1). As relações corporais foram realizadas com o objetivo de analisar as diferenças entre os grupos onde verificou - se a proporção relativa entre os órgãos, como: PI/PC, PH/PC PR/PC e PP/PC (Anexo 2).

3.8. Avaliação Histológica

Depois de fixados em paraformaldeído 4% as amostras de intestino, fígado, rins e placentas foram desidratadas em uma gradiente crescente de etanol, diafanizadas e incluídas em parafina histológica. Os cortes histológicos foram realizados em micrótomo leica - modelo rm 2145, com espessura de 5µm para todos os órgãos e posteriormente coletados em lâminas histológicas pré -

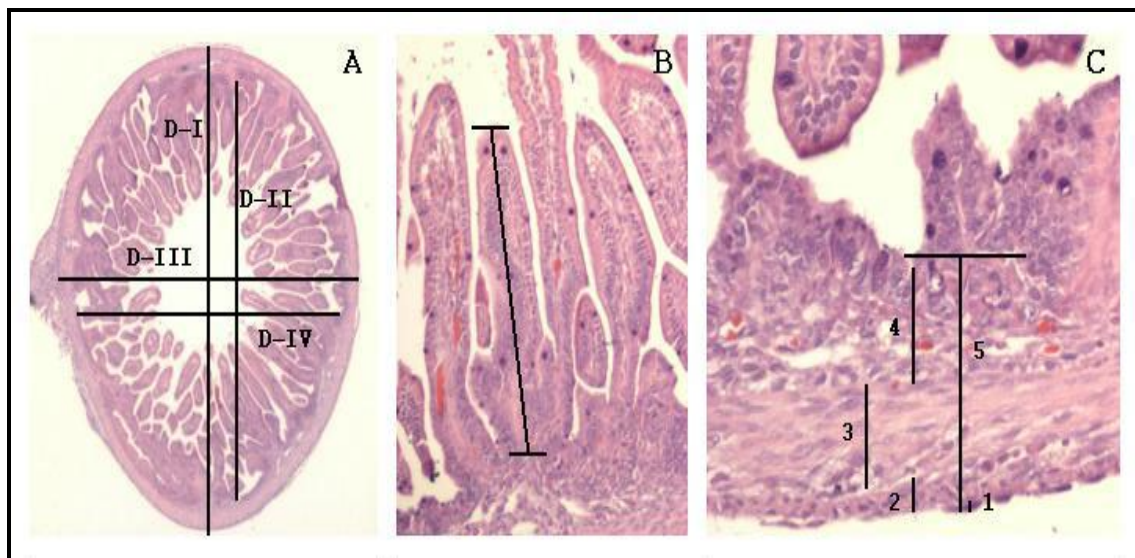
tratadas com poli-L-lisina para melhor aderência. Os cortes foram corados por hematoxilina de Erlich/Eosina (H/E) e as lâminas foram montadas em Entellan[®]. No fígado foi realizada a coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) para identificação histológica de armazéns de glicogênio. No intestino e rins foi analisado a morfometria das diferentes camadas celulares pela coloração de H/E.

3.8.1. Análise morfométrica das camadas intestinais

Para a análise histológica morfométrica intestinal foram analisados os segmentos jejuno/ileais. Os cortes histológicos transversais foram fotografados utilizando o foto microscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 20 vezes, avaliando-se o diâmetro intestinal D-I (medida externa vertical serosa - serosa), D-II (medida interna vertical mucosa - mucosa), D-III (medida externa horizontal serosa- serosa) e D-IV (medida interna horizontal mucosa - mucosa), 100 vezes para a medida da altura dos vilos e 200 vezes para a medida das camadas da parede intestinal. Na avaliação estatística foi utilizada a média entre D-I e D-III para avaliação da espessura da parede e entre D-II e D-IV para o tamanho da luz intestinal. As imagens foram digitalizadas, possibilitando a medida dos diâmetros intestinais, altura dos vilos desde o topo até a junção da cripta, espessura total da parede, camadas mucosa e submucosa, muscular circular,

muscular longitudinal e serosa por meio do programa Image Pro Plus[®] (49,50). As medidas, em μm , são realizadas em orientação radial, nos quatro quadrantes de cinco cortes sequenciais, de cada variável para cada feto.

Figura 4. Medidas em cortes histológicos transversais de intestino para a análise estatística. Em A, aumento de 20x para medida dos diâmetros, observando que no D-I e D-III é desde a serosa e em D-II e D-IV é desde a mucosa. Em B, aumento de 100x para medida dos vilos desde o topo até a junção da cripta. Em C, aumento de 200x para medida das camadas, sendo 1 - Serosa, 2 – Muscular Longitudinal, 3 – Muscular Circular, 4 – Submucosa e mucosa e 5 – Espessura total da parede



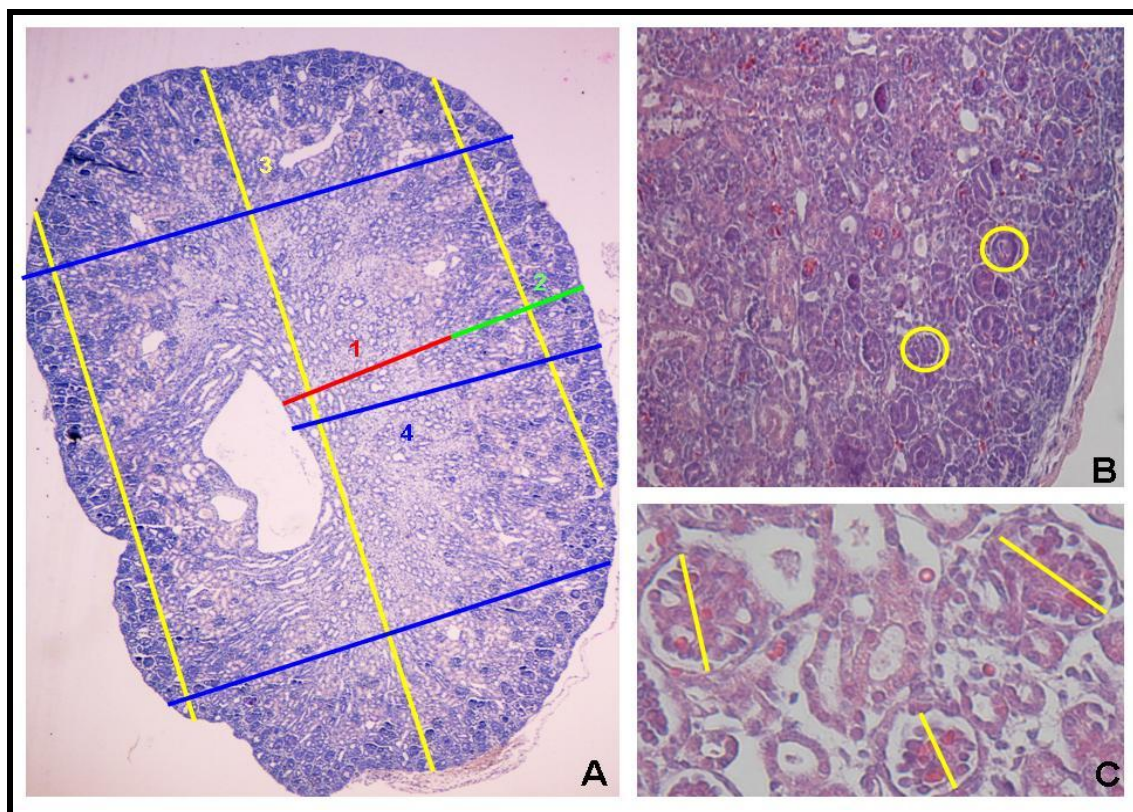
3.8.2. Análise morfométrica das camadas renais

Os cortes histológicos renais foram fotografados utilizando o fotomicroscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 40 vezes para a avaliação da largura, altura, espessura do córtex e da medula renal. Ampliação de 200 vezes para contagem do número de glomérulos e de 400 vezes para avaliação da área glomerular. As medidas, em μm , foram realizadas em rins de cinco fetos, sendo observados três campos de cada corte (total de 3 cortes por órgão). A microtomia foi feita em série, porém a análise foi realizada a cada sete cortes por amostragem. As imagens foram analisadas por meio do programa Image Pro Plus[®]. Para a análise do volume médio glomerular, foi utilizado o método descrito por Weibel ⁽⁴⁷⁾, que envolve a determinação da área do perfil médio glomerular e o cálculo do volume médio glomerular através da fórmula:

$$V_G = \text{Área}^{1,5} \times 1,38/1,01$$

Onde 1,38 é β , o coeficiente da forma de uma esfera, e 1,01 é o coeficiente de distribuição do tamanho assumindo um coeficiente de variação de 10%.

Figura 5. Medidas em cortes histológicos longitudinais de rim para a análise estatística. Em A, aumento de 40x para medida do rim, sendo 1 – Medula, 2 – Córtex, 3 – Altura renal e 4 – Largura renal (para estes dois itens foi feita a média de 3 medidas realizadas). Em B, aumento de 200x para contagem de glomérulos por rim. Em C, aumento de 400x para melhor visualização dos glomérulos e medida do diâmetro para cálculo do volume renal.



3.9. Análise proteica por *Imunoblotting*

As amostras de todos os órgãos foram pesadas e homogeneizadas em tampão de extração Tris-HCl 100mM, pH 7,4 contendo 2mM de PMSF, EDTA 10mM, Pirofosfato de sódio 10mM, Fluoreto de sódio 100mM, Ortovanadato de sódio 10mM e Aprotinina 0,1 mg/mL. Em seguida, foram centrifugadas a 12000 r.p.m., por 30 min a 4°C e o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas foi determinada pela leitura em 595 nm, através do método de Bradford ⁽⁵¹⁾

As amostras, de acordo com sua concentração de proteínas foram diluídas em tampão de Laemmli: 0,0625M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0.001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) e aquecidas a 100 °C por 5 minutos. Após rápida centrifugação a 12000 r.p.m. (30 seg), as proteínas das amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% contendo 0.1% de lauril sulfato de sódio ⁽⁵²⁾.

A composição do tampão utilizado na corrida eletroforética é a seguinte: TRIS (25 mM), glicina (192 mM) e SDS (0.1%) ajustado para p.H. 8,3.

A separação eletroforética das proteínas é realizada com uma intensidade de corrente constante (100 V), durante aproximadamente 1 minuto e 30 segundos, resultando em valores de voltagem variando entre 80V a 100V.

Posteriormente, as bandas protéicas são transferidas eletroforeticamente através de sistema submerso para uma membrana de nitrocelulose, aplicando - se uma voltagem de 120 V durante 1 hora e 40 min. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética das proteínas para a membrana de nitrocelulose é a seguinte: TRIS (25mM), glicina (192mM), e metanol (20%).

Para comprovar a eficiência da transferência, os géis foram corados com corante Commassie blue (solução a 0.1% de Commassie brilliant blue em solução aquosa de ácido acético 5% contendo 25% de etanol), e as membranas são coradas com vermelho de Ponceau (0,2% de Pounceau + 3% de ác. Tricloro acético + 3% de ác. sulfosalicílico). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana são bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 0,5% de leite em pó desnatado em tampão PBS (*Phosphate buffered saline*) sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 15 a 18 horas, a - 4 °C com anticorpo primário específicos: Anticorpos IR- β , IRS-1, IRS-2 e IGF-IR β , (Laboratório Santa Cruz). Diluídos em albumina bovina (0,03%) em tampão PBS.

Após o término da incubação, as membranas são lavadas (três vezes durante 10 minutos) com tampão PBS e incubadas com anticorpos secundários IR- β anti-rabbit 711, IRS-1 anti-rabbit (C-20) 559, IRS-2 anti-rabbit 560 e IGF-IR β anti-rabbit sc713 em albumina bovina (0,03%) e em tampão PBS durante 2 horas.

Em seguida, as membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens com PBS e as bandas imunoreativas foram reveladas mediante um kit de revelação de quimioluminescência (West Pico Super Signal para HRP, Pierce, EUA).

As imagens foram detectadas em aparelho de imagens e as intensidades das bandas foram estimadas através do programa Image J por análise densitométrica e colocadas em forma de gráficos para melhor visualização da expressão dos receptores nos grupos estudados.

4.0. Análise Estatística

Os valores obtidos através das pesagens e da morfometria foram avaliados pelo método de ANOVA com pós-teste Tukey - Kramer considerando as diferenças significativas para $p < 0,05$. Os resultados foram expressos em média $\pm$ desvio-padrão. Os cálculos foram feitos por meio do *Programa GraphPad Prism 3.02*.

4.1. Avaliação do Comitê de Ética e Experimentação Animal

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-UNICAMP) e foi aprovado como projeto de pesquisa N° 1644-1 (Anexo 3).

4. Publicações

Artigo 1 – **Efeitos da restrição de crescimento fetal pela ligadura da artéria uterina no modelo experimental de ratos**

Artigo 2 - **Avaliação da expressão do IR β , IRS-1, IRS-2 e IGF-IR β em fetos de ratas submetidas à modelo experimental de restrição de crescimento intrauterino**

4.1. Artigo 1

Efeitos da restrição de crescimento fetal pela ligadura da artéria uterina no modelo experimental de ratos

Márcia Pereira Bueno¹, Ricardo Barini¹, Frances Lilian Lanhellas Gonçalves²,
Rilde Plutarco Veríssimo³, Lourenço Sbragia²

¹ Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas-SP, ² Divisão de Cirurgia Pediátrica do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto, SP- Brasil.e ³ Departamento de Patologia da Pontifícia Universidade Católica de Campinas

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental Fetal “Michael R. Harrison” UNICAMP

Prof. Dr. Lourenço Sbragia
Departamento de Cirurgia e Anatomia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo – USP
Av. Bandeirantes, 3900 Ribeirão Preto – SP – Brasil – CEP – 14048-900
Fone: 55-16-3602-2593 Fax: 55 - 16 – 3633-0836 *email:sbragia@fmrp.usp.br*

Projeto auxílio de pesquisa No. 02/02563-8 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Submetido e aprovada- Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia
(protocolo 3761)

Resumo

A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) é um processo capaz de limitar o desenvolvimento fetal adequado aumentando a morbidade e mortalidade perinatais, bem como de aumentar o risco de doenças na idade adulta. Vários modelos experimentais de RCIU vêm sendo propostos para facilitar a compreensão da fisiopatologia da RCIU, entre eles a ligadura da artéria uterina. **OBJETIVO:** Avaliar a eficácia do modelo de RCIU por ligadura da artéria uterina simulando insuficiência placentária em ratos. **MATERIAL E MÉTODO:** Ratas prenhes Sprague-Dawley com 18,5 dias de gestação (mancha de esperma = D zero; termo = D 22) foram divididas em 3 grupos de fetos: Grupo I – RCIU, ligadura da artéria uterina no corno direito; Grupo II - C-RCIU, controle no corno esquerdo e Grupo III – CE, fetos de ratas não manipuladas. **RESULTADO:** Os dados morfométricos avaliados mostraram o peso corpóreo (PC), hepático (PH) e intestinal (PI) dos fetos com RCIU menor que C-RCIU e o CE ($p < 0,001$). O peso placentário (PP), renal (PR) e as relações PH/PC, PI/PC, PR/PC não se alteraram. A espessura renal foi menor na RCIU ($p < 0,001$) e houve diminuição da camada mucosa e submucosa intestinal ($p < 0,05$). A avaliação histológica mostrou diminuição do glicogênio hepático nos fetos com RCIU em relação ao C-RCIU e CE. **CONCLUSÃO:** O modelo descrito foi eficiente e causou RCIU fetal simétrica com diminuição da maioria dos órgãos especialmente do peso hepático e alteração dos seus depósitos de glicogênio. **Palavras-chave:** restrição de crescimento intrauterino, modelo experimental, desenvolvimento fetal

Abstract

The intrauterine growth restriction (IUGR) is a process that will limit fetal development appropriate increase morbidity and perinatal mortality, and increasing the risk of disease in adulthood. Several experimental models of IUGR have been proposed to facilitate the understanding of the pathophysiology of IUGR including ligation of the uterine artery. **OBJECTIVE:** To evaluate the effectiveness of the model of IUGR by uterine artery ligation mimicking placental insufficiency in rats. **METHODS:** Female pregnant Sprague-Dawley rats at 18.5 days of gestation (sperm stain D = 0; term D = 22) were divided into 3 groups of fetuses: Group I - IUGR, uterine artery ligation in the right horn; Group II - C-IUGR control in the left horn and Group III - EC, fetuses of rats not manipulated. **RESULTS:** The morphometric data evaluated showed body weight (BW), liver (PH) and intestinal (PI) of fetuses with IUGR than C-IUGR and EC ($p < 0.001$). The placental weight (PP), renal (PR) and the relations PH/PC, PI/PC, PR/PC did not change. The thickness of kidney was lower in IUGR ($p < 0.001$) and decreased layer intestinal mucosa and submucosa ($p < 0.05$). Histological evaluation showed reduction of liver glycogen in fetuses with IUGR in relation to C-IUGR and CE. **CONCLUSION:** The model described was efficient and caused fetal IUGR symmetric decrease in most organs, especially the liver weight and change their glycogen stores.

Keywords: intrauterine growth restriction, model experimental,
fetal development

A restrição de crescimento intrauterino (RCIU) é uma importante causa de morbidade e mortalidade perinatal. Na população de mães saudáveis e nutridas a incidência de fetos com RCIU varia de 1 a 3% dos casos ⁽¹⁾ e pode chegar a 25% em mães tabagistas, nas usuárias de droga e nas portadoras de doenças cardiovasculares, hematológicas e auto-imunes ⁽²⁾.

As complicações neonatais mais frequentes decorrentes das RCIU são hipoglicemia, hipotermia, hipóxia, doenças pulmonares, alterações neurológicas e diminuição da estatura ^(3,4). Durante a infância indivíduos que tiveram RCIU apresentam mais dificuldades no aprendizado e piores desempenhos neuropsicomotores ⁽⁵⁾ e, durante a fase adulta têm mais chance de desenvolverem doenças cardíacas e metabólicas (dislipidemias, intolerância a glicose e diabetes melitus do tipo II) ^(6,7).

Vários modelos experimentais de RCIU vêm sendo propostos para facilitar a compreensão da fisiopatologia da doença. O modelo utilizando rato é o mais comum, além de ter alta semelhança genética, bioquímica e fisiológica com a biologia humana; possui vantagens por apresentar curto período de gestação, baixo custo e fácil manipulação ^(8,9).

A RCIU nestes modelos pode ser induzida por meio da embolização, ligadura da artéria uterina, causando desnutrição crônica ou hipertensão materna ^(10,11). A vantagem do modelo da ligadura unilateral da artéria uterina é que ele possui fetos com RCIU e fetos controle na mesma gestação ⁽¹²⁾.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a ligadura da artéria uterina durante a fase final da gestação da rata teria eficácia em causar RCIU pela diminuição de circulação materno-placentária.

Material e Método

Estudo experimental realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental Fetal Michael R. Harrison da Universidade Estadual de Campinas e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEAA-UNICAMP) N° 1644-1.

Treze fêmeas de ratos Sprague-Dawley com peso ao redor de 250g foram submetidas ao acasalamento. O casal foi mantido em conjunto durante uma noite. No dia seguinte ao encontro, a região genital da fêmea foi examinada para verificação de mancha vaginal de esperma (*vaginal smear*). A presença da mancha vaginal configurou o acasalamento e foi considerado dia zero de gravidez, o tempo de gestação normal de ratas até o termo é de 22 dias.

Três grupos compostos de 20 fetos cada um foram divididos e denominados: Grupo I – RCIU - fetos de ratas grávidas localizados no corno uterino direito e submetidos à ligadura da artéria uterina com 18,5 dias, Grupo II – controle da RCIU (C-RCIU) - fetos de ratas grávidas localizados no corno

uterino esquerdo sem ligadura da artéria uterina e Grupo III - Controle Externo (CE) - fetos de ratas não submetidas à intervenção.

Após aclimação de 24 horas no laboratório, ratas Sprague-Dawley grávidas com 18,5 dias de gestação foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de Ketamina base- 50mg/ml (Ketamina® - Pfizer do Brasil) associada com Xilazina 10mg/ml (Rompum® - Bayer do Brasil) na dose de 0,6 ml por animal via intramuscular aplicado na musculatura lateral da coxa. Esta composição anestésica (175mg/kg de Ketamina/ 2,5mg/kg de Xilazina) mantém o animal sob anestesia profunda durante um período de três horas e o pós-operatório indolor durante 6 a 12 horas. O abdome foi submetido à raspagem dos pêlos com tosquiadeira elétrica. Após assepsia e colocação de campos estéreis, o animal foi submetido à laparotomia mediana em dois planos (pele e aponeurose / peritônio). A região uterina foi exposta com visualização dos cornos uterinos e sua circulação. A artéria uterina direita foi dissecada e ligada bem próxima ao corno uterino com fio de algodão 3.0 cuidando para não envolver os vasos do mesentério (Figura 1). Após a ligadura da artéria uterina ocorre hipofluxo sanguíneo placentário com recirculação proveniente da artéria ovariana e nos três dias finais da gestação causa RCIU.

A seguir o abdome da rata foi fechado em dois planos, com utilização de fio mononylon 4-0, sutura contínua. Após o término do procedimento, as ratas foram recuperadas com oxigênio a 100% inalado a 1 litro por minuto em

máscara adaptada, até estarem completamente acordadas e movimentando - se sem problemas. O período pós - operatório ocorreu em gaiolas de acrílico, em baias individuais, com água e ração oferecidas *ad libitum*.

No dia 21,5 de gestação, as ratas dos grupos I, II e III foram novamente anestesiadas, mesma dose previamente descrita, e submetidas à operação cesariana por laparotomia mediana. Os fetos foram removidos do útero e a rata foi sacrificada por exsanguinação sob anestesia. Após remoção uterina os fetos foram pesados em balança de precisão modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) e o peso corporal (PC) aferidos em miligramas (mg). A seguir os fetos foram anestesiados e submetidos à punção occipital e o abdome fetal foi aberto por incisão mediana e dissecado sob foco de luz, com auxílio de microscopia óptica, expondo as alças. As alças intestinais foram removidas desde o piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal. O intestino, o fígado, os rins e a placenta de todos os grupos foram removidos, pesados (mg) e fixados em solução de paraformaldeído 4% fresco, respectivamente denominados peso intestinal (PI), hepático (PH), renal (PR) e placentário (PP). As relações corporais PH/PC, PI/PC, PR/PC, PP/PC foram criadas com objetivo de verificar a proporção relativa entre os órgãos. Todos os tecidos foram corados com Hematoxilina / Eosina (H&E) e o tecido hepático corado pela técnica de Schiff (PAS) para avaliação do acúmulo de glicogênio.

Para a morfometria do intestino foram analisados os segmentos intestinais intermediários (jejuno-ileal). Os cortes histológicos intestinais

transversais foram fotografados utilizando o fotomicroscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 20 vezes para a avaliação do diâmetro intestinal D-I (medida externa vertical desde a serosa), D-II (medida interna vertical desde a mucosa), D-III (medida externa horizontal desde a serosa) e D-IV (medida interna horizontal desde a mucosa), 100 vezes para a medida da altura dos vilos e 200 vezes para a medida das camadas da parede intestinal. Para avaliação estatística foi utilizado à média entre D-I e D-II e entre D-III e D-IV. As imagens foram digitalizadas, possibilitando a medida dos diâmetros intestinais, altura dos vilos desde o topo até a junção da cripta, espessura total da parede, camadas mucosa e submucosa, muscular circular, muscular longitudinal e serosa por meio do programa Image Pro Plus[®]. As medidas, em μm , foram realizadas em orientação radial, nos quatro quadrantes de cinco cortes seqüenciais, de cada variável para cada feto ^(13,14) (Figura 2).

Para a morfometria renal foi analisado um dos dois rins sem distinção entre lado direito e esquerdo. Os cortes histológicos renais longitudinais foram fotografados utilizando o foto microscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 40 vezes. As imagens foram digitalizadas por meio do programa Image Pro Plus[®] em cinco cortes seqüenciais, aferidas em μm , de cada variável para cada feto. A altura renal medida do diâmetro entre o pólo superior e inferior, a largura, entre a pelve e o lado contra lateral, a medula e o córtex renal (Figura 3).

A análise estatística realizada foi através do teste T de *Student* para amostras pareadas para a comparação dos pesos e das relações corporais e apresentados como média e desvio padrão. Os grupos foram comparados segundo ANOVA seguido do teste de Tukey. Foram considerados valores estatisticamente significativos quando o $p < 0.05$.

Resultados

O total de 13 ratas grávidas compôs o estudo. A ligadura da artéria uterina foi realizada em 10 ratas e três foram utilizadas como controle externo (CE). O peso médio das ratas submetidas à cirurgia aos 18,5 dias foi de 324 g (± 67) e peso médio final aos 21,5 dias de gestação foi de 340g (± 83) com aumento de peso de 16g (± 65). As três ratas CE apresentaram peso médio inicial de 320g (± 65) e final de 348g (± 25) com aumento de peso de 60g (± 20). Embora as ratas CE ganhassem mais peso médio que as ratas operadas, não houve diferença no peso médio final entre as ratas operadas e o grupo CE ($p > 0.05$).

O total de fetos do corno direito; submetidos ao regime de hipofluxo cirúrgico; foi de 55 e destes 20 sobreviveram. Dos fetos mortos 30 foram os que estavam mais próximo da ligadura arterial, ou seja, principalmente o primeiro e o segundo fetos seqüenciais à ligadura.

O peso corporal, o peso hepático e o intestinal dos fetos RCIU foi significativamente menor que os seus respectivos C-RCIU e o grupo CE ($p<0,001$). O peso renal, o peso placentário e as relações entre o peso corporal, hepático, intestinal, renal e placentário não mostraram diferença estatística (Tabela 1). Com a diminuição de peso de alguns órgãos e a manutenção das relações entre o peso corporal / órgão demonstra que os fetos com RCIU tiveram uma diminuição proporcional do seu tamanho (Figura 4).

A análise morfométrica intestinal mostrou na RCIU em relação ao CE uma diminuição significativa da luz intestinal (camada interna) e largura da alça intestinal (diâmetro externo). A diminuição das camadas intestinais concentra - se especificamente na serosa, mucosa e submucosa no grupo de RCIU em relação ao grupo do C-RCIU e CE (Tabela 2).

Não houve diferença morfométrica entre o comprimento e largura renal nos grupos RCIU, C-RCIU e CE, no entanto a espessura da camada cortical renal foi menor em relação à espessura da camada medular no grupo de RCIU quando comparada as espessuras cortical e medular dos grupos C-RCIU e CE ($p<0,01$) (Tabela 3).

A descrição geral histológica dos fígados corados com ácido periódico de Schiff (PAS) demonstrou respectivamente: a) depósito de glicogênio de aspecto homogêneo nos hepatócitos em cerca de 80% dos fragmentos examinados no grupo CE, b) depósito de glicogênio de distribuição

heterogênea (irregular) no grupo C-RCIU e c) irregularidade acentuada no depósito de glicogênio, alternando zonas claras (sem depósito) com zonas coradas (com depósito) em mais de 50% dos fragmentos no grupo RCIU (Figura 5).

Discussão

Fetos que possuem RCIU apresentam resposta adaptativa à suplementação inadequado de oxigênio e/ou nutrientes. Modelos animais para determinar os eventos moleculares, genéticos ou celulares são utilizados para compreender melhor a relação entre nutrição fetal na RCIU e as doenças na idade adulta ⁽¹⁵⁾.

Vários animais têm sido utilizados em modelos experimentais de RCIU. A maioria dos estudos emprega animais de pequeno porte como os ratos (60%) e camundongos (10%) pela facilidade de manipulação e pela similaridade dos seus sistemas embriológico, anatômico e fisiológico com o humano ⁽⁹⁾. O modo de indução da RCIU nestes animais pode ser realizado de maneiras a) nutricional, restringindo a oferta de alimento; b) hipóxia, restringindo a oferta de oxigênio; c) química, utilizando drogas que afetam a prole e d) cirúrgico ⁽¹⁵⁾.

Nos modelos nutricionais empregam-se o jejum prolongado, há uma diminuição nutricional ⁽¹⁶⁾ ou uma diminuição específica de proteínas ⁽¹⁷⁾. Nos

modelos que induzem hipóxia materna empregam-se a diminuição de diferentes níveis de oxigênio, o uso do nitrogênio endotraqueal e a indução de anemia materna ⁽¹⁸⁾. No modelo induzido químico, as substâncias como glicocorticóides e deidroergotaminas são as mais comumente utilizadas ⁽¹⁹⁾.

Nos modelos cirúrgicos utilizam-se animais de pequeno e grande porte. Nos de grande porte, especialmente em ovelhas e porcos, a RCIU é induzida de duas maneiras; ou pela embolização de microesferas de 15µm a 30µm de diâmetro na circulação útero-placentária ou pela retirada de cotilédones na implantação da placenta. No modelo cirúrgico de animais de pequeno porte a RCIU pode ser feita ligando a artéria uterina de um ou de ambos os lados ⁽²⁰⁾.

Wigglesworth em 1964 demonstrou a importância da circulação uterina no crescimento fetal com a criação do modelo cirúrgico de RCIU em fetos de rato por meio da ligadura unilateral completa da artéria uterina. Neste modelo a incidência de fetos mortos ou reabsorvidos após a oclusão arterial varia de 30 a 60% dos casos. Nós obtivemos resultados similares à técnica proposta pelo autor.

A incidência de mortalidade fetal pode ser reduzida com oclusão parcial da artéria uterina ⁽²⁰⁾, ou com a oclusão em intervalos de minutos à horas⁽²¹⁾. Nesses estudos as respostas fetais variam em relação à quantidade de fluxo sanguíneo mantido para o feto. Esta alteração de aporte sanguíneo

não controlado poderia influenciar o grau de RCIU fetal que dificultaria a comparação com o modelo de oclusão arterial completa.

A RCIU pode ser didaticamente classificada em simétrica e assimétrica. Na simétrica os fetos tiveram diminuição de nutrientes ou disfunção placentária durante o primeiro ou início do segundo trimestre da gestação, nesta situação os fetos têm um crescimento proporcional diminuído.

Em nosso estudo, embora a ligadura seja realizada no final do segundo trimestre da gestação da rata, as relações dos pesos entre os diferentes órgãos (PH/PC, PI/PC, PR/PC E PP/PC) demonstraram que neste modelo os fetos tiveram RCIU simétrica.

A insuficiência útero placentária pode promover alterações na parede intestinal e refletir a morbidade da RCIU sobre o trato gastrointestinal. Nós verificamos que a espessura intestinal foi menor nas camadas da mucosa, submucosa e serosa, outros estudos relatam diminuição do peso intestinal e um aumento do apoptose intestinal no mesmo modelo ⁽²²⁾.

No rim da RCIU pode ser encontrado diminuição da relação córtico medular atribuída à diminuição do número e função glomerular que reflete a situação adaptativa do regime de hipofluxo sanguíneo fetal. Nossos resultados corroboram estes achados com diminuição na espessura do córtex semelhante aos achados de outros autores ⁽²³⁾.

Nossos resultados não demonstram diminuição do peso placentário, resultado semelhante ao de Wigglesworth (1964) na obstrução completa da artéria uterina. Hayashi (1988), por outro lado, encontrou diminuição do peso placentário, porém a RCIU foi feita por meio da obstrução parcial da artéria uterina ⁽²⁰⁾. Já no modelo de RCIU nutricional, o peso placentário é sempre menor ⁽⁸⁾. A placenta na metade da gestação cresce mais rápido que o feto, uma deficiência nutricional neste período pode diminuir o peso fetal, diminuir ou manter o peso placentário, na tentativa de corrigir esta deficiência ⁽²⁴⁾. Possivelmente, o período da realização da ligadura da artéria uterina, no DG 18,5 do nosso modelo, não foi suficiente para que diminuísse o tamanho placentário.

A capacidade fetal de se adaptar a restrição de nutrientes regulariza todo metabolismo e essa nova situação pode ser responsável por algumas doenças na vida adulta ⁽²⁵⁾.

A glicose é o principal substrato para o crescimento e o metabolismo fetal. Durante o desenvolvimento fetal há maior produção de insulina e de seus receptores em órgãos como músculo, fígado, coração e tecido adiposo; a resposta da insulina e seus receptores são dependentes do metabolismo da glicose e faz com que o feto cresça ⁽²⁵⁾.

Na tentativa de manter a glicemia o feto com RCIU lança mão de mecanismos de diminuição de aminoácidos, proteínas, e dos depósitos de

glicogênio hepático ⁽²⁵⁾, esse achado vai de encontro aos nossos resultados experimentais que demonstrou diminuição na marcação dos estoques de glicogênio hepático nos fetos com RCIU.

Finalmente, concluímos que o modelo de RCIU por meio da ligadura unilateral da artéria uterina foi eficaz e que pode ser útil para avaliar a restrição de crescimento fetal de causa materna e as possíveis repercussões neonatais.

Referências

1. Bryan SN, Hindmarsh PC. Normal and Anormal Fetal Growth. *Horm Res.* 2006; 65(3):19-27.
2. Galbraith RS, Karchmar EJ, Piercy WN. The clinical prediction of intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 133(3):281-286.
3. Yu VY, Upadhya YA. Neonatal management of the growth-restricted infant. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004; (5):403-409.
4. Yanney M, Marlow N. Paediatric consequences of fetal growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med* 2004; 9(5):411-418.
5. Greenwood PL, Bell AW. Consequences of intra-uterine growth retardation for postnatal growth, metabolism and pathophysiology. *Reprod* 2003; 61:195-206.
6. Hales CN, Ozanne SE. For debate fetal and early postnatal growth restriction lead to diabetes the metabolic syndrome and renal failure. *Diabetologia* 2003; 46(7):1013-9.
7. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 2006; 49(2):270-83.
8. Schröder HJ. Models of fetal growth restriction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2003; 110:S29-S39.
9. Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. *Horm Res* 2007; 68(3):113-23
10. Hill DE. Experimental alteration of fetal growth in animals. *Mead Johnson Symposium Number 23.* Evansville, In, Med Johnson, 1983.

11. Harding JE, Charlton V. Experimental nutritional supplementation for intrauterine growth retardation In: Harrison, M.R.; Golbus, M.S.; Filly, R.A. The unborn patient. Philadelphia: Ed. WB Saunders Co, 1991, p598-613.
12. Wigglesworth JS. Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. J Path Biol 1964, 88, 1-13
13. Ribeiro SR, Pinto PE Jr, de Miranda AC, Bromberg SH, Lopasso FP, Irya K. Weight loss and morphometric study of intestinal mucosa in rats after massive intestinal resection: influence of a glutamine-enriched diet. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo 2004; 59(6):349-56.
14. França WM, Langone F, de la Hoz CL, Gonçalves A, Bittencourt D, Pereira LV, Sbragia L. Maturity of the myenteric plexus is decreased in the gastroschisis rat model. Fetal Diagn Ther 2008; 23(1):60-8.
15. Haugaard CT, Bauer MK. Rodent intrauterine growth restriction. Scand J Lab Anim Sci 2001; 28, 10-21.
16. Gerard JR, Ferre P, Gilbert M, Kervran A, Assan R, Marliiss EB. Fetal metabolic response to maternal fasting in the rat. Am J Physiol 1977; 232, 456-463.
17. Latorraca MQ, Reis MA, Carneiro EM, Mello MA, Velloso LA, Saad MJ, Baschero AC. Protein deficiency and nutritional recovery modulate insulin secretion and the early steps of insulin action in rats. J Nutr 1998; 128, 1643-1649.
18. Tapanainen PJ, Bang P, Wilson K, Unterman TG, Vreman HJ, Rosenfeld RG. Maternal hypoxia as a model for intrauterine growth retardation: effects

on insulin-like growth factors and their binding proteins. *Pediatr Res* 1994; 36(2):152-8.

19. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet* 1993; 341(8841):339-41.
20. Hayashi TT, Dorko ME. A rat model for the study of intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158 (5):1203-7.
21. Tanaka M, Natori M, Ishimoto H, Miyazaki T, Kobayashi T, Nozawa S. Experimental growth retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant Sprague-Dawley rats. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171 (5):1231-4.
22. Baserga M, Bertolotto C, MacLennan NK, Hsu JL, Pham T, Laksana GS, Lane RH. Uteroplacental insufficiency decreases small intestine growth and alters apoptotic homeostasis in term intrauterine growth retarded rats. *Early Hum Dev* 2004; 79(2):93-105.
23. Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA. Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16(10):2913-9.
24. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JA, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993; 341,938-941.
25. William WH. Recent observations on the regulation of fetal metabolism by glucose. *J Physiol* 2006; 572 (1): 17-24.

Tabela 1. Valores médios e os respectivos desvios padrão do peso corporal (PC), hepático (PH), intestinal (PI), renal (PR), placentário (PP) em miligramas e das relações corporais PH/PC, PI/PC, PR/PC e PP/PC dos fetos dos grupos RCIU, C-RCIU e CE.

	RCIU n=20	C-RCIU n=20	CE n=20	P
Peso Corporal	4368 ± 773	5297 ± 563	6790 ± 360	<0,001
Peso Hepático	299 ± 52	332 ± 49	420 ± 41,8	<0,001
Peso Intestinal	174 ± 41	217 ± 41	242 ± 36	<0,001
Peso Renal	56 ± 7	87 ± 43	78 ± 12,3	NS
Peso Placentário	551 ± 69	613 ± 120	627 ± 78	NS
PH/PC	0,061 ± 0,007	0, 057 ± 0,010	0,062 ± 0,007	NS
PI/PC	0,035 ± 0,006	0, 037 ± 0,025	0,036 ± 0,005	NS
PR/PC	0,006 ± 0,001	0.007 ± 0,004	0,006 ± 0,001	NS
PP/PC	0,114 ± 0,014	0, 114 ± 0,014	0,092 ± 0,015	NS

Tabela 2. Resultado das medidas dos diâmetros internos e externos da luz intestinal e da espessura das camadas intestinais dos fetos (μm) RCIU, C-RCIU e CE.

Camada	RCIU (n=20)	C-RCIU (n=20)	CE (n=20)	P
Diâmetro externo	977,25 $\pm$ 113,18	948,32 $\pm$ 89,8	1018,68 $\pm$ 139,0	<0,05 ^A
Diâmetro interno	831,93 $\pm$ 106,9	833,78 $\pm$ 83,8	883,66 $\pm$ 110,8	<0,05 ^A
Vilosidades	179,19 $\pm$ 75,1	187,34 $\pm$ 92,9	179,48 $\pm$ 92,9	NS
Serosa	3,06 $\pm$ 0,71	3,70 $\pm$ 1,17	4,60 $\pm$ 2,26	<0,05 ^{A,B}
Muscular Externa	7,55 $\pm$ 1,26	8,90 $\pm$ 1,86	9,57 $\pm$ 5,18	NS
Muscular Interna	14,90 $\pm$ 3,22	16,70 $\pm$ 6,45	18,13 $\pm$ 7,21	NS
Mucosa e Submucosa	33,28 $\pm$ 8,54	50,42 $\pm$ 17,26	50,37 $\pm$ 36,3	<0,05 ^{A,B}
Total	59,64 $\pm$ 7,79	82,72 $\pm$ 20,83	82,38 $\pm$ 50,19	<0,05 ^{A,B}

Valores expressos em média $\pm$ desvio-padrão.

Grupos de comparação: A = RCIU x CE B= RCIU x C-RCIU

Tabela 3. Resultados das médias do comprimento, largura e espessura da camada medular e córtex renal dos fetos RCIU, C-RCIU e CE.

	RCIU (n=36)	C-RCIU (n=36)	CE (n=36)	P
Comprimento	4296,56 ±1199,1	4586,7 ±1061,2	4507,78 ±1178,1	NS
Largura	2658,02 ±727,0	3014,1 ±689,1	3016,65 ±551,6	NS
Medula	1238,83 ±130,5	987,08 ±234,7	1021,28 ±245,4	NS
Córtex	640,66 ±130,5	1308,93 ±256,5	1481,70 ±257,8	<0,05 ^{A,B}

Valores expressos em média ± desvio-padrão.

Grupos de comparação: A = RCIU x CE B= RCIU x C-RCIU

Figura 1. Visualização dos cornos uterinos com maior número de fetos em corno direito. Local da ligadura da artéria uterina bem próxima ao início do corno uterino direito (seta)

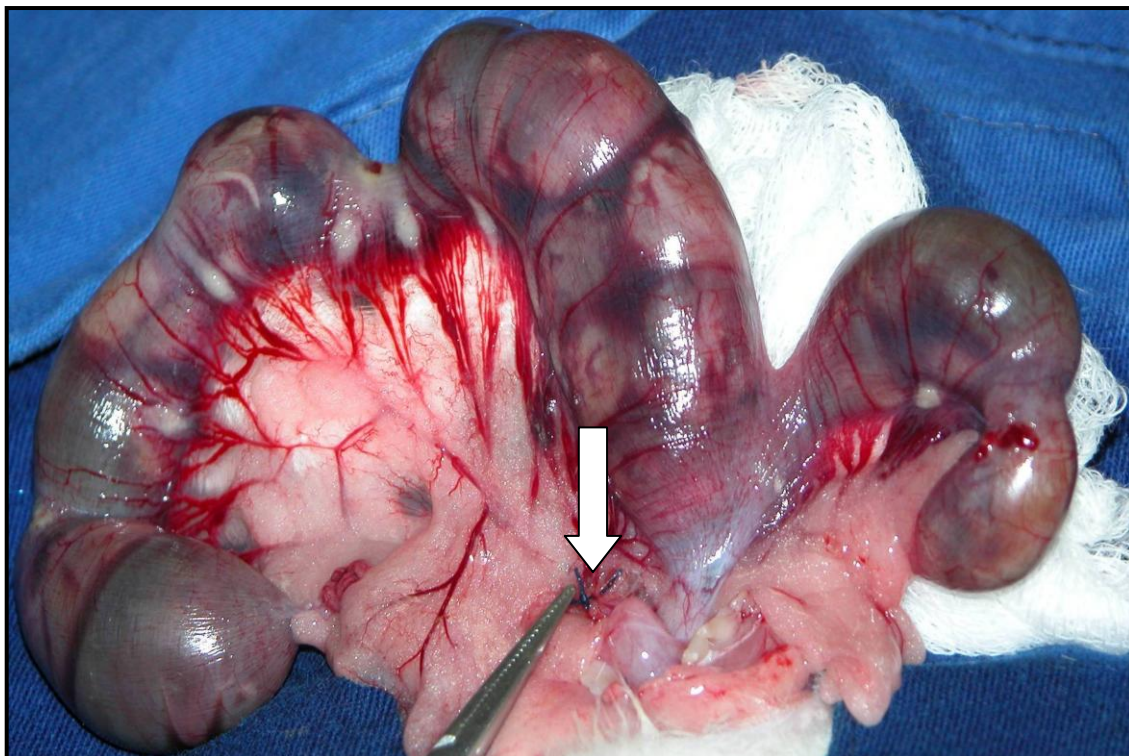


Figura 2. Esquema das medidas dos cortes histológicos transversais de intestino para a análise estatística. Em A, aumento de 20x para medida dos diâmetros, observando que no D-I e D-III é desde a serosa e em D-II e D-IV é desde a mucosa. Em B, aumento de 100x para medida dos vilos desde o topo até a junção da cripta. Em C, aumento de 200x para medida das camadas, sendo 1- Serosa, 2 – Muscular Longitudinal, 3 – Muscular Circular, 4 – Submucosa e mucosa e 5 – Espessura total da parede

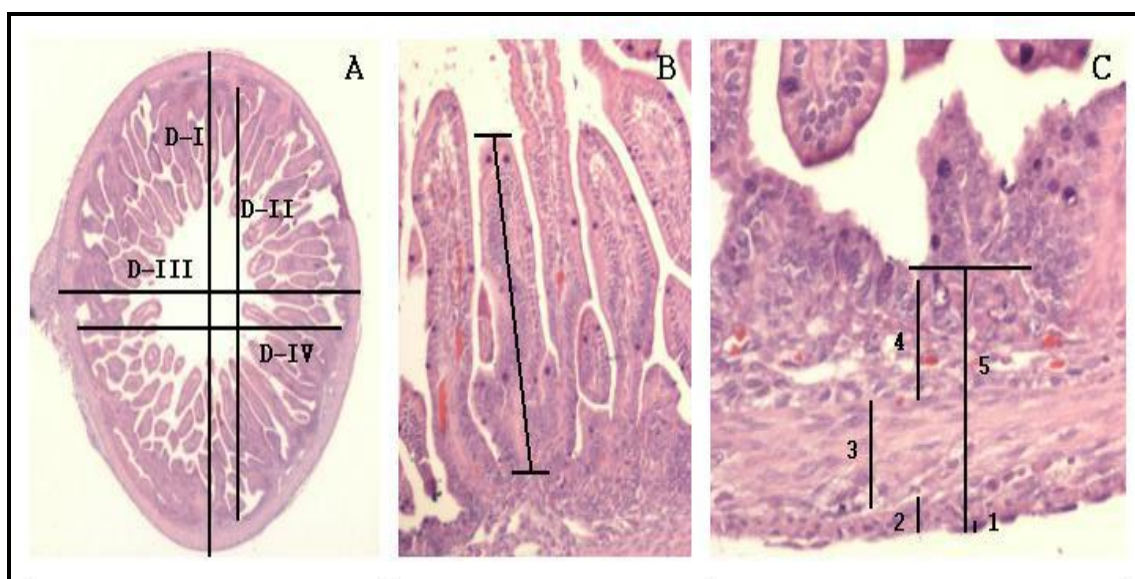


Figura 3. Esquema das medidas do rim (A) em corte histológicos longitudinais com aumento de 40x, sendo 1 – Medula, 2 – Córtex, 3 – Altura renal e 4 – Largura renal.

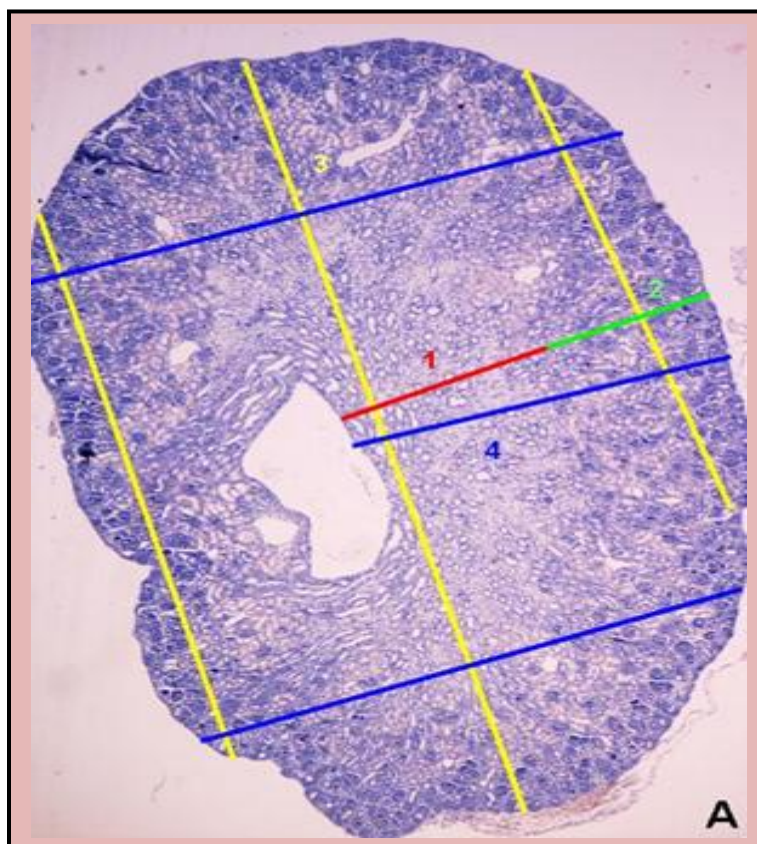
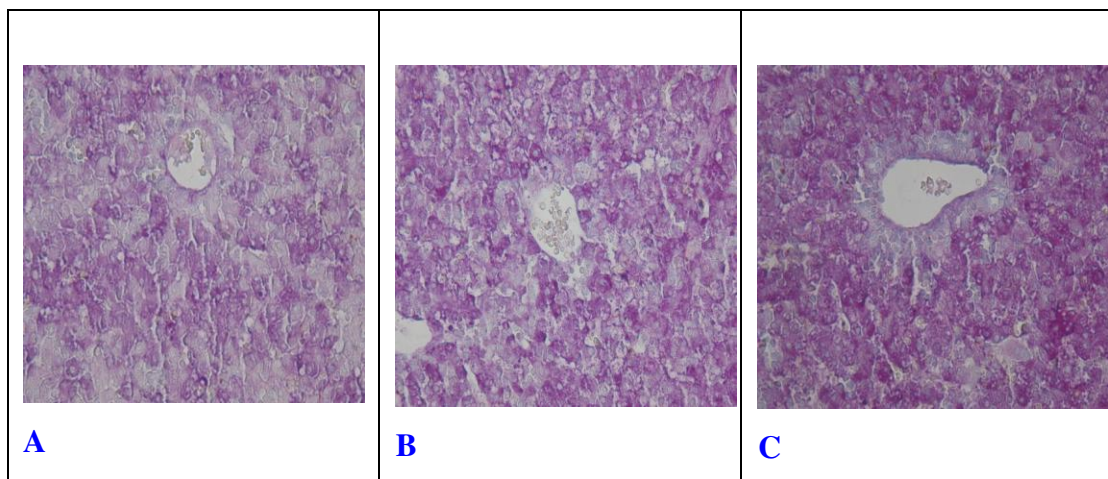


Figura 4. Fotos da macroscopia dos fetos com RCIU, Controle da RCIU (C-RCIU) e Controle Externo (CE).



Figura 5. Fígado de fetos corados com PAS, mostrando na sequência RCIU, C - RCIU e CE respectivamente em A, B e C. Nota-se na parte A da figura menor coloração dos depósitos de glicogênio na RCIU.



4.2. Artigo 2

Receptores de insulina e de crescimento em fetos de ratas submetidas à modelo experimental de restrição de crescimento intrauterino

Márcia Pereira Bueno¹, Dioze Guadagnini², Frances Lilian Lanhellas Gonçalves³, Ricardo Barini², Mario José Abdalla Saad ², Augusto Frederico Schmidt³, Lourenço Sbragia³

¹ Departamento de Tocoginecologia, ² Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas-SP e ³ Divisão de Cirurgia Pediátrica do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP – Ribeirão Preto, SP- Brasil.

Autor correspondente:

Prof. Dr. Lourenço Sbragia

Departamento de Cirurgia e Anatomia

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo – USP

Av. Bandeirantes 3900

Ribeirão Preto – SP – Brazil

14.048-900

Fone: 55-16-3602-2593

Fax: 55 - 16 – 3633-0836

Email : *sbragia@fmrp.usp.br*

Projeto auxílio de pesquisa No. 02/02563-8 da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Submetido - Fetal Diagnosis Therapy

Resumo

A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) é um processo capaz de limitar o desenvolvimento fetal adequado aumentando a morbidade e mortalidade perinatais e o risco de doenças na idade adulta. Avaliação dos receptores envolvidos no metabolismo fetal é uma forma de compreender melhor a fisiopatologia da RCIU e suas conseqüências no desenvolvimento de doenças na vida adulta. **OBJETIVO:** Avaliar os receptores IR β , IRS-1, IRS-2, IGF-IR β no modelo de RCIU fetal por ligadura da artéria uterina em ratos. **MATERIAL E MÉTODO:** Ratas prenhes Sprague-Dawley com 18,5 dias de gestação foram divididas em três grupos de fetos: Grupo I – RCIU, ligadura da artéria uterina no corno direito; Grupo II - C-RCIU, controle no corno esquerdo e Grupo III – CE, fetos de ratas não manipuladas. **RESULTADO:** Os dados morfométricos avaliados mostraram o peso corpóreo (PC) da RCIU, hepático (PH) e intestinal (PI) menor que C-RCIU e o CE ($p < 0,001$). O peso placentário (PP), renal (PR) e as relações PH/PC, PI/PC, PR/PC não se alteraram. O número de glomérulos foi menor na RCIU ($p < 0,001$) com aumento do volume glomerular ($p < 0,001$). A expressão hepática dos receptores IR- β , IRS-1 e IRS-2 foi menor nos fetos com RCIU. Houve menor expressão do IRS-2 no intestino e rins e maior expressão do IGF-IR β em todos os tecidos nos fetos com RCIU. **CONCLUSÃO:** O modelo descrito foi eficiente e causou RCIU fetal simétrica, com diminuição do número de glomérulos, alteração do metabolismo de glicose em todos os tecidos que poderiam justificar no futuro um maior risco de doenças metabólicas.

Palavras- chave: restrição de crescimento intra-uterino, modelo experimental,
receptores de insulina

Summary

INTRODUCTION: Intrauterine growth restriction (IUGR) compromises fetal development and increases risk of diseases in adulthood. Evolution of receptors involved in fetal metabolism may clarify this association. **OBJECTIVE:** Assess the expression of IR β , IRS-1, IRS-2, IGF-IR β in an IUGR rat model. **MATERIAL AND METHODS:** We studied three groups of Sprague-Dawley fetuses: IUGR – restricted by right uterine artery ligation at 18.5 days of gestation (term=22 days); C – left horn controls; EC – external controls from nonmanipulated pregnant rats. We analyzed body weight (BW), liver weight (LW), intestinal weight (IW), placental weight (PW), renal weight (RW), organ to body ratios, glomeruli count and volume. Expression of IR β , IRS-1, IRS-2, IGF-IR β in liver, intestine, kidneys was analyzed by Western Blotting. **RESULTS:** IUGR fetuses had lower BW, LW, IW than C and EC ($p<0.001$). PW, RW, organ to body ratios were similar. IUGR fetuses had less glomeruli ($p<0.001$) with increased volume ($p<0.001$). IUGR fetuses had lower expression of IR β , IRS-1 in liver and of IRS-2 in liver, intestine, kidneys. IGF-IR β was higher in liver, intestine, kidneys of IUGR fetuses. **DISCUSSION:** The model caused symmetric IUGR with decreased glomeruli count and disturbance of glucose metabolism, which may be implicated in increased risk of diseases in the adulthood.

Keywords: Intrauterine growth restriction, animal model, fetal development, insulin receptor

O crescimento fetal é um processo complexo e dinâmico que envolve fatores genéticos, nutricionais e hormonais. Fatores hormonais que atuam sobre o crescimento fetal envolvem o transporte de glicose e de aminoácidos e as vias que regulam o mecanismo de crescimento e de proliferação celulares. O equilíbrio entre os mecanismos moleculares e celulares destes fatores levam ao desenvolvimento fetal adequado ⁽¹⁾.

O desequilíbrio destes fatores pode levar a restrição de crescimento intrauterino (RCIU), importante causa de morbidade e mortalidade perinatal, e risco de desenvolver doenças na vida adulta especialmente o diabetes mellitus e as doenças cardiovasculares ⁽²⁾.

A diminuição de oxigênio e nutrientes no feto com RCIU causa redistribuição da circulação e diminuição do crescimento, por mecanismos não bem esclarecidos, mas envolvem o sistema de insulina e seus fatores de crescimento.

A insulina atua por meio da ativação de seus receptores de membrana. Com a ligação ao receptor de membrana este se autofosforila catalisando a fosforilação de proteínas intracelulares como as proteínas IRS (*insulin-receptor substrate*), Shc (*Src homology collagen*) e Cbl (*Casitas B-lineage lymphoma*). Essas vias intracelulares regulam o transporte de glicose, a síntese de

glicogênio, lipídeos e proteínas, coordenando e integrando o metabolismo intermediário celular ⁽³⁾.

O sistema IGF (*insulin-like growth factors*) é importante na regulação do crescimento e proliferação celulares, incluem IGF-I e IGF-II, os receptores de IGF tipo 1 e 2 (IGF-IR e IGF-IIR), as proteínas ligantes IGFBP 1 a 6 (*binding proteins IGF*) e as proteínas intracelulares sinalizadoras associadas ao IGF-IR: a) membros da família do IRS (*insulin-receptor substrate*), b) AKT (*serine/threonine kinase*), c) TOR (*target of rapamicina*) e d) S6K (*S6 kinase*) ⁽⁴⁾. Após a ligação da IGF-I ou da IGF-II ao IGF-IR ocorre uma atividade catalítica com domínio tirosina-quinase que desencadeia a fosforilação de substratos intracelulares ativando o crescimento e a proliferação celulares ^(5,6). Para a melhor compreensão do processo de alterações metabólicas que envolvem o crescimento fetal, procuramos avaliar os receptores de insulina (IR) e de crescimento (IGF) no modelo experimental de RCIU em fetos de rato.

Material e Método

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-UNICAMP) N° 1644-1.

Fêmeas de ratos Sprague-Dawley com peso ao redor de 250g foram submetidas ao acasalamento. O casal foi mantido em conjunto durante uma noite. No dia seguinte ao encontro, a região genital da fêmea foi examinada

para verificação de mancha vaginal de esperma (*vaginal smear*). A presença da mancha vaginal configurou o acasalamento e foi considerado dia zero de gravidez, o tempo de gestação normal de ratas até o termo é de 22 dias.

Três grupos de 20 fetos cada um foram compostos e denominados: Grupo I – Controle Externo (CE) - fetos de ratas não submetidas a nenhuma intervenção, Grupo II – Controle da RCIU(C) - fetos de ratas grávidas localizados no corno esquerdo sem ligadura da artéria uterina e Grupo III - RCIU - fetos de ratas grávidas localizados no corno direito e submetidos à ligadura da artéria uterina com 18,5 dias.

Utilizou-se o modelo de RCIU pela ligadura da artéria uterina de acordo com Wigglesworth (1964) ⁽⁷⁾. Após aclimação de 24 horas no laboratório, ratas Sprague-Dawley grávidas com 18,5 dias de gestação (termo=22 dias) foram submetidas à anestesia geral com injeção intramuscular de Ketamina base- 50mg/ml (Ketamina[®] - Pfizer do Brasil) associada com Xilazina 10mg/ml (Rompum[®] - Bayer do Brasil) na dose de 0,6 ml por animal via intramuscular aplicado na musculatura lateral da coxa. Esta composição anestésica (175mg/kg de Ketamina/ 2,5mg/kg de Xilazina) mantém o animal sob anestesia profunda durante um período de três horas e o pós-operatório indolor durante 6 a 12 horas. O abdome foi submetido à raspagem dos pêlos com tosquiadeira elétrica com cuidado para não lesar os mamilos. Após assepsia e colocação de campos estéreis, o animal foi submetido à laparotomia mediana em dois planos

(pele e aponeurose/peritônio). A região uterina foi exposta com visualização dos cornos uterinos e sua circulação. A artéria uterina esquerda foi dissecada e ligada bem próxima ao corno uterino por ligadura com fio de algodão 3.0 (Figura 1).

A seguir o abdome da rata foi fechado em dois planos, com utilização de fio mononylon 4-0, sutura contínua. Após o término do procedimento, as ratas foram recuperadas com oxigênio a 100% inalado a 1 litro por minuto em máscara adaptada, até estarem completamente acordadas e movimentando-se sem problemas. O período pós-operatório ocorreu em gaiolas de acrílico, em baias individuais, com água e ração oferecidas *ad libitum*.

No dia 21,5 de gestação, as ratas dos grupos I, II e III foram novamente anestesiadas, mesma dose previamente descrita, e submetidas à operação cesariana, por laparotomia mediana. Os fetos foram removidos do útero e a rata foi sacrificada por exsanguinação sob anestesia. Após remoção uterina os fetos foram pesados em balança de precisão modelo OHAUS 360 (Denver Instruments, Denver, CO) e o peso corporal (PC) foram aferidos em miligramas (mg). A seguir os fetos foram anestesiados e submetidos à punção occipital e o abdome fetal foi aberto por incisão mediana e dissecado sob foco de luz, com auxílio de microscopia óptica, expondo as alças. As alças intestinais foram removidas desde o piloro até a região do reto superior, na reflexão peritoneal. O intestino, o fígado, os rins e a placenta de todos os grupos foram removidos, pesados (mg) e os rins foram fixados em solução de paraformaldeído 4% fresco para avaliação histométrica dos glomérulos. Os órgãos mensurados foram

denominados respectivamente peso intestinal (PI), hepático (PH), renal (PR) e placentário (PP). As relações corporais PH/PC, PI/PC, PR/PC, PP/PC foram criadas com objetivo de verificar a proporção relativa entre os órgãos.

Avaliação Fotográfica e Histológica Renal

Os cortes histológicos renais foram fotografados utilizando o fotomicroscópio Nikon Eclipse E800, com ampliação de 200 vezes para a contagem e medida da área glomerular. Os cortes histológicos foram fotografados utilizando o fotomicroscópio Nikon Eclipse E800, com As medidas, em μm , foram realizadas em rins de cinco fetos, sendo observados três campos de cada corte (total de 3 cortes por órgão). A microtomia foi feita em série, porém a análise foi realizada a cada sete cortes. As imagens foram digitalizadas por meio do programa Image Pro Plus® e realizadas em μm , em cinco cortes seqüenciais, de cada variável para cada feto. Para a análise do volume médio glomerular, foi utilizado o método descrito por Pascale *apud* Weibel ⁽⁸⁾ que envolve a determinação da área do perfil médio glomerular e o cálculo do volume médio glomerular através da fórmula:

$$V_G = \text{Area}^{1,5} \times 1,38/1,01$$

Onde 1,38 é β , o coeficiente da forma de uma esfera, e 1,01 é o coeficiente de distribuição do tamanho assumindo um coeficiente de variação de 10% (Figura 2).

Análise Protéica por *Immunoblotting*

O fígado, rins e intestino foram retirados, e imediatamente homogeneizados em tampão de extração contendo (mm): Tris 100 (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100, fluoreto de sódio 100, EDTA 10, 10 vanadato de sódio e fluoreto phenylmethylsulfonyl (PMSF) 2, e 0,1 ml aprotinina mg⁻¹ e 1% Triton-X100 a 4°C com Polytron cwith PTA 20S generator (Brinkmann Instruments modelo PT 10/35) operado em velocidade máxima de 30 s. Os extratos foram centrifugados a 15 000 R.P.M. (9000 g) e 4°C em Beckman Ti 70,1 (Palo Alto, CA, E.U.A.) por 45 minutos para remover o material insolúvel, e os sobrenadantes destes tecidos foram utilizados para a quantificação da proteína usando o método de Bradford ⁽⁹⁾. As proteínas foram desnaturadas pela fervura em Laemmli ⁽¹⁰⁾ amostras contendo 100 milímetros TDT, executado em SDS-PAGE, transferido para membranas de nitrocelulose, que foram bloqueados, sondados e desenvolvidos como descrito anteriormente ⁽¹¹⁾. A subunidade β do IR (IR β), IRS-1, IRS-2 e IGF-IR foram imuno precipitadas dos fetos RCIU, C-RCIU e CE. Os anticorpos foram utilizados para realização de *immunoblotting*, anti - IR, anti-IRS-1, anti-IRS-2, anti-IGF-IR (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, E.U.A.). Borrões foram expostos a preflashed Kodak XAR film com Cronex Lightning Plus telas de intensificação de -80C durante 12-48 h. Intensidades de bandas foram quantificadas por densitometria óptica (software Scion Image, ScionCorp, Frederick, MD, E.U.A.) das radiografias auto desenvolvidos.

A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido do teste de Tukey. Foram considerados valores estatisticamente significativos quando o $p < 0.05$.

Resultados

Resultados Morfométricos

A ligadura da artéria uterina foi realizada em 10 ratas e quatro foram utilizadas como controle externo, num total de 14 ratas grávidas. O peso médio das ratas submetidas à cirurgia foi de 324 g (± 67) e peso final no 21,5 dias de gestação de 340g (± 83) com aumento de peso de 16 g (± 65). As quatro ratas do CE com média de peso inicial de 320g (± 65) tiveram com 21,5 dias um aumento de peso de 60g (± 20). Não houve diferença do ganho de peso ponderal entre as ratas operadas e o grupo CE ($p > 0.05$).

O total de fetos do corno direito; submetidos ao regime de hipofluxo cirúrgico; foi de 55 e destes 20 sobreviveram. Dos fetos mortos 30 foram os que estavam mais próximo da ligadura arterial, ou seja, principalmente o primeiro e o segundo fetos seqüenciais à ligadura.

O peso corporal, o peso hepático e o intestinal dos fetos RCIU foram significativamente menores que os seus respectivos C e CE ($p < 0,001$). O peso renal, o peso placentário e as relações entre o peso corporal, hepático, intestinal, renal e placentário não mostraram diferença estatística (Tabela 1).

Os fetos com RCIU tiveram uma diminuição proporcional do seu tamanho (Figura 3).

O número de glomérulos nos fetos com RCIU foi menor que nos grupos C e CE ($p<0,01$), no entanto o volume glomerular dos fetos com RCIU é maior que o C e CE ($p<0,01$) (Figura 4 e 5).

Efeitos da RCIU na expressão do IR β , IGF-IR β , IRS-1 e IRS-2 nos tecidos dos ratos

A expressão hepática dos receptores IR - β , IRS-1 foram menores no grupo de fetos submetidos à RCIU quando comparados aos grupos de CE e C respectivamente. Os receptores IRS-2 tiveram menor expressão quando comparado ao grupo de CE e maior expressão comparados ao grupo C. O receptor de IGF-IR β tem maior expressão nos grupos de RCIU comparado ao CE e C (Figura 6).

No intestino os receptores IR β , IRS-1 e IGF- IR β , nos fetos submetidos à RCIU houve maior expressão que os seus respectivos controles e o IRS-2 obteve menor expressão que o seu controle (Figura 7).

Nos rins os receptores IR β , IRS-1 e IGF- IR β nos fetos submetidos à RCIU houve maior expressão que os seus respectivos controles. O receptor de

IRS-2 teve a menor expressão que os C e CE com expressões muito semelhantes (Figura 8).

Discussão

O aparecimento de doenças crônicas ao longo da vida está relacionado epidemiologicamente com fatores genéticos e ambientais no período fetal e neonatal ^(12,13).

Vários modelos experimentais de RCIU vêm sendo propostos para facilitar a compreensão dos efeitos da restrição nutricional fetal como em ovelhas, coelhos, ratos e camundongos ⁽¹⁴⁾. O modelo utilizando rato é o mais comum e possui as vantagens de ter curto período de gestação, baixo custo e fácil manipulação; além de alta semelhança genética, bioquímica e fisiológica com a biologia humana. A RCIU nestes modelos pode ser feita por meio da embolização ou ligadura da artéria uterina, ou causando desnutrição crônica e/ou hipertensão materna ⁽¹⁵⁾.

A ligadura unilateral da artéria uterina é um modelo pouco utilizado que possui a vantagem de causar RCIU e ter os fetos controle na mesma gestação. A técnica da ligadura unilateral completa da artéria uterina resultou na diminuição proporcional dos órgãos com maior mortalidade fetal, principalmente dos dois primeiros fetos mais próximos à ligadura da artéria, resultados semelhantes ao descrito por Wigglesworth ⁽⁷⁾.

Técnicas de ligadura com oclusão parcial da artéria uterina ⁽¹⁶⁾ e oclusão total da artéria uterina por 60 minutos ⁽¹⁷⁾ demonstraram menor número de mortes fetais, com fetos em diferentes estágios de restrição e fetos sem alteração de peso. Em nosso estudo obtivemos uma diminuição do peso corpóreo, hepático e intestinal em relação ao grupo controle e controle externo, o mesmo resultado é avaliado por autores que utilizam a ligadura bilateral total da artéria uterina que resulta em uma RCIU mais homogênea. ⁽¹⁸⁾

A nefrogênese fetal do rato só termina após o nascimento em torno do oitavo dia pós-natal ⁽¹⁹⁾. Tanto a RCIU quanto a desnutrição após nascimento podem diminuir o número de glomérulos e levar a um aumento compensatório do volume dos mesmos, esses resultados foram também observados por nós ^(20,21).

A diminuição de nutrição intraútero reduz o crescimento fetal (RCIU) e poderá resultar em alterações endócrinas e metabólicas permanentes na vida adulta como hipertensão arterial, diabetes, alteração da resistência a insulina, alteração plasmática de lipídeos, redução de densidade óssea ⁽¹²⁾. Baker defende a hipótese que o genótipo fetal pode produzir mais que um fenótipo e que é dependente das condições de pré e pós natais do indivíduo ⁽²²⁾. Neste sentido, um dos mecanismos que poderia explicar a relação entre RCIU e algumas doenças na idade adulta podem envolver os receptores de insulina IR

e receptores dos fatores de crescimento insulina *like* (IGF), ambos relacionados ao desenvolvimento e crescimento fetal.

O receptor de insulina pertence à família dos receptores de membrana que possuem capacidade tirosina quinase intrínseca. Ele é composto de duas subunidades alfa (IR- α) extracelulares e duas subunidades betas (IR- β) transmembrana, ligadas por ponte dissulfeto. A insulina liga-se à subunidade alfa do receptor, provocando uma mudança conformacional na subunidade beta, que leva a sua autofosforilação em tirosina e ativa sua capacidade tirosina - quinase ⁽⁴⁾.

Em nosso estudo houve um aumento da expressão do IR- β em relação ao grupo controle, que poderia estar relacionado ao aumento de insulina em ratos submetidos à RCIU. Embora não tenhamos dosado a insulina no período neonatal dos fetos com RCIU, já foi descrito que estes ratos neonatos podem desenvolver hiperglicemia, hipoinsulinemia com intolerância a glicose, fato que justificaria a hipótese de que ratos adultos submetidos à RCIU fetal desenvolvem diabetes mellitus tipo II, similar ao que ocorre em humanos ^(23,24).

Uma vez ativado, o receptor de insulina é capaz de fosforilar diversos substratos intracelulares que recrutam e ativam diversos efetores intracelulares obtendo como resultado funções celulares diversas. Entre os substratos encontram-se os receptores de insulina IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4.

Os IR 1 2 e 4 são expressos tanto em humanos como roedores; o IRS-3 é expresso somente em roedores ⁽²⁵⁾. O IRS-1 tem importante papel no crescimento somático, camundongos com supressão do gene IRS-1 tem redução de 40% do crescimento fetal e neonatal ^(26,27). O IRS-1 está diminuído em fetos de menor crescimento fetal ⁽²⁸⁾. Nossos resultados mostraram diminuição da expressão no fígado de fetos com RCIU.

O IRS-2 participa principalmente no metabolismo regulador de glicose, camundongos com supressão do IRS-2 têm diminuição do fenótipo para o tamanho corporal apenas em 10% só que uma resistência a insulina com progressão ao diabetes o que não ocorre com a supressão do gene IRS-1 ⁽²⁹⁾. O IRS-2 é o maior responsável pelo crescimento das células B pancreáticas e pela secreção de insulina, ratos sem este receptor desenvolvem alterações semelhantes ao diabetes tipo II de humanos ⁽³⁰⁾. Nossos resultados foram semelhantes quanto à diminuição da expressão de IRS-2 em fígado, intestino e rins em outros modelos de RCIU ⁽²⁴⁾.

O IGF-I (*insulin-like growth factor I*) estimula o crescimento e inibe a morte celular em uma grande variedade de células e tecidos. IGF-IR é um receptor tirosina-quinase com duas subunidades alfa extracelulares e duas subunidades beta transmembrana, desempenha papel importante na proliferação celular, liga-se ao IGF-I ativando *fosfatidilinositol 3-quinase* (PI3K) e a seguir a *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) em cascata. Esta ativação em cascata de um lado promove a proliferação celular, de outro; o bloqueia⁽³¹⁾.

O receptor de IGF e insulina são homólogos, tem similaridade de suas subunidades e tem papel importante na regulação do crescimento fetal. Estudos de Efstratiadis *et al.* demonstraram IGF ligantes e IGF receptores são importantes moléculas na regulação do crescimento fetal ^(32,33). Camundongos com ausência de IGF-I, IGF-II e IGF-IR apresentam restrição de crescimento cuja ação do IGF-I é por meio do IGF-IR e o IGF-II por meio do receptor de insulina ⁽³⁴⁾.

Animais com dieta protéica restritiva prolongada apresentam diminuição do IGF-I no plasma e no fígado ⁽³⁵⁾. O mesmo é observado em fetos de ratos submetidos à RCIU no modelo nutricional ou cirúrgico ^(36,37). Nós encontramos aumento da expressão do receptor de IGF-IR β no fígado, intestino e rins dos fetos de ratos com RCIU semelhante aos resultados de Yang *et al.* ⁽³⁸⁾.

A ausência gênica de IGF-I em humanos resulta em grave RCIU e nos fetos portadores de RCIU existe diminuição de IGF-I e do IGF-IR placentário. ⁽³⁹⁾.

A ação da insulina através da ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) está principalmente envolvida no controle do crescimento e da mitogênese, enquanto a ativação da PI-3 quinase pelo IRS-1 está preferencialmente ligada às ações metabólicas da insulina.

Recentemente, demonstrou-se que a regulação da sinalização de insulina pode estar associada ao balanço entre a modulação positiva que acontece pela fosforilação em tirosina do IRS-1 e a modulação negativa que acontece pela fosforilação em serina do mesmo IRS-1 ⁽³⁹⁾.

Está bem estabelecido que insulina e IGF-1 induzem a fosforilação em tirosina do IRS-1, enquanto agentes que sabidamente levam à resistência à insulina, tais como TNF- α , ácidos graxos livres, estresse celular e hiperinsulinêmico, induzem a ativação de quinases de serina/treonina que fosforilam o IRS-1 em serina, inibindo sua função ⁽⁴⁰⁾.

A fosforilação inibitória do IRS-1 em serina pode ser um mecanismo molecular unificador dos diversos fatores desencadeantes de resistência à insulina. A transformação em serina determina uma menor eficácia nas vias finais tróficas e metabólicas e conseqüentemente alterações nos gatilhos de crescimento, replicação e desenvolvimento de organelas celulares. O resultado desta menor eficácia acomete os sistemas de crescimento celular fetal e resultam na RCIU ⁽⁴⁰⁾.

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que existe uma regulação entre os tecidos sensíveis (fígado, rins e intestino) e as proteínas sinalizadoras de insulina e IGF-1. A maior expressão das proteínas dos receptores para estes fatores de crescimento, pode revelar um aumento da regulação relacionados com a redução dos níveis de insulina e IGF -1. No entanto, é importante ressaltar que o IRS-1 e IRS-2, que são os principais

substratos destes receptores são reduzidos especialmente no fígado e rins de fetos com RCIU, sugerindo mecanismos moleculares que podem contribuir para uma redução no crescimento destes tecidos em fetos RCIU. Estes resultados mostram que este é um modelo viável e pode contribuir ainda mais para a compreensão da síndrome metabólica em adultos.

Referências Bibliográficas

1. Gicquel C, Le Bouc Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res.* 2006;65 (3):28-33.
2. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006; 49 (2):270-283.
3. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000; 106:165-9.
4. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor - a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.*1998; 9:89 -109.
5. Holt RI. Fetal programming of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13 (9):392-7.
6. Randhawa R, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Mol Genet Metab.* 2005; 86 (1-2):84-90.
7. Wigglesworth JS. Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. *J Path Biol.*1964; 88:1-13.
8. Pascale H. Lane, Michael W. Steffes, and S. Michael Mauer. Estimation of glomerular volume: A comparison of four methods. *Kidney International.* 1992; 41: 1085-1089

9. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248–254.
10. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
11. Ropelle ER, Pauli JR, Prada PO, Souza CT, Picardi PK, Faria MC et al. Reversal of diet-induced insulin resistance with a single bout of exercise in the rat: the role of PTP1B and IRS-1 serine phosphorylation. *J Physiol*. 2006; 577(3) : 997–1007
12. Silveira P P, Portell A K, Goldani M Z, Barbieri M A. Developmental origins of health and disease. *J Pediatr* 200 7; 83 (6):494-504.
13. Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol*. 2002; 31(6):1235-9.
14. Schröder HJ. Models of fetal growth restriction. *Eur J Obst & Gyn Rep Biol*. 2003; (110) S29-39.
15. Vuguim PM Animal models for small for gestation age and fetal programming of adult disease. *Horm Res*. 2007; 68 (3)113-23.
16. Hayashi TT, Dorko ME. A rat model for the study of intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol*. 1988; 158 (5):1203-7.
17. Tanaka M, Natori M, Ishimoto H, Miyazaki T, Kobayashi T, Nozawa S. Experimental growth retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant Sprague-Dawley rats. *Am J Obstet Gynecol*. 1994; 171(5):1231-4.

18. Baserga M, Bertolotto C, MacLennan NK, Hsu JL, Pham T, Laksana GS, Lane RH. Uteroplacental insufficiency decreases small intestine growth and alters apoptotic homeostasis in term intrauterine growth retarded rats. *Early Hum Dev.* 2004; 79 (2):93-105.
19. Nyengaard JR. The quantitative development of glomerular capillaries in rats with special reference to unbiased stereological estimates of their number and sizes. *Microvasc Res* 1993; 45: 243–261.
20. Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal H. Glomerular number and function are influenced by spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol.* 2005; 16 (10):2913-9.
21. Schreuder MF, Nyengaard JR, Remmers F, van Wijk JA, Delemarre-van de Waal HA Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 291 (5):F1104-7.
22. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JA, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet.* 1993; 341:938 - 941.
23. Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes.* 2001; 50 (10):2279-86.
24. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest.* 1999; 104 (6):787-4.
25. Lee YH, White MF Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Arch Pharm Res.* 2004; 27 (4):361-70.

26. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*.1994; 372:186-90.
27. Araújo EP, De Souza CT, Gasparetti AL, Ueno M, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA Short-term in vivo inhibition of insulin receptor substrate-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia, and increased adiposity. *Endocrinology*. 2005; 146 (3):1428-37.
28. Liao Y, Li HQ, Deng B, Qu P. Study on the mechanism of insulin resistance in rats born with intrauterine growth retardation *Beijing Da Xue Xue Bao*. 2008; 40 (6):590-4.
29. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391 :900-4.
30. Burks DJ, White MF. IRS proteins and beta-cell function. *Diabetes*. 2001; 50 Suppl 1:S140-5.
31. Carvalho-Filho MA, Cavalheira JBC, Velloso LA, Saad MJA. Insulin and Angiotensin II Signaling Pathways Cross-Talk: Implications with the Association Between Diabetes Mellitus, Arterial Hypertension and Cardiovascular Disease. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2007; 51/2:195 - 203.
32. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 1993; 75(1):73-82.
33. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*. 1990; 345(6270):78-80.

34. Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, Efstratiadis A. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Dev Biol.* 1996; 177(2):517-36.
35. Maiter D, Maes M, Underwood LE, Fliesen T, Gerard G, Ketelslegers JM. Early changes in serum concentrations of somatomedin-C induced by dietary protein deprivation in rats: contributions of growth hormone receptor and post-receptor defects. *J Endocrinol.* 1988; 118(1):113-20.
36. Muaku SM, Thissen JP, Gerard G, Ketelslegers JM, Maiter D. Postnatal catch-up growth induced by growth hormone and insulin-like growth factor-I in rats with intrauterine growth retardation caused by maternal protein malnutrition. *Pediatr Res.* 1997; 42(3):370-7.
37. Yang F, Yao Y, Li W, Chen Y, Tang J, Zeng Y, Bai B. Studies on insulin-like growth factor I receptor in fetal rats with intrauterine growth retardation. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2001; 32(3):402-4.
38. Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med.* 1996; 335(18):1363-7.
39. Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem.* 1996; 271:22100 - 4.
40. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Levefre M, York D, Quon MJ, Ye J. Serine insulin signaling. *J Mol Endocrinol.* 1996; 17(3):174-184.

Tabela 1. Valores médios e os respectivos desvios padrão do peso corporal em mg (PC), hepático (PH), intestinal (PI), renal (PR), placentário (PP) e das relações corporais PH/PC, PI/PC, PR/PC e PP/PC dos fetos dos grupos CE, C-RCIU e RCIU.

	CE	C	RCIU	
	n=20	n=20	n=20	P
Peso Corporal	6790 ($\pm$ 360)	5297 ($\pm$ 563)	4368 ($\pm$ 773)	<0.001
Peso Hepático	420 ($\pm$ 41,8)	332 ($\pm$ 49)	299 ($\pm$ 52)	<0.001
Peso Intestinal	242 ($\pm$ 36)	217 ($\pm$ 41)	174 ($\pm$ 41)	<0.001
Peso Renal	78,6 (13,6)	87 ($\pm$ 43)	56 ($\pm$ 7)	NS
Peso Placentário	627 ($\pm$ 78)	613 ($\pm$ 120)	551 ($\pm$ 69)	NS
PH/PC	0,062 ($\pm$ 0,007)	0,057 ($\pm$ 0,001)	0,061 ($\pm$ 0,007)	NS
PI/PC	0,036 ($\pm$ 0,005)	0,037 ($\pm$ 0,025)	0,035 ($\pm$ 0,006)	NS
PR/PC	0,006 ($\pm$ 0,001)	0,007 ($\pm$ 0,004)	0,006 ($\pm$ 0,001)	NS
PP/PC	0,092 ($\pm$ 0,015)	0,114 ($\pm$ 0,014)	0,114 ($\pm$ 0,014)	NS

Figura 1. Visualização dos cornos uterinos com maior número de fetos em corno direito. Local da ligadura da artéria uterina bem próxima ao início do corno uterino direito (seta)

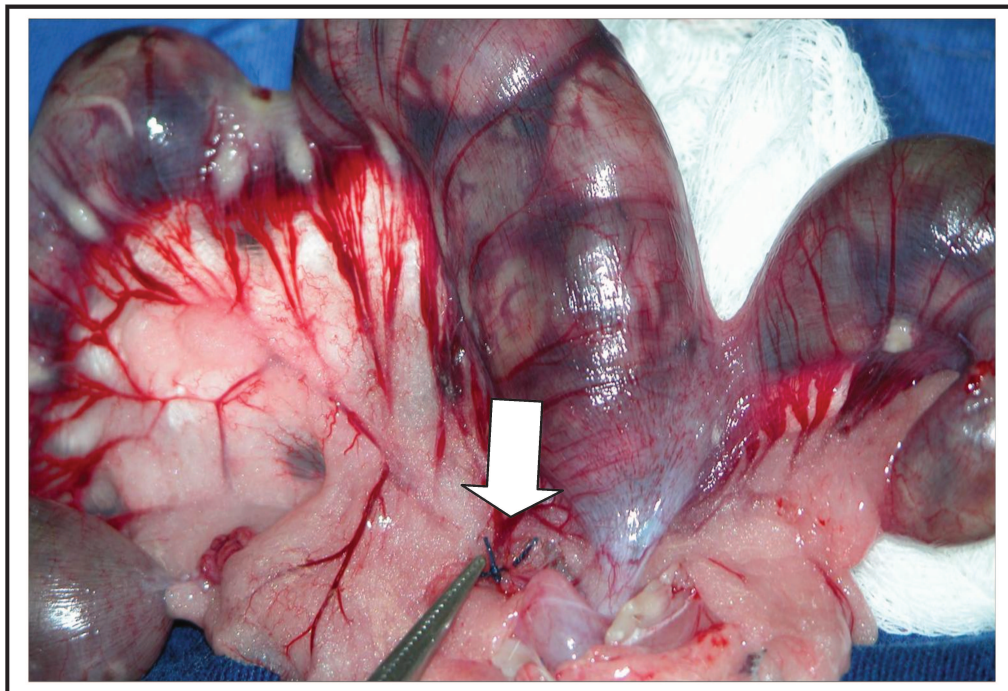


Figura 2. Esquema das medidas em cortes histológicos longitudinais corados por H/E de rim para a análise morfométrica Em A aumento de 200x para contagem de glomérulos por rim. Em B aumento de 400x para melhor visualização dos glomérulos e medida do diâmetro para cálculo do volume renal.

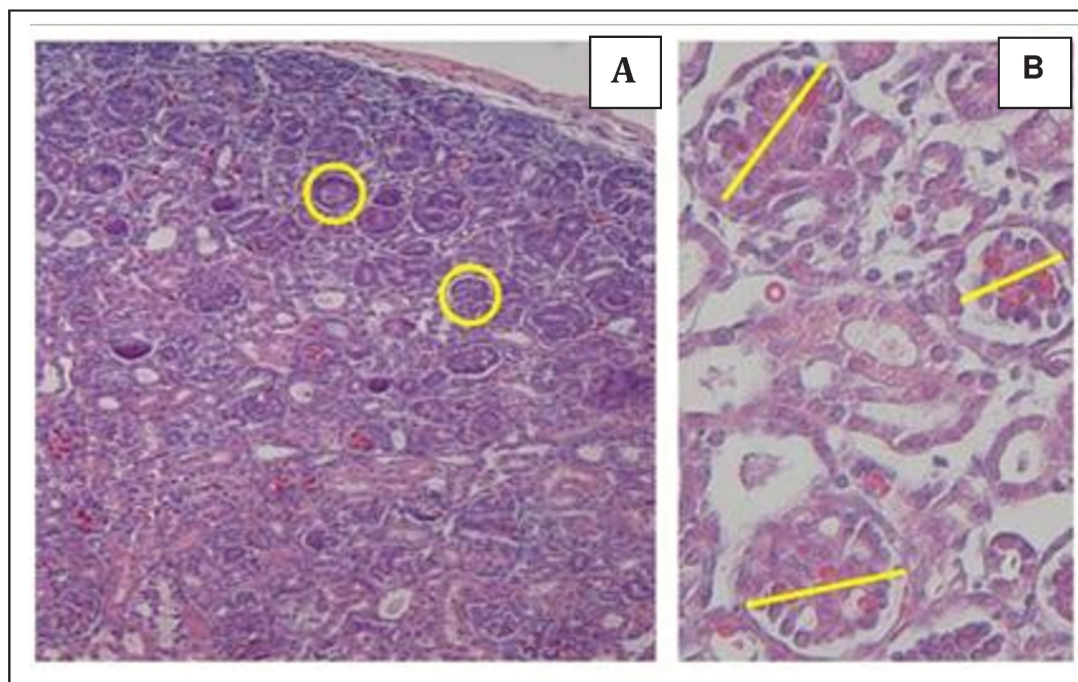


Figura 3. Fetos com RCIU, Controle da RCIU (C-RCIU) e Controle Externo (CE).



Figura 4. Representação da média da contagem do número de glomérulos em grupo de fetos (n=5) do Controle Externo (CE), RCIU Controle - RCIU (C) aos 21,5 dias de gestação.

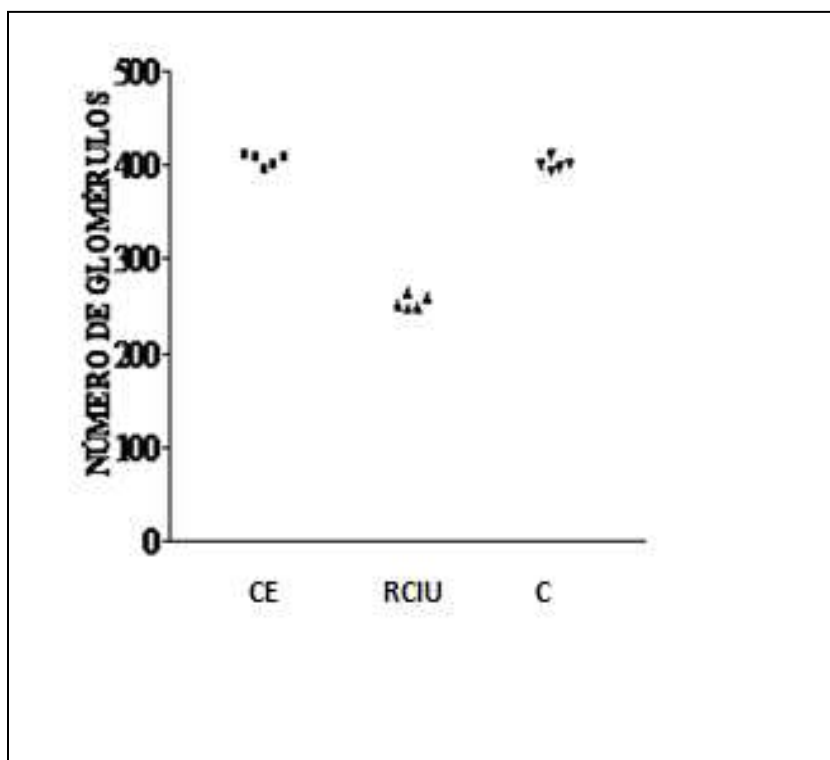


Figura 5. Representação do volume glomerular ($10^6 \mu\text{m}^3$) em grupo de fetos (n=5) Controle Externo (CE), Controle - RCIU (C) e RCIU aos 21,5 dias de gestação.

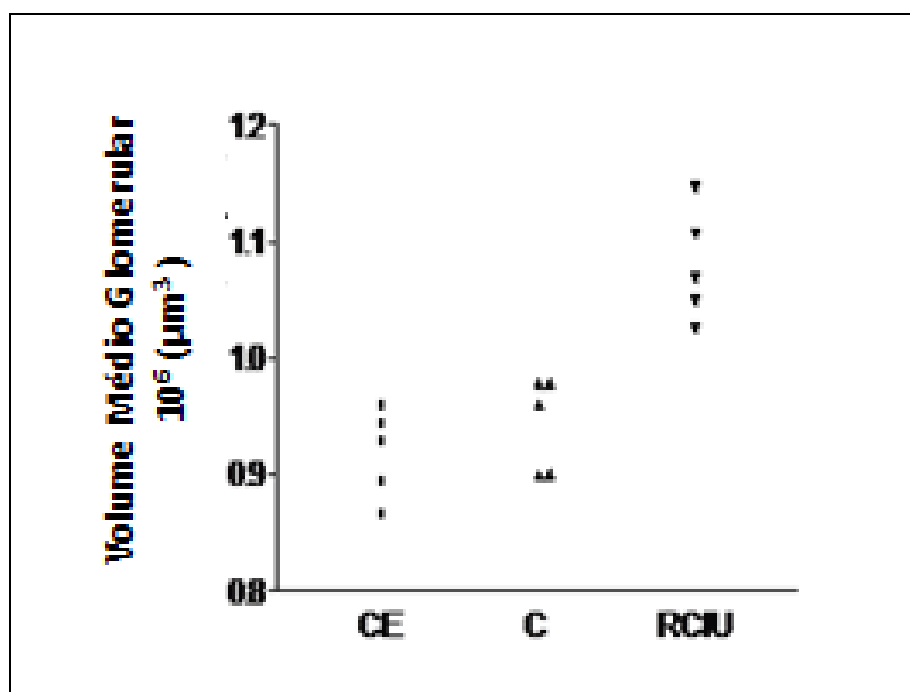


Figura 6. Expressão hepática de IR β , IRS-1, IRS-2 e IGF-IR β nos grupos Controle Externo (CE), Controle - RCIU (C) e RCIU aos 21,5 dias de gestação.

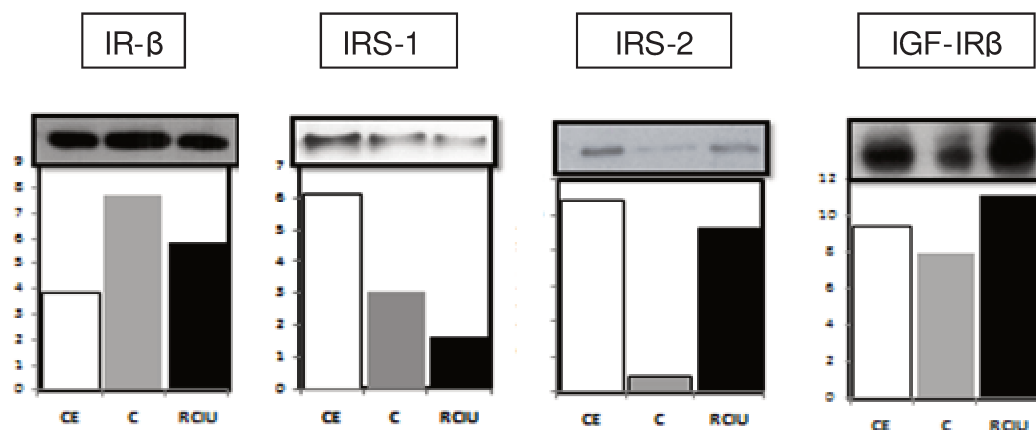


Figura 7. Expressão intestinal de IR β , IRS-1, IRS-2 e IGF-IR β nos grupos Controle Externo (CE), Controle - RCIU (C) e RCIU aos 21,5 dias de gestação.

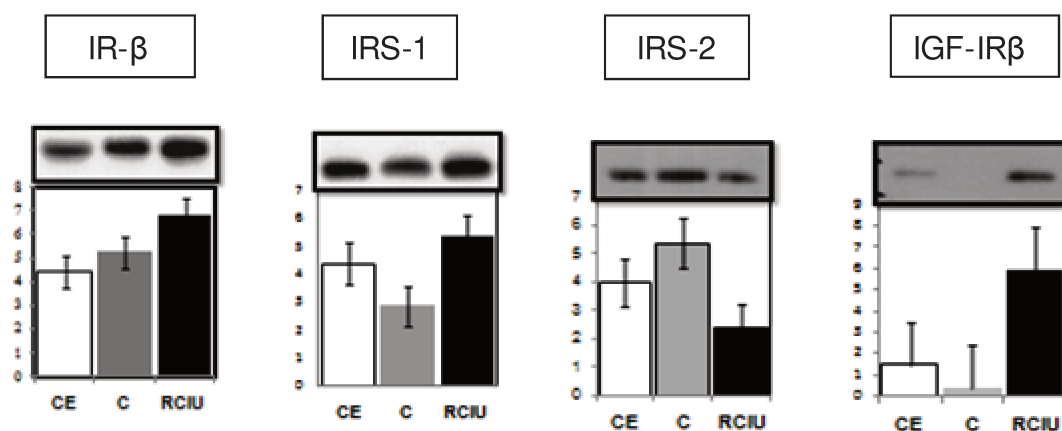
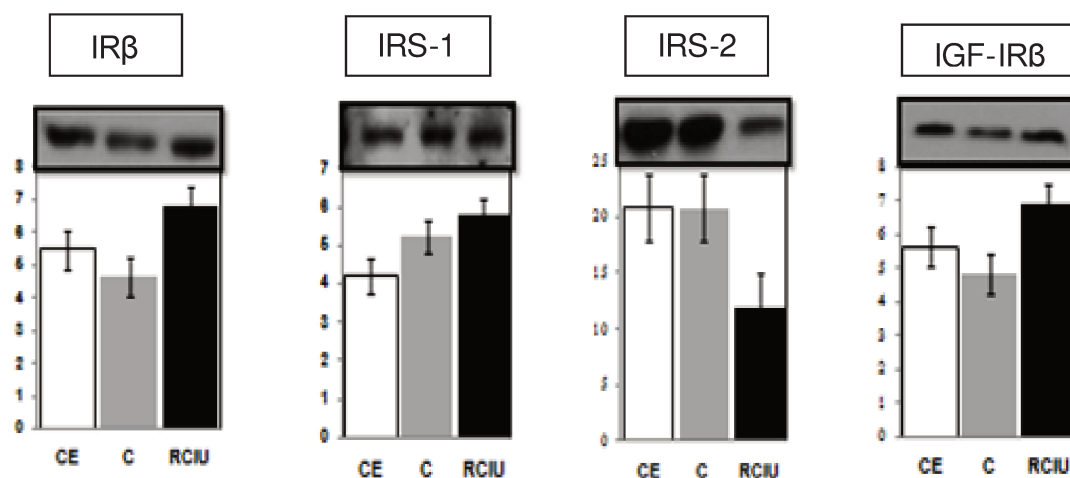


Figura 8. Expressão renal de IR β , IRS-1, IRS-2 e IGF-IR β nos grupos CE, C-RCIU e RCIU aos 21,5 dias de gestação.



5. Discussão

Os estudos experimentais são muito utilizados para avaliação da RCIU. Cerca de 80% dos trabalhos de RCIU utilizam ratos e essa preferência é devido a inúmeros fatores como: proximidade de seu metabolismo com o dos humanos, à facilidade de manipulação, ao seu baixo custo, ao tempo de gestação pequeno, à grande disponibilidade de números de fetos por gravidez, ao baixo índice de abortamento e trabalho de parto prematuro e o material para estudo da biologia molecular é abundante no mercado ⁽⁴³⁾.

Em nosso estudo utilizamos a ligadura unilateral completa da artéria uterina segundo técnica descrita por Wigglesworth ⁽⁴⁸⁾ para avaliarmos as prováveis consequências histológicas e metabólicas fetais da RCIU.

Na ligadura unilateral da artéria uterina tivemos uma sobrevida de 37% dos fetos, e as mortes ocorreram principalmente em fetos próximos ao território vascular da ligadura. A sobrevivência fetal após a ligadura total da artéria uterina ocorre devido à circulação colateral realizada pelas ramificações e anastomoses da artéria ovariana. Na literatura os resultados obtidos em

estudos de obstrução total das artérias uterinas são semelhantes aos nossos, em torno de 30 a 70% dos casos de óbitos ^(53,54).

A incidência da mortalidade fetal pode ser reduzida com oclusão parcial da artéria uterina ⁽⁵⁵⁾, ou com oclusão intermitente realizada em intervalos de minutos a horas ⁽⁵⁶⁾. Nesses estudos as respostas fetais são variáveis em relação à quantidade de fluxo sanguíneo mantido para o feto. Estas variabilidades do aporte sanguíneo não controlado podem influenciar de forma inconstante o grau de RCIU fetal que dificultaria a comparação com o modelo de oclusão arterial completa.

Os fetos submetidos à RCIU em nosso estudo encontram - se no grupo classificado como RCIU do tipo simétrica. Com diminuição morfométrica proporcional dos tecidos submetidos à hipóxia, as relações entre o peso corpóreo e os tecidos do fígado, intestino e rins foram proporcionais.

A análise histológica do fígado não mostrou alteração de sua estrutura pela coloração H/E nos grupos RCIU, C e CE. Contudo, quando coramos as células hepáticas com PAS (Ácido Periódico de Schiff) observamos uma diminuição do teor glicogênio nas células do grupo da RCIU em comparação com o grupo C e CE. Provavelmente, esta diminuição do glicogênio hepático foi causada pelo mecanismo de adaptação fetal em tentar manter a glicemia através da utilização dos depósitos de glicogênio. Esses resultados também foram observados no estudo de Wigglesworth ⁽⁴⁸⁾.

A análise morfométrica histológica do intestino mostrou uma diminuição das camadas serosa, submucosa e mucosa, com alteração do peso intestinal do grupo RCIU quando comparado ao grupo C e CE. Outros estudos experimentais de RCIU também mostraram a mesma alteração do peso intestinal devido ao aumento da apoptose e diminuição das células intestinais ⁽⁵²⁾.

Em ratos com RCIU a imaturidade das células intestinais determina maior impacto celular que nos humanos ⁽⁵²⁾. Em humanos a RCIU causa alterações significativas do intestino com aumento da apoptose intestinal e maior incidência de enterocolite necrotizante, intolerância alimentar e absorção de gordura ⁽⁵⁷⁾.

Na análise morfométrica histológica dos rins dos fetos com RCIU não observamos uma diminuição do peso. Contudo, houve uma diminuição da espessura do córtex renal e do número total de glomérulos com aumento do volume glomerular dos fetos com RCIU quando comparados ao grupo de fetos C e CE. Outros estudos experimentais justificam o aumento do volume glomerular como uma forma compensatória adaptativa à diminuição do número de glomérulos ⁽⁵⁸⁾.

O número reduzido de glomérulos predispõe a um maior risco de desenvolvimento de hipertensão arterial. Com a diminuição do número de

glomérulos há um aumento do volume glomerular, com um aumento da filtração glomerular que leva a uma maior absorção de sódio, ocorrência de microalbuminemia e uma esclerose glomerular renal, tendo como resultado final a hipertensão arterial ⁽⁵⁹⁾.

. No rato a nefrogênese renal tem seu término após o oitavo dia de nascimento, diferente do humano em que a nefrogênese renal termina com 36 semanas de gestação ⁽⁵⁶⁾. Portanto, nos ratos a RCIU leva a uma diminuição glomerular que pode não ser a causa de hipertensão futura na idade adulta, diferentemente do que possa acontecer com seres humanos.

Os mecanismos para adaptação fetal na RCIU geram alterações metabólicas para sua sobrevivência que podem perpetuar-se mudando a resposta metabólica durante toda a vida. Esses mecanismos ainda não são completamente elucidados. Estudos mostram que as mudanças no sistema de IGF e IR tanto em animais quanto em humanos são provavelmente os responsáveis pelo aparecimento de doenças metabólicas na vida adulta. Logo, as alterações do ambiente intrauterino com desvio do crescimento fetal poderiam ser a gênese de doenças futuras metabólicas no indivíduo.

A glicose é o principal substrato energético fetal, essencial para o crescimento e metabolismo fetal. O feto tem capacidade de adaptar-se metabolicamente às alterações agudas e crônicas da oferta de glicose. Vários modelos experimentais de RCIU mostram que, embora o feto seja privado de

glicose, seja por hipoglicemia materna ou insuficiência placentária, o organismo fetal tenta manter a glicose utilizada nos tecidos dentro de suas taxas normais, e isso é realizado pelo aumento do transporte de glicose pela placenta e a maior capacidade do tecido fetal em captar a glicose pelos receptores de membrana ⁽⁶⁰⁾.

No fígado, intestino e rins dos fetos com RCIU observamos um aumento da expressão de IR- β , que é o receptor de membrana responsável pelo início do metabolismo intermediário intracelular.

Após a ligação da insulina ao receptor de membrana, são ativados os substratos protéicos intracelulares entre eles o IRS-1 e IRS-2. O IRS-1 está diminuído em fetos de menor crescimento fetal ⁽⁶¹⁾; camundongos com supressão gênica de IRS-1 têm redução de seu crescimento somático ^(62, 63).

Em nosso estudo, tivemos uma diminuição da expressão do IRS-1 no fígado dos fetos com RCIU em comparação ao C e CE. Nos rins e intestino a expressão do IRS-1 mostrou-se aumentada em relação ao grupo C e CE. Essa diferença de expressão dos receptores pode ser explicada pela característica hepática que consiste em manter o metabolismo de transporte de glicose, a síntese de glicogênio e a síntese proteica, portanto o fígado é o órgão que tem a maior modificação do seu metabolismo na RCIU ⁽⁶⁴⁾.

O IRS-2 participa principalmente no metabolismo regulador de glicose. Camundongos com supressão do IRS-2 têm resistência à insulina com progressão ao diabetes, o que não ocorre com a supressão do gene IRS-1⁽⁶³⁾. O IRS-2 é o maior responsável pelo crescimento das células B pancreáticas e pela secreção de insulina. Ratos sem este receptor desenvolvem alterações semelhantes ao diabetes tipo 2 de humanos⁽⁶⁵⁾. Nossos resultados foram semelhantes quanto à diminuição da expressão de IRS-2 em fígado, intestino e rins como em outros modelos de RCIU⁽⁶⁶⁾.

As concentrações baixas de glicose sérica durante o desenvolvimento fetal levam a apoptose tecidual, à diminuição da replicação e à da neoformação do tecido pancreático contribuindo para redução do tecido pancreático e da massa de células beta.⁽⁶⁷⁾ A diminuição das células pancreáticas diminui a produção de insulina, com diminuição da produção proteica e menor ativação da via de IGF/insulina com menor crescimento fetal⁽⁶⁸⁾.

Se o dano da diminuição do tecido pancreático for permanente, isso poderia estar relacionado com uma resposta inadequada à glicose durante a vida adulta propiciando uma alteração favorável ao aumento da incidência de diabetes⁽⁶⁸⁾

O IGF promove a proliferação celular e bloqueia a apoptose pela indução da fosforilação e pela inibição de proteínas pró apoptóticas. O receptor de IGF e insulina são homólogos, tem similaridade de suas subunidades e tem papel

importante na regulação do crescimento fetal ⁽⁶⁹⁾. Estudos de Efstratiadis e colaboradores em 1990, demonstraram que o IGF e seus receptores são importantes moléculas na regulação do crescimento fetal. Camundongos com ausência de IGF-I, IGF-II e IGF-IR apresentam restrição de crescimento. A ação do IGF-I ocorre através do IGF-IR e a ação do IGF-II através do receptor de insulina ⁽⁷⁰⁾.

Animais com dieta proteica restritiva prolongada apresentam IGF-I diminuído no plasma e fígado ⁽⁷¹⁾. O mesmo é observado em fetos de ratos submetidos à RCIU no modelo nutricional ou cirúrgico ⁽⁷²⁾.

Observamos aumento da expressão do receptor de IGF-IR β no fígado, intestino e rins dos fetos de ratos com RCIU semelhante ao resultado de Yang e colaboradores (2001)⁽⁷³⁾. Esse aumento do receptor de membrana do crescimento serve para tentar manter o crescimento fetal.

A regulação da sinalização de insulina intracelular pode estar associada ao balanço entre a modulação positiva que acontece pela fosforilação em tirosina do IRS-1 e a modulação negativa que acontece pela fosforilação em serina do mesmo IRS-1 ⁽⁷⁴⁾.

Está bem estabelecido que insulina e IGF-1 induzem a fosforilação em tirosina do IRS-1, enquanto agentes que sabidamente levam à resistência à insulina, tais como TNF- α , ácidos graxos livres e estresse celular, induzem a

ativação de quinases de serina/treonina que fosforilam o IRS-1 em serina, inibindo sua função ⁽⁷⁵⁾.

A fosforilação inibitória do IRS-1 em serina pode ser um mecanismo molecular unificador dos diversos fatores desencadeantes de resistência à insulina. A transformação em serina determina uma menor eficácia nas vias finais tróficas e metabólicas e conseqüentemente determina também alterações nos gatilhos de crescimento, replicação e desenvolvimento de organelas celulares. O resultado desta menor eficácia acomete os sistemas de crescimento celular fetal e resultam na RCIU ⁽⁷⁴⁾.

A RCIU diminui a insulina e como resposta metabólica temos uma desnutrição crônica dos tecidos sensíveis à insulina como: fígado, músculo e pâncreas. Simultaneamente ocorre um aumento da produção de cortisol e adrenalina, como resposta fetal para a utilização máxima dos nutrientes, conseqüentemente o feto altera sua circulação diminuindo seu crescimento e as vias intracelulares que começam a agir é via das serinas ⁽⁷⁶⁾.

No modelo experimental de RCIU a adaptação fetal a diminuição de nutrientes leva às respostas metabólicas para tentar manter a vida fetal. Essas respostas metabólicas avaliadas principalmente nos receptores de sinalização intracelulares de insulina mostram mudanças de comportamento desses receptores, mudanças essas importantes para a sobrevivência fetal, como o aumento da expressão do receptor de membrana IR- β para tentar manter o

metabolismo celular e a mudança das vias metabólicas de IRS-1 e IRS-2 que apresentam uma similaridade com alterações encontradas em doenças metabólicas.

As alterações metabólicas e histológicas encontradas no momento do nascimento fetal sugerem doenças na vida adulta. Essa hipótese poderia ser comprovada com nova avaliação dos fetos com RCIU na vida adulta o que comprovaria que o genótipo fetal pode produzir mais que um fenótipo dependendo das condições de pré-natais do indivíduo.

Nosso estudo em parte corrobora essas hipóteses, na medida as alterações demonstradas nos receptores de insulina e seus fatores de crescimento compõem a base fisiopatológica para aspectos da síndrome metabólica do adulto, associada clinicamente à restrição de crescimento intrauterino.

6. Conclusões

- O modelo de RCIU por meio da ligadura unilateral da artéria uterina foi eficaz e pode ser útil para avaliar a restrição de crescimento intrauterina de causa placentária e as possíveis repercussões neonatais
- Os fetos com RCIU pela ligadura da artéria uterina mostraram uma alteração na expressão dos receptores de insulina e crescimento que podem ajudar a compreender possíveis alterações metabólicas na vida adulta

7. Referências Bibliográficas

1. Gicquel C, Le B Y. Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res.* 2006; 65 (3):28-33.
2. . Monk D, Moore GE. Intrauterine growth restriction--genetic causes and consequences. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004; 9(5):371-378.
3. Gluckman PD, Harding JE. Fetal growth retardation: underlying endocrine mechanisms and postnatal consequences. *Acta Paediatr Suppl.* 1997; 422:69-72.
4. Shepard MJ, Richards VA, Berkowitz RL, Warsof SL, Hobbins JC. An evaluation of two equations for predicting fetal weight by ultrasound. *Am J Obstet Gynecol.* 1982; 142(1):47-54.
5. Bamberg C, Kalache KD. Prenatal diagnosis of fetal growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004; 9(5):387-394.

6. McBurney RD. The undernourished full term infant: cases reports. *Western J Surg.* 1947; 55: 363-9.
7. Battaglia FC, Lubchenco LO. A practical classification of newborn infants by birthweight and gestational age. *J Pediatr.* 1967; 71: 159-69.
8. Campbell S. The detection of intrauterine growth retardation. In Sharp F, Fraser RB, Milner RDG: *Fetal growth: proceedings of the twentieth study group of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.* London. 1989; 251-61.
9. Stewart A. Fetal growth: mortality and morbidity. In Sharp F, Fraser RB, Milner RDG: *Fetal growth: proceedings of the 20th study group of the Royal College of Obstetricians and Gynaecologists.* London. 1989; 403-12.
10. McIntire DD, Bloom SL, Casey BM, Leveno KJ. Birth weight in relation to morbidity and mortality among newborn infants. *N Engl J Med.* 1999; 340 (16): 1234-8.
11. Hales CN, Ozanne SE. For debate: Fetal and early postnatal growth restriction lead to diabetes, the metabolic syndrome and renal failure. *Diabetologia.* 2003; 46(7):1013-9

12. Galbraith RS, Karchmar EJ, Piercy WN. The clinical prediction of intrauterine growth retardation. *Am J Obstet Gynecol.* 1979, 133(3):281-286.
13. Villar J, Belizan JM. The timing factor in the pathophysiology of the intrauterine growth retardation syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 1982; 143(7):793-798.
14. Lockwood CJ, Weiner S. Assessment of fetal growth. *Clin Perinatol.* 1986; 13(1):3-35.
15. Yu VY, Upadhyaya YA. Neonatal management of the growth-restricted infant. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004; 9(5):403-409.
16. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006; 49(2):270-28.
17. Gluckman PD, Liggins GC. Regulation of fetal growth. In: Beard RC & Nathanielsz PW Ed. Marcel Dekker Inc- Butterwoeths. *Fetal Physiology and Medicine.* New York. 1984; 511-57.
18. Cavalleira JB, Ribeiro EB, Telles MM, Velloso LA, Gontijo LA et al. . Characterization of seletive insulin resistance to insulin signaling in the hypothalamus of obese Zucker rats. *Diabetes.* 2002; (51):A41.
19. Lemons JA, Ridenour R, Orsini EN. Congenital absence of the pancreas and intrauterine growth retardation. *Pediatrics.* 1979; 64(2): 255-257.

20. Haber EP, Curi C, Carvalho CR, Carpinelli AR. Secreção de insulina: Efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001; 45(3):219-227.
21. Kahn CR. Current concepts of molecular mechanism of insulin action. *Ann Rev Med.* 1985; 36:429-51.
22. White MF. The insulin signaling system and the IRS proteins. *Diabetologia.* 1997; 40:2-17.
23. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature.* 1991; 352(6330):73-77.
24. Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem.* 1996; 271(36):22100-4.
25. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; 106:165-9.
26. Saad MJ, Araki E, Miralpeix M, Rothenberg PL, White MF, Kahn CR. Regulation of insulin receptor substrate-1 in liver and muscle of animal models of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1992; 90: 1839-4

27. Shepherd PR, Nave BT, Siddle K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem J* .1995; 305: 25-8.
28. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994; 372:186-90.
29. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJC. Vias de sinalização da insulina Arq Bras Endocrinol Metab 2002; 46(4): 419-425.
30. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM. Previs et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature*. 1998; 391:900-4.
31. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000; 278: 127-33.
32. Woods KA, Camacho-Hubner C, Barter D, Clark AJ, Savage MO. Insulin-like growth factor I gene deletion causing intrauterine growth retardation and severe short stature. *Acta Paediatr*. 1997; 423: 39–45.
33. Jones JL, 1995; 16(1):3-34. Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev*.

34. Monzani R, Cohen P. IGFs and IGBPs: role in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2002; 16(3): 433-447.
35. Nayak NR, Giudice LC. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. *Placenta.* 2003; 24(4):281-96.
36. Fowden AL. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta.* 2003; 24(8-9):803-12.
37. Patti ME, Kahn CR. The insulin receptor - a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1998; 9:89-109.
38. Collett-Solberg PF, Cohen P.T. Genetics, chemistry, and function of the IGF/IGFBP system. *Endocrine.* 2000; 12(2):121-36.
39. Holt RI. Fetal programming of the growth hormone-insulin-like growth factor axis. *Trends Endocrinol Metab.* 2002; 13(9):392-7.
40. Spinola Castro AM, Guerra GJ. GH/IGF e Neoplasia: O Que Há de Novo Nesta Associação. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2005; 49(5): 833-842.
41. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 1993; 75(1):73-82.

42. Schröder HJ. Models of fetal growth restriction. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003; 110(1): S29-39.
43. Vuguin PM. Animal models for small for gestational age and fetal programming of adult disease. Horm Res. 2007; 68(3):113-23.
44. Harding JE, Charlton V. Experimental nutritional supplementation for intrauterine growth retardation In: Harrison MR, Golbus MS, Filly R.A. The unborn patient. Philadelphia: Ed.WB Saunders Co,1991; 598-613.
45. Wu G, Bazer FW, Cudd TA, Meininger CJ, Spencer TE. Maternal nutrition and fetal development. J Nutr. 2004; 134(9):2169-2172.
46. Oh W, Omori K, Hobel CJ. Umbilical blood flow and glucose uptake in lamb fetus following single umbilical artery ligation. Biol.Neonate. 1975; 26:291
47. Pascale H. Lane, Michael W. Steffes, and S. Michael Mauer. Estimation of glomerular volume: A comparison of four methods. Kidney International. 1992; 41: 1085-1089
48. Wigglesworth JS. Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. J Path Biol. 1964; 88:1-13.

49. Ribeiro SR, Engler P JR, Miranda AC, Bromberg SH, Lopasso FP, Irya K. Original research weight loss and morphometric study of intestinal mucosa in rats after massive intestinal resection. Influence of a glutamine-enriched diet. Rev Hosp Clin Pac Med S Paulo 2004; 59(6):349-.
50. França WM, Langone F, de la Hoz CL, Gonçalves A, Bittencourt D, Pereira LV, Sbragia L. Maturity of the myenteric plexus is decreased in the gastroschisis rat model. Fetal Diagn Ther. 2008; 23(1):60-8.
51. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for a Quatitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-54.
52. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227
53. Baserga M, Bertolotto C, MacLennan NK, Hsu JL, Pham T, Laksana GS, Lane RH. Uteroplacental insufficiency decreases small intestine growth and alters apoptotic homeostasis in term intrauterine growth retarded rats. Early Hum Dev. 2004; 79 (2):93-105.
54. Hayashi TT, Dorko ME. A rat model for the study of intrauterine growth retardation. Am J Obstet Gynecol. 1988; 158 (5):1203-7.

55. Unterman TG, Simmons RA, Glick RP, Ogata ES. Circulating levels of insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-II, and IGF-binding proteins in the small for gestational age fetal rat. *Endocrinology*. 1993; 132 (1):327-36.
56. Tanaka M, Natori M, Ishimoto H, Miyazaki T, Kobayashi T, Nozawa S. Experimental growth retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant Sprague-Dawley rats. *Am J Obstet Gynecol*. 1994; 171 (5):1231-4.
57. Lee MJ, Conner EL, Charafeddine L, Woods JP, Prince GD. A critical birth weight and other determinants of survival for infants with severe intrauterine growth restriction. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 943:326-39.
58. Schreuder MF, Nyengaard JR, Fodor M, Van Wijk JA, Delemarre-Van W H. Glomerular number and function are influenced by Spontaneous and induced low birth weight in rats. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16 (10):2913-9.
59. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primaryhypertension. *N Engl J Med*. 2003; 348: 101–108.
60. Wallace JM, Bourke DA, Aitken RP, Leitch N, Hay WW. Blood flows and nutrient uptakes in growth restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep. *Am J Physiol Regul. Integr Comp Physiol*. 2002; 282(4): 1027–36.

61. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, Johnson RS et al. Alternative pathway of insulin signaling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*.1994; 372:186-90.
62. Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes*. 2001; 50 (10):2279-86.
63. Hales CN, Ozanne SE. For debate fetal and early postnatal growth restriction lead to diabetes the metabolic syndrome and renal failure. *Diabetologia*, 2003; 46 (7):1013-1019.
64. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*. 1994; 10 (6502): 182-6.
65. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S et al. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391 :900-4.
66. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1999; 104 (6): 787-94.
67. Limesand SW, Rozance PJ, Zerbe GO, Hutton JC, Hay WW. Attenuated insulin release and storage in fetal sheep pancreatic islets with intrauterine growth restriction. *Endocrinology*. 2006; 147(3):1488-97.

68. William W, Hay Jr. Recent observations on the regulation of fetal metabolism by glucose *J Physiol.* 2006; 572(1): 17–24 17.
69. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis. A Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell.* 1993; 75(1):73-82.
70. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature.* 1990; 345(6270):78-80.
71. Maiter D, Maes M, Underwood LE, Fliesen T, Gerard G, Ketelslegers JM. Early changes in serum concentrations of somatomedin-C induced by dietary protein deprivation in rats: contributions of growth hormone receptor and post-receptor defects. *J Endocrinol.* 1988; 118(1):113-20.
72. Muaku SM, Thissen JP, Gerard G, Ketelslegers JM, Maiter D. Postnatal catch-up growth induced by growth hormone and insulin-like growth factor-I in rats with intrauterine growth retardation caused by maternal protein malnutrition. *Pediatr Res.* 1997; 42(3):370-7.
73. Yang F, Yao Y, Li W, Chen Y, Tang J, Zeng Y, Bai B. Studies on insulin-like growth factor I receptor in fetal rats with intrauterine growth retardation. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2001; 32(3):402-4.
74. Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem.* 1996; 271:22100-4.

75. Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996; 271:665-8.
76. Gao Z, Hwang D, Bataille F, Levefre M, York D, Quon MJ, Ye J. Serine insulin signaling. *J Mol Endocrinol*. 1996; 17(3):174-184.

8. Anexos

Anexo 1 – Resultados dos pesos corpóreos(PC), hepáticos(PF), renais(PR) e placentários(PP) em mg de fetos submetidos a RCIU, controle da RCIU(C-RCIU) e Controle Externo(CE).

RCIU- PC-	RCIU -PF	RCIU - PI	RCIU-PR	RCIU-PP
4620	236	129	45	591
4445	286	156	60,9	561
3604	193	68	45,2	416
5228	293	181	57,3	695
4445	294	155	61	510
4417	293	153	59,1	616
4146	218	157	52,2	463
5445	320	178	66,9	542
5456	331	186	70,2	567
4790	318	172	53,6	511
5440	340	179	58,3	584
5628	342	191	58,3	574
5541	301	191	60,1	571
5103	378	231	54,1	568

5052	365	243	50,4	538
5750	366	245	58,1	519
4467	287	180	44,5	427
4199	221	146	53,7	570
4973	301	159	50,8	654
3504	192	72	48,7	
3482	90	100	41,7	
3293	157	85	40,7	
3197	114	70	36,2	
2886	147	136	22	
3068	110	89	33,2	
3309	138	83	23,8	
4353	338	251	195,8	
5275	293	182	66,5	
4230	194	104	31,7	
4074	315	104	32,2	
3802	186	81	32,9	
4162	279	194	163,4	
4199	248	193	158,1	
3563	334	154	128,3	
4231	337	206	174,1	
3899	239	116	797	
4166	274	116	82,4	
3960	186	157	37,9	
4312	287	146	83,4	
5041	365	243	132,4	
MD- 4368,83	263	155	85,5	551
DV -71	79	52	122,8	69
C-RCIU-PC	C-RCIU-PF	C - RCIU-PI	C - RCIU-PR	C-RCIU-PP
6132	321	189	32,4	690
5478	432	156	65,8	567

6418	275	191	74,4	553
6487	370	201	72,9	601
6485	301	197	68,6	493
6075	312	197	169,0	424
5528	399	178	158,9	512
5205	314	154	94,0	478
5731	398	213	156,0	528
5425	401	176	64,5	703
5987	305	176	132,0	901
6251	312	187	160,0	840
5705	365	812	72,1	721
5822	372	202	50,8	593
5963	304	189	48,9	570
5623	312	192	48,0	573
5621	245	187	56,1	601
5894	287	191	58,1	590
5589	320	174	62,1	582
5921	292	182	95,3	745
6239	341	199	15,8	
4453	244	133	48,6	
4920	270	111	45,0	
5234	291	136	47,1	
5254	394	144	51,5	
4916	296	149	39,2	
5498	278	174	65,9	
7197	328	221	80,9	
5157	223	198	59,9	
4877	265	126	47,0	
4829	205	123	43,4	
5794	455	295	179,0	
5435	455	220	158,0	

	5524	400	222	166,0	
	5582	463	250	145,0	
	5276	323	160	89,4	
	5165	436	178	93,9	
	5451	408	153	46,0	
	5423	336	189	89,3	
	6776	321	262	178,0	
MD	5296,8	334	200	85,72	613
DV	563,32	66	106	47,2	120
	CE-PC	CE-PF	CE-PI	CE-PR	CE-PP
	6939	430,4	242,9	84,1	714,8
	7103	522,9	239,4	63	656,3
	7465	402	228,4	81,7	694,3
	6442	407,3	214,2	71,6	659,3
	7422	428,3	247,7	74,2	794,5
	6081	421,6	185	54,4	688,7
	6107	411,4	163,1	50,4	776,4
	7205	422,2	251,2	66,9	717,7
	6814	419,4	212	87,3	573,3
	6216	371,4	213,2	84	431,9
	7120	473,4	312,3	91,6	682,5
	6421	461,6	286,6	85,4	583,5
	6552	360,5	252,6	73,4	660,9
	6824	400,7	235,9	88,1	615,8
	6815	424,5	270,3	76,3	571,3
	7406	392,1	261,5	85,1	572,1
	6589	483,2	248,8	80,6	549,9
	6754	355,9	243,5	94,3	537,2
	7035	400,3	294,8	90,1	437,7
	6983	491,3	284,3	87,7	
	7465	442,4	250,6	69,4	

7034	432	268,2	100,5	
6608	383,1	234,8	99,7	
6638	407,6	242,8	75	
6274	437,4	201,1	74,4	
6625	410,9	223,3	79,9	
6922	401,5	232,1	81,3	
6836	390,6	254,1	82,8	
6819	329,9	235,3	83,1	
6185	377	228,9	74	
7024	342,8	174	37,4	
6947	438,5	259	87,6	
6569	402	232,2	89,3	
7087	284,8	234,3	73,5	
6652	342,3	235,7	73,5	
6865	354,5	249,7	81,5	
6427	349,2	198	78,3	
6882	371	258,5	48,5	
6623	258,8	243,3	97,1	
6835	321	211,7	86,9	
MD 6790	398,94	238,88	78,59	627,26
DV 360	53,34	30,54	13,58	99,91

Anexo 2 - Resultados das proporções entre PF/PC, PI/PC, PR/PC, PP/PC em fetos submetidos a RCIU, controle da RCIU (C-RCIU) e Controle Externo (CE)

PF/PC RCIU	PI/PC RCIU	PP/PC RCIU	PR/PC RCIU
0,051	0,028	0,128	0,005
0,064	0,035	0,126	0,007
0,054	0,019	0,115	0,006
0,056	0,035	0,133	0,005
0,066	0,035	0,115	0,007
0,066	0,035	0,139	0,007
0,053	0,038	0,112	0,006
0,059	0,033	0,100	0,006
0,061	0,034	0,104	0,006
0,066	0,036	0,107	0,006
0,063	0,033	0,107	0,005
0,061	0,034	0,102	0,005
0,054	0,034	0,103	0,005
0,074	0,045	0,111	0,005
0,072	0,048	0,106	0,005
0,064	0,043	0,090	0,005
0,064	0,040	0,096	0,005
0,053	0,035	0,136	0,006
0,061	0,032	0,132	0,005
0,055	0,021		0,007
0,026	0,029		0,006
0,048	0,026		0,006
0,036	0,022		0,006

0,051	0,047		0,004
0,036	0,029		0,005
0,042	0,025		0,004
0,078	0,058		0,022
0,056	0,034		0,006
0,046	0,025		0,004
0,077	0,025		0,004
0,049	0,021		0,004
0,067	0,047		0,020
0,059	0,046		0,019
0,094	0,043		0,018
0,080	0,049		0,021
0,061	0,030		0,102
0,066	0,028		0,010
0,047	0,040		0,005
0,067	0,034		0,010
0,072	0,048		0,013
MD-0,059	0,035	0,114	0,010
DV-0,013	0,009	0,014	0,016
PF/PC C-RCIU	PI/PC C-RCIU	PP/PC C-RCIU	PR/PC C-RCIU
0,052	0,031	0,128	0,003
0,079	0,028	0,126	0,006
0,043	0,030	0,115	0,006
0,057	0,031	0,133	0,006
0,046	0,030	0,115	0,005
0,051	0,032	0,139	0,014
0,072	0,032	0,112	0,014

0,060	0,030	0,100	0,009
0,069	0,037	0,104	0,014
0,074	0,032	0,107	0,006
0,051	0,029	0,107	0,011
0,050	0,030	0,102	0,013
0,064	0,142	0,103	0,006
0,064	0,035	0,111	0,004
0,051	0,032	0,106	0,004
0,055	0,034	0,090	0,004
0,044	0,033	0,096	0,005
0,049	0,032	0,136	0,005
0,057	0,031	0,132	0,006
0,049	0,031	0,126	0,008
0,055	0,032		0,001
0,055	0,030		0,005
0,055	0,023		0,005
0,056	0,026		0,004
0,075	0,027		0,005
0,060	0,030		0,004
0,051	0,032		0,006
0,046	0,031		0,006
0,043	0,038		0,006
0,054	0,026		0,005
0,042	0,025		0,004
0,079	0,051		0,015
0,084	0,040		0,015
0,072	0,040		0,015
0,083	0,045		0,013

0,061	0,030		0,008
0,084	0,034		0,009
0,075	0,028		0,004
0,062	0,035		0,008
0,047	0,039		0,013
MD-0,059	0,035	0,114	0,008
DV-0,012	0,018	0,014	0,004

PF/PC CE	PI/PC CE	PP/PC CE	PP/PC CE
0,062	0,035	0,103	0,006
0,074	0,034	0,092	0,004
0,054	0,031	0,093	0,005
0,063	0,033	0,102	0,006
0,058	0,033	0,107	0,005
0,069	0,030	0,113	0,004
0,067	0,027	0,127	0,004
0,059	0,035	0,100	0,005
0,062	0,031	0,084	0,006
0,060	0,034	0,069	0,007
0,066	0,044	0,096	0,006
0,072	0,045	0,091	0,007
0,055	0,039	0,101	0,006
0,059	0,035	0,090	0,006
0,062	0,040	0,084	0,006
0,053	0,035	0,077	0,006
0,073	0,038	0,083	0,006
0,053	0,036	0,080	0,007

0,057	0,042	0,062	0,006
0,070	0,041	0,090	0,006
0,059	0,034		0,005
0,061	0,038		0,007
0,058	0,036		0,008
0,061	0,037		0,006
0,070	0,032		0,006
0,062	0,034		0,006
0,058	0,034		0,006
0,057	0,037		0,006
0,048	0,035		0,006
0,061	0,037		0,006
0,049	0,025		0,003
0,063	0,037		0,006
0,061	0,035		0,007
0,040	0,033		0,005
0,051	0,035		0,006
0,052	0,036		0,006
0,054	0,031		0,006
0,054	0,038		0,004
0,039	0,037		0,007
0,047	0,031		0,006
MD-0,059	0,035	0,092	0,006
DV-0,008	0,004	0,015	0,001

Anexo 3 – Protocolo da Comissão de Ética na Experimentação Animal



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

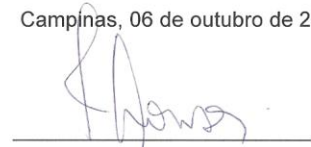
Certificamos que o Protocolo nº **1644-1**, sobre "**Validação do modelo experimental de restrição do crescimento intra-uterino em fetos de ratos**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Lourenço Sbragia / Dra. Márcia Pereira Bueno**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **06 de outubro de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1644-1**, entitled "**Intra-uterine growth restriction in fetal rat: a method validation**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **October 6, 2008**.

Campinas, 06 de outubro de 2008.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Artigo 1 Resposta da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia

Ribeirão Preto, 21 de janeiro de 2010

Ilmo. Sr. Prof. Dr.

Lourenço Sbragia

Prezado Professor,

Recebemos e agradecemos o envio do trabalho "Efeitos da restrição de crescimento fetal pela ligadura da artéria uterina no modelo experimental de rato", para análise e publicação na RBGO protocolado sob **número 3761**. O manuscrito foi analisado por Membros do Conselho Editorial que recomendaram a **aceitação do mesmo para publicação** sem modificações relevantes. Serão feitas alterações de estilo no texto e uma cópia com as alterações mencionadas será enviada para verificação dos autores. Outras modificações formais poderão ser necessárias e estas serão informadas quando do envio da correspondência citada acima.

Recomendamos conservar arquivado todo o material referente ao trabalho, inclusive a correspondência, até a sua publicação. Mencionar o número de protocolo nas próximas correspondências.

Atenciosamente,

Jurandyr Moreira de Andrade

Editor Científico da RBGO

Artigo 2 – Submetido à Fetal Diagnosis and Therapy

Subject: Fetal Diagnosis and Therapy Submission Received

Dear Prof. Dr. Lourenço Sbragia:

Thank you for submitting your manuscript to "Fetal Diagnosis and Therapy"; the submission number is: **4383**. Your submission will now be checked by the editorial office, and you will receive a confirmation mail from the editorial office soon. This step will also activate your personal user-id and password, enabling you to login to the system to check the status of your manuscript.

If you have any queries please send an email to: fdt@karger.ch.

With kind regards,

Editorial Office

----- End of Forwarded Message -----