



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO POR REDUÇÃO
DA PRESSÃO DE PERFUSÃO UTERINA SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS, DE NEUROPLASTICIDADE E MEMÓRIA**

Dissertação de Mestrado

Cristian Camilo Figueroa Tovar

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO POR REDUÇÃO
DA PRESSÃO DE PERFUSÃO UTERINA SOBRE PARÂMETROS
COMPORTAMENTAIS, DE NEUROPLASTICIDADE E MEMÓRIA**

Cristian Camilo Figueroa Tovar

Orientadora: Profa. Dra. Simone Marcuzzo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pelufo Silveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

PORTO ALEGRE

2015

DEDICATÓRIA

A minha mãe, por acreditar e apoiar sempre as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora doutora Simone Marcuzzo, por ter aberto para mim, às portas da vida acadêmica e da pesquisa, do Brasil e do seu laboratório na UFRGS. Pelo voto de confiança, apoio, ensinamentos e ânimo ao longo do curso, meus sinceros agradecimentos.

À minha Co-orientadora, Professora doutora Patricia Pelufo Silveira, por ter mostrado novas áreas do conhecimento, pela inspiração e confiança depositada.

À estrutura e financiamento da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Laboratório de Histofisiologia Comparada, pelas quais foi possível o desenvolvimento experimental deste trabalho.

A Marta Giotti, Tuane Garcez, Fabiola Meyer e Silvia Barbosa, pelo apoio técnico e ensinamentos durante o desenvolvimento experimental deste trabalho.

Aos integrantes e colegas do grupo de pesquisa Plasticidade do Neurodesenvolvimento (PND) e Origem Fetal das Doenças do Adulto (DoHAD) pelas orientações, apoio, acompanhamento e amizade.

Aos amigos no Brasil, por me receber como em casa e fazer de Porto Alegre o meu segundo lar.

Aos Professores da banca avaliadora pela disponibilidade e pelas contribuições.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da UFRGS pela oportunidade de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e pelo apoio financeiro.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) é conhecida como uma condição na qual o feto não consegue desenvolver todo o seu potencial de crescimento intrínseco. Crianças com RCIU em idade escolar têm prejuízos no aprendizado, memória, atenção e cognição em geral, e maior predisposição a transtornos psicológicos como Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH), quando comparados com crianças não restritas. **OBJETIVO:** este estudo busca encontrar modificações neurobiológicas encefálicas, em ratos Wistar adolescentes, que possam explicar os efeitos, em parâmetros comportamentais, de neuroplasticidade e memória, da RCIU por redução da pressão de perfusão uterina (RPPU). **MÉTODOS:** ratas Wistar prenhes de 75 dias de idade foram submetidas à RPPU no dia gestacional 14, período que corresponde ao início da fase de rápido crescimento, diferenciação e maturação em ratos, por meio da colocação de um clipe na artéria aorta abdominal descendente antes da bifurcação para as artérias ilíacas e um clipe em cada artéria ovariana. O grupo *Sham* foi submetido à laparotomia exploratória sem a RPPU e o grupo controle não foi submetido a nenhum procedimento cirúrgico. Ratos Wistar de 30 dias, provenientes de mães submetidas à RPPU, *Sham* ou Controles, foram submetidos ao *Teste de Campo Aberto*, para avaliação da atividade locomotora e exploratória, e no 32º dia pós-natal (DPN) foram submetidos ao teste *de Reconhecimento do Novo Objeto* para avaliar a memória de longo prazo. Os encéfalos da prole foram coletados no 34º DPN e conservados para análise. A Técnica de imunistoquímica foi realizada para mensurar a expressão de marcadores celulares neurais: NeuN (neurônios maduros) GFAP (astrócito) no córtex pré-frontal e estriado da prole. **RESULTADOS:** a RPPU causou diminuição no peso ao nascimento no grupo RCIU e *Sham*, porém não houve diferença no peso entre os grupos no 30º DPN. A RPPU aumentou significativamente a duração da

gestação no grupo RCIU em um dia. Os animais restritos apresentaram aumento na atividade exploratória no teste de campo aberto. RCIU e *Sham* apresentaram déficit de memória no teste de reconhecimento do novo objeto. Associado a essas alterações comportamentais, a RCIU levou a o aumento significativo na expressão de NeuN no CPF e de GFAP no estriado no 34º DPN. CONCLUSÃO: a RPPU produz alterações na gravidez causando maior duração da gestação e RCIU na prole, conduzindo a modificações comportamentais e de memória, assim como a nível encefálico celular, promovendo novas perspectivas sobre as consequências do modelo em ratos de RCIU-RPPU. São necessários mais estudos para desvendar se essas modificações continuam presente na vida adulta dos ratos.

Palavras-chave: Restrição de crescimento intrauterino, Baixo peso ao nascimento, Pequeno para idade gestacional, Déficit cognitivo, Hiperatividade, Memória, Comportamento, Astrócitos, Imunoistoquímica

ABSTRACT

INTRODUCTION: Intrauterine growth restriction (IUGR) is known as a condition where the fetus cannot develop its intrinsic growth potential. IUGR Children in early scholar age have impaired learning abilities, memory, attention and cognitive deficit in general; also, they are in higher risk of psychological disorders as Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD) when compared with non-IUGR children. **OBJECTIVE:** The study aims to find neurobiological brain modifications, in adolescent Wistar rats, that could clarify these memory and behavioral impairments in a rat animal model of IUGR by Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP). **METHODS:** 75 days-old pregnant Wistar rats were underwent to RUPP procedure on 14th gestational day, period where the fast growing, differentiation and maturation phase begins in rats, by putting one clip at the abdominal descendent aorta before iliac bifurcation and one clip in each ovarian artery. The *Sham* group underwent exploratory laparotomy procedure without the RUPP and the control group was not exposed to any surgical procedure. 30 days old Wistar rats from RUPP, *Sham*, and Control mothers were exposed to the *Open Field Test* to assess the locomotor and exploratory activity and, at 32th postnatal day (PND), to the *Novel Object Recognition* test to assess the long-term memory. Offspring brains were collected at 34th PND and preserved for analysis. Immunohistochemistry technique was performed to measure the expression of neural cells markers: NeuN (mature neurons) and GFAP (astrocytes) in prefrontal cortex and striatum on the offspring. **RESULTS:** RUPP caused a decreased birth weight in IUGR and Sham group, however there was no difference between birth weight at 30th PND. RUPP significantly increased gestation in 1 day in IUGR rats. IUGR animals had greater exploratory, locomotor activity in the Open Field test. IUGR

and *Sham* showed memory deficit in the Novel Object Recognition test. Associated to those behavioral modifications, the RUPP led to a significant increase in expression of NeuN and GFAP marker in prefrontal cortex and striatum at PND34. CONCLUSIONS: The RUPP disturbs pregnancy increasing gestation length and inducing IUGR in the offspring; which leads to behavioral and memory modifications, also, in a brain cellular level, promoting new insight about the IUGR-RUPP rat model consequences. Further analysis are needed to find whether this changes are still present in adult life.

Key-words: Intrauterine growth restriction, Low birth weight, Small for gestational age, Cognitive deficit, Hyperactivity, Memory, Behavior, Astrocytes, Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS

CA1	Região hipocampal 1
CA3	Região hipocampal 3
DPN	Dia pós-natal
GD	Giro denteado do hipocampo
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
IL-6	Interleucina 6
PIG	Pequeno para idade gestacional
RCIU	Restrição do crescimento Intrauterino
RPPU	Redução da pressão de perfusão uterina
NeuN	Antígeno nuclear neuronal

ARTIGO

ACC	Anterior cingulate cortex
ADHD	Attention deficit and hyperactivity disorder
ANOVA	Analysis of variance
AOI	Area of interest
CNS	Central nervous system
D4R	Dopamine D ₄ receptor
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DG	dentate gyrus of the hippocampus
G	Gestational day
GFAP	Glial fibrillary acid protein
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
IgG	Immunoglobulin G
IHC	Immunohistochemistry
IU	International unit

IUGR	Intrauterine Growth Restriction
LPS	Lipopolysaccharide
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
NeuN	Neuron nuclear antigen
NeuN-IR	NeuN-immunoreactive
NOR	Novel object recognition
OD	Optical densitometry
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffer saline
PBS –Tx	PBS + 0.1% Triton X-100
PFC	Prefrontal cortex
PND	Post natal day
RUPP	Reduced uterine perfusion pressure procedure
SGA	Small for gestational age
SVZ	Sub ventricular zone

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Table 1. Weight in grams (g). * IUGR and Sham showed difference from Control group (p<0.001). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Mean \pm S.E.M of absolute values.

PND0=Birth..... 65

Table 2. Open-Field test. Mean \pm S.E.M of first minute crossing, total crossings, frequency of rearing and grooming behavior at PND32. One-way ANOVA + Tukey post hoc test. *

IUGR showed increased locomotor activity (p<0.01) and grooming behavior (p<0.05) compared to Sham and Control group. n=15-22 per group..... 65

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO

- Figure 1. Length of gestation (days). *IUGR ($n=11$) and Sham ($n=10$) presented increased length of gestation period compared to Controls ($n=7$) ($p<0.05$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Data expressed as Mean \pm S.E.M..... 66
- Figure 2. Percentage of preference for the novel object during test trial in the NOR Test at PND33. *IUGR ($n=17$) and Sham ($n=19$) groups showed less exploration of the novel object in comparison to Control group ($n=20$) ($p<0.05$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Data expressed as Mean \pm S.E.M..... 66
- Figure 3. Effect of IUGR on NeuN in prefrontal cortex (PFC). (A) Optical Density (OD) measurement of NeuN Immunoreactivity in PFC at PND34. (B) Digital images of representative coronal sections of the PFC stained for NeuN. *IUGR ($n=5$) and Sham ($n=5$) showed increased immunoreactivity in PFC compared to control group ($n=6$)($p<0.05$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Data expressed as Mean \pm S.E.M. 67
- Figure 4. Effect of IUGR on GFAP in striatum. (A) Optical Density (OD) measurement of GFAP immunoreactivity in striatum at PND34. (B) Digital images of representative coronal sections of the striatum stained for GFAP. *IUGR ($n=7$) showed increased immunoreactivity in striatum compare to Sham ($n=6$) and Control ($n=7$) groups ($p<0.05$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Data expressed as Mean \pm S.E.M. 68

SUMARIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
4. MÉTODO E RESULTADOS	13
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	57
7. PERSPECTIVAS	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

1.1 Restrição do crescimento intrauterino

A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) é conhecida como uma condição onde o feto não consegue desenvolver todo o seu potencial de crescimento intrínseco (CAMPBELL *et al*, 2012). O termo RCIU e pequeno para idade gestacional (PIG) estão relacionados, mas não são sinônimos. É importante diferenciar entre um neonato pequeno e um neonato restrito. A RCIU consiste em uma redução patológica do crescimento fetal causando um padrão de crescimento inesperado devido a injúrias acometidas dentro do útero. Essa diminuição do crescimento pode resultar em neonatos PIG, definido como um recém-nascido com um peso de nascimento abaixo do percentil 10 para idade gestacional, referindo-se ao baixo peso da criança e não ao padrão de crescimento (ERGAZ *et al*, 2005; NETO *et al*, 2011). De fato Rosenberg (2008) afirma que crianças com RCIU podem ou não ser PIG, e crianças que são PIG podem não ter sido afetadas pelos processos restritivos do crescimento que causam RCIU. Conforme exposto acima, o diagnóstico de RCIU requer o acompanhamento longitudinal do crescimento ao longo da gestação, o que é frequentemente inviável devido a impossibilidade, dentro do sistema público de saúde, de fazer um acompanhamento de cada gestante. Também, por causa das limitações econômicas familiares que dificultam a consulta com especialistas durante a gestação. Logo, clinicamente, com frequência PIG é assumido como sinônimo de RCIU (Rosenberg, 2008).

O número de crianças apresentando baixo peso ao nascimento continua em crescimento apesar da melhora nos cuidados pré-natais. Por exemplo, nos Estados Unidos, passou de 7,8% em 2002, a 7,9% em 2003 e, aproximadamente, de 250.000 crianças que nascem por ano, cerca de 40.000 crianças que nascem a termo pesam menos que 2.500 g. (ERGAZ *et al*, 2005). Em

geral considera-se que a prevalência mundial da RCIU é entre 7 a 15% dos partos; já no Brasil considera-se de 10 a 15% (NETO *et al*, 2011).

Os processos patofisiológicos que acontecem a nível celular e molecular na RCIU são ainda desconhecidos. O crescimento do feto é afetado pelos nutrientes e oxigênio que recebe da mãe, cujo tamanho corporal, composição e metabolismo são influenciados pela genética e o ambiente (FANG, 2005). Os mecanismos responsáveis pelo crescimento fetal incluem uma regulação crítica de proliferação celular, organização e diferenciação do embrião, junto com uma sincronização do crescimento dos diferentes sistemas de órgãos. Esses processos dependem de fatores maternos, fetais e placentários (ERGAZ *et al*, 2005; MEDEIROS e GOUVEIA, 2005). Mudanças nesses fatores e interferências externas, como as condições socioeconômicas, os cuidados pré-natais, o uso de medicamentos, de drogas e as infecções podem interferir diretamente no crescimento fetal (DU PLESSIS, 2012). Uma redução na entrega de substratos que são necessários para o funcionamento normal celular, e uma alteração de mediadores moleculares que regulam o crescimento e a diferenciação celular podem ser mecanismos importantes. Com um decréscimo mínimo no substrato energético do feto, a formação de glicogênio, gordura e o crescimento muscular são limitados (FANG, 2005; ROSENBERG, 2008).

Entre as etiologias da RCIU, destacam-se a diminuição do fluxo sanguíneo uteroplacentário por um longo período de tempo, que pode levar a uma maior morbidade e mortalidade nas crianças (TASHIMA *et al*, 2001; NETO *et al*, 2011; DU PLESSIS, 2012). Enquanto nos países em desenvolvimento, a principal causa está relacionada com a baixa qualidade nutricional durante a gestação, nos países desenvolvidos, problemas na perfusão uteroplacentária e a incompetência do colo uterino são mais frequentes. As insuficiências vasculares levam à redução no transporte de nutrientes placentários, causando restrição do

crescimento e podendo levar a prematuridade. (HENRIKSEN e CLAUSEN, 2002; HUIZINGA, 2004; NETO *et al*, 2011; LONGO *et al*, 2013).

A RCIU pode ser diferenciada em “simétrica” ou “assimétrica”. Crianças com RCIU simétrica são menores de forma proporcional em comprimento, peso e tamanho da cabeça, para idade gestacional, sendo resultante de um insulto que geralmente ocorre precocemente durante a gestação. As causas de RCIU simétrica incluem condições genéticas, síndromes de nanismo, infecções virais congênitas, erros no metabolismo e exposição intrauterina a drogas (ROSENBERG, 2008). Nas crianças com RCIU assimétrica, o comprimento e peso do corpo estão diminuídos para a idade gestacional, mas há uma preservação do tamanho da cabeça e, portanto, a circunferência da mesma é apropriada para a idade gestacional (ERGAZ *et al*, 2005). Geralmente são de apresentação tardia durante a gestação e estão mais relacionadas com uma função uteroplacentária deficitária, pré-eclâmpsia, hipertensão crônica e diabetes, ou deficiências nutricionais (ROSENBERG, 2008; MORSING e MARŠÁL, 2013). Esse fenômeno é conhecido como um mecanismo de preservação do encéfalo, no qual o fluxo sanguíneo é redistribuído dentro do organismo para assegurar a integridade do sistema nervoso central, modificando assim o aporte do tronco e dos membros do feto que passa a ser direcionado ao encéfalo (FANG, 2005).

A morbidade em fetos com restrição de crescimento perinatal é cinco vezes maior em relação a crianças com crescimento fetal adequado, devido à maior frequência de complicações neonatais (GARITE *et al*, 2004). Entre as principais complicações estão a hipóxia, aspiração de mecônio, hipoglicemia, hipocalcemia, policitemia, hipotermia, hemorragia pulmonar e intravascular, sepse e enterocolite necrótica (GARITE *et al*, 2004; DAMODARAM *et al*. 2011; NETO *et al*, 2011). Outro fator que pode representar um importante mecanismo para o desenvolvimento de doenças neurológicas, e que está frequentemente associado à RCIU, é a neuroinflamação por sepse em estágios precoces do desenvolvimento (BURD *et al*, 2012; TIEN

et al, 2013). A sepse neonatal se mantém como uma complicação séria especialmente entre crianças prematuras com peso muito baixo ao nascimento. Sepse causada por *E. Coli* tem aumentado nos últimos anos, representando 24,5% dos casos (CAMACHO-GONZALEZ *et al*, 2013). Crianças prematuras com peso muito baixo ao nascer estão em risco de infecção principalmente pelo fato de ficarem hospitalizadas mais tempo, o que envolve procedimentos invasivos, além disso, os neonatos, especialmente os prematuros, são relativamente imunocomprometidos devido à imaturidade do sistema imune, assim como a passagem diminuída de anticorpos maternos pela placenta. As células neonatais têm uma menor capacidade para produzir citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α do inglês *Tumor Necrosis Factor*) e interleucina-6 (IL-6). (CHALLIS *et al*, 2009; CAMACHO-GONZALEZ *et al*, 2013)

Crianças nascidas prematuramente em associação à RCIU apresentam retardo no crescimento corporal e alterações no neurodesenvolvimento, assim como um maior risco de apresentar déficit cognitivo, dificuldade para alcançar maiores níveis acadêmicos e dificuldades na regulação das emoções e do comportamento quando comparadas com crianças sem RCIU (LEITNER *et al*, 2007; CLARK e WOODWARD, 2008; MORSING *et al*, 2011; FISCHIGÓMEZ *et al*, 2014). O déficit cognitivo é associado principalmente a dificuldades em tarefas de memória - especialmente em testes de reconhecimento de objetos e memória espacial-, habilidades de aprendizagem, funções viso-motoras, déficit de atenção e hiperatividade (LEITNER *et al*, 2007; DELOBEL-AYOUB, *et al*. 2009). O menor número de títulos acadêmicos não é atribuído somente às habilidades (coeficiente intelectual), mas também aos déficits específicos no aprendizado (LEITNER *et al*, 2007)

No entanto, o ambiente também interfere nos déficits comportamentais; onde e como a criança desenvolve-se tem um papel importante no aparecimento de déficits cognitivos, sendo que crianças com RCIU são mais vulneráveis a ambientes sociais adversos. Além disso, quando

o nível de escolaridade da mãe é baixo, há ainda maior prejuízo das habilidades de linguagem, memória e aprendizado em crianças nascidas com RCIU (KALLANKARI *et al*, 2014).

Estudos de neuroimagem, realizados em humanos, tem encontrado que no sistema nervoso central, esses déficits associam-se com volume reduzido da substância branca cortical, diminuição no volume do hipocampo e um padrão alterado de giros do encéfalo (PADILLA *et al*, 2014). A maior diferença estrutural entre uma criança com RCIU e uma PIG é a distribuição da substância branca e cinzenta, assim como a complexidade cortical no encéfalo, sendo desorganizada em crianças com RCIU (FISCHI-GÓMEZ *et al*, 2014; PADILLA *et al*, 2014). Também se sabe que há um significativo atraso na mielinização em crianças com RCIU assimétrica *in utero* (RAMENGGHI *et al*, 2011)

Além de alterações neurocognitivas, neurocomportamentais e maior risco para doenças psiquiátricas, a RCIU pode predispor ao desenvolvimento de uma série de outras doenças crônicas na vida adulta como, por exemplo, obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, aterosclerose, hipertensão e síndrome metabólica (HUIZINGA *et al*, 2004; HALES and BAKER, 1992; RICHEDWARDS, STAMPFER *et al*, 1997; RAVELLI, VAN DER MEULEN *et al*, 1999; PORTELLA e SILVEIRA, 2014).

1.1.2 Modelos animais de restrição de crescimento intrauterino

Estudos pré-clínicos têm sido conduzidos para investigar os efeitos da RCIU em diferentes espécies animais, como roedores, primatas e pequenos ungulados, assim como tem se utilizado diferentes metodologias para tal fim. Esses modelos são essenciais para estudarmos estratégias de tratamento e de prevenção dessa e de outras condições patológicas. Em roedores, a etapa gestacional compreende três períodos importantes: 1) período precoce, que corresponde ao período de pré-implantação, implantação e fase embrionária da vida (dias 0 a 7); 2) período intermediário que corresponde ao período de organogênese (8° a 14° dias); e 3) período que

corresponde à fase de rápido crescimento, diferenciação e maturação (15° a 22° dias) (BELLINGER e LANGLEY-EVANS, 2005).

Em ovelhas, é de uso comum o modelo de insuficiência placentária induzida por temperatura ambiente, onde se expõem ovelhas prenhes a condições hipertérmicas por aproximadamente 55 dias (37° a 99° dias pós-coito) ou 80 dias (40° a 120° dia pós-coito) resultando em uma restrição do crescimento tanto do feto quanto da placenta (BARRY *et al*, 2008). Em ratos, os modelos de restrição do crescimento variam bastante: desde a administração de tromboxano sintético A2 via intraperitoneal (i.p) na dose de 20 ng/h a partir do 13° dia de gestação (HAYAKAWA, 2006), a exposição das ratas prenhes a ambientes hipóxicos (12% O₂) do 15° até o 21° dia de gestação (RUEDA-CLAUSEN *et al*, 2009), restrição nutricional proteica (leve - 9% ou severa - 5% do aporte de proteína) ou calórica (severa- 70%, moderada - 50%, leve - 30% do aporte calórico) durante a gravidez (VUGUIN, 2007; ZOHDI *et al*, 2015), exposição a estressores e drogas, como o álcool e tabaco, durante a gravidez (VUGUIN, 2007) até a redução do aporte sanguíneo por meio da ligação ou colocação de cliques das artérias uterinas em diferentes períodos da gestação (ALEXANDER *et al*, 2001; LI *et al*, 2012).

Em ratos, os protocolos mais utilizados que reproduzem a RCIU por redução de fluxo sanguíneo do útero geralmente são realizados no 14°, 17° ou 19° dias de gestação. A ligação das artérias uterinas no 17° dia gestacional coincide com o período de rápido crescimento fetal em ratos, o que pode ser comparado ao terceiro trimestre gestacional em humanos (HUIZINGA, 2004; BELLINGER e LANGLEY-EVANS, 2005). A hipoperfusão uteroplacentária por ligação das artérias uterinas no 17° dia da gestação em ratas produz uma significativa redução do peso nos filhotes até o dia pós-natal 80 (P80) (HUIZINGA, 2004).

1.1.3 Neuroplasticidade na RCIU

A RCIU gera modificações importantes na estrutura celular e molecular do sistema nervoso central associadas a alterações no comportamento e no desempenho cognitivo. Foram estudadas algumas alterações nas células do sistema nervoso causadas pela restrição do crescimento intrauterino. Por exemplo, a redução do fluxo uteroplacentário por meio da ligação unilateral da artéria uterina na metade da gestação, foi capaz de causar lesões na substância branca encefálica e diminuição da mielinização, especialmente no corpo caloso e no bulbo, comparados aos neonatos sem RCIU em roedores (TOLCOS *et al*, 2011, DELCOUR *et al*, 2012). Ratos com RCIU mostraram atraso significativo na diferenciação de oligodendrócitos e mielinização, assim como diminuição no número de oligodendrócitos imaturos na região CA1 do hipocampo (SCHOBER *et al*, 2009). Tal redução pode afetar negativamente a função normal do hipocampo ao longo prazo, pois neurônios desta região são responsáveis por enviar a principal informação de saída do hipocampo ao córtex para o processamento de informação (SCHOBER *et al*, 2009; FUNG *et al*, 2012).

No entanto, outro estudo demonstrou que apesar do atraso na maturação de oligodendrócitos e mielinização *in utero*, essas modificações foram restauradas oito semanas após o nascimento, sugerindo que a RCIU retarda transitoriamente a maturação de oligodendrócitos e a mielinização no desenvolvimento (TOLCOS *et al*, 2011). Porém, apesar da aparente recuperação, deficiências comportamentais foram encontradas em ratas fêmeas com oito semanas de idade, sugerindo assim que os defeitos que acontecem cedo na mielinização têm efeitos permanentes (REID *et al*, 2013).

Também, a RCIU por ligação bilateral completa das artérias uterinas no 17º dia gestacional conseguiu produzir uma perda neuronal no córtex parietal e perda da estrutura estratificada do córtex encefálico em ratos machos e fêmeas (TASHIMA *et al*, 2001). Utilizando o mesmo modelo no 19º dia gestacional, Fung e colaboradores (2012) encontraram uma

diminuição no número de neurônios no hipocampo ao nascimento. Em machos houve uma diminuição de neurônios em CA1 e CA3 enquanto nas fêmeas houve diminuição no giro denteado (GD), estruturas diretamente associadas com a memória espacial. Também tem se encontrado menor contagem de células neuronais no córtex entorrinal e córtex somatossensorial primário (S1), assim como diminuição de interneurônios GABAérgicos em S1 com aumento dos mesmos no córtex pré-frontal, além disso, aumento da presença de Caspase 3 em neurônios apoptóticos em S1 (DELCOUR *et al*, 2012).

Em um modelo de RCIU com restrição proteica desde o 1º dia de gestação até o parto, houve um aumento de células apoptóticas no encéfalo. Esse aumento de células apoptóticas poderá levar a um prognóstico desfavorável na manifestação de doenças e transtornos neurológicos a longo prazo em crianças com restrição de crescimento. Nesse mesmo estudo, a suplementação do aminoácido Taurina a partir do 12º de gestação reduziu consideravelmente o número de células apoptóticas, aumento a expressão de fatores neurotróficos derivados das células gliais e diminuiu a expressão de Caspase 3 em amostras de tecido nervoso (LIU *et al*, 2013).

Outro tipo celular importante em processos patológicos dentro do SNC são os astrócitos. Considerando suas amplas funções de homeostase e sua presença tanto na substância branca como na cinzenta, os astrócitos estão também envolvidos em processos patológicos. Eles respondem a injúrias por meio da ativação de complexos bioquímicos e mudanças morfológicas. Esse processo é conhecido como “astroglíose reativa” e, posteriormente pode conduzir a proliferação celular e formação de cicatriz (LANCIOTTI *et al*, 2013). Há evidências que alterações na funcionalidade destas células têm um papel importante em doenças neurodegenerativas, doenças inflamatórias desmielinizantes, infecções, doenças metabólicas, intoxicações, leucodistrofias, epilepsia, enxaqueca e esquizofrenia (DE KEYSER *et al*, 2008). Delcour e colaboradores (2012) encontraram uma astroglíose persistente na substância branca

do córtex cingulado, córtex S1, córtex entorrinal e complexo hipocampal, em ratos de 60 dias de idade provenientes de mães submetidas a ligação unilateral no 17º dia gestacional. Esses achados são similares aos reportados por Fung e colaboradores (2012) num modelo de ligação bilateral no 19º dia gestacional. Os machos da prole apresentaram quantidades aumentadas de astrócitos em CA1 e CA3 no hipocampo quando comparados com animais controles.

No presente estudo, ratos de 30 dias de idade foram submetidos a dois testes de comportamento: Campo aberto e Reconhecimento do novo objeto. No campo aberto, expõe-se o rato a um novo ambiente, estimulando o comportamento exploratório natural - perante à novidade - do animal. Além disso, pode-se avaliar também a atividade motora.

Um recente estudo realizado em humanos, demonstra que o processamento na detecção de estímulos novos e familiares, e conseqüentemente a formação de memórias futuras, precisa da conectividade de regiões como o hipotálamo, a substância nigra, a área tegmental ventral, o estriado e o globo pálido (KAFKAS e MONTALDI, 2015). O estriado tem sido implicado também no controle motor sensitivo e nos comportamentos exploratórios induzidos por novidade (GRAYBIEL, 1995; LEUSSIS e BOLIVAR, 2006). Estudos em animais têm associado deficiências na plasticidade sináptica cortico-estriatal com dificuldades para habituação comportamental ao campo aberto (SERGEEVA *et al*, 2005), menor exploração, déficit no aprendizado espacial e na memória de objetos (SCHULZ *et al*, 2004; DERE *et al*, 2008).

Na memória de reconhecimento precisa-se um julgamento acerca da ocorrência prévia de um determinado estímulo. Esse julgamento pode ser feito baseado na familiaridade com objetos individuais, usando informação recente, ou integrando informações de associação entre o objeto e o local (BARKER *et al*, 2007). Em outras palavras o reconhecimento de objetos é a habilidade de discriminar a familiaridade de objetos previamente conhecidos (AKIRAV e

MAROUN, 2006). Estudos em animais têm sugerido amplamente a integração principalmente do córtex entorrinal, córtex orbito-frontal - uma região do córtex pré-frontal-, córtex pré-frontal ventromedial e a divisão magnocelular do núcleo talâmico dorso medial no processamento da memória de objetos, incluindo o reconhecimento de objetos e a recompensa associada a objetos (MEUNIER, BACHEVALIER e MISHKIN, 1997; XIANG e BROWN, 2004; AKIRAV e MAROUN, 2006).

Em humanos, outro tipo de aprendizado como o aprendizado espacial por reforço está associado a habilidades importantes como atenção, recompensa e processamento executivo (JARBO e VERSTYNEN, 2015). Essas funções dependem da integridade das vias corticoestriatais encarregadas da integração dessas informações. Estudos com ressonância magnética funcional têm associado a conectividade entre o cortex orbito-frontal, cortex pré-frontal dorso-lateal e parietal posterior dentro do estriado neste tipo de aprendizado. Demonstrando uma arquitetura convergente das projeções que integram a recompensa, o controle executivo e a atenção espacial na região do estriado (JARBO e VERSTYNEN, 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A prevalência de RCIU na nossa população é alta (10-15%) e há um aumento da sobrevivência de crianças com restrição do crescimento intrauterino, graças aos avanços nos cuidados neonatais nas últimas décadas. A relação entre RCIU e crianças com problemas cognitivos, déficit de aprendizado, alterações comportamentais, emocionais e transtornos psicológicos é evidente, porém ainda não está totalmente esclarecida. Estudar essa relação entre restrição de crescimento intrauterino e déficit cognitivo em modelos animais pode nos ajudar a esclarecer alguns aspectos dessa associação.

Além disso, há grande necessidade de maior entendimento dos mecanismos biológicos encefálicos consequentes a RCIU, e das possíveis modificações estruturais, no sistema nervoso central que interagem para determinar os desfechos comportamentais e no desempenho cognitivo de crianças nascidas como tal condição.

Uma das contribuições científicas advindas desse estudo é o estabelecimento de modelo animal factível e acessível, para assim, estudarmos como a redução do fluxo sanguíneo na unidade feto-placenta e a combinação de eventos durante e após a gestação interferem com o desenvolvimento dos filhotes. Os estudos realizados em modelos animais, como o aqui proposto, certamente permitirão que se consolidem e avancem os conhecimentos sobre as bases biológicas de alterações comportamentais induzidas por interferências durante a gestação. Espera-se que esse conhecimento também viabilize maior respaldo para que se invista em diagnóstico, prevenção, bem como tratamento dos distúrbios relacionados à redução do crescimento fetal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da restrição de crescimento intrauterino, por redução da pressão de fluxo uterino, sobre parâmetros comportamentais, de memória e neuroplasticidade em ratos Wistar.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da RCIU por RUPP sobre a atividade motora e exploratória dos filhotes utilizando o teste do campo aberto.

- Avaliar o efeito da RCIU por RUPP sobre a memória de longo prazo dos filhotes utilizando o teste de reconhecimento do novo objeto.

- Avaliar o efeito da RCIU por RUPP sobre a expressão de marcadores para neurônio (NeuN) e astrócito (GFAP) no córtex pré-frontal e estriado dos filhotes.

4. MÉTODO E RESULTADOS

4.1 Artigo: **Intrauterine growth restriction-induced hyperactivity and memory impairment are associated to prefrontal cortex and striatal neuroadaptations in adolescent rats.**

Cristian Figueroa, Francele Valente Piazza, Ethiane Segabinazi, Otavio Américo Augustin, Patricia Pelufo Silveira, Simone Marcuzzo.

Intrauterine growth restriction-induced hyperactivity and memory impairment are associated to prefrontal cortex and striatal neuroadaptations in adolescent rats.

Cristian Figueroa^{a,b}, Francele Valente Piazza^{a,b}, Ethiane Segabinazi^{a,b}, Otavio Américo Augustin^b, Patricia Pelufo Silveira^{ac}, Simone Marcuzzo^a.

^aPrograma de Pós-Graduação em Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

^bLaboratório de Histofisiologia Comparada, Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Faculdade de Medicina, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Simone Marcuzzo, PhD

Laboratório de Histofisiologia Comparada, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Rua Sarmiento Leite 500, CEP: 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil

Tel.: +55 51 33083624 Fax: +55 51 33083092

E-mail address simone.marcuzzo@ufrgs.br

ABSTRACT

INTRODUCTION: Intrauterine growth restriction (IUGR) is a condition where the fetus cannot develop its intrinsic growth potential. Children born with IUGR have impaired learning abilities, memory, attention and cognitive deficit in early scholar age; also, they have a higher risk for psychological disorders such as Attention Deficit and Hyperactivity Disorder (ADHD) when compared with non-IUGR children. **OBJECTIVE:** The study aims to find neurobiological brain modifications that could underlie these memory and behavioral impairments in a rat animal model of IUGR by Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP). **METHODS:** Pregnant Wistar rats were underwent to RUPP procedure on 14th gestational day, sham surgery or were left undisturbed generating three offspring groups: IUGR, Sham, and Control. The Novel Object Recognition (NOR) and the Open Field tests measured, respectively long-term object recognition memory, locomotor as also exploratory activity after the 30th postnatal day (PND). Immunohistochemistry procedures were conducted to measure the expression of neural cells markers: NeuN (neurons) and GFAP (astrocytes) in prefrontal cortex and striatum. **RESULTS:** IUGR and Sham offspring had decreased birth weight compared to controls; however, both groups showed catch up growth at PND30. RUPP procedure increased gestation length in IUGR rats in 1 day. IUGR animals had higher exploratory, locomotor activity at PND30 and memory impairment at PND32. Immunohistochemistry at PND34 revealed a significant increased expression of NeuN in prefrontal cortex in both IUGR and sham groups. However, increased GFAP marker in striatum was found specifically in the IUGR group. **CONCLUSIONS:** The RUPP disturbs pregnancy causing higher gestation length and IUGR in offspring, leading to behavioral and memory changes, as well as modifications at cellular brain level. Further studies are needed to find whether these changes are still present in adult life.

Key words: Intrauterine Growth Restriction, Small for gestational age, low birth weigh, Hyperactivity, Memory impairment, Behavior, Astrocytes, Immunohistochemistry.

INTRODUCTION

Intrauterine growth restriction (IUGR) could be defined as a condition in which the fetus cannot reach its intrinsic growth potential (Campbell *et al*, 2012). Despite the fact that there is a relationship between the concepts of IUGR and small for gestational age (SGA), they are not synonyms. IUGR is the result of pathological reduction of the growth rate due to injuries *in utero*; this condition could lead to SGA newborns, defined as birth weight below the 10th percentile of that predicted by their gestational age.(Ergaz *et al*, 2005; Neto *et al*, 2011).

IUGR prevalence babies is increasing in spite of the growing medical and pre-natal care efforts. In the United States, from 250.000 babies born per year, 40.000 babies that born at term weighing less than 2.500 g. (Ergaz *et al*, 2005). In general, the worldwide prevalence of IUGR is between 7% and 15% of the pregnancies (Neto *et al*, 2011).

In developing countries, the main cause of IUGR is the poor nutritional quality during pregnancy, while in developed countries it is often associated with maternal uterine and circulatory issues. Vascular insufficiency leads to impaired nutrient delivery to the placenta and fetus, causing IUGR and possibly prematurity (Henriksen & Clausen, 2002; Huizinga, 2004; Neto *et al*, 2011; Longo *et al*, 2013).

Besides being associates with impaired body growth and neural development, IUGR also is related to poor cognitive skills in scholars, especially with deficits in spatial memory, learning, executive and attention, as well as hyperactivity and low academic achievement in general compared to their non-restricted peers (Leitner *et al*, 2007; Delobel-Ayoub *et al*. 2009; Fisci-Gómez *et al*, 2014). It is relevant to highlight that the environment has an important role in establishing the behavioral and cognitive deficits, as IUGR children are more vulnerable to social adverse environments (Kallankari *et al*, 2014). These deficits are associated with reduced cortical white and grey matter volumes, reduced hippocampal volume and an altered pattern of

brain gyrification (Padilla *et al*, 2014). In addition, it is known that the myelination process is delayed in IUGR children (Ramenghi *et al*, 2011).

The IUGR brain's structural modifications can have long-term consequences and predispose these children to several diseases in adult life (Huizinga *et al*, 2004). In addition to neurocognitive and psychiatric conditions, IUGR individuals have increased predisposition to develop obesity, cardiovascular disease, type II diabetes, arteriosclerosis, hypertension, and metabolic syndrome (Hales and Baker, 1992; RichEdwards, Stampfer *et al*, 1997; Ravelli, Van der Meulen *et al*, 1999; Portella and Silveira, 2014).

There are several animal models to study IUGR. The main models uses food restriction and reduction of blood flow to the uterus during pregnancy (Tashima *et al*, 2001; Delcour *et al*, 2012; Liu *et al*, 2013) Other models based on exposure to stress, tobacco and alcohol are also used (Vuguin, 2007). These studies have found several structural and cellular modifications on the central nervous system (CNS). Including white matter injury, especially in the corpus callosum and internal capsule (Delcour *et al*, 2012), impaired myelination, decreased number of oligodendrocytes on the hippocampal CA1 region (Schober *et al*, 2009; Tolcos *et al*, 2011), neuronal loss in the parietal, entorhinal and somatosensory cortices and hippocampus (Tashima *et al*, 2001; Delcour *et al*, 2012; Fung *et al*, 2012). In addition, increased brain apoptotic cells (Liu *et al*, 2013) associated with increased number of activated astrocytes in white matter in cortex and hippocampus (Delcour *et al*, 2012; Fung *et al*, 2012). Behavioral outcomes associated to these changes are described as hyperactivity, as well as impaired memory and learning (Tashima *et al*, 2001; Delcour *et al*, 2012). However, these results were described separately and using different IUGR models. None of these studies related directly the behavioral outcomes with neural plasticity modifications.

This study used a protocol of reducing uterine perfusion pressure (RUPP) at gestational day 14 (G14) in Wistar rats. Our hypotheses were that rats subjected to this protocol would 1) induce IUGR that would be reflected in lower birth weight in comparison to sham and control groups 2) impair memory and affect locomotion and 3) these behavioral changes would be associated with altered neuronal and glial density in key areas related to attention and motor control such as the PFC and striatum. The striatum is implicated on the motor sensitive control and exploratory behavior induced by novelty (Graybiel, 1995; Leussis and Bolivar, 2006). The PFC and other cortical areas have been suggested for the processing of memory object, recognition of novelty and familiarity and spatial learning (Meunier, Bachevalier e Mishkin, 1997; Xiang e Brown, 2004; Akirav e Maroun, 2006).

MATERIAL & METHODS

Animals

The study was performed in the Animal Research Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Pregnant Wistar rats were randomly selected and housed individually in Plexiglas (65 x 25 x 15 cm) cages with sawdust-covered floors. Animals were kept in a controlled environment (lights on from 07:00 h to 19:00h, temperature at $22 \pm 2^\circ$ C, cage cleaning twice a week, food and water *ad libitum*). Proestrous rats were housed with one male overnight, and day 1 of pregnancy was defined when observing sperm through a vaginal smear. RUPP procedure was done on G14 as described previously (Granger *et al*, 2006) and below. Rats were classified in three groups: *IUGR*: complete RUPP procedure ($n=11$); *Sham*: surgery without RUPP procedure ($n=10$) and *control*: no surgical procedure at all ($n=11$). Rats had natural parturition. Birth was considered post-natal day (PND) 0, only males were selected for the study, females were euthanized by anesthesia overdose. The number of pups were culled to 8 per dam. Pups' weight was measured every 2 days until PND30. Dams and pups after weaning (PND

21) had free access to food (Rodent chow, Nutrilab, Colombo, Brazil) and water. All the experimental procedures were performed in accordance with national and international ethics guidelines and were approved by the Animal Research Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA, project number 13-0417).

RUPP procedure

A modified technique of the previously described model by Granger and others was used. A small-wide Horizon™ Titanium Ligating Clips (Ref 001201 Weck®) with a modified Horizon™ applicator (Ref 137082 Weck®) was used to reduce the flux of blood to the uterus. Briefly, under Isoflurane anesthesia, the abdominal cavity was approached by a midline incision; carefully the lower abdominal aorta was exposed and one clip (0.203mm interdiameter) was placed above the iliac bifurcation. (Alexander *et al*, 2003; LaMarca *et al*, 2005; Granger *et al*, 2006).

This procedure had shown an adaptive increased of blood flow from the ovarian arteries to the uterus. Consequently, a ligation clip (0.100 mm interdiameter) was placed on both right and left uterine branches of the ovarian arteries (Granger *et al*, 2006).

Open Field Test

To assess the spontaneous motor activity and exploratory behaviors (rearing and grooming) animals were exposed to the Open Field test consisting in a 40X40X40 cm Plexiglas arena. On 30th (habituation) and 31st PND (test), rats were placed inside the apparatus always looking at the same side and located in the same square. Both sessions were recorded with a high quality camera per 5 minutes (Tashima *et al*, 2001). The number of line crossings in the first minute, total number of line crossing, number of rearing and grooming in each session were evaluated on 15 - 20 animals per group.

Novel Object Recognition (NOR) test

On 32nd PND, NOR test was used to assess the long-term memory and cognition function. 15 to 20 rats per group were exposed to a 40X40X40 cm Plexiglas arena with two identical objects in size, color and texture (A - A) for 5 minutes. On 33rd PND, the rats were re-exposed to the arena with a new different object in size, color and texture (A - B) for another 5 min (Antunes and Biala, 2012). Time exploring object A and B during the both sessions were recorded. To prevent object preference bias the object A and B were switched from rat to rat, and the floor and walls of the apparatus and objects were thoroughly cleaned with a 70% ethanol solution after each session (Jorgensen *et al*, 2015). The objects were made of metal and glass, and had no natural significance for the rats and had never been associated with a reinforcer (Delcour *et al*, 2015). Both behavioral tests were performed at the same time of the day (from 09:00h to 11:00h) by the same researcher in the same laboratory conditions. Videos were analyzed by two blinded researchers using the X-Plo-Rat 2005 1.1.0[®] freeware, developed by Fernando Cardenas and Silvio Morato from the Laboratory of Exploratory Behavior, Department of Psychology and Education FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. The exploration parameters were previously defined as sniffing, licking and touching the object while facing it (Revsin *et al*. 2009; Piazza *et al*. 2011). The preference for exploring the object B was quantified as a percentage, as follows: Time exploring the relocated B / Total time exploring both objects X 100.

Histological procedures

On 34th PND the animals were deeply anesthetized with sodium thiopental (50 mg/kg, i.p.; Cristália, Brazil), injected with 1000 IU heparin (Cristália, Brazil) and euthanized by transcardiac perfusion using 200 mL of saline solution, followed by 200 mL of a solution containing 4% paraformaldehyde (Reagen, Brazil) diluted in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) using a

peristaltic pump (Milan, Brazil, 30 mL/min). The brains were dissected, post-fixed in the same fixative solution at room temperature for 4 h and cryoprotected by immersion in 15% and 30% sucrose solution (Synth, Brazil) in PBS at 4°C until they sank. The brains were then quickly frozen in isopentane (Merck, Germany), cooled in liquid nitrogen and kept in a freezer (−70 °C) for further analyses.

Coronal sections (40 µm thick) of the prefrontal cortex and striatum (5.20 to 4.70, +1.60 to -0.40 mm posterior to the bregma, respectively, Paxinos and Watson, 1998) were obtained using a cryostat (CM1850, Leica, Germany) at −20 °C. Slices were serially collected on gelatin-coated slides and processed for different immunostainings (described below).

Immunohistochemistry (IHC) procedures: NeuN PFC, GFAP striatum

Sections were fixed in ice-cold acetone (10 min) at room temperature and then washed in ice-cold phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4. Antigen retrieval was performed by heating sections in 0.01 M sodium citrate buffer (pH 6.0) in a thermostatic bath at 92 °C for 20 min. Sections were washed in PBS and the endogen peroxidase was inactivated with 3% hydrogen peroxide (Synth, Brazil) dissolved in PBS for 30 min. The tissues were washed in PBS and after in PBS containing 0.1% Triton X-100 (PBS-Tx), and pre-incubated with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma Aldrich, USA) in PBS-Tx for 30 min. Then, samples were separately incubated with monoclonal mouse anti-NeuN antibody (1:1000; Millipore, Brazil) to detect mature neurons in the PFC; primary polyclonal rabbit anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) antibody to detect astrocytes (1:1000; Dako, UK) in the striatum for 48h at 4°C. After washing in PBS-Tx, sections were incubated with the secondary antibody anti-mouse or anti-rabbit IgG conjugated with peroxidase (1:500, Sigma Aldrich, USA) at room temperature for 2 h. The immunohistochemical reaction was revealed using a solution of 0.06% 3,3-diaminobenzidine (DAB; Sigma Aldrich, USA) and 10% hydrogen peroxide for 5 min. Finally, the sections were

rinsed in PBS, dehydrated in ethanol, cleared with xylene and covered with synthetic Canada balsam (Chemical Reaction, Brazil) and coverslips. Negative control sections were prepared omitting the primary antibody. In order to minimize differences in the staining and background, all histological procedures were performed at the same time and using the same solutions (Xavier *et al*, 2005).

Optical densitometry (OD)

To measure the intensity of the immunoreactions it was used a semi-quantitative densitometry analysis. Digitalized images of the PFC and striatum, were obtained with a Nikon Optiphot-2 microscope (100 and 200 X, Tokyo, Japan) coupled to a Micrometric camera (Accu Scope, Commack, NY, USA). Using the software Image Pro Plus 6.0 (Media Cybernetics, USA), the images were converted to an 8-bit gray scale (0–255 gray levels) and the OD was obtained from mean of 3 squares, an AOI (Area of interest) measuring 4976.83 and 518684.7 μm^2 overlaid in the striatum and PFC, respectively. All of the lighting conditions and magnifications were held constant. From each animal, 10-24 images were analyzed (5-12 sections per animal, both left and right sides), 7-8 animals per group. The background correction and the optical density were calculated as described for Xavier and others, 2005

Statistical analysis

The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) to compare the difference between the groups. When there were statistically significant F values ($p < 0.05$), the Tukey *post hoc* test was used. Statistical analysis was performed using the Statistica 6.0 Software package (StatSoft, Inc., USA). All data are represented by mean \pm standard error of mean (S.E.M). Size of the sample was calculated based on previous published data.

RESULTS

Firstly, we studied the effect of bilateral reduced uterine perfusion pressure procedure on the fetal growth. One-way ANOVA revealed an effect of the RUPP procedure on birth weight ($F(2, 98) = 35.56; p < 0.05$). Despite there is no statistical difference in birth weight between IUGR and *Sham* groups, Tukey *pos hoc* test revealed significant difference of both groups when compared to Control group ($p < 0.001$). Groups showed no difference in body weight at PND30 ($F(2, 51) = 2.605, p > 0.05$) (Table.1). Also, RUPP had effect on the duration of pregnancy ($F(2, 25) = 6.2, p < 0.05$) (Fig. 1) being longer in IUGR groups (23 days) than in *Sham* (22.4 days) and Control group (22 days).

Open-field Test

One way ANOVA revealed significant main effect of the group on the number of crossings during first minute ($F(2, 54) = 6.95, p < 0.01$), total number of crossings ($F(2, 52) = 7.57, p < 0.001$), frequency of grooming ($F(2, 59) = 5, 21, p < 0.01$) but not in rearing behavior ($F(2, 50) = 1.17, p > 0.05$). The Tukey *post hoc* test showed that IUGR rats had a higher rate of locomotion in the first minute ($p < 0.01$) and total number of crossing in 5 minutes ($p < 0.001$) than *sham* and control groups; there was no difference between *Sham* and Control groups. The frequency of grooming was higher in IUGR group ($p < 0.05$) but there were no significant differences between groups in the frequency of rearing ($p > 0.05$) (Table 2).

Novel Object Recognition Test

In the sample trial, the time percentages for exploration of both objects were similar in all groups (IUGR: 45.69; *Sham*: 41.97; Control: 58.84; $p > 0.05$). One-way ANOVA of novel-object preference index showed significant differences between the groups ($F(2, 53) = 18.20, p < 0.001$). Tukey *post hoc* test revealed a significant decrease in the percentage of preference

for exploring the novel object in the IUGR and the *Sham* groups in comparison to controls ($p < 0.05$) (Fig. 2).

Expression of NeuN + neurons and GFAP + astrocytes

Analysis of neuronal immunoreactivity in the prefrontal cortex showed significant main effects of the group ($F(2, 13) = 11.16$; $p < 0.05$). The Tukey *post hoc* test revealed a significant increase in the OD of neurons in IUGR and *Sham* groups when compared to Controls ($p < 0.05$) (Fig.3).

Additionally, analysis of GFAP+ astrocytes immunoreactivity in the striatum showed significant main effect of the group ($F(2, 17) = 3.75$; $p < 0.05$). The Tukey *post hoc* showed a significant increase in the OD of GFAP in the IUGR compared to *Sham* and Control groups ($p < 0.05$) (Fig. 4)

DISCUSSION

In the present study, we found that RUPP procedure was able to reduce birth weight in IUGR group when compared to controls but not in comparison to *Sham*. However, no differences were found in body weight at PND30 between the experimental groups. Even though RUPP increased the length of gestation, birth weight in these groups was lower than controls. IUGR and *Sham* group showed long-term memory deficit in the Novel Object Recognition test at PND32 and increased neuronal optical density in prefrontal cortex when compared with the control group. Notably, rats exposed to the RUPP procedure had specific behavioral findings such as increased locomotor activity and exploratory behavior in the *open field* test and increased astrocyte optical density in striatum at PND34, demonstrating that the procedure was successful in inducing IUGR and its long-term consequences.

Our results show that blood flow reduction to the uterus at G14 was able to reduce the weight of neonates rats at birth as previously described (Tashima *et al*, 2001; Campbell *et al*, 2012), however, the same effect was seen in the *Sham* group. To our knowledge, this is the first study that uses both *sham* and intact animals as Controls. Laparotomy is a moderate to severe stressor in rats (Vuguin *et al*, 2007), therefore we attribute the low birth weight of the *Sham* group to the surgical procedure itself. Several models of IUGR are produced by exposing the pregnant rat to different stressors, such as loud noise, exposure to predators, heat chamber at 40°C or maternal restraint (Vuguin *et al*, 2007). The increased of circulating glucocorticoids as a physiological response to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis after acute stressors is well described (Fleshner *et al*, 1995). Additionally, It is known that IUGR babies have elevated levels of cortisol compared to normal babies (Goland *et al*, 1993), and this leads to a higher production of glucocorticoids by the placenta, specially in uteroplacental insufficiency, seen in preeclampsia (Goland *et al*, 1995). Finally, several studies have demonstrated that the prenatal exposition to glucocorticoids produces low birth weight both in animals and humans (Reinish *et al*, 1978; French *et al*, 1999; Seckl, 2004), being a possible explanation for the reduced birth weight seen in both IUGR and Sham groups in this study.

It is known that the disruption of maternal cytokine balance due to the exposure to a surgical procedure is associated with adverse pregnancy outcomes, such as miscarriage, abortion, preeclampsia, preterm labor and IUGR (Orsi e Tribe, 2008; Challis *et al*, 2009). Reduced availability of oxygen, resulting from reduced tissue perfusion, triggers a cellular response mediated by the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) leading to the increase of proinflammatory cytokines, a state well characterized in preeclampsia and hypertension (Challis *et al*, 2009). Therefore, this could explain the low birth weight in both IUGR and sham groups. In addition, the surgically induced placental ischemia in rats that undergo RUPP

procedure leads to elevated levels of circulating TNF- α , IL-6 and IL-7 (LaMarca *et al*, 2005), and these could be associated to the specific findings that we described in the IUGR group.

It is known that the exposure to isoflurane in the prenatal period does not affect litter size, viability, and weight compared to control animals (Kong *et al*, 2011), discarding the effect of the inhalant anesthetics on these outcomes.

At PND30, the groups did not differ significantly in body weight. This could be explained by the catch-up growth: a condition seen in both humans and animals, first described in growth-restricted children that underwent a period of illness or starvation after the cause of the retardation was removed (Prader *et al*, 1963). Catch-up growth is defined as a growth velocity above the statistical limits of normality for age during a defined period of time with the final goal of optimizing the organism for survival (William *et al*, 1974; Wit *et al*, 2002).

The Wistar rat natural gestational duration in normal conditions is 21-22 days (Cagen *et al*, 1999). Our study described an increased length of gestation in the IUGR mothers (23 days) compared to the Sham and Control group. It is suggested that exposition to stress and inflammation during gestation could be associated with shorter gestation length in humans (Wadhwa *et al*, 1998; Glynn *et al*, 2001) and animals (Paris *et al*, 2011). On the contrary, a study performing energetic challenges in musk shrews at different phases of pregnancy found that an acute reduction of 40% - 50% of food restriction at the pre-implantation phase caused an increased gestation length, suggesting that energetic and metabolic challenges experienced early in pregnancy delays the time of implantation (Kauffman *et al*, 2010). Our RUPP model is performed after the implantation phase, what lead us to suggest the existence of a compensatory mechanism of delaying the delivery to increase fetal growth. A similar finding is described in

a model of prenatal exposure to ethanol from gestational days 6 to 10 (Bond, 1982). We highlight that despite the longer gestational length, IUGR group had lower birth weight when compared to control animals.

We also found higher locomotor activity assessed by the total number of crossing and the first minute of exposure to the OF apparatus in the IUGR group. It is been reported increased locomotor activity in rats at PND40 (Delcour *et al*, 2012), PND187 (Wattez *et al*, 2014), and also, in mice at four months of life (Dexter *et al*, 2014). However, decreased locomotor activity at PND49 have been reported in rats (Tashima *et al*, 2001). This contradictory results may depend on the age of testing, the duration of the protocol and parameters used for the evaluation of the locomotor activity in the Open Field.

Other early life injury model such as an hypoxic event have been studied in non IUGR rats. A long-term hypoxic post-natal and intermittent antenatal hypoxia model caused hyperactivity on PND35 (Gramatté and Schmidt, 1986) and PND19 in male rats (Herman *et al*, 1999). IUGR-induced RUPP could also be considered an hypoxic-ischemic event in early life due to reduction of the blood flow to the uterus (LaMarca *et al*, 2005) supporting the locomotor activity outcomes seen in IUGR rats.

Besides the horizontal locomotion, rat's behavioral response to novelty is also characterized by vertical activation (rearing behavior), considered to reflect not only the exploratory activity, but also emotionally (Thiel *et al*, 1999). According to previous studies (Delcour *et al*, 2012) we did not find statistical significant difference between groups on the frequency of rearing. However, there is a slight tendency on IUGR rats to show more rearing behavior when compared to control animals. We hypothesize that IUGR may be more sensitive and react different to novelty and novel environments than control rats.

We also showed an increased frequency of grooming in the IUGR group. It has been suggested that this behavior works as a deactivating mechanism of self-directedness after extremely arousing conditions (Van Erp *et al*, 1994). Grooming is elicited after the administration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH), electrical stimulation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (Van Erp *et al*, 1991), intracerebroventricular or subcutaneous injections of oxytocin (Drago *et al*, 1985), stress, conflict situations, novel environment, frustration and anxiety (Katz, 1979; Nunes *et al*, 2012), suggesting that these pathways could be differentially modulated in IUGR rats. Our results suggest that IUGR rats presents higher anxiety induced by novelty, however, further specific tests are needed to confirm this hypothesis.

Our study also showed a memory deficit in a NOR test at PD33 in both IUGR and *Sham* groups. A similar model of IUGR founded short-term and long-term memory deficit in object-recognition task (Delcour *et al*, 2012), similar memory and attention impairment was founded in IUGR rabbits at PND70, equivalent to pre-adolescence human age, associated to long-term structural changes in grey matter areas in cortical and hippocampal regions (Illa *et al*, 2013). Performance on the NOR test depends on the hippocampal, medial temporal lobe, anterior cingulate cortex and prefrontal cortex integrity (Aggleton *et al*, 2010; Hammond *et al*, 2004; Preston & Eichenbaum, 2013; Weible *et al*, 2009); our results suggest that such structures could be altered, in a structural and molecular level, in IUGR and Sham groups, as described previously (Cintra *et al*, 1997; Black *et al*, 2004).

It is interesting to note that exposure to high concentrations of isoflurane (3%) on G14, for 1 to 4 hours, lead to impaired acquisition of spatial working memory and learning in adult offspring (Li *et al*, 2007, Palanisamy *et al*, 2011; Kong *et al*, 2011). It is suggested that isoflurane exposure diminishes the number of synapses and synaptophysin expression in the dentate gyrus and CA1 area, increasing apoptosis in the hippocampus (Kong *et al*, 2011; Xiong *et al*, 2014). We suggest that even though our study used Isoflurane (2% per 30 minutes) in the

surgical procedures, during a critical period of gestation, nor the time or the concentration was high enough to cause significant memory impairment in both IUGR and Sham group.

Surprisingly, the IUGR and *Sham* group had an increased neuronal optical density in prefrontal cortex, being greater in the IUGR group. To our knowledge, this is the first study to report increased neuronal optical density in PFC of IUGR rats at PND34. Similar results in striatum as well as frontal, temporal and parietal cortices are found after 30 and 60 days after a transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) followed by reperfusion, (Jiang *et al*, 2001). Proliferation and neurogenesis, measured by Bromodeoxyuridine (BrdU), is described to happen in the forebrain sub ventricular zone (SVZ) in the striatum and cortex adjacent to infarcts 10 and 20 days after stroke (Parent *et al*, 2002). We suggest that the surgical procedure promotes neurogenesis and cell proliferation on the offspring, possibly as a compensatory mechanism to overcome the injury. The PFC is involved in higher-order social, emotional, communication, and cognitive development, but increased cellularity not necessarily is linked to better cognitive performance. For example, a MRI study found that children with autism have an average 67% increase in prefrontal neurons than typically developing children (Courchesne *et al*, 2011). On the other hand, on study in IUGR rabbits (Batalle *et al*, 2014) demonstrated that the IUGR brain shows a decreased network infrastructure and different network reorganization, maybe as a compensatory mechanism, that could support evidence to behavioral and developmental changes described in this study.

Finally, we showed increased astrocytes' immunoreactivity in the IUGR offspring striatum compared to *Sham* and control groups at PND34; this finding is comparable to the striatal glial activation found after RUPP + interventricular lipopolysaccharide (LPS) injection at PND5 in rats (Campbell *et al*, 2012). The activation of glial cells results in complex downstream events, as they have both protective and destructive roles through the production of trophic and

toxic mediators (Campbell *et al*, 2012). In humans, astrogliosis is seen in several neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease (Nagele *et al*, 2004), inflammatory demyelinating diseases, human immunodeficiency virus-associated dementia, acute traumatic brain injury, and prion-associated spongiform encephalopathy (Eng and Ghirnikar, 1994). IUGR animals are described as having increased GFAP immunoreactivity in the corpus callosum at postnatal day 14, associated with white matter injury (Reid *et al*, 2013). It is interesting to note that brain striatal activity has an important role in locomotor behavior, and these behavior/neurohistological findings were specific to the IUGR (not sham) group in our study. Brain striatal lesion resulting from kainic acid injection leads to the same behavioral outcome of increased basal locomotor activity (Kafetzopoulos 1986) as described here; therefore we propose that the striatal astrogliosis that we reported in the IUGR group likely underlies the behavioral differences found in the Open Field in this group.

In conclusion, exposure to the RUPP procedure at G14 was able to produce IUGR in Wistar rats, with typical alterations in behavioral outcomes due to structural modifications in the developing brain of the animals. Since it is known that the reduction of blood flow to the uterus causes placental insufficiency, this event induces related abnormalities and predisposes to disturbances in the same way that hypoxic-ischemic injuries does, such as memory deficit and hyperactivity. Further histological and molecular analysis of the model is needed to corroborate the correlation with these behavioral changes.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Brazilian funding agencies: CNPq, CAPES, FAPERGS and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA). Figueroa C received an MSc grant from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil.

REFERENCES

Alexander, B. (2003) Placental insufficiency Leads To Development of Hypertension in Growth: restricted Offspring. *Hypertension*, (41): 457-462

Aggleton, J., Albasse, M., Aggleton, D., Poirier, G. and Pearce, J. (2010) Lesion of the rat perirhinal cortex spare the acquisition of a complex configural visual discrimination yet impair object recognition. *Behav Neuosci*, (1):56-68.

Akirav, I., Maroun, M. (2006) Ventromedial Prefrontal Cortex Is Obligatory for Consolidation and Reconsolidation of Object Recognition Memory. *Cerebral cortex*, (12):1759-1765.

Antunes, M. and Biala, G. (2012) The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, (13):93-110.

Batalle, D., Muñoz-Moreno, E., Arbat-Plana, A., Illa, M., Figuers, F., Eixarch, E and Gratacos, E. (2014) Long-term reorganization of structural brain networks in a rabbit model of intrauterine growth restriction. *Neuroimage*, DOI: 10.1016/j.neuroimage.2014.05.065.

Black, LS., DeRegnier, R., Long, L., Georgieff, MK. and Nelson, CA. (2004) Electrographic imaging of recognition memory in 34–38 week gestation intrauterine growth restricted newborns. *Experimental Neurology*, (190):72-83.

Bond, N. (1982) Prenatal exposure to ethanol: association between increased gestational length and offspring mortality. *Neurobehav Toxicol Teratol*, (5):501-3.

Cagen, s., Waechter, M., Dimond, S., Breslin, W., Butala, H., Jekat, F., Joiner, R., Shiotsuka, R., Veenstra, G. and Harris, L. (1999) Normal Reproductive Organ Development in Wistar Rats Exposed to Bisphenol A in the Drinking water. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. (30): 130–139.

Campbell, L., Pang, Y., Ojeda, N., Zheng, B., Thodes, P., and Alexander, B. (2012). Intracerebral lipopolysaccharide induces neuroinflammatory change and augmented brain injury in growth-restricted neonatal rats. *Pediatric Research*, (71):645-652.

Challis, J., Lockwood, C., Myatt, L., Norman, J., Strauss, J. and Petraglia, F. (2009) Inflammation and Pregnancy. *Reproductive Sciences*, (2):206-215.

Cintra, L., Aguilar, A., Granados, L., Galvan, A., Kemper, T., DeBassio, W., Galler, J., Morgane, P., Duran, P. and Diaz-Cintra, S. (1997) Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups. *Hippocampus*, (7):192–203

Courchesne, E., Mouton, P., Calhoun, M., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M., Barnes, C. and Pierce, K. (2011) Neuron Number and Size in Prefrontal Cortex of Children With Autism. *JAMA*, (18):2001-2010.

Delobel-Ayoub, M., arnaud, C., White-Koning, M., Casper, C., Pierrat, V., Garel, M., Burguet, A., Roze, J., Matis, J., Picaud, J., Kaminski, M. and Larroque, B., EPIPAGE study group. (2009) Behavioral problems and cognitive performance at 5 years of age after very preterm birth: the EPIPAGE Study. *Pediatrics*, (6):1485-92.

Delcour, M., Olivier, P., Chambon, C., Pansio, J., Russier, M., Liberge, M., Xin, D., Gestreau, C., Alescio-Lautier, B., Gressens, P., Verney, C., Barbe, M., Baud. O. and Coq, J. (2012) Neuroanatomical, sensorimotor and cognitive deficits in Adult Rats with Matter Injury Following Prenatal Ischemia. *Brain Pathology*, (22):1–16.

Dexter, BC, Rahmouni, K., Cushman, T., Herman, GM., Ni, C., Nopoulus, PC., Thedens, DL. and Roghair, RD. (2014) Neonatal leptin deficiency reduces frontal cortex volumes and programs adult hyperactivity in mice. *Behav Brain Res*, (15):115-21.

Drago, F., Pedersen, C., Caldwell, J. and Prange, A. (1985) Oxytocin Potently Enhances Novelty-Induced Grooming Behavior in the Rat. *Brain Research*, (386):287-295.

Eng, LF and Ghirnikar, RS. (1994) GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol*, (4):229 –237.

Ergaz, Z., Avgil, M., and Ornoy, A. (2005) Intrauterine growth restriction—etiology and consequences: What do we know about the human situation and experimental animal models?. *Reproductive Toxicology*. 20, 301-322.

Fischi-Gómez, E., Vasung, L., Meskaldji, D., Lazeyras, F., Borradori-Tolsa, C., Hagmann, P., Brisnikov, K., Thiran, J. and Hüppi, P. (2014) Structural Brain Connectivity in School-Age Preterm Infants Provides Evidence for Impaired Networks Relevant for Higher Order Cognitive Skills and Social Cognition. *Cerebral Cortex*, doi:10.1093/cercor/bhu073

Fleshner, M., Deak, T., Spencer, RL., Godfrey, M. and Newnham, JP. (1995) A long-term increase in basal levels of corticosterone and a decrease in corticosteroid-binding globulin after acute stressor exposure. *Endocrinology*, (12):5336-42.

French, NP., Hagan, R., Evans, SF., Godfrey, M., Newnham, JP. (1999) Repeated antenatal corticosteroids: size at birth and subsequent development. *Am J Obstet Gynecol*, (180):114-21.

Fung, C., Ke, X., Brown, A, Yu, X., Mcknight, R. and Lane, R. (2012) Uteroplacental insufficiency alters rat hippocampal cellular phenotype in conjunction with ErbB receptor expression. *Pediatr Res*. 1, 2-9

Glynn, LM., Wadhwa, PD., Dunkel-Schetter, C., Chicz-DeMet, A. and Sandman CA. (2001) When stress happens matters: Effects of earthquake timing on stress responsivity in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, (4): 637–642

Goland, RS., Jozak, S., Warren, WB., Conwell, IM., Stark, RI. and Tropper, PJ. (1993) Elevated levels of umbilical cord plasma cortico- tropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (77): 1174–1179.

Goland, RS., Tropper, PJ., Warren, WB., Stark, RI., Jozak, SM. and Conwell, IM. (1995) Concentrations of corticotropin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies complicated by preeclampsia. *Reproduction, Fertility, and Development*, (7) 1227 – 1230.

Grabyel, AM. (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol*, (5):733–741

Gramatté, T., and Schmidt, J. (1986). The effect of early postnatal hypoxia in the development of locomotor activity in rats. *Biomed Biochim Acta*, (45):523-529.

Granger, J., LaMarca, BB., Cockrell, K., Sedeek, M., Balzi, C., Chandler, D. and Bennet, W. (2006) Reduced uterine perfusion pressure (RPPU) model for studying cardiovascular-renal dysfunction in response to placental ischemia. *Methods Mol Med*. (122): 383-92.

Hales, CN. and Barker, DJ. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, (7):595-601.

Hammond, R., Tull, L. and Stackman, R. (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*, (82):26-34.

Henriksen, T. and Clausen, T. (2002) The fetal origins hypothesis: placental insufficiency and inheritance versus maternal malnutrition in well-nourished populations. *Acta Obstet Gynecol Scand*, (81):112–4.

Huang, P., Gou, W., Jiang, M., Zhang, R. and Sun, Y. (2009) Impairment of spatial learning and memory in rat offspring with fetal growth restriction. *Journal of Nnjing Medical University*, (1):54-58.

Huizinga, C., Engelbregt, M., Rekers-Mombarg, L., Vaessen, S., Delemarre-van, H. and Fodor, M. (2004) Ligation of the Uterine Artery and early Postnatal food restriction – Animal Models for Growth Retardation. *Horm Res*, (62):233-240.

Illa, M., Eixarch, E., Batalle, D., Arbat-Plana, A., Muñoz-Moreno, E., Figueras, F. and Gratacos, E. (2013) Long-Term Functional Outcomes and Correlation with Regional Brain Connectivity by MRI Diffusion Tractography Metrics in a Near-Term Rabbit Model of Intrauterine Growth Restriction. *PLoS One*, (8):e76453.

Jiang, W., Gu, W., Brännström, T., Rosqvist, R., Wester, P. (2001) Cortical Neurogenesis in Adult Rats After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke*, (32):1201-1207

Jorgensen, P., Krych, L., Pedersen, TB., Plath, N., Redrobe, JP., Hansen, AK., Nielsen, DS., Pedersen, CS., Larsen, C. and Sorensen, DB. (2015) Investigating the long-term effect of sub-chronic phencyclidine-treatment on novel object recognition and the association between the gut microbiota and behavior in the animal model of schizophrenia. *Physiol behav*, (141):32-9

Kafetzopoulos, E. (1986) Effects of amphetamine and apomorphine on locomotor activity after kainic acid lesion of the nucleus accumbens septi in the rat. *Psychopharmacology*, (3) 271-271

Kallankari, H., Kaukola, T., Olsén, P., Ojaniemi, M. and Hallman, M. (2014) Very preterm birth and foetal growth restriction are associated with specific cognitive deficits in children attending mainstream school. *Acta paediatrica*, (1):84-90.

Katz, R. and Roth, K. (1979) Stress induced grooming in the rat – an endorphin mediated syndrome. *Neuroscience letters*, (13):209-212.

Kauffman, AS., Bojkowska, K. and Rissman, EF. (2010) Critical periods of susceptibility to short-term energy challenge during pregnancy: Impact on fertility and offspring development. *Physiol Behav*, (1):100-8

Kong, F., Xu, L., He, D., Zhang, X., and Lu, H. (2011) Effects of gestational isoflurane exposure on postnatal memory and learning in rats. *European Journal of Pharmacology*, (1):168-74.

LaMarca, B., Bennett, A., Alexander, B., Cockrell, K. and Granger, J. (2005) Hypertension produced by reductions in uterine perfusion in the pregnant rat: role of tumor necrosis factor-alpha. *Hypertension*, (4):1022-5.

Leitner, Y., Fattal-Valeski, A., Geva, R., Eshel, R., Toledano-Alhadeef, H., Rotstein, M. and Bassan, H., Radianu, B., Bitchonsky, O., Jaffa, A. and Harel, S. (2007) Neurodevelopmental Outcome of Children With Intrauterine Growth Retardation: A Longitudinal, 10-Year Prospective Study. *Journal of Child Neurology*, (5):580-587

Leussis, MP. and Bolivar, VJ. (2006) Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*, (30):1045–1064.

Li, Y., Liang, G., Wang, S., Meng, Q., Wang, Q. and Wei, H. (2007) Effects of fetal exposure to isoflurane on postnatal memory and learning in rats. *Neuropharmacology*, (53):942–950.

Liu, J., Wang, X., Liu, Y., Yang, N., Xu, J. and Ren, X. (2013) Antenatal taurine reduces cerebral cell apoptosis in fetal rats with intrauterine growth restriction. *Neural Regen Res.* 23, 2190–2197.

Longo S., Bollani L., Decembrino L., Di Comite A., Angelini M. and Stronati M. (2013) Short-term and Long-term sequelae in intrauterine growth retardation (RCIU). *J matern Fetal Neonatal Med.* (26):222-5.

Meunier, M., Bechevalier, J., Mishkin, M. (1997) Effects of orbital frontal and anterior cingulate lesions on object and spatial memory in rhesus monkeys. *Neuropsychologia*, (7):999-1015.

Nagele, RG., Wegiel, J., Venkataraman, V., Imaki, H., Wang, KC., Wegiel, J. (2004) Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, (25):663– 674.

Neto, A., Córdoba, J. and Peraçoli, J. (2011) Etiologia da restrição de crescimento intrauterino (RCIU). *Com. Ciências Saúde*, (1):S21-S30.

Nunes, H., Pezzato, F. and Hoshino, K. (2012) Self-grooming, experimental anxiety and paradoxical sleep deprivation in rats. *Sleep Science*, (1):19-23

Orsi, N. and Tribe, R. (2008) Cytokine networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *Journal of Neuroendocrinology*, (4):462-9.

Padilla, N., Junqué, C., Figueras, F., Sanz-Cortes, M., Bargalló, N., Arranz, A., Donaire, A., Figueiras, J. and Gratacos, E. (2014) Differential vulnerability of gray matter and white matter to intrauterine growth restriction in preterm infants at 12 months corrected age. *Brain Research*, (1545):1-11.

Palanisamy, A., Baxter, M., Keel, P, Xie, Z., Crosby, G. and Culley, D. (2011) Rats exposed to isoflurane in utero during early gestation are behaviorally abnormal as adults. *Anesthesiology*, (3):521-8.

Parent, J., Vexler, Z., Gong, C., Derugin, N., Ferreiro, D. (2002) Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Annals of Neurology*, (52):802-813.

Paris, JJ., Brunton, PJ, Russell, JA. and Frye, CA. (2011) Immune stress in late pregnant rats decreases length of gestation and fecundity, and alters later cognitive and affective behaviour of surviving pre-adolescent offspring. *Stress*.(6):652-64.

Paxinos G. and Watson C. (1998) The rat brain stereotaxic coordinates. Orlando, Fl. Academic Press.

Piazza, F., Pinto, G., Trott, G., Marcuzzo, S., Gomez, R. and Fernandes, M. (2011) Enriched environment prevents memory deficits in type 1 diabetic rats. *Behav Brain Res*, (217):16–20.

Portella, AK. and Silveira, PP. (2014) Neurobehavioral determinants of nutritional security in fetal growth-restricted individuals. *Ann N Y Acad Sci*, doi: 10.1111/nyas.12390

Prader, A., Tanner, J. and Harnack, G. (1963) Catch-up growth following illness or starvation. An example of developmental canalization in man. *J pediatr*, (62):646-59

Preston, A. and Eichenbaum, H. (2013) Interplay of hippocampus and prefrontal cortex in memory. *Curr Biol*, (17):764-773.

Ramenghi, L., Martinelli, A., De Carli, A., Brusati, V., Mandia, L., Fumagalli, M., Triulzi, F., Mosca, F. and Cetin, I. (2011) Cerebral Maturation in IUGR and Appropriate for Gestational Age Preterm Babies. *Reproductive Sciences*, (5):469-475

Ravelli, A., van der Meulen, J., Osmond, C., Barker, D., Bleker, O. (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally¹:²:³. *Am J Clin Nutr*, (5)811-816.

Reid, M., Murray, K., Marsh, E., Golden, J., Simmons, R., e Grinspan, J. (2013) Delayed Myelination in an Intrauterine Growth Retardation Model Is Mediated by Oxidative Stress Upregulating Bone Morphogenetic Protein 4. *J Neuropathol Exp Neurol*, (7):640-653

Reinish, JM., Simon, NG., Karow. and Gandelman, R. (1978) Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science* (202): 436-438

Revsin, Y., Rekers, N., Louwe, M., Saravia, F., Nicola, A., Kloet, E. and Oitz, M. (2009) Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin- induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology*, (34):747–58.

Rosenberg, A. (2008) The IUGR newborn. *Semin Perinatol*. (3): 219-24

Rich-Edwards, JW., Stampfer, MJ., Manson, JE., Rosner, B., Hankinson, SE., Colditz, GA., Willett, WC., Hennekens, CH. (1997) Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *British Medical Journal*, (7105):396-400.

Schober, ME., McKnight, RA., Yu, X., Callaway, CW., Ke, X., and Lane, RH. (2009) Intrauterine growth restriction due to uteroplacental insufficiency decreased white matter and altered NMDAR subunit composition in juvenile rat hippocampi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, (3):R681-92.

Seckl, JR. (2004) Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol*, (3):U49-62

Tashima, L., Nakata, M., Anno, Kikue., Sugino, N. and Kato, H. (2001). Prenatal Influence of ischemia-hypoxia-induced intrauterine growth retardation on brain development and Behavioral Activity in Rats. *Biol Neonate*. (80): 81–87.

Thiel, C., Huston, J., and Schwarting, R. (1998) Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*, (4):1253-62.

Tolcos, M., Bateman, E., O’dowd, R., Markwick, R., Vrijssen, K., Rehn, A., Rees, S. (2011) Intrauterine growth restriction affects the maturation of Myelin. *Exp Neurol*. 232, 53-65.

Van Erp, AM., Kruk, MR., Meelis, W. and Willekens-Bramer DC. (1994) Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self- grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behav Brain Res*, (1):47-55.

Van Erp, A., kruk, M., Willekens-Bramer, D., Bressers, W., Roeling, T, veening, J. and Spruyt, B. (1991) Grooming induced by intrahypothalamic injection of ACTH in the rat: comparison

with grooming induced by intrahypothalamic electrical stimulation and i.c.v. injection of ACTH. *Brain research*, (2):203-10.

Vuguin, P. (2007) Animal Models for Small for Gestational Age and Fetal Programming of Adult Disease. *Horm. Res*, (3):113-123.

Wadhwa, PD., Porto M., Garite, TJ., Chicz-DeMet, A. and Sandman CA. (1998) Maternal corticotropin-releasing hormone levels in the early third trimester predict length of gestation in human pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, (4):1079–1085

Wattez, JS., Delahave, F., Barella, LF., Dickes-Coopman, A., Montel, V., Breton, C., Mathias, P., Foligne, B., Lesage, J. and Vieau, D. (2014) Short- and long-term effects of maternal perinatal undernutrition are lowered by cross-fostering during lactation in the male rat. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, (2): 109–120.

Weible, A., Rowland, D., Pang, R. and Kentros, C. (2009) Neural correlates of novel object and novel location recognition behavior in the mouse anterior cingulate cortex. *J. Neurophysiol*, (102):2055-2068.

Williams, J., Tanner, J., Hughes, P. (1974) Catch-up Growth in Male Rats after Growth Retardation during the Suckling Period. *Pediat. Res*, (8):149-156

Wit, J. and Boersma, B. (2002) Catch-up growth: definition, mechanisms, and models. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab*, (5):1229-41.

Xavier, L., Viola, G., Ferraz, A., Da Cunha, C., Deonizion, J., Netto, C. and Achaval, M. (2005) A simple and fast densitometric method for the analysis of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the substantia nigra pars compacta and in the ventral tegmental area. *Brain Res Protoc*, (16):58-64

Xiang, JZ., Brown, MW. (2004) Neuronal responses related to long-term recognition memory processes in prefrontal cortex. *Neuron*, (5):817-29.

Xion, M., Li, J., Alhashem, H., Tilak, V., Patel, A., Pisklakov, S., Siegel, A., Ye, J. and Bekker, A. (2014) Propofol Exposure in Pregnant Rats Induces Neurotoxicity and Persistent Learning Deficit in the Offspring. *Brain Sci*, (2):356-375.

Tables

Group	PND0	PND30	<i>n</i>
Control	7.41±0.05	127.62±3.23	42
<i>Sham</i>	6.64±0.08*	128.05±2.0	33
IUGR	6.77±0.08*	130.02±3.11	26

Table 1. Weight in grams (g). * IUGR and Sham showed low birth weight in comparison with Control group ($p < 0.001$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Mean \pm S.E.M of absolute values. PND0=Birth.

Group	Crossings (1')	Total crossings	Rearings	Groomings
Control	48.11±1.73	150.125±5.90	49.96±2.37	1.80±0.12
<i>Sham</i>	48.57±1.36	158.90±3.86	50.54±2.9	1.89±0.17
IUGR	54.39±0.70*	174.67±3.45*	55.08±1.77	2.47±0.18*

Table 2. Open-Field test. Mean \pm S.E.M Number of first minute crossing, total crossings, frequency of rearing and grooming behavior at PND32. One-way ANOVA + Tukey post hoc test. * IUGR showed increased locomotor activity and ($p < 0.01$) and grooming behavior ($p < 0.05$) compared to *Sham* and Control groups. $n = 15-22$ per group.

Figures

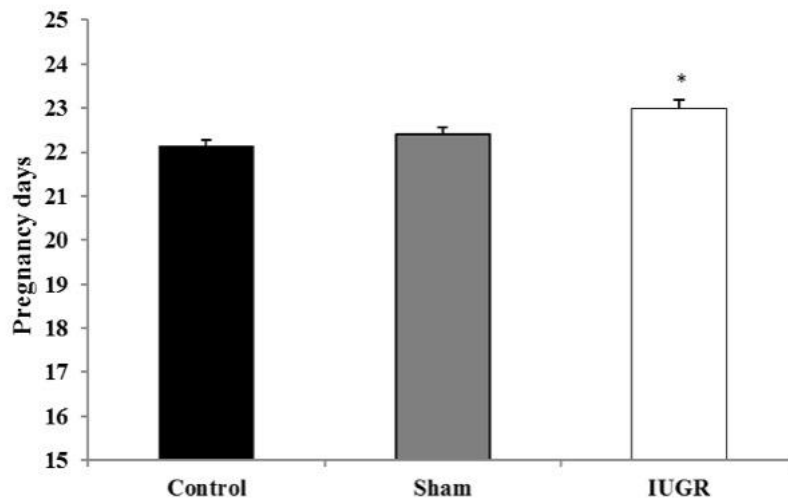


Figure 1. Length of gestation (days). *IUGR ($n=11$) and Sham ($n=10$) presented increased length of gestation period compared to Controls ($n=7$) ($p<0.05$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Data expressed as Mean±S.E.M.

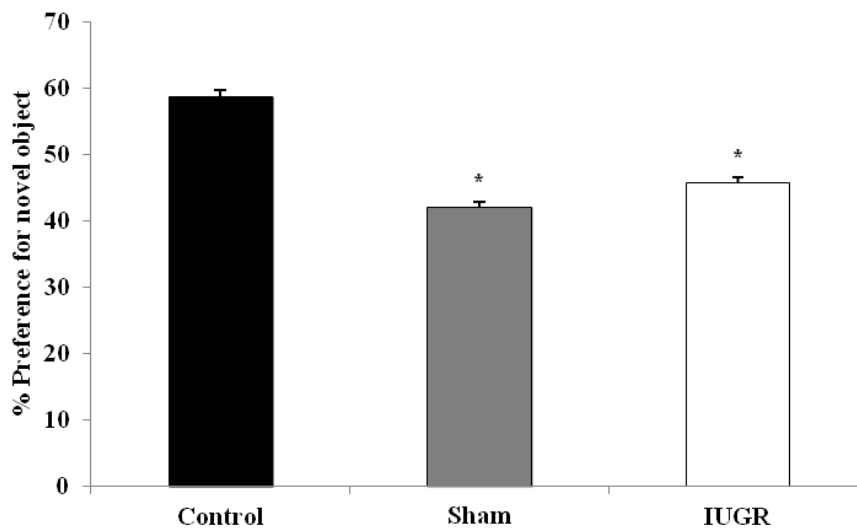


Figure 2. Percentage of preference for the novel object during test trial in the NOR Test at PND33. *IUGR ($n=17$) and Sham ($n=19$) groups showed less exploration of the novel object in comparison to Control group ($n=20$) ($p<0.05$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Data expressed as Mean±S.E.M.

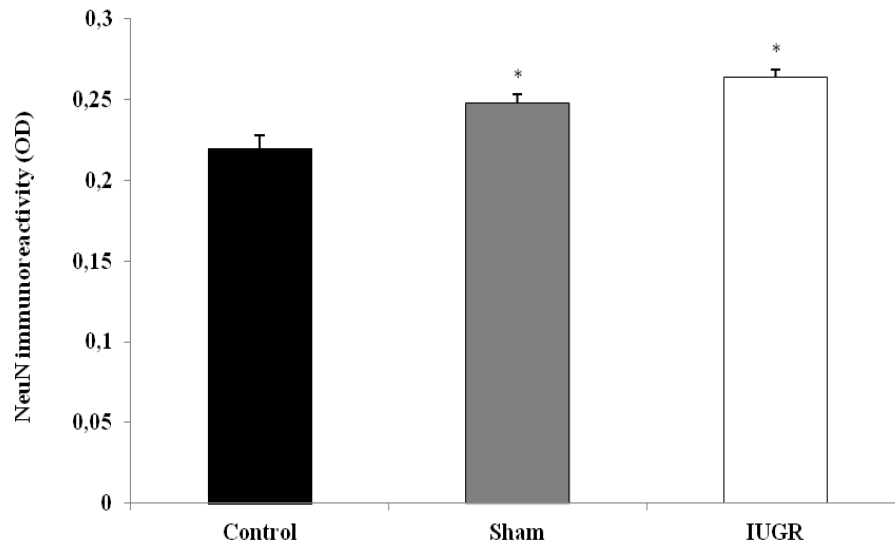
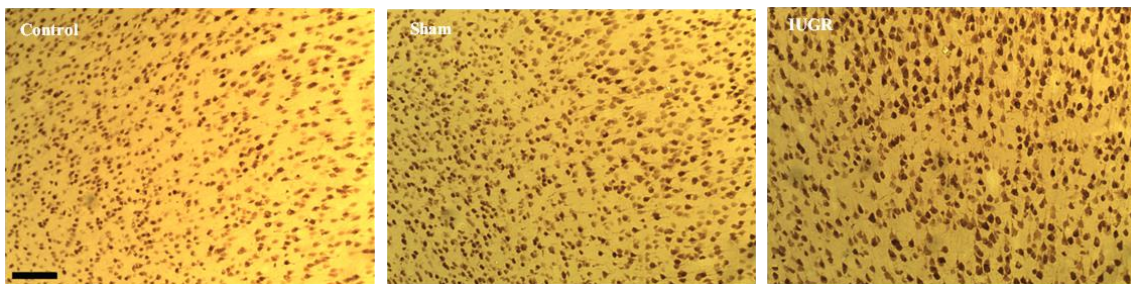
A**B**

Figure 3. Effect of IUGR on NeuN in prefrontal cortex (PFC). (A) Optical Density (OD) measurement of NeuN Immunoreactivity in PFC at PND34. (B) Digital images of representative coronal sections of the PFC stained for NeuN. *IUGR ($n=5$) and Sham ($n=5$) showed increased immunoreactivity in PFC compared to control group ($n=6$)($p<0.05$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Data expressed as Mean \pm S.E.M.

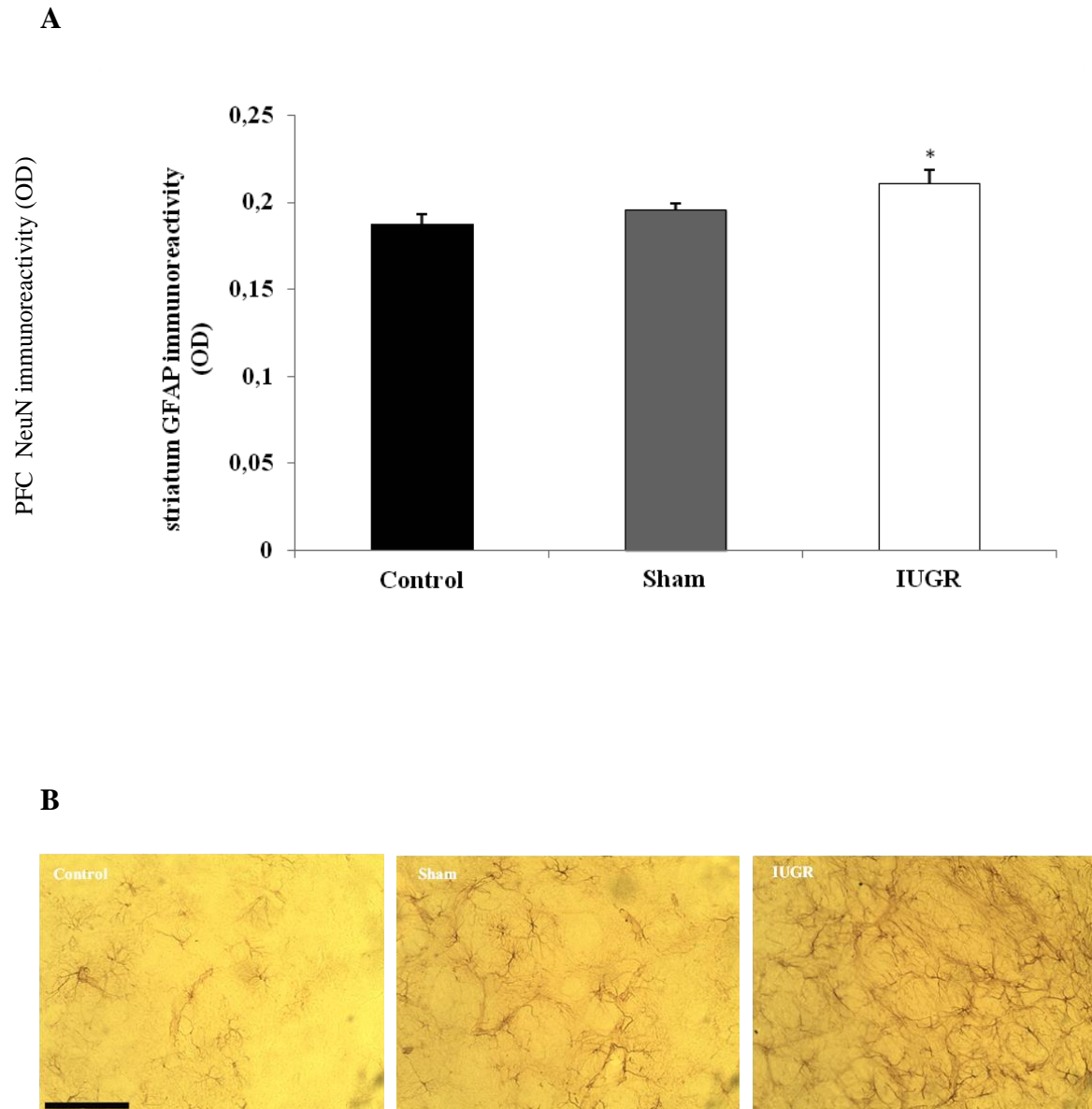


Figure 4. Effect of IUGR on GFAP in striatum. (A) Optical Density (OD) measurement of GFAP immunoreactivity in striatum at PND34. (B) Digital images of representative coronal sections of the striatum stained for GFAP. *IUGR ($n=7$) showed increased immunoreactivity in striatum compare to *Sham* ($n=6$) and Control ($n=7$) groups ($p<0.05$). One-way ANOVA + Tukey post hoc test. Data expressed as Mean \pm S.E.M.

5. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a redução da pressão de percussão uterina é capaz de induzir restrição de crescimento intrauterino em ratos Wistar e tem efeitos sobre o comportamento, a memória e parâmetros de neuroplasticidade na adolescência.

A RPPU foi capaz de reduzir o peso ao nascimento no grupo RCIU quando comparado ao grupo controle, mas não em comparação com o grupo *Sham*. No entanto, não foram encontradas diferenças no peso corporal no P30 entre os grupos experimentais. Embora os grupos RCIU e *Sham* apresentaram um aumento na duração da gestação, o peso ao nascimento nestes grupos foi menor do que os controles, ambos apresentaram déficit de memória de longo prazo no teste de reconhecimento do novo objeto no P32 e aumento da densidade óptica neuronal no córtex pré-frontal, quando comparado com o grupo controle. Apesar de não haver diferença entre RCIU e *Sham* nesses parâmetros, o procedimento de RPPU causou efeitos comportamentais específicos tais como hiperatividade no teste de campo aberto e incremento na densidade óptica de astrócitos no estriado no P34, demonstrando que o procedimento foi bem sucedido na indução de RCIU e suas consequências a longo prazo.

Os nossos resultados mostram que a redução do fluxo sanguíneo para o útero no G14 foi capaz de reduzir o peso de ratos recém-nascidos como anteriormente descrito (TASHIMA *et al*, 2001; CAMPBELL *et al*, 2012), no entanto, o mesmo efeito foi observado no grupo *Sham*. Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que usa tanto *Sham* e animais intactos como controles. A laparotomia é um estressor moderado a grave em ratos (VUGUIN *et al*, 2007), portanto, sugere-se que o baixo peso ao nascimento do grupo *Sham* deve-se ao procedimento cirúrgico em si. Vários modelos de RCIU são produzidos pela exposição da rata grávida a diferentes fatores de estresse, como barulho alto, a exposição a predadores, câmara de calor a 40 °C ou restrição materna (VUGUIN *et al*, 2007). Por outro lado, a exposição ao isoflurano no período pré-natal não afeta o tamanho de ninhada, a viabilidade e peso em comparação com

os animais de controle (KONG *et al*, 2011), descartando-se o efeito dos anestésicos inalantes sobre estes resultados.

Apesar de não termos medido marcadores inflamatórios nas mães ou nos filhos, sabe-se que a ruptura do equilíbrio das citocinas maternas devido à exposição a um procedimento cirúrgico está associado a resultados adversos na gravidez, tais como aborto espontâneo, pré-eclâmpsia, trabalho de parto prematuro e RCIU (ORSI e TRIBE, 2008; CHALLIS *et al*, 2009). A disponibilidade reduzida de oxigênio, resultante da reduzida perfusão dos tecidos, desencadeia uma resposta celular mediada pelo fator de transcrição induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α) que conduz ao aumento de citocinas pró-inflamatórias, um estado bem caracterizado na pré-eclâmpsia e hipertensão (CHALLIS *et al*, 2009). Portanto, isso poderia explicar o baixo peso ao nascimento dos grupos RCIU e *Sham*. Além disso, a isquemia placentária induzida cirurgicamente em ratos que sofrem RPPU conduz a níveis elevados de TNF- α , IL-6 e IL-7 (LAMARCA *et al*, 2005), e estes podem estar associados com os achados específicos que encontramos no grupo RCIU.

No P30, os grupos não diferiram significativamente no peso corporal. Isto pode ser explicado pelo crescimento *catch-up*: uma condição observada em ambos humanos e animais. Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez em crianças com restrição de crescimento causado por um período de doença ou de fome, mas que depois foi resolvido (RADER *et al*, 1963). O crescimento *catch-up* é definido como uma velocidade de crescimento acima dos limites estatísticos de normalidade para a idade, durante um período de tempo definido, com o objetivo final de otimizar o organismo para a sobrevivência (WILLIAM *et al*, 1974; WIT *et al*, 2002).

Outro achado interessante do estudo foi a duração gestacional. Em ratos Wistar em condições normais, a gestação tem duração de 21-22 dias (CAGEN *et al*, 1999). Nosso estudo mostrou um aumento do tempo de gestação nas mães RCIU (23 dias) quando comparadas com as mães *Sham* e Controle. Um estudo de restrição energética em musaranhos em diferentes

fases da gravidez encontrou que uma redução aguda de 40% - 50% de restrição alimentar na fase de pré-implantação, causou um aumento da duração da gestação, o que sugere que os desafios energéticos e metabólicos experimentados no início da gravidez causa atrasos na implantação do embrião (KAUFFMAN *et al*, 2010). No entanto, o nosso modelo é realizado após a fase de implantação, o que nos leva a sugerir a existência de um mecanismo de compensação para atrasar o parto, e assim aumentar o crescimento fetal. Achados semelhantes foram descritos em um modelo de exposição pré-natal ao etanol do 6º ao 10º dia de gestação (BOND, 1982). Ressalta-se que, apesar de uma maior duração da gestação, o grupo RCIU teve peso menor ao nascimento quando comparado ao grupo controle.

Os resultados também mostraram uma maior atividade locomotora no grupo RCIU, avaliada pelo número total de cruzamentos e cruzamentos no primeiro minuto quando expostos ao campo aberto. Os resultados na literatura são controversos. Tashima e colaboradores (2001) encontraram uma diminuição na atividade locomotora aos 49 dias de idade, em ratos machos, usando um modelo de RCIU por hipóxia-isquemia pré-natal. Em contraste, um estudo utilizando um modelo hipóxico precoce de longo prazo em ratos causou hiperatividade no P35, no mesmo teste (GRAMATTE e SCHMIDT, 1986). Outro estudo utilizando hipóxia pré-natal intermitente em ratos relatou um aumento da atividade locomotora no P19 em machos (HERMAN *et al*, 1999). A RCIU induzida por RPPU também poderia ser considerado um evento hipóxico-isquêmico no início da vida devido à redução do fluxo sanguíneo no útero (LAMARCA *et al*, 2005), e portanto, isso poderia explicar a ausência de diferenças na atividade locomotora do grupo *Sham* com o grupo Controle. Além da locomoção horizontal, a resposta comportamental do rato a novidade também é caracterizada por ativação vertical (comportamento de *rearing*), considera-se que reflete não apenas a atividade exploratória, mas também emocional do rato (THIEL *et al*, 1999). Nosso estudo não encontrou diferença significativa entre os grupos na frequência de *rearings*.

Nós também encontramos um aumento da frequência de *grooming* (autocuidado) no grupo RCIU. Tem sido sugerido que este comportamento funciona como um mecanismo de desativação de auto-direcionamento após condições extremamente excitantes. O *grooming* é induzido após a administração do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), estimulação elétrica no núcleo paraventricular do hipotálamo (VAN ERP, 1991), injeção intracerebroventricular ou subcutâneas de ocitocina (DRAGO *et al*, 1985), estresse, situações de conflito, novos ambientes, frustração e ansiedade (KATZ, 1979; NUNES *et al*, 2012), o que sugere que estas vias podem ser moduladas de forma diferente em ratos com RCIU. Nossos resultados sugerem que ratos com RCIU apresentam maior ansiedade induzida por novidade, no entanto, testes mais específicos são necessários para confirmar esta hipótese.

Aceita-se que a novidade, como ambientes ou objetos desconhecidos, produz dois comportamentos conflitantes em ratos: aproximação e esquiva. O comportamento de aproximação ou "exploração", reflete a tendência de um animal para explorar novos estímulos ou ambientes, enquanto a esquiva - comportamento relacionado com ansiedade - é associado como forma do animal refletir o medo perante a novidade (DULAWA *et al*, 1999). Com base nas diferenças na atividade locomotora e comportamento de autocuidado descrito em nosso estudo, poderíamos sugerir que ratos com RCIU são mais sensíveis a novidade e novos ambientes.

Nosso estudo também mostrou um déficit de memória no teste de RO no P32 em ambos os grupos, RCIU e Sham. Até onde sabemos, nosso estudo é o primeiro a testar a memória de reconhecimento de objeto de longo prazo em ratos com RCIU induzida por RPPU. O desempenho no teste RO depende da integridade do hipocampo, lobo temporal medial, córtex cingulado anterior e córtex pré-frontal (AGGLETON *et al*, 2010; HAMMOND *et al*, 2004; PRESTON e EICHENBAUM, 2013; WEIBLE *et al*, 2009). Nossos resultados sugerem que essas estruturas podem ser afetadas em ratos do grupo RCIU e Sham. É interessante notar que

a exposição ao isoflurano em G14 (mas não no G20; LI *et al*, 2007) conduzem a aquisição prejudicada de memória de trabalho espacial e aprendizagem na prole em idade adulta (PALANISAMY *et al*, 2011; KONG *et al*, 2011). Sugere-se que a exposição ao isoflurano diminui o número de sinapses e a expressão de sinaptofisina no giro dentado e na área CA1, e aumenta a apoptose no hipocampo (KONG *et al*, 2011; XIONG *et al*, 2014). A exposição a altas concentrações de isoflurano durante um período crítico de desenvolvimento poderia explicar a memória prejudicada em ambos os grupos, RCIU e *Sham*, em nosso estudo.

Surpreendentemente, o grupo RCIU e *Sham* apresentaram um aumento da densidade óptica neuronal no córtex pré-frontal, sendo significativamente maior no grupo RCIU. Este é o primeiro estudo a relatar um aumento da densidade óptica neuronal no CPF de ratos com RCIU no P34. Resultados semelhantes no estriado, assim como em córtex frontal, temporal e parietal são encontrados 30 e 60 dias após uma oclusão transitória da artéria cerebral média, seguido de reperfusão (JIANG *et al*, 2001). A proliferação e a neurogênese, marcada por BrdU, é descrita na zona sub ventricular no prosencéfalo, no corpo estriado e no córtex adjacente aos infartos, 10 e 20 dias após episódio de acidente vascular encefálico (PARENT *et al*, 2002). Sugerimos que, em nosso estudo, o procedimento cirúrgico pode ter promovido a neurogênese e a proliferação celular na prole, possivelmente como um mecanismo compensatório para superar a lesão. O CPF está envolvido na comunicação e desenvolvimento cognitivo, social, emocional, mas o aumento da celularidade não necessariamente está ligada a um melhor desempenho cognitivo. Por exemplo, um estudo de ressonância magnética constatou que as crianças com autismo têm um aumento médio de 67% nos neurônios pré-frontais comparado com crianças com desenvolvimento típico (COURCHESNE *et al*, 2011).

Finalmente, mostramos um aumento na imunorreatividade dos astrócitos no estriado no grupo RCIU em comparação com o grupo *Sham* e controle no P34; este achado é comparável à ativação glial estriatal encontrada após RPPU + injeção interventricular de lipopolissacarídeo

(LPS) no P5 em ratos (CAMPBELL *et al*, 2012). Os astrócitos são a população de células da glia mais importante dentro do SNC, comunicam-se com neurônios para regular a liberação de vários fatores neurotróficos, a fim de manter a homeostase do SNC (BRAMACHARI, FUNG e PAHAN, 2006). A ativação de células gliais resulta em eventos complexos, uma vez que têm ambos papéis de proteção e destruição, por meio da produção de mediadores tóxicos e tróficos (CAMPBELL *et al*, 2012). Nos humanos, a astrogliose é vista em várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (NAGELE *et al*, 2004), doenças inflamatórias desmielinizantes, a demência associada ao vírus da imunodeficiência humana, lesão cerebral traumática aguda e encefalopatia espongiiforme associada a príon. Após a ativação, os astrócitos secretam diversas substâncias neurotóxicas e expressam um maior nível de GFAP, que é considerada um marcador para astrogliose (BRAHMACHARI *et al*, 2006). Tem sido descrito que animais com RCIU apresentam aumento da imunorreatividade a GFAP no corpo caloso no P14, associado com lesão da substância branca (REID *et al*, 2013). É interessante notar que a atividade do estriado no encéfalo tem um papel importante no comportamento locomotor e estes resultados de comportamento e neuro-histológicos foram específicos para o grupo RCIU (não vistos no *Sham*) no nosso estudo. A lesão encefálica no estriado resultante da injeção de ácido caínico conduz ao mesmo resultado comportamental de um aumento da atividade locomotora basal (KAFETZOPOULOS, 1986) como descrito aqui; portanto, propomos que a astrogliose no estriado no grupo RCIU provavelmente seja a base das diferenças comportamentais encontradas no teste de campo aberto neste grupo.

Em conclusão, a exposição ao procedimento de RPPU no G14 foi capaz de produzir RCIU em ratos Wistar, com alterações típicas em resultados comportamentais devido a modificações estruturais no encéfalo em desenvolvimento dos animais. Uma vez que é sabido que a redução do fluxo de sangue para o útero provoca a insuficiência placentária, neste caso induz anomalias relacionados e predispõe a transtornos da mesma maneira que as lesões

hipóxicas-isquêmicas, tais como déficit de memória e hiperatividade. Outras análises histológicas e moleculares do modelo são necessárias para confirmar a relação dos mecanismos biológicos com as mudanças comportamentais.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nessa dissertação nos permitem concluir que:

O modelo de redução da pressão de perfusão uterina (RPPU) no dia gestacional 14 foi capaz de produzir restrição de crescimento intrauterino (RCIU) em ratos Wistar.

Foi evidenciado baixo peso ao nascimento nos grupos submetidos a procedimento cirúrgico, que é em si, é um estressor moderado para a mãe gestante e que é um dos fatores que conduz a RCIU. Essa diminuição de peso ao nascimento não foi vista quando os animais foram avaliados com 30 dias de vida, possivelmente por o crescimento acelerado dos ratos. É importante ressaltar que unicamente o modelo de RPPU foi o capaz de produzir o quadro de RCIU acompanhado de baixo peso ao nascimento, maior locomoção total e no primeiro minuto, no teste de *open field*, demonstrando atividade exploratória espontânea e hiperatividade motora em idade juvenil.

É possível que ratos com RCIU apresentem maiores níveis de ansiedade à novidade demonstrado pelo aumento na frequência de comportamentos de *groomings*, no teste de *open field*, porém é necessário o uso de outros testes comportamentais específicos pra ansiedade, como o labirinto em cruz elevado, para determinar o estado emocional dos ratos restritos.

Ratos com RCIU e *Sham* apresentam déficit de memória de longo prazo (24 horas de intervalo) no teste de *reconhecimento do novo objeto*. Embora a restrição de crescimento seja, de fato, um fator predisponente para déficit cognitivo em ratos e humanos, outra possível explicação pode residir na exposição pré-natal ao anestésico inalatório isoflurano que produz

déficit de memória espacial em animais, já que não houve diferença significativa entre os animais RCIU e *Sham*.

Ambos os grupos RCIU e *Sham* apresentaram aumento na expressão de neurônios (NeuN) em córtex pré-frontal no P34 após o nascimento, o qual pode ser um mecanismo adaptativo compensatório à injúria pré-natal. Porém mais estudos são necessários para esclarecer a viabilidade e a funcionalidade dessas novas células neuronais e se esse aumento permanece com o passar do tempo.

Confirmou-se astrogliose por aumento de expressão de astrócitos (GFAP) no estriado nos animais com RCIU no P34 após o nascimento. O aumento de astrócitos reativos é comum em diversas patologias encefálicas que cursam com injúria o dano encefálico, confirmando assim o efeito da RPPU sobre a integridade encefálica dos ratos.

7. PERSPECTIVAS

Futuras análises imunoistoquímicas serão realizadas. Serão analisadas a expressão da proteína básica da mielina (PBM) no corpo caloso, NeuN (neurônio), Iba-1 (microglia), e marcadores de proliferação celular (Ki-67) no hipocampo, e 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) em córtex pré-frontal.

As alterações comportamentais e de neuroplasticidade achadas no presente estudo foram encontradas em machos restritos de 30 dias de idade, futuros estudos são necessários para determinar se essas modificações são permanentes na vida adulta, portanto será realizado um novo estudo com machos de 60 e 90 dias de idade.

Em humanos existem diferenças de gênero entre crianças com restrição de crescimento. É de nosso interesse estudar o modelo de RPPU e seus efeitos em ratas fêmeas de 30, 60 e 90 dias de idade, para tentar identificar possíveis diferenças associadas ao sexo nos testes comportamentais.

A padronização do modelo de RCIU por RUPP é de utilidade no estudo do comportamento dos ratos, quando comparados com outros modelos de RCIU. Futuros estudos serão realizados para comparar o comportamento alimentar entre ratos restritos provenientes de mães submetidas a restrição calórica e mães com alteração na circulação uteroplacentária (RPPU).

Futuros estudos serão realizados para determinar o impacto de procedimentos cirúrgicos e exposição aos anestésicos inalatórios sobre o sistema nervoso central e as possíveis consequências na vida pós-natal avaliando parâmetros comportamentais e cognitivos em ratos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, B., KASSAB, S., MILLER, T., ABRAM, S, RECKELHOFF, J., BENNET, W E GRANGER J. (2001) Reduced Uterine Perfusion Pressure During Pregnancy in the rat Is Associated With Increases in Arterial Pressure and Changes in renal Nitric Oxide. *Hypertension*. 37, 1191-1195.

AKIRAV, I., MAROUN, M. (2006) Ventromedial Prefrontal Cortex Is Obligatory for Consolidation and Reconsolidation of Object Recognition Memory. *Cerebral cortex*, (12):1759-1765.

BARRY, J., ROZANCE, P., ANTHONY, R. (2008) An Animal Model of Placental Insufficiency-Induced Intrauterine Growth Restriction. *Seminars in Perinatology*.3,225-230.

BARKER, G., BIRD, F., ALEXANDER, V., WARBURTON, C. (2007) Recognition Memory for Objects, Place, and Temporal Order: A Disconnection Analysis of the Role of the Medial Prefrontal Cortex and Perirhinal Cortex. *The Journal of Neuroscience*, (11):2948-2957.

BELLINGER, L. E LANGLEY-EVANS S. (2005) Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clinical Science*. 109, 413-420.

BRAHMACHARI, S., FUNG, Y. AND PAHAN, K. (2006) Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide. *Neurobiology of disease*, 18, 4930-4939.

BURD, I., BALAKRISHNAN, B. E KANNAN, S. (2012) Models of fetal brain injury, intrauterine inflammation, and preterm birth. *Am J Reprod Immunol.* 67, 287–295

CAMACHO-GONZALEZ, A., SPEARMAN, P., STOLL, B. (2013) Neonatal Infectious Diseases. Evaluation of Neonatal Sepsis. *Pediatr Clin N Am.* 60, 367-389

CAMPBELL, L., PANG, Y., OJEDA, N., ZHENG, B., THODES, P., E ALEXANDER, B. (2012). Intracerebral lipopolysaccharide induces neuroinflammatory change and augmented brain injury in growth-restricted neonatal rats. *Pediatric Research.* 71, 645-652.

CHALLIS, J., LOCKWOOD, C., MYATT, L., NORMAN, J., STRAUSS, J., PETRAGLIA, F. (2009) Inflammation and Pregnancy. *Reproductive Sciences*, 2, 206-215.

CLARK, C. E WOODWARD, L. (2008) Development of Emotional and Behavioral Regulation in Children Born Extremely Preterm and Very Preterm: Biological and Social Influences. *Child Development.* 5, 1444-1462.

DAMODARAM, M., STORY, L., KULINSKAYA, E., RUTHERFORD, M., KUMAR, S. (2011) Early adverse perinatal complications in preterm growth-restricted fetuses. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 3, 204-209

DE KEYSER, J., MOSTERT, J. E KOCH, M. (2008) Dysfunctional astrocytes as key players in the pathogenesis of central nervous system disorders. *J Neurol Sci.* (1-2), 3–16.

DERE, E., ZHENG-FISCHHÖFER, Q., VIGGIANO, D., GIRONI CARNEVALE, UA., RU-
OCCO, LA., ZLOMUZICA, A., SCHNICHELS, M., WILLECKE, K., HUSTON, JP.,
SADILE, AG. (2008) Connexin31.1 deficiency in the mouse impairs object memory and mod-
ulates open-field exploration, acetylcholine esterase levels in the striatum, and cAMP response
element-binding protein levels in the striatum and piriform cortex. *Neuroscience*, (2):396-405.

DELOBEL-AYOUB, M., ARNAUD, C., WHITE-KONING, M., CASPER, C., PIERRAT, V.,
GAREL, M., BURGUET, A., ROZE, J., MATIS, J., PICAUD, J., KAMINSKI, M., LAR-
ROQUE, B., EPIPAGE Study Group. (2009) Behavioral problems and cognitive performance
at 5 years of age after very preterm birth: the EPIPAGE Study. *Pediatrics.* 6,1485-92.

DELCOUR, M., OLIVIER, P., CHAMBON, C., PANSIO, J., RUSSIER, M., LIBERGE, M.,
XIN, D., GESTREAU, C., ALESCIO-LAUTIER, B., GRESSENS, P., VERNEY, C., BARBE,
M., BAUD. O. E COQ, J. (2012) Neuroanatomical, sensorimotor and cognitive deficits in
Adult Rats with Matter Injury Following Prenatal Ischemia. *Brain Pathology.* 22, 1–16.

ERGAZ, Z., AVGIL, M., E ORNOY, A. (2005) Intrauterine growth restriction—etiology and consequences: What do we know about the human situation and experimental animal models?. *Reproductive Toxicology*. 20, 301-322.

FISCHI-GÓMEZ, E., VASUNG, L., MESKALDJI, D., LAZEYRAS, F., BORRADORI-TOLSA, C., HAGMANN, P., BRISNIKOV, K., THIRAN, J. E HÜPPI, P. (2014) Structural Brain Connectivity in School-Age Preterm Infants Provides Evidence for Impaired Networks Relevant for Higher Order Cognitive Skills and Social Cognition. *Cerebral Cortex*, doi:10.1093/cercor/bhu073

FUNG, C., KE, X., BROWN, A., YU, X., MCKNIGHT, R. E LANE, R. (2012) Uteroplacental insufficiency alters rat hippocampal cellular phenotype in conjunction with ErbB receptor expression. *Pediatr Res*. 1, 2-9

GARITE, J., CLARK, R. E THORP, A. (2004) Intrauterine growth restriction increases morbidity and mortality among premature neonates. *Am J Obstet Gynecol*. 2, 481–7.

GRABYEL, AM. (1995) Building action repertoires: memory and learning functions of the basal ganglia. *Curr Opin Neurobiol*, 5):733–741

GRANGER, J., LAMARCA, BB., COCKRELL, K., SEDEEK, M., BALZI, C., CHANDLER, D., BENNET, W. (2006) Reduced uterine perfusion pressure (RPPU) model for studying cardiovascular-renal dysfunction in response to placental ischemia. *Methods Mol Med.* 122, 383-92.

HALES, CN. e BARKER, DJ. (1992) Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, (7):595-601.

HAYAKAWA, M. (2006) An Animal Model of Intrauterine Growth Retardation Induced by Synthetic Thromboxane A2. *Reproductive Sciences.* 8,566-572.

HENRIKSEN T, CLAUSEN T. (2002) The fetal origins hypothesis: placental insufficiency and inheritance versus maternal malnutrition in well-nourished populations. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 81,112-4.

HUIZINGA, C., ENGELBREGT, M., REKERS-MOMBARG, L., VAESSEN, S., DELEMARRE-VAN, H., FODOR, M. (2004) Ligation of the Uterine Artery and early Postnatal food restriction – Animal Models for Growth Retardation. *Horm Res.* 62, 233-240.

JARBO, K., VERSTYNNEN, TD. (2015) Converging structural and functional connectivity of orbitofrontal, dorsolateral prefrontal, and posterior parietal cortex in the human striatum. *J Neurosci*, (9):3865-75.

KAFKAS, A., MONTALDI, D. (2015) Striatal and midbrain connectivity with the hippocampus selectively boosts memory for contextual novelty. *Hippocampus*, DOI: 10.1002/hipo.22434

KALLANKARI, H., KAUKOLA, T., OLSÉN, P., OJANIEMI, M. E HALLMAN, M. (2014) Very preterm birth and foetal growth restriction are associated with specific cognitive deficits in children attending mainstream school. *Acta paediatrica*. 1, 84-90.

LANCIOTTI, A., BRIGNONE, M., BERTINI, E., PETRUCCI, T., ALOISI, F. E AMBROSINI, E. (2013) Astrocytes: emerging stars in leukodystrophy pathogenesis. *Transl Neurosci*. doi:10.2478/s13380-013-0118-1

LEITNER, Y., FATTAL-VALESKI, A., GEVA, R., ESHEL, R., TOLEDANO-ALHADEF, H., ROTSTEIN, M. E BASSAN, H., RADIANU, B., BITCHONSKY, O., JAFFA, A. E HAREL, S. (2007) Neurodevelopmental Outcome of Children With Intrauterine Growth Retardation: A Longitudinal, 10-Year Prospective Study. *Journal of Child Neurology*. 5, 580-587

LEUSSIS, MP., BOLIVAR, VJ. (2006) Habituation in rodents: a review of behavior, neurobiology, and genetics. *Neurosci Biobehav Rev*, (30):1045–1064.

LI, J., LAMARCA, B., RECKELHOFF, J. (2012) A model of preeclampsia in rats: the reduced uterine perfusion pressure (RPPU) model. *Am Jour Phy Heart Circulatory Phys.* 303, H1-H8.

LIU, J., WANG, X., LIU, Y., YANG, N., XU, J. E REN, X. (2013) Antenatal taurine reduces cerebral cell apoptosis in fetal rats with intrauterine growth restriction. *Neural Regen Res.* 23, 2190–2197.

LONGO S., BOLLANI L., DECEMBRINO L., DI COMITE A., ANGELINI M., STRONATI M. (2013) Short-term and Long-term sequele in intrauterine growth retardation (RCIU). *J matern Fetal Neonatal Med.* 26, 222-5.

MEDEIROS A, GOUVEIA N. (2005) Relação entre baixo peso ao nasce e a poluição do ar no Município de São Paulo. *Ver Saúde Pública.* 6, 965-972.

MEUNIER, M., BECHEVALIER, J., MISHKIN, M. (1997) Effects of orbital frontal and anterior cingulate lesions on object and spatial memory in rhesus monkeys. *Neuropsychologia,* (7):999-1015.

MORSING E, ÃSARD M, LEY D, STJERNQVIST K, MARSÁL K. (2011). Cognitive function after intrauterine Grwoth restriction and very preterm Birth. *Pediatrics.* 127,1-8.

MORSING, E. E MARŠÁL, K. (2013) Pre-eclampsia—An additional risk factor for cognitive impairment at school age after intrauterine growth restriction and very preterm birth. *Early Human Development*. 90,99-101.

NETO, A., CÓRDOBA, J. E PERAÇOLI, J. (2011) Etiologia da restrição de crescimento intrauterino (RCIU). *Com Ciências Saúde*. 1, S21-S30.

PADILLA, N., JUNQUÉ, C., FIGUERAS, F., SANZ-CORTES, M., BARGALLÓ, N., ARRANZ, A., DONAIRE, A., FIGUEIRAS, J., GRATACOS, E. (2014) Differential vulnerability of gray matter and white matter to intrauterine growth restriction in preterm infants at 12 months corrected age. *Brain Research*. 1545,1-11.

PORTELLA, AK. e SILVEIRA, PP. (2014) Neurobehavioral determinants of nutritional security in fetal growth-restricted individuals. *Ann N Y Acad Sci*, doi: 10.1111/nyas.12390

RAMENGGHI, L., MARTINELLI, A., DE CARLI, A., BRUSATI, V., MANDIA, L., FUMAGALLI, M., TRIULZI, F., MOSCA, F. E CETIN, I. (2011) Cerebral Maturation in IUGR and Appropriate for Gestational Age Preterm Babies. *Reproductive Sciences*. 5, 469-475.

RAVELLI, A., VAN DER MEULEN, J., OSMOND, C., BARKER, D., BLEKER, O. (1999) Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally¹²³. *Am J Clin Nutr*, (5)811-816.

REID, M., MURRAY, K., MARSH, E., GOLDEN, J., SIMMONS, R., E GRINSPAN, J. (2013) Delayed Myelination in an Intrauterine Growth Retardation Model Is Mediated by Oxidative Stress Upregulating Bone Morphogenetic Protein 4. *J Neuropathol Exp Neurol.* 7, 640:653

RICH-EDWARDS, JW., STAMPFER, MJ., MANSON, JE., ROSNER, B., HANKINSON, SE., COLDITZ, GA., WILLETT, WC., HENNEKENS, CH. (1997) Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *British Medical Journal*, (7105):396-400.

ROSENBERG, A. (2008) The IUGR newborn. *Semin Perinatol.* 3, 219-24

RUEDA-CLAUSEN, C., MORTON, J. E DAVIDGE, S. (2009) Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood. *Cardiovascular Research.* 81, 713-722.

SCHOBER, ME., MCKNIGHT, RA., YU, X., CALLAWAY, CW., KE, X., e LANE, RH. (2009) Intrauterine growth restriction due to uteroplacental insufficiency decreased white matter and altered NMDAR subunit composition in juvenile rat hippocampi. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, (3):R681-92.

SCHULZ, D., SERGEEVA, O.A., IANOVSKII, E., LUHMANN, H.J., HAAS, H.L., HUSTON, J.P. (2004) Behavioural parameters in aged rats are related to LTP and gene expression of ChAT and NMDA-NR2 subunits in the striatum. *Eur J Neurosci*, (19):1373–1383.

SERGEEVA, O.A., SCHULZ, D., DOREULEE, N., PONOMARENKO, A.A., SELBACH, O., BORSCH, E., KIRCHEIS, G., HUSTON, J.P., HAUSSINGER, D., HAAS, H.L. (2005) Deficits in cortico-striatal synaptic plasticity and behavioral habituation in rats with portacaval anastomosis. *Neuroscience*, (134):1091–1098.

SILVEIRA, P., AGRANONIK, M., FARAS, H., PORTELA, A., MEANEY, M., LEVITAN, R. (2012) Preliminary evidence for a impulsivity-based thrifty eating phenotype. *Pediatric Research*. 71, 293-298

TASHIMA L, NAKATA M, ANNO KIKUE, SUGINO N, KATO H. (2001). Prenatal Influence of ischemia-hypoxia-induced intrauterine growth retardation on brain development and Behavioral Activity in Rats. *Biol Neonate*. 80, 81–87.

THIEL, C., HUSTON, J., E SCHWARTING, R. (1998) Hippocampal acetylcholine and habituation learning. *Neuroscience*. 4, 1253-62.

THIEL, C., MÜLLER, C., HUSTON, J., E SCHWARTING, R. (1999) High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*. 1, 243-251.

TOLCOS, M., BATEMAN, E., O'DOWD, R., MARKWICK, R., VRIJSEN, K., REHN, A., REES, S. (2011) Intrauterine growth restriction affects the maturation of Myelin. *Exp Neurol*. 232, 53-65.

XIANG, JZ., BROWN, MW. (2004) Neuronal responses related to long-term recognition memory processes in prefrontal cortex. *Neuron*, (5):817-29.

ZOHDI, V., LIM, K., PEARSON, J. E BLACK, M (2015) Developmental Programming of Cardiovascular Disease Following Intrauterine Growth Restriction: Findings Utilising A Rat Model of Maternal Protein Restriction. *Nutrients*. 7, 119-152.