

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

MÁRCIO BONESSO ALVES

**FLEXIBILIDADE COGNITIVA EM ROEDORES ADULTOS EXPOSTOS À
RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO: INVESTIGAÇÃO DO
PAPEL DO CUIDADO MATERNO E DA RESPOSTA NEUROQUÍMICA À
RECOMPENSA**

Porto Alegre

2014

**FLEXIBILIDADE COGNITIVA EM ROEDORES ADULTOS EXPOSTOS À
RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO: INVESTIGAÇÃO DO
PAPEL DO CUIDADO MATERNO E DA RESPOSTA NEUROQUÍMICA À
RECOMPENSA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Neurociências.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Pelufo Silveira

Porto Alegre
2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, Professora Patrícia Pelufo Silveira, pela oportunidade, por todo o apoio e por ter sido tão acessível em todos os momentos deste trabalho;

Aos colegas do Grupo DOHaD por terem sido essenciais na execução de todas as etapas desta jornada, em especial à Roberta pelo auxílio nas fases iniciais do projeto;

Aos integrantes do laboratório 35 pelo auxílio e empréstimo de materiais para a realização das análises bioquímicas;

Aos funcionários do PPG-Neurociências e aos membros da coordenação por estarem sempre à disposição e prontos para resolver qualquer tipo de problema;

Aos funcionários da Unidade de Experimentação Animal - HCPA por todo suporte e pelo zelo com os animais;

Agradeço muito a meus pais por sempre me incentivarem e me oferecerem todas as condições para que eu pudesse realizar este trabalho da melhor forma possível;

Também agradeço muito à Bárbara por estar do meu lado, por sempre me incentivar e por ter feito com que esta fase fosse tão prazerosa;

E por fim, aos meus familiares, amigos e colegas de biologia que de alguma forma participaram de toda esta jornada.

RESUMO

A restrição do crescimento intrauterino (RCIU) está associada com preferências alimentares alteradas, assim como com um aumento do risco de obesidade na vida adulta. Enquanto os desfechos metabólicos adversos têm sido de certa forma bem caracterizados nesta condição, seus déficits neurocomportamentais e alterações em áreas específicas do sistema nervoso têm recebido significativamente menos atenção. Além disso, o papel do cuidado materno no estabelecimento destes desfechos também deve ser avaliado. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da RCIU sobre a flexibilidade cognitiva dos animais na vida adulta, explorando o possível envolvimento do cuidado materno e da resposta neuroquímica à recompensa – através da medida do conteúdo de tirosina hidroxilase (TH) no córtex orbitofrontal (OFC) e núcleo accumbens (NAcc) – sobre este desfecho. **Materiais e Métodos:** A partir do dia 10 de gestação e durante toda a lactação, ratas *Sprague-Dawley* receberam uma dieta *ad libitum* (Contr), ou uma dieta restrita a 50% do consumo médio das ratas do grupo Contr (FR). No dia do nascimento, foi realizada a adoção cruzada, gerando os grupos Contr/Contr e FR/Contr (gestação/lactação). Do dia 2 ao dia 7 pós-parto, o cuidado materno foi registrado em cinco sessões diárias de 72 minutos cada. A flexibilidade cognitiva foi medida nos ratos na idade adulta utilizando o *Attentional Set-Shifting Task* (ASST) que utiliza um pellet de alimento doce como recompensa. Os animais também foram submetidos a jejum de 4 horas e em seguida expostos ao alimento doce durante 1 hora para verificar o consumo agudo de alimento palatável. O conteúdo de TH no córtex orbitofrontal e núcleo accumbens foi medido em jejum ou em resposta à ingestão de alimentos palatáveis. **Resultados:** Ratas FR mostraram menos comportamentos de lambe os filhotes que fêmeas do grupo Contr ($p < 0,01$) sem diferença nos escores das posturas de amamentação e no tempo permanecido em contato com os filhotes. Filhotes de ratas FR apresentaram peso reduzido ao nascer ($p < 0,01$). Aos 90 dias de idade, machos do grupo FR/Contr apresentaram maior consumo de alimento doce no teste de exposição aguda ($p = 0,04$), enquanto que as fêmeas não diferiram na quantidade consumida ($p = 0,37$). Quando comparadas às controles, fêmeas RCIU necessitaram menos *trials* para alcançar o critério na etapa de Reversão 2 do ASST ($p = 0,04$), e apresentaram um aumento de TH no OFC em resposta à ingestão de alimentos doces ($p = 0,04$). Não foram observadas diferenças para o sexo masculino em relação à performance no ASST ou nos níveis de TH no OFC. No NAcc, houve um aumento de TH no estado de jejum tanto nos machos RCIU ($p = 0,03$) quanto nas fêmeas RCIU ($p = 0,02$). **Discussão:** O protocolo utilizado foi eficiente em induzir RCIU nos filhotes. Caracterizar o cuidado materno em diferentes protocolos é crucial para entender melhor as relações entre ambientes precoces adversos e seus coincidentes desfechos adversos na vida adulta. A melhora no desempenho do ASST e concomitante aumento de TH no OFC após consumo de doce sugere que as pistas relacionadas aos alimentos palatáveis sejam mais fortes para as fêmeas expostas à RCIU. Além disso, as alterações encontradas no Nacc em ambos os sexos sugere que a RCIU induz modificações na resposta central para as pistas de alimentos palatáveis e no consumo, afetando a liberação de dopamina em algumas estruturas do circuito encefálico de recompensa.

Palavras-chave: RCIU, cuidado materno, programação fetal, ASST, dopamina

ABSTRACT

Intrauterine growth restriction (IUGR) is associated with altered food preferences as well as increased risk for obesity in adult life. However, while the adverse metabolic outcomes have been better characterized in this condition, the neurobehavioral disabilities and particular abnormalities in specific areas of the brain have received less attention. Moreover, the role of maternal care in the establishment of these outcomes should be evaluated. The aim of this study was to investigate the effects of IUGR on the cognitive flexibility of adult animals, exploring the putative involvement of maternal care and the neurochemical response to reward – through the measurement of tyrosine hydroxylase (TH) content in the orbitofrontal (OF) cortex and nucleus accumbens (nacc) - on this behavioral outcome. **Materials and methods:** From day 10 of gestation and through lactation, Sprague-Dawley rats received either an ad libitum (AdLib), or a 50% food restricted (FR) diet. At birth, pups were cross-fostered, generating AdLib/AdLib and FR/AdLib groups (pregnancy/lactation). From day 2 to 7 postpartum maternal care was recorded in a five daily sessions. Cognitive flexibility was measured using the Attentional Set-Shifting Task (ASST) with a sweet pellet as a reward. Animals were also submitted to 4 hours of fasting and then exposed to a sweet food for 1 hour to verify the palatable food consumption. TH content in the OF cortex and Nacc was measured at baseline or in response to palatable food intake. **Results:** Dams of FR group showed less care toward her pups. More precisely, these FR dams showed less licking/grooming than AdLib dams ($p < 0.01$), without difference in the nursing postures and time spent out of the nest. Pups of FR dams had reduced birth weight ($p < 0.01$). At 90 days of age, FR/AdLib males showed increased intake of sweet food in the acute exposure ($p = 0.04$), while females did not differ in the amount consumed ($p = 0.37$). When compared to Controls, IUGR females needed fewer trials to reach criterion in the ASST ($p = 0.04$) and had an increase in TH in response to sweet food intake in the OFC ($p = 0.04$), but not at baseline. No differences were seen in males ($p = 0.51$). In the nacc, there was an increase in TH at baseline in IUGR males ($p = 0.03$) and females ($p = 0.02$). **Discussion:** The protocol used was efficient in inducing IUGR in the pups. To characterize maternal care in different protocols is crucial to better understand the relationships between early adverse environment and their coincident adverse outcomes in adult life. The improvement in performance of FR females in ASST and concomitant increase in OFC TH in response to sweet food consumption suggests that palatable food cues are stronger for intrauterine restricted females. Besides, alterations found in the Nacc in both sexes suggest that IUGR induces modifications in the central response to palatable food cues and its intake, affecting dopamine release in select structures of the brain reward system.

Key words: IUGR, maternal care, fetal programming, cognitive flexibility, dopamine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação dos grupos utilizados no estudo.....	16
Figura 2. Posturas de amamentação. A linha representa o ventre da genitora visto lateralmente, enquanto os círculos representam os filhotes.	17
Figura 3. Animal cavando em busca da recompensa no <i>ASST</i>	19
Figura 4. Teste de exposição aguda ao alimento doce.....	22
Figura 5. MÉDIA±E.P.M. do peso das genitoras do grupo controle (n=15) e FR (n=14) nos dias 1 e 21 da gestação. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de medidas repetidas.....	26
Figura 6. MÉDIA±E.P.M. do peso dos filhotes do grupo controle (n=78♂; 74♀) e FR50% (n=97♂; 92♀) no dia do nascimento. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias ajustada pelo tamanho da ninhada.....	27
Figura 7. MÉDIA±E.P.M. do número de filhotes de cada ninhada do grupo controle (n=15) e FR50% (n=14) no dia do nascimento. Os dados foram analisados utilizando Test <i>t</i> de <i>Student</i>	28
Figura 8. Distribuição dos nascimentos ao longo dos turnos do dia para os grupos controle (n=15) e FR50% (n=14). Os dados foram analisados utilizando o teste Qui-quadrado.	29
Figura 9. MÉDIA±E.P.M. do número total de realizações do comportamento de lamber os filhotes durante os seis dias de registro nas fêmeas dos grupos. Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de <i>post hoc</i> Bonferroni.....	31
Figura 10. MÉDIA±E.P.M. do percentual de registros do comportamento de amamentar os filhotes nas posições 1 e 2 durante os seis dias de registro para as genitoras dos grupos Controle/Controle (n=7), Controle/FR50% (n=6), FR50%/Controle (n=6) e FR50%/FR50%(n=6). Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de <i>post hoc</i> Bonferroni	32
Figura 11. MÉDIA±E.P.M. do percentual de registros do comportamento de amamentar os filhotes nas posições 3 e 4 durante os seis dias de registro para as genitoras dos grupos Controle/Controle (n=7), Controle/FR50% (n=6), FR50%/Controle (n=6) e FR50%/FR. Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de <i>post hoc</i> Bonferroni	33
Figura 12. MÉDIA±E.P.M. do percentual de registros do comportamento de permanecer sem contato com os filhotes durante os seis dias de registro para as genitoras dos grupos Controle/Controle (n=7), Controle/FR50% (n=6), FR50%/Controle (n=6) e FR50%/FR50% (n=6). Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de <i>post hoc</i> Bonferroni.....	34
Figura 13. MÉDIA±E.P.M. do consumo de alimento doce durante o período de 1 hora para os grupos Contr/Contr (n=5♂; 5♀), Contr/FR50% (n=5♂; 5♀), FR50%/Contr (n=4♂; 6♀) e FR50%/FR50% (n=5♂; 6♀). ANOVA de uma via seguida de <i>post hoc</i> LSD.....	35

Figura 14. MÉDIA±E.P.M. do número de cruzamentos de quadrantes na arena de teste dos animais dos grupos Controle/Controle (n=10♂; 10♀) e FR50%/Controle (n=10♂; 10♀). Dados analisados utilizando ANOVA de duas vias.....	36
Figura 15. MÉDIA±E.P.M. do número de <i>trials</i> necessários para atingir o critério de desempenho em cada fase do teste em machos. ANOVA de duas vias realizada para cada fase da tarefa.	37
Figura 16. MÉDIA±E.P.M. do número de <i>trials</i> necessários para atingir o critério de desempenho em cada fase do teste nas fêmeas. ANOVA de duas vias realizada para cada fase da tarefa.	38
Figura 17. Conteúdo de tirosina hidroxilase no córtex orbitofrontal em jejum e em resposta ao consumo agudo de alimento doce em machos (A). Dados expressos em porcentagem do grupo controle	39
Figura 18. Conteúdo de tirosina hidroxilase no córtex orbitofrontal em jejum e em resposta ao consumo agudo de alimento doce em fêmeas (B). Dados expressos em porcentagem do do grupo controle	40
Figura 19. Conteúdo de tirosina hidroxilase no núcleo accumbens em jejum e em resposta ao consumo agudo de alimento doce em machos. Dados expressos em porcentagem do grupo controle	41
Figura 20. Conteúdo de tirosina hidroxilase no núcleo accumbens em jejum e em resposta ao consumo agudo de alimento doce em fêmeas. Dados expressos em porcentagem do grupo controle	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases do Attentional Set-shifting Task	21
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Córtex cingulado anterior
APOM	Area pré-óptica medial
ASST	<i>Attentional set-shifting task</i>
BDNF	Fator neurotrófico derivado do encéfalo
CEP/HCPA	Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre
DA	Dopamina
DC	Discriminação composta
DS	Discriminação simples
E.P.M.	Erro padrão da media
EDS	<i>Extradimensional shift</i>
EPI	Equipamento de proteção individual
EST	Estriado
FR	Grupo restrição alimentar em 50%
GC	Glicocorticóides
GPPG	Grupo de pesquisa e pós-graduação
HCPA	Hospital de Clínicas de Clínicas de Porto Alegre
HPA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
IDS	<i>Intradimensional shift</i>
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LG	Licking/grooming
MED	Mudança extradimensional
MID	Mudança intradimensional
OFC	Córtex orbitofrontal

PFC	Córtex pré-frontal
PFCm	Córtex pré-frontal medial
PIG	Pequeno para a idade gestacional
RCIU	Restrição de crescimento intrauterino
REV	Reversão
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TDAH	Transtorno de déficit de atenção e hiperatividade
TH	Tirosina Hidroxilase
VTA	Área Tegmental Ventral
WCST	<i>Wisconsin Card Sorting Test</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
Estresse nas fases iniciais da vida	1
Restrição de Crescimento Intrauterino	3
Comportamento materno	6
Flexibilidade Cognitiva	9
OBJETIVOS	13
HIPÓTESE	14
MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
Animais e Condições Experimentais	15
Registro do Cuidado Materno.....	16
Atividade Locomotora.....	17
Teste de Flexibilidade Cognitiva (<i>Attentional set shifting</i>).....	18
Teste de Exposição Aguda ao Alimento Doce	21
Coleta e Armazenamento dos Tecidos	22
Medidas Centrais – Western Blotting	23
Rotinas/Normas de Segurança e Descarte de Rejeitos.....	24
Análise Estatística	24
Considerações Éticas.....	25
RESULTADOS	26
Cuidado Materno	30
Consumo Agudo de Alimento Palatável	35
Atividade Locomotora.....	36
Tarefa de Flexibilidade Cognitiva	37
Medidas Centrais	39
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS	56

INTRODUÇÃO

Estresse nas fases iniciais da vida

O ambiente ao qual o feto é exposto durante seu desenvolvimento influencia significativamente seu comportamento e sua predisposição para doenças ao longo da vida. Embora esta noção exista desde tempos bastante remotos, e seja melhor ilustrada pelo entendimento dos efeitos da exposição a agentes tóxicos (Talge *et al.*, 2007), é relativamente recente a sua abordagem sistemática pela ciência. Em uma revisão sobre o assunto, Ferreira (1965) foi um dos pioneiros a reunir evidências a favor da existência de um “ambiente pré-natal” que, dependendo de suas características, poderia deixar “marcas” permanentes sobre o indivíduo.

Contudo, foi somente durante o último par de décadas que diversos estudos, principalmente epidemiológicos, pavimentaram nosso conhecimento sobre este tema, e mais do que apontar para uma clara relação entre a qualidade do ambiente fetal e o risco de desenvolver distúrbios comportamentais e metabólicos na vida adulta, nos levaram ao conceito de programação fetal. Neste contexto, programação pode ser entendida como o processo pelo qual um estímulo ou insulto durante períodos específicos do desenvolvimento traz, através de adaptações fisiológicas, efeitos permanentes para o indivíduo (Lucas, 1991; Schwartz *et al.*, 2005; Talge *et al.*, 2007).

Interessantemente, a natureza e a intensidade destes efeitos parecem ser fortemente influenciadas pela severidade e pelo “*timing*” da exposição aos estímulos (Talge *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2007; Weinstock, 2008). Esta peculiaridade apoia a ideia de que o desenvolvimento pré-natal se caracterize por períodos críticos, durante os quais os indivíduos são mais susceptíveis aos efeitos de estímulos externos (Lopes *et al.*, 2000). Durante estes períodos, estruturas e sistemas específicos que estejam sob processos organizacionais ou maturacionais tornam-se especialmente vulneráveis aos efeitos da programação fetal (Scott, 1986; Talge *et al.*, 2007).

Tratando-se de sistema nervoso, o período pré-natal é uma fase onde diversos processos cruciais como diferenciação celular, organização funcional, migração neuronal, sinaptogênese e mielinização estão ocorrendo (Rice & Barone, 2000). Embora o padrão temporal de desenvolvimento do sistema nervoso apresente diferenças

substanciais entre os diferentes grupos de mamíferos (Clancy *et al.*, 2007), de forma geral este período pode ser caracterizado como extremamente crítico para o seu desenvolvimento.

Durante este período, eventos estressantes são capazes de promover alterações duradouras em sistemas de neurotransmissores e em estruturas encefálicas como hipocampo, hipotálamo, amígdala e córtex frontal (Coe *et al.*, 2003; Kaufman *et al.*, 2000; Braun *et al.*, 2000; Salm *et al.*, 2004; Poeggel *et al.*, 1999) e desta forma, induzir a mudanças neurobiológicas e comportamentais definitivas no fenótipo dos indivíduos (Vázquez *et al.*, 2005; Cui *et al.*, 2004).

Estudos epidemiológicos têm sugerido que a exposição a situações estressantes – sejam elas físicas ou psicológicas - durante a gestação está associada com um aumento na propensão dos filhos em apresentar déficits de atenção, problemas emocionais, hiperatividade e comportamentos ligados à ansiedade durante a infância (Glover *et al.*, 2004; Beversdorf *et al.*, 2005; Kofman, 2002; Koenig *et al.*, 2002). Filhos de mães que relatam altos níveis de ansiedade durante a gravidez, por exemplo, tendem a ser mais irritáveis e apresentar maiores incidências de distúrbios alimentares e de sono do que filhos de mães não ansiosas (Weerth *et al.*, 2003; Huizink *et al.*, 2002). Além disso, a predisposição destes indivíduos em apresentar psicopatologias como depressão e esquizofrenia na idade adulta também estaria aumentada (Sanchez *et al.*, 2001; Heim *et al.* 2004; Kofman, 2002; Huizink *et al.*, 2004).

Porém, os efeitos de situações adversas durante o período pré-natal têm sido mais extensivamente estudado em modelos animais, e seus achados têm se mostrado bastante semelhantes aos da pesquisa clínica. Estresse por imobilização, exposição a predador, nado forçado e estresse variado não previsível estão entre os protocolos mais empregados a fim de gerar ambientes gestacionais desfavoráveis (Kinnunem *et al.*, 2003; Koenig *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2004; Patin *et al.*, 2002; Alonso, 1991), e todos têm sido associados a desfechos desfavoráveis em funções cognitivas, emocionais ou sociais (amplamente revisados em Weinstock, 2008; Baker *et al.*, 2008 ;2009).

Acredita-se que grande parte dos efeitos do estresse pré-natal sejam decorrentes de uma exposição aumentada aos hormônios maternos relacionados ao estresse. Estes, ao serem transportados através da placenta teriam a capacidade de promover alterações em importantes processos celulares, além de alterar de forma permanente o funcionamento do eixo HPA da prole (através de uma diminuição da expressão de receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides em áreas importantes para seu

feedback negativo) (Darnaudery & Maccari, 2008; Weinstock, 2008; Seckl & Meaney, 2004; Hadoke *et al.*, 2006). Quando a secreção destes hormônios é suprimida, a partir da adrenalectomia de fêmeas prenhas, diversos prejuízos comportamentais produzidos pelo estresse neonatal podem ser prevenidos (Zagron & Weinstock, 2006; Barbazanges *et al.*, 1996).

Restrição de Crescimento Intrauterino

A Restrição de Crescimento Intrauterino (RCIU) ocorre quando há uma diminuição na velocidade de crescimento fetal, resultando em um feto que não consegue atingir todo o seu potencial de crescimento (Geva *et al.*, 2012; Bertino *et al.*, 2007). Esta condição pode resultar de uma ampla variedade de fatores que, de alguma maneira, afetem o ambiente intrauterino, e sua ocorrência está relacionada com uma série de desfechos adversos tanto a curto quanto a longo prazo.

Tipicamente, neonatos são identificados com RCIU quando seu peso ao nascer encontra-se abaixo do percentil 10 para sua idade gestacional e indicadores tais como má nutrição, tabagismo e infecções maternas estiverem presentes durante a gestação (Halpern *et al.*, 2001), porém, seu preciso diagnóstico necessita uma correlação entre diferentes idades gestacionais e medidas seriadas de ultrassom (Hendrix & Berghella, 2012). Além disso, é necessário levar em conta características constitucionais familiares. Mulheres de baixa estatura, por exemplo, são mais propensas a terem filhos pequenos, e embora frequentemente esses neonatos sejam pequenos para a idade gestacional, eles são geralmente saudáveis (Lyons, 2006). A RCIU afeta entre 3-10% de todos os nascimentos (Pollack & Divon, 1992), e estima-se que em gestações datadas com exatidão, aproximadamente 80-85% dos fetos identificados com RCIU sejam constitucionalmente pequenos porém saudáveis, enquanto somente 15-20% dos casos possam ser caracterizados como RCIU “verdadeira” (Manning, 2004).

O processo de crescimento fetal é multifatorial e complexo, de forma que diversos fatores podem levar à RCIU. Na grande maioria dos casos, estes fatores atuam comprometendo - direta ou indiretamente - a perfusão uteroplacentária, e podem ser classificados de uma forma ampla em fetais e maternos (Sabogal & Weiner, 2007).

Entre os fatores fetais, há uma grande variedade de anormalidades genéticas associadas à RCIU, sendo responsáveis por aproximadamente 10% dos casos (Sabogal & Weiner, 2007). Anormalidades como a trisomia do cromossomo 21 (Síndrome de

Down), trissomia do cromossomo 18 (Síndrome de Edwards) e Síndrome de Turner podem causar restrição de crescimento supostamente por causar uma redução no número de arteríolas das vilosidades placentárias (Rochelson *et al.*, 1990). Infecções fetais, como rubéola, sífilis e toxoplasmose também respondem por parcela significativa dos casos de RCIU (Pollack & Divon, 1992), e para completar o quadro, má formações congênitas e gestações múltiplas correspondem juntas a cerca de 5% dos casos (Gruenwald, 1966).

Já entre os fatores maternos, há uma grande variedade de condições associadas com um aumento no risco de apresentar RCIU. Doenças maternas como diabetes e hipertensão, doenças cardíacas congênitas e problemas vasculares em geral, além da exposição a agentes tóxicos como tabaco e álcool estão entre as causas mais comuns (Sabogal & Weiner; 2007; Siu *et al.*, 2002; Ang *et al.*, 2006; Walfisch & Hallack, 2006; Bouhours-Nouet *et al.*, 2005; Mills *et al.*, 1984; Okah *et al.*, 2005). De uma forma ou de outra, todos estes fatores acabam por levar a uma redução no fluxo sanguíneo uteroplacentário, a uma redução na capacidade do sangue em carregar oxigênio e até mesmo a uma redução no volume sanguíneo materno. Mulheres deprimidas durante a gestação também apresentam maior risco de RCIU (Bansil & Kuklina, 2012), e acredita-se que o efeito da depressão sobre o crescimento fetal se dê principalmente devido a alterações no funcionamento do eixo HPA materno, cuja hipersecreção de hormônios poderia atuar reduzindo o tamanho da placenta e afetando sua perfusão e permeabilidade (Diego *et al.*, 2006; Field *et al.*, 2006).

Embora a RCIU apresente diversas etiologias, é indiscutível que a desnutrição materna apresenta um papel destacado no estabelecimento desta condição (Bansil & Kuklina, 2012). Durante a gestação, a desnutrição provavelmente se associa à RCIU através de três mecanismos básicos. Em primeiro lugar, uma alimentação restrita ou desbalanceada pode afetar a disponibilidade de nutrientes vitais para o feto. Além disso, a nutrição materna inadequada pode levar a uma redução no peso e na área de superfície da placenta, resultando em uma reduzida transferência de nutrientes e oxigênio. E por último, a má nutrição materna está associada com concentrações séricas alteradas de hormônios importantes como a insulina, leptina e IGF-1, as quais também estimulam o transporte de nutrientes através da placenta (Jansson & Powell, 2000; Jansson *et al.*, 2008).

A RCIU é um dos problemas mais comuns e complexos na obstetrícia moderna, sendo motivo de grande preocupação particularmente devido a sua associação com altas

taxas de mortalidade e morbidades perinatais (prematuridade, anormalidades congênitas) (Faraci *et al.*, 2011; Bansil & Kuklina, 2012). Para estes neonatos, a taxa de mortalidade chega a ser oito vezes maior (Fernández-Carrocerá *et al.*, 2003), correspondendo a 20% dos óbitos fetais no mundo ocidental. Em diversos países em desenvolvimento, estas taxas são ainda maiores (WHO, 2008).

Mais do que isto, acredita-se que a RCIU induza um processo programação fetal capaz de promover desfechos desfavoráveis a longo prazo sobre a saúde dos indivíduos. Diversos estudos têm associado a ocorrência de RCIU com um aumento nas taxas de hipertensão (Manalich *et al.*, 2000), diabetes tipo II (Hales & Barker, 2001) e obesidade (Ravelli *et al.*, 1999; Pilgaard *et al.*, 2011) na vida adulta, além de levar a alterações em estruturas cardiovasculares (Painter *et al.*, 2006). Alterações no desenvolvimento endócrino-metabólico também foram descritas, como por exemplo, disfunções na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (Reynolds *et al.*, 2005; Kajantie *et al.*, 2007; Osterholm *et al.*, 2012). Outros estudos também apontam para um aumento no risco de apresentar desfechos comportamentais adversos como transtorno de déficit de atenção/hiperatividade (TDAH) (Hultman *et al.*, 2007), transtornos do espectro esquizofrênico (Susser *et al.*, 2008), impulsividade (Silveira *et al.*, 2012) e depressão (Brown *et al.*, 2000) além de alterações no comportamento alimentar (Barbieri *et al.*, 2009).

Atualmente, diversas manipulações têm sido utilizadas para induzir RCIU em roedores, geralmente utilizando-se de modelos nutricionais ou cirúrgicos, hipóxia gestacional ou condições induzidas por drogas (Haugaard & Bauer, 2001). Entre os modelos induzidos por alterações nutricionais, há uma grande variedade de modelos baseados principalmente na exposição a curtos períodos (tipicamente 48 horas) de jejum total ou a períodos mais prolongados de exposição a uma dieta pobre em proteínas e/ou calorias. Estes modelos apresentam a vantagem de serem de fácil estabelecimento, serem altamente reproduzíveis e permitirem a combinação de diferentes parâmetros de duração e intensidade do insulto, refletindo melhor as variações que naturalmente ocorrem em humanos (Haugaard & Bauer, 2001).

Já os modelos cirúrgicos, baseiam-se na ligadura ou clampeamento de artérias uterinas e foram desenhados para demonstrar a importância do adequado fluxo sanguíneo útero-placentário para o crescimento fetal (Wigglesworth, 1964; Tanaka *et al.*, 1994). Embora relativamente simples, uma clara desvantagem desta abordagem é a alta taxa de mortalidade e a exposição dos animais a anestésicos, o que por si só pode

trazer efeitos prejudiciais para o crescimento fetal (Allaert *et al.*, 2007). Nos modelos de hipóxia, fêmeas gestantes são expostas a diferentes níveis de oxigênio durante a segunda metade da gestação (Tapanainen *et al.*, 1994, Schwartz *et al.*, 1998). Os modelos de hipóxia podem ser considerados bastante poderosos, visto que o crescimento fetal será prejudicado mesmo se expostos a episódios breves e intermitentes de hipóxia. E entre os modelos de RCIU induzidos por drogas, torna-se especialmente relevante o modelo de indução por administração de glicocorticoides, uma vez que sua administração é amplamente utilizada a fim de induzir maturação pulmonar fetal em casos de parto pré-termo (Roghair *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2007; 2012).

Estes modelos animais, além de resultarem em desfechos metabólicos e comportamentais semelhantes ao encontrados em humanos, permitem o estudo mais detalhado de aspectos de difícil acesso em estudos clínicos, além de serem essenciais na identificação de seus mecanismos causadores (Rees *et al.*, 2007). A partir destes estudos, já foram relatadas alterações na estrutura e nos níveis de BDNF no hipocampo (Diene & Rees, 2004; Pinilla & Vaynman 2005), diminuição do número de neurônios no cerebelo (Mallard *et al.*, 2000; Rees *et al.*, 2007), alterações microestruturais regionais nas matérias branca e cinzenta (Eixarch *et al.*, 2012), além de disfunções nos sistemas serotoninérgico (Manjarrez-gutierrez *et al.*, 2010) e dopaminérgico (Whitaker *et al.*, 2011).

Comportamento maternal

O termo “Comportamento maternal” refere-se a um conjunto de comportamentos exibidos pela mãe em preparação ao nascimento de seus filhotes e no cuidado e proteção de seus recém-nascidos. Para a maioria dos mamíferos, este repertório comportamental surge próximo ao momento do parto e representa um padrão complexo e previsível muitas vezes espécie-específico (Kristal, 2009). Em roedores, o período que antecede o nascimento é marcado por uma significativa alteração no padrão de limpeza corporal das fêmeas, que passam a dar mais atenção à região mamária e genital (Rosenblatt & Lehrman, 1963). Além disso, alguns dias antes do parto as fêmeas iniciam a construção de ninhos semelhantes àqueles que receberão os filhotes e que garantirão sua proteção e manutenção da temperatura na ausência da mãe.

Após o nascimento da ninhada, os principais componentes do comportamento maternal são os atos de recolher, amamentar e lambar os filhotes, além do

comportamento de construir ninho que permanecerá durante grande parte do período da lactação (Numan & Insel, 2003). No comportamento de recolher os filhotes, que se torna mais necessário na medida em que os filhotes amadurecem seu sistema motor, as fêmeas lactantes os transportam de um local a outro a fim de mantê-los protegidos. Na amamentação, são assumidas posturas que expõem a região mamária aos filhotes e permitem que eles se alimentem. Já no ato de lambe os filhotes, grande ênfase é dada à região anogenital, o que estimula seus processos de excreção (Numan & Stolzenberg, 2009; Friedman *et al.*, 1981). Além disso, e como veremos mais adiante, lambe os filhotes produz profundos efeitos no desenvolvimento da prole (Lévy, 2008). Além destes comportamentos, fêmeas irão proteger e defender seus filhotes de intrusos que se aproximem de seu ninho e superarão situações estressantes e arriscadas para ficar próximas de seus filhotes (Lonstein & Gammie, 2002; Pereira *et al.*, 2005; Lonstein & Morrell, 2007).

Muitos desses cuidados originam-se de estímulos provenientes dos próprios filhotes (Fleming *et al.*, 1999), e são típicos de animais altriciais, os quais nascem bastante imaturos e necessitam integralmente de sua mãe para sobreviverem (Pryce & Feldon, 2003). Além disso, fêmeas não formam vínculos exclusivamente a seus próprios filhotes, sendo que também cuidarão de filhotes de outras mães que porventura sejam colocados em seu ninho (Bridges, 2008).

No momento do parto, este repertório completo de comportamentos maternos é rapidamente apresentado até mesmo por ratas primíparas. Em contraste, ratas nulíparas ao serem expostas a filhotes irão evitá-los e por vezes até mesmo atacá-los (Numan & Insel, 2003). Esta diferença na responsividade aos filhotes torna-se bastante importante, pois evidencia que apenas os estímulos provenientes dos filhotes não são suficientes para induzir o aparecimento de respostas maternas nas fêmeas. Ratas que passaram pela experiência do parto são imediatamente responsivas pelo fato de seus encéfalos terem sido afetados por eventos endócrinos associados à gestação e ao momento do parto (Moltz *et al.*, 1970; Mann & Bridges, 2001).

Estas alterações endócrinas responsáveis pela imediata responsividade materna incluem um acentuado declínio dos níveis de progesterona e elevação dos níveis de estradiol e prolactina circulantes (Nemsadze & Silagava, 2010). Esta alteração do perfil hormonal agiria em regiões encefálicas específicas, coordenando e facilitando o início dos comportamentos maternos, mas sem ser necessária para a expressão destes comportamentos ao longo da gestação (Numan & Stolzenberg, 2009).

Diversos estudos têm apontado que a Área Pré-óptica Medial do Hipotálamo (APOM) é essencial para a correta expressão dos comportamentos maternos em roedores e em outros animais (Numan, 2006). Os neurônios desta região contêm receptores para estradiol, progesterona e prolactina, fazendo com que seja um dos locais prováveis de ação dos hormônios da gestação na estimulação dos circuitos que regulam as respostas maternas voluntárias (Shughrue *et al.*, 1997; Bakowska & Morrell, 1997; Stack *et al.*, 2002; Li & Fleming, 2003). Estudos demonstram que lesões nesta área são relativamente específicas, trazendo prejuízos para os comportamentos maternos sem levar a alterações em outros comportamentos como o sexual e na atividade locomotora (Numan & Insel, 2003).

Embora o padrão de comportamentos maternos de cada espécie obedeça a um padrão bastante previsível, variações individuais na qualidade do cuidado oferecido aos filhotes podem ocorrer. Estas variações, sejam naturais ou causadas por situações estressantes, apresentam uma influência crítica no desenvolvimento dos indivíduos (Champagne *et al.*, 2003; Francis *et al.*, 2002), sendo que em roedores, as variações particularmente nos comportamentos de lambar e limpar os filhotes são responsáveis por regular o desenvolvimento emocional, cognitivo e neuroendócrino destes filhotes (Macri *et al.*, 2004; Champagne *et al.*, 2003; Pryce *et al.*, 2000; Caldji *et al.*, 2000).

Filhotes de mães altamente cuidadoras apresentam maior locomoção e menor latência para entrar nos quadrantes centrais no teste do campo aberto, indicando menor inibição neste teste (Uriarte *et al.*, 2007), maior densidade de receptores para benzodiazepínicos no núcleo central e lateral da amígdala e no locus coeruleus (LC), bem como um aumento de receptores beta adrenérgicos no LC em comparação com filhotes cujas mães apresentavam um menor índice de comportamento maternal (Caldji *et al.*, 1998). Além disso, filhotes de mães altamente cuidadoras apresentam resposta reduzida ao estresse quando adultos se comparados com filhotes de mães pouco cuidadoras (Padoin *et al.*, 2001).

Desta forma, alterações no comportamento maternal podem induzir a modificações epigenéticas nos filhotes, exercendo um efeito persistente que pode estender-se entre gerações (Zhang *et al.*, 2005; Pruessner *et al.*, 2004). A estimulação táctil oriunda da mãe durante a primeira semana de vida parece ter uma importante função no estabelecimento de fenótipos estáveis no comportamento da ninhada (Kaffman & Meaney, 2007).

Alguns estudos têm sugerido que condições adversas durante o período pré-natal possam interagir com a qualidade do cuidado maternal recebido, e desta forma, causar uma considerável variabilidade nos desfechos observados (Barker *et al.*, 2002a; 2002b). Buss (2007) observou um volume hipocampal significativamente menor em indivíduos que nasceram pequenos para a idade gestacional (PIG) e que reportaram ter recebido um cuidado materno de baixa qualidade durante a infância. Esta diminuição do volume hipocampal não foi encontrada em indivíduos PIG que relataram cuidado materno de alta qualidade, tampouco em indivíduos adequados para a idade gestacional que relataram cuidado materno de baixa qualidade (Buss *et al.*, 2007).

Esta interação entre peso ao nascer e qualidade do cuidado maternal também foi encontrada em um estudo que avaliou características atencionais em crianças com 18 meses de vida. Crianças que nasceram PIG e receberam um cuidado maternal de baixa qualidade apresentaram prejuízos na habilidade de transferir o foco da atenção de uma atividade para outra, o que poderia trazer prejuízos a longo prazo para seu desenvolvimento cognitivo (Neuwald *et al.*, 2014). Juntos, estes achados sugerem que os efeitos associados a um ambiente fetal adverso podem ser modulados pela qualidade do cuidado maternal recebido nas fases iniciais da vida.

Flexibilidade Cognitiva

Em um ambiente que passa por constantes mudanças e traz novos desafios a cada instante, os organismos precisam apresentar comportamentos flexíveis e que se adaptem a estas mudanças. Tal habilidade recebe o nome de flexibilidade cognitiva, um processo pertencente às funções executivas que permite a alteração das estratégias cognitivas e motoras baseando-se em novas informações, permitindo desta forma uma adaptação às demandas do meio (Gilbert & burgess 2008; Previc, 2009).

Déficits específicos nesta habilidade (rigidez cognitiva) são observados em diversas desordens como Doença de Parkinson, Esquizofrenia, Autismo e Transtornos do humor, estão frequentemente presentes em indivíduos com distúrbios alimentares, e podem inclusive surgir naturalmente ao longo do envelhecimento normal (Chamberlain *et al.*, 2006; Verdejo-Garcia *et al.*, 2006; Ceaser *et al.*, 2008; Tchanturia *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2011). Indivíduos que apresentam estes déficits normalmente são capazes de aprender informações e regras que guiam seus comportamentos, porém, quando uma

situação exige mudanças, a habilidade em modificar suas respostas fica comprometida (Bissonette *et al.*, 2013).

Diversos testes já foram desenvolvidos a fim de acessar os diferentes aspectos da flexibilidade cognitiva. Nestes testes, os indivíduos precisam aprender a discriminar entre uma estratégia/resposta correta (muitas vezes associadas a uma recompensa) e outra incorreta. Quando a tarefa é alterada, e a resposta que anteriormente era correta agora passa a ser incorreta, outra estratégia precisa ser escolhida, iniciada e mantida, o que requer a extinção da associação “antiga” e aquisição de uma nova.

Em humanos, o teste mais comumente utilizado é o *Wisconsin Card Sorting Test* (WCST). Neste teste, cartas com diferentes formas, cores e números (Ex.: dois quadrados vermelhos) são apresentadas, e é exigido ao indivíduo que as ordene de acordo com alguma categoria perceptual pré-determinada (Ex.: cor). Ao longo do teste, esta categoria perceptual relevante é alterada (ex.: para forma), e o participante deverá modificar seu comportamento a fim de identificar qual a “regra perceptual” agora vigente, tudo isso sem qualquer instrução explícita.

Já em modelos animais, uma ferramenta comum para acessar a flexibilidade cognitiva é o uso do *Attentional Set-shifting Task* (ASST) em roedores, que assim como o WCST, requer que uma regra inicialmente aprendida (que previa uma recompensa) seja substituída por outra (Birrel & Brown, 2000). Embora estas tarefas variem no seu design, todas mantêm o mesmo princípio geral, exigindo o aprendizado de regras abstratas e associações que guiarão o comportamento do animal e que serão seguidas de substituições entre as regras disponíveis (Birrel & Brown, 2000). Neste processo de substituição, duas etapas figuram como as mais relevantes e estudadas: as mudanças de configurações atencionais (*attentional set-shiftings*) e os aprendizados reversos (*Reversal learnings*).

Nas etapas de *set-shiftings*, são exigidas adaptações comportamentais em resposta a alterações nos estímulos perceptuais relevantes (estímulos que preveem recompensa), e podem ser classificados em intra (*Intradimensional shift* - IDS) ou extradimensionais (*Extradimensional shift* - EDS). Na etapa intradimensional, novos exemplares (cores, formas e cheiros) são apresentados, porém, a dimensão perceptual relevante permanece a mesma (Ex.: o animal precisa continuar prestando atenção na cor). Neste caso, não é exigido que a atenção seja reorientada, e uma adaptação comportamental bem sucedida exige a manutenção da regra atual.

Do contrário, nas mudanças extradimensionais não só os exemplares são novos, mas a dimensão perceptual que prevê recompensa também é alterada. Isto significa que, neste tipo de mudança, é necessária uma alteração da resposta para a dimensão que anteriormente era irrelevante (Ex.: ao invés da cor, o animal precisa, agora, responder ao cheiro) (Rogers *et al.*, 2000). De uma forma bastante sucinta, regras são aprendidas e reforçadas dentro da sua dimensão na mudança intradimensional para depois serem alteradas entre dimensões na mudança extradimensional.

Já nas etapas de reversão, é exigido ao animal que pare de responder ao estímulo que previa recompensa e passe a responder ao outro estímulo, da mesma dimensão perceptual, que anteriormente não estava associado a recompensas (Robbins, 1998). Ao contrário da mudança intradimensional, na qual todos os exemplares são novos, na reversão os exemplares permanecem os mesmos, porém, o exemplar anteriormente correto agora é o incorreto.

E foi justamente utilizando a tarefa do ASST que, em um importante estudo, Birrel e Brown demonstraram que diferentes áreas do córtex pré-frontal são exigidas na resolução efetiva de tarefas que exijam flexibilidade cognitiva, e mais do que isto, demonstraram que durante estas tarefas, as áreas envolvidas apresentam papéis independentes e distintos (Birrel & Brown, 2000). Atualmente, sabemos que o córtex orbitofrontal (OFC), o córtex pré-frontal medial (PFCm), o córtex cingulado anterior (ACC) e o corpo estriado (EST) compõem e as estruturas mais importantes para este processamento em roedores (Klanker *et al.*, 2013; Bissonette, 2013).

Lesões restritas ao Córtex Orbitofrontal levam a déficits específicos para as *reversal learnings* sem causar prejuízos na capacidade de efetuar *set-shiftings* (McAlonan & Brown, 2003; Hornak *et al.*, 2004; Boulougouris *et al.*, 2007). Por outro lado, lesões no PFCm e no ACC de roedores levam a prejuízos específicos para as etapas de *set-shiftings* (Birrell & Brown, 2000; Bissonette *et al.*, 2008). Ao que parece, o PFCm e o ACC são responsáveis, pelo menos em certo grau, por diversas funções fundamentais que necessitam ser precisamente realizadas para que os *set-shiftings* ocorram adequadamente. Essas funções incluem a formação de associações entre os estímulos e respostas, a detecção de erros e conflitos entre as regras e o acompanhamento do histórico de recompensas para determinar quais respostas já não são mais válidas (Bissonette, 2008).

Além destas áreas, o corpo estriado também estaria envolvido com a regulação da flexibilidade cognitiva (Clarke *et al.*, 2008; Castane *et al.*, 2010). Nesta região,

circuitos fronto-estriatais contribuiriam para as *reversal learnings*, enquanto os *set-shiftings* dependeriam de conexões entre o PFCm e o estriado (Castane *et al.*, 2010; Ghahremani *et al.*, 2010; Graham *et al.*, 2009). Para fins de comparação, torna-se importante notar a consistentes similaridades entre primatas e roedores nestas áreas envolvidas com a flexibilidade cognitiva (Mailly *et al.*, 2013).

Diversos estudos, tanto em animais quanto em humanos, tem indicado que a DA está envolvida na regulação de diferentes aspectos da flexibilidade cognitiva (revisto em Kankler, 2013). Ao que parece, conjuntos de neurônios dopaminérgicos do PFC sinalizam especificamente discrepâncias entre o desfecho esperado e o real, formando uma rede inibitória capaz de interromper a atividade corrente e ajustar os comportamentos com base no novo contexto (Rodriguez-Jimenez *et al.*, 2006; Braver & Barch, 2002).

Mas embora a DA apresente uma forte influência sobre a flexibilidade cognitiva, é importante notar que prejuízos nesta tarefa devido a perturbações na sinalização dopaminérgica são, na grande maioria das vezes, transitórias. Isto sugere que a DA possa facilitar estes comportamentos, mas não seja totalmente indispensável (Floresco & Magyar 2006; Lee *et al.*, 2007). Além disso, a habilidade de adaptação comportamental em resposta a alterações ambientais não é totalmente abolida diante de manipulações no sistema dopaminérgico (Kankler *et al.*, 2013).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito da restrição de crescimento intrauterino sobre uma tarefa de flexibilidade cognitiva aplicada na vida adulta, avaliar a interação entre o cuidado materno recebido e os desfechos comportamentais encontrados, assim como possíveis alterações na sinalização dopaminérgica mesocorticolímbica dos animais.

Objetivos específicos

- Verificar o efeito da restrição alimentar em 50% sobre o ganho de peso, a duração da gestação e o crescimento fetal;
- Investigar o efeito da restrição de crescimento intrauterino sobre o cuidado materno;
- Avaliar o efeito da restrição de crescimento intrauterino sobre o consumo de alimento palatável na vida adulta;
- Avaliar a flexibilidade cognitiva dos animais na idade adulta em uma tarefa que utiliza alimentos doces como recompensa;
- Avaliar a interação entre restrição de crescimento intrauterino e cuidado materno recebido sobre o resultado do teste de flexibilidade cognitiva;
- Investigar a sinalização dopaminérgica em áreas do sistema mesocorticolímbico que estejam envolvidas com os comportamentos analisados.

HIPÓTESE

O protocolo de indução de restrição de crescimento intrauterino levará a alterações no cuidado materno das fêmeas lactantes. Nos filhotes, esta intervenção levará a um retardo no crescimento fetal e, na vida adulta, estará associada a déficits na flexibilidade cognitiva. Além disso, o cuidado materno recebido terá influencia sobre os desfechos encontrados, e alterações na sinalização dopaminérgica mesocorticolímbica estarão subjacentes às alterações comportamentais encontradas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e Condições Experimentais

Para este estudo foram selecionados, ao acaso, 59 ratos da linhagem *Sprague-Dawley* provenientes da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As fêmeas (n=40) permaneceram, individualmente, em caixas-moradia confeccionadas em *Plexiglas*, medindo 49 x 34 x 16cm, com assoalho recoberto de maravalha e mantidas em um ambiente controlado: ciclo claro/escuro de 10/14 horas (luzes acendendo às 09h e apagando às 19h), temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, limpeza das caixas uma vez por semana, ração padrão e água *ad libitum*. Estas fêmeas foram mantidas nestas condições ambientais por pelo menos 10 dias antes de qualquer procedimento experimental. Já os machos (n=19), permaneceram nestas mesmas condições de laboratório, com a exceção de terem permanecido agrupados em, no máximo, cinco indivíduos por caixa. Para o acasalamento, verificou-se o ciclo estral de cada rata diariamente através da visualização em microscópio óptico do material coletado por lavado vaginal. Após a constatação do período fértil, as ratas foram colocadas individualmente juntas de um macho, durante o ciclo escuro, para que o acasalamento ocorresse. Após a confirmação do acasalamento através da aferição da presença de espermatozoides no lavado vaginal, este foi considerado o dia 1 (um) de gestação.

As ratas prenhes foram randomizadas pelo peso corporal e, no dia 10 de gestação, divididas em dois grupos: Controle (Contr) e Restrição Alimentar em 50% (FR). Enquanto o grupo Controle recebia ração padrão à vontade durante toda a gestação e lactação, as fêmeas do grupo FR50% receberam diariamente apenas 50% do consumo médio de ração dos animais do grupo controle. O cálculo do consumo médio de ração do grupo Controle baseou-se nos dados de consumo de um estudo anterior de nosso grupo que utilizou o mesmo protocolo. Do dia 10 de gestação até o desmame (21 dias de vida dos filhotes), aferiu-se diariamente o consumo de ração e o peso corporal das fêmeas (Desai *et al.*, 2005).

O dia do nascimento foi constantemente monitorado e em até 24 horas após nascer os filhotes foram pesados, padronizados em oito filhotes por ninhada e o procedimento de adoção cruzada (*cross-fostering*) foi realizado. Neste procedimento, as ninhadas passam da mãe gestante para uma mãe adotiva durante o período da lactação, formando agora quatro grupos (gestação/lactação) (Figura 1):

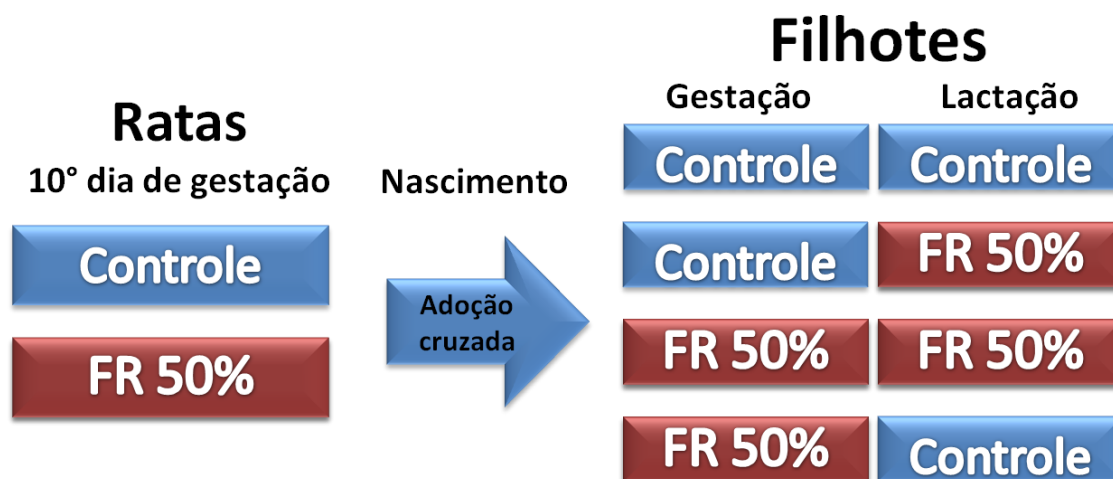


Figura 1. Formação dos grupos utilizados no estudo.

- Contr/Contr (n=24♂ e 24♀) – filhotes de mães controles são adotados por outras mães controles.

- FR/Contr (n=20♂ e 20♀) – filhotes de mães desnutridas são adotados por mães controles.

- FR/FR (n=20♂ e 18♀) - filhotes de mães desnutridas são adotados por outras mães desnutridas.

- Contr/FR (n=17♂ e 22♀) - filhotes de mães controles são adotados por mães desnutridas.

Com o objetivo de diminuir as rejeições e obtermos sucesso nas adoções, os filhotes foram retirados da caixa da mãe e colocados em um recipiente contendo maravalha da mãe adotiva. Este procedimento foi realizado para que os filhotes ficassem com o cheiro desta mãe. As adoções foram observadas por um período de 30 minutos ou até que as mães demonstrassem cuidado com a ninhada, amamentando ou carregando os filhotes para o ninho.

No dia 21 após o nascimento ocorreu o desmame, sendo os animais separados por sexo e mantidos em no máximo 5 animais por caixa, recebendo ração padrão e água *ad libitum*, com ciclo claro/escuro de 12/12h, sendo manipulados apenas para a pesagem semanal que foi realizada até o início dos testes comportamentais.

Registro do Cuidado Materno

O comportamento materno de cada genitora foi registrado em cinco períodos diários de 72 minutos cada, do dia 2 ao dia 7 pós-natal (segundo os procedimentos

descritos por Champagne et al. 2003). Os registros ocorreram em tempos regulares, sendo três no período claro (10:00, 13:00 e 17:00 h) e dois no período escuro (07h e 20h). Em cada período de observação, o comportamento da genitora foi registrado de forma pontual a cada três minutos (25 observações/dia x 5 períodos/dia = 125 observações/genitora/dia), sendo que a frequência dos seguintes comportamentos foi registrada:

- a) Genitora em contato com no mínimo 3 filhotes.
- b) Genitora fora do ninho.
- c) Genitora amamentando os filhotes, conforme a posição do dorso arqueado: (1), (2), (3) ou (4); sendo a posição (1) a menos arqueada e a posição (4) a mais arqueada (Figura 2).
- d) Genitora amamentando os filhotes de forma passiva, ou seja, quando ela está deitada de costas ou de lado ao amamentar.
- e) Genitora lambendo (licking and grooming) algum filhote. Este comportamento podia acontecer de forma concomitante a outros comportamentos como a amamentação.

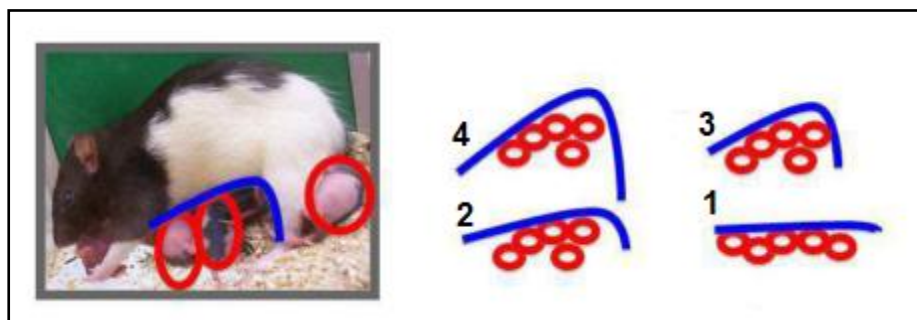


Figura 2: Posturas de amamentação. A linha representa o ventre da genitora visto lateralmente, enquanto os círculos representam os filhotes.

Os comportamentos foram registrados em uma planilha do Excel e seus escores foram calculados dividindo a frequência do comportamento pelo número total de observações.

Atividade Locomotora

Para os testes comportamentais e bioquímicos foram utilizados apenas dois filhotes/sexo de cada ninhada. O teste de atividade locomotora foi realizado colocando-se os animais em uma arena retangular dividida em 12 quadrantes pelo período de 5

minutos. Durante este tempo, a locomoção foi quantificada através da contagem manual do número de quadrantes que o animal cruzou com as quatro patas.

Teste de Flexibilidade Cognitiva (*Attentional set shifting*)

Na investigação da flexibilidade cognitiva em tarefa de atenção, realizou-se o *Attentional set shifting task* (ASST), adaptado de Birrell & Brown (2000) e que combina tarefas de *set-shifting* e *reversal learnings*. Nesta tarefa, a atenção do animal precisa ser direcionada para determinado estímulo relevante (por exemplo, o cheiro), enquanto outros estímulos irrelevantes devem ser ignorados. Em seguida, o estímulo relevante é alterado e, tanto a habilidade do animal mudar de estratégia quanto a sua capacidade de manter a nova estratégia adquirida são avaliadas. O ASST baseia-se no fato de roedores aprenderem rapidamente a cavar em potes em busca de recompensas palatáveis e rapidamente aprenderem as dicas externas associadas para guiar suas decisões.

Na semana anterior à realização do teste, os animais foram expostos a uma restrição de 20% na quantidade de ração oferecida e, adicionalmente, receberam 4 *pellets* diários de Froot Loops® para habituação. Nesta etapa, os animais foram isolados e mantidos individualmente em suas caixas-moradia. Para que os animais não tivessem dificuldades na tarefa de escavar, foram utilizados potes de cerâmica com um diâmetro interno de 7 cm e uma profundidade de 4 cm, com a recompensa palatável consistindo de ¼ de *pellet* de Froot Loops® a cada trial.

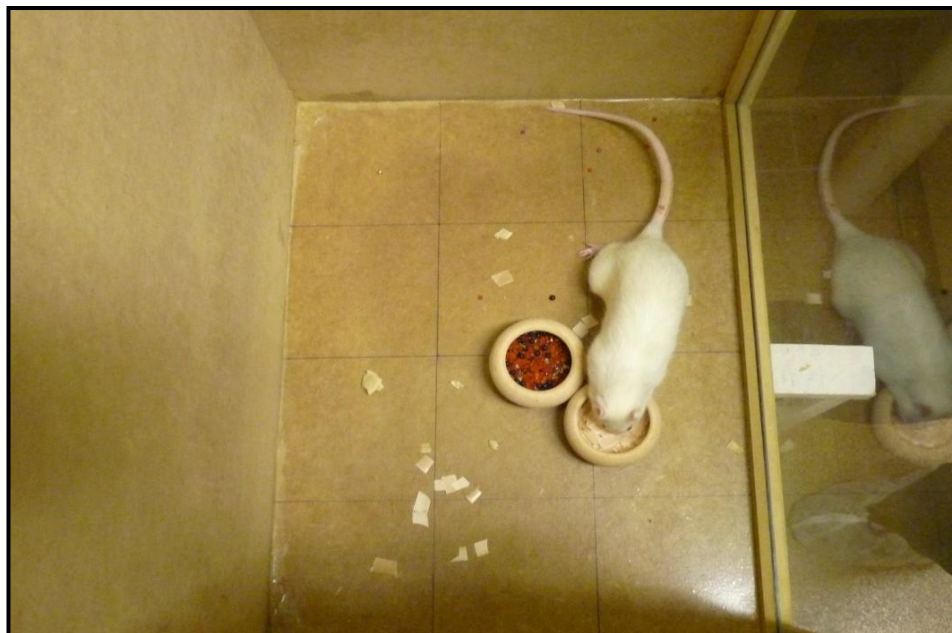


Figura 3: Animal cavando em busca da recompensa no ASST.

Foram realizadas sessões de habituação, treino e teste. Na habituação, era permitido ao animal explorar o ambiente (arena de teste), apanhar e comer as recompensas colocadas em seu interior. Na medida em que o animal passava a realizar estas ações mais rapidamente e com mais segurança, os pellets passaram a ser colocados dentro dos potes e recobertos por quantidades progressivamente maiores de maravalha. Nesta etapa, era necessário que os animais perdessem o medo dos potes e cavassem na maravalha para apanhar o pellet escondido em seu interior. Os critérios de habituação foram definidos pela rapidez na qual o animal apanhava os pellets e os consumia. Os animais que, no período de três dias não atingiram estes critérios, foram excluídos do teste.

No treino, os animais deveriam realizar duas discriminações simples (DS): de odor e de meio (material onde a recompensa estava escondida). Era permitido ao rato cavar em ambos os potes, sendo que um erro era registrado sempre que o animal cavasse no pote sem recompensa. No caso de erro, os dois potes eram rapidamente retirados, sem permitir acesso ao pote correto. No caso de acerto, era permitido ao animal consumir toda a recompensa. Estas DS foram realizadas na mesma ordem para todos os ratos, e em cada caso, somente um dos dois exemplares de escolha obtinha recompensa. Desta forma, na DS de meio, a recompensa estava sempre escondida no pote contendo lascas de papel, e não no pote contendo tecido TNT picado. Já na DS de odor, a recompensa estava sempre escondida no pote contendo maravalha com odor de

morango, e não no pote com maravalha odor cominho. Para passar desta fase, os animais precisavam acertar 6 *trials* consecutivos em cada DS. Estes exemplares de meio e odor não foram usados novamente no decorrer do teste.

Já o teste, é composto por sete etapas: discriminação simples (DS), discriminação composta (DC), reversão da discriminação composta (REV1), mudança intradimensional (MID), reversão da mudança intradimensional (REV2), mudança extradimensional (MED) e reversão da mudança extradimensional (REV3).

A primeira discriminação no teste é a Discriminação Simples (DS). Assim como no treino, os potes diferiam apenas em uma dimensão (odor ou meio) e somente um possuía a recompensa (Ex.: pote com cheiro de orégano). Uma vez que o rato atingia o critério de desempenho na DS (6 acertos consecutivos), iniciava-se a discriminação composta (DC). Nesta etapa, outra dimensão perceptual era introduzida (Ex: meio), porém, o estímulo correto continuava sendo o mesmo da DS (Ex.: cheiro de orégano). Na mudança intradimensional (MID), um novo conjunto de estímulos era introduzido (novos odores e novos meios), mas a dimensão perceptual relevante continuava a mesma das etapas anteriores (Ex.: odor). O aprendizado nesta etapa deveria ser facilitado pela manutenção da atenção do animal à dimensão perceptual relevante desde o início do teste, de modo que menos *trials* deveriam ser necessários para completar a MID em comparação com a DC. Na mudança extradimensional, um terceiro par de estímulos novos era introduzido. A diferença na MED é que a dimensão perceptual irrelevante desde o começo do teste (meio) se tornava, agora, a dimensão correta. Nas reversões (REV 1, REV 2 e REV 3), a dimensão relevante e os exemplares permanecem os mesmos, porém, o animal precisa aprender que o estímulo previamente correto agora é o incorreto e vice-versa.

Estágio	Descrição	Dimensões	
		Relevante	Irrelevante
Discriminação Simples (DS)	Dois estímulos pertencentes a uma mesma dimensão são apresentados (Ex.: odor). Um dos estímulos é o correto e outro é incorreto	Odor	-
Discriminação Composta (DC)	Uma segunda dimensão (Ex.: Meio) é introduzida, mas esta é irrelevante e o animal precisa continuar discriminando entre os dois estímulos originais.	Odor	Meio
Reversão da Discriminação Composta (REV1)	A relevância dos estímulos é agora invertida: o estímulo correto passa a ser incorreto, enquanto o anteriormente incorreto se torna o correto.	Odor	Meio
Mudança Intradimensional (MID)	Novos estímulos de ambas dimensões são introduzidos. A dimensão correta (Ex.: odor) permanece a mesma.	Odor	Meio
Reversão da Mudança Intradimensional (REV2)	O estímulo relevante é novamente invertido: o estímulo correto passa a ser incorreto, enquanto o incorreto se torna o correto.	Odor	Meio
Mudança Extradimensional (MED)	Novos estímulos de ambas dimensões são introduzidos. Nesta etapa, a dimensão relevante é alterada (Ex.: de odor para meio).	Meio	Odor
Reversão da Mudança Extradimensional (REV3);	A relevância dos novos estímulos é invertida, e novamente o estímulo correto se torna incorreto e vice-versa.	Meio	Odor

Tabela 1: Fases do Attentional Set-shifting Task.

Em todas as etapas do teste os potes foram colocados pseudoaleatoriamente em diferentes posições e ordens na arena de teste. Os aromas utilizados foram morango e cominho para o treino e orégano, canela, tomilho, baunilha, páprica e cravo da índia para o teste. Em relação aos meios, foi utilizado papel picado e tecido TNT para o treino e tiras de cetim, miçangas, botões, cliques, arruelas e pedaços de papelão para o teste.

Teste de Exposição Aguda ao Alimento Doce

Após todos os animais terem completado o ASST, realizamos o teste de exposição aguda ao alimento doce. Na manhã do dia do teste, os animais foram previamente pesados e mantidos em jejum por um período de 4 horas (com água *ad libitum*). Ao final deste período, um animal de cada ninhada foi imediatamente decapitado, enquanto o outro foi exposto a uma quantidade previamente pesada (aprox. 30 g) de Froot Loops® por 1 hora.



Figura 4: Teste de exposição aguda ao alimento doce.

Ao final desta 1 hora o restante dos animais foi imediatamente decapitado e seu consumo de Froot Loops® avaliado.

Coleta e Armazenamento dos Tecidos

Para a realização da coleta de tecidos os animais foram eutanasiados por decapitação. Este protocolo experimental foi necessário para que fosse mínimo o estresse em que o animal é submetido e também para viabilizar a coleta das estruturas de interesse desse trabalho. O procedimento de decapitação é extremamente rápido, a fim de evitar qualquer forma de sofrimento aos animais e foi realizado em uma sala separada, afastada dos outros animais para não stressá-los.

Imediatamente após a eutanásia, o cérebro e parte do sangue do tronco dos animais foram coletados. Os cérebros foram rapidamente removidos e congelados através da imersão em isopentano e armazenados em freezer a -80°C . Enquanto isso, o sangue dos animais foi coletado em tubos específicos para futuras determinações bioquímicas. As amostras sanguíneas foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C e o soro separado e armazenado a -80° .

Medidas Centrais – Western Blotting

Para quantificação do conteúdo proteico, o material analisado foi extraído através de “punches” (Paxinos; Watson, 2007). A proteína foi quantificada através de método colorimétrico (Pierce* BCA* Protein Assay, cat: 23225, Thermo Scientific) sendo feita a leitura do resultado com o espectrofotômetro a 562nm. Após, foi realizada a extração citosólica, as amostras incubadas com LDS e DTT a 95 °C por 3min. As amostras já processadas foram pipetadas nos poços do gel NUPAGE 4-12% bis-tris gel (Bis-Tris-HCl buffer (pH 6.4), Acrylamide, Bis-acrylamide, APS, Ultrapure water) (INVITROGEN, cat: NP0323BOX) em um dos poços foi pipetado o marcador de proteína (Magic Mark XP western protein standard 20-220 Kda, INVITROGEN, cat: LC5602) foi colocado na cuba de eletroforese um tampão de corrida (NUPAGE MES SOS running buffer 20x, INVITROGEN, cat: np002) e ao mesmo foi adicionado um antioxidante (Nupage antioxidant, INVITROGEN, cat: np005).

A cuba de eletroforese foi conectada a uma fonte, e a corrida realizada por 1:30h, 120V e 100mA. Após a corrida, o gel foi colocado juntamente com esponjas embebidas em tampão de transferência (NUPAGE transfer buffer 20 x, INVITROGEN, cat: np006) dentro de um compartimento de transferência. Foram colocadas sequencialmente as esponjas, o papel filtro, o gel e a membrana (hybond-C Amersham biosciences nitrocelulose 0,4 micron 30 cm x 3 m roll, GE heathcare, cat: RPN303C), e inseridas dentro da cuba de transferência. Foi colocado nesta cuba o tampão de transferência e adicionado o antioxidante, a corrida foi 1:30h, 30V, 400mA. Após a transferência foi colocado Ponceau solution (Sigma-Aldrich, cat: P7170-1L) na membrana para verificar se as proteínas haviam sido transferidas. A membrana foi incubada em ar ambiente por 1 hora com leite em pó desnatado + TBS-T, para bloquear a mesma, esse processo impede que ocorram interações não específicas entre a membrana e o anticorpo usado para a detecção da proteína alvo.

A membrana ficou em incubação “*overnight*” na câmara fria com o anticorpo primário e, no dia seguinte, foi incubada por 2 horas com o anticorpo secundário. Uma peroxidase – ligada secundariamente foi usada em conjunção com um agente quimiluminescente (ECL western blotting analysis system, GE heathcare, cat: RNP 2106) e a mesma foi exposta ao filme fotográfico (KODAK). Para correção de potenciais erros de pipetagem, a membrana foi também incubada com Actina em “*overnight*” na câmara fria, no dia seguinte incubada com o seu respectivo anticorpo

secundário (AmershamECL Anti-Mouse IgG, GE heathcare, cat: NA 931) e revelada. A quantidade de proteína de interesse é calculada em relação a actina usando o software Image J® (SRINIVASAN; DUNN, 2011; KURIEN; HAL SCOFIELD, 2006; CORDEIRA *et al.*, 2010). Para dosagem de tirosina hidroxilase (TH) foi utilizada concentração protéica de 20 µg, além dos anticorpos primários TH (1:5000) (anti-tyrosine hydroxylase, peso molecular: 60 KDa, Sigma-Aldrich, cat: T2928), e actina (1:500) (β-actina, Sigma-Aldrich), e o anticorpo secundário anti-mouse (1:2000) (Amersham ECL Anti-Mouse IgG, GE heathcare, cat: NA 931).

Rotinas/Normas de Segurança e Descarte de Rejeitos

Os pesquisadores fizeram uso de jaleco, luvas, toucas e propés durante a permanência na Unidade de Experimentação Animal, local onde o projeto foi desenvolvido. Da mesma forma, utilizaram os equipamentos de proteção individual (EPI) visando à segurança do pesquisador nos laboratórios, respeitando as normas de segurança vigentes. O manuseio e o descarte de reagentes foram realizados conforme as rotinas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O descarte dos animais também seguiu a rotina do HCPA: após a decapitação dos animais, as carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos de cor branca, próprios para descarte, e armazenadas em freezer a -18°C. Em seguida, o material foi encaminhado ao Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) para processamento de acordo com o procedimento local.

Análise Estatística

O peso durante a gestação foi analisado através de uma ANOVA de medidas repetidas ajustada pelo tamanho da ninhada. Teste t de student e Qui-quadrado foram utilizados respectivamente para avaliar o tamanho da ninhada e a porcentagem de nascimentos por turno do dia. Para as variáveis do cuidado materno utilizou-se ANOVA de uma via. Exceto para o consumo de alimento doce (analisado por ANOVA de uma via seguido pelo post hoc LSD), os outros dados comportamentais foram analisados com foco nos dois grupos de interesse para investigar os efeitos da programação fetal (FR50%/Contr e Contr/Contr). ANOVA de duas vias foi utilizada para analisar o peso no momento do nascimento (grupo e sexo como fatores, ajustado para o tamanho da ninhada), ASST (realizado para cada fase da tarefa, de acordo com Cheng & Li, 2013),

e Western blots (dividido por sexo e utilizando grupo e status metabólico como fatores). Dados da TH no Nacc não apresentaram distribuição normal (*Kolmogorov-Smirnov test*, $p < 0,0001$) e foram transformados em logaritmo para a análise.

Todos os dados foram analisados no programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 22.0 (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA). Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%.

Considerações Éticas

Todos os procedimentos deste trabalho foram submetidos e aprovados em seus aspectos éticos e metodológicos pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA (GPPG/HCPA), estando de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08/10/2008 (BRASIL, 2008), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais. (Projeto número 12-0353).

RESULTADOS

Em relação ao ganho de peso das genitoras, a ANOVA de medidas repetidas considerando o dia 1 e 21 de gestação e tendo tempo e grupo como fatores e tamanho da ninhada como covariável demonstrou que houve efeito do tempo [$F(1,26)=16,36$, $p<0,001$], no qual as ratas de ambos os grupos ganharam peso durante a gestação, assim como há interação entre tempo e grupo [$F(1,26)=153,97$, $p<0,001$], indicando que embora ambos ganhem peso, o ganho das FR50% é menor que das fêmeas controle. Há também interação entre tempo e o número de filhotes de cada ninhada [$F(1,26)=8,03$, $p<0,01$], sendo que quanto mais filhotes, mais peso as genitoras ganham. Não houve efeito principal do grupo [$F(1,26)=2,26$, $p=0,14$], tampouco efeito principal do número de filhotes [$F(1,26)=0,14$, $p=0,71$].

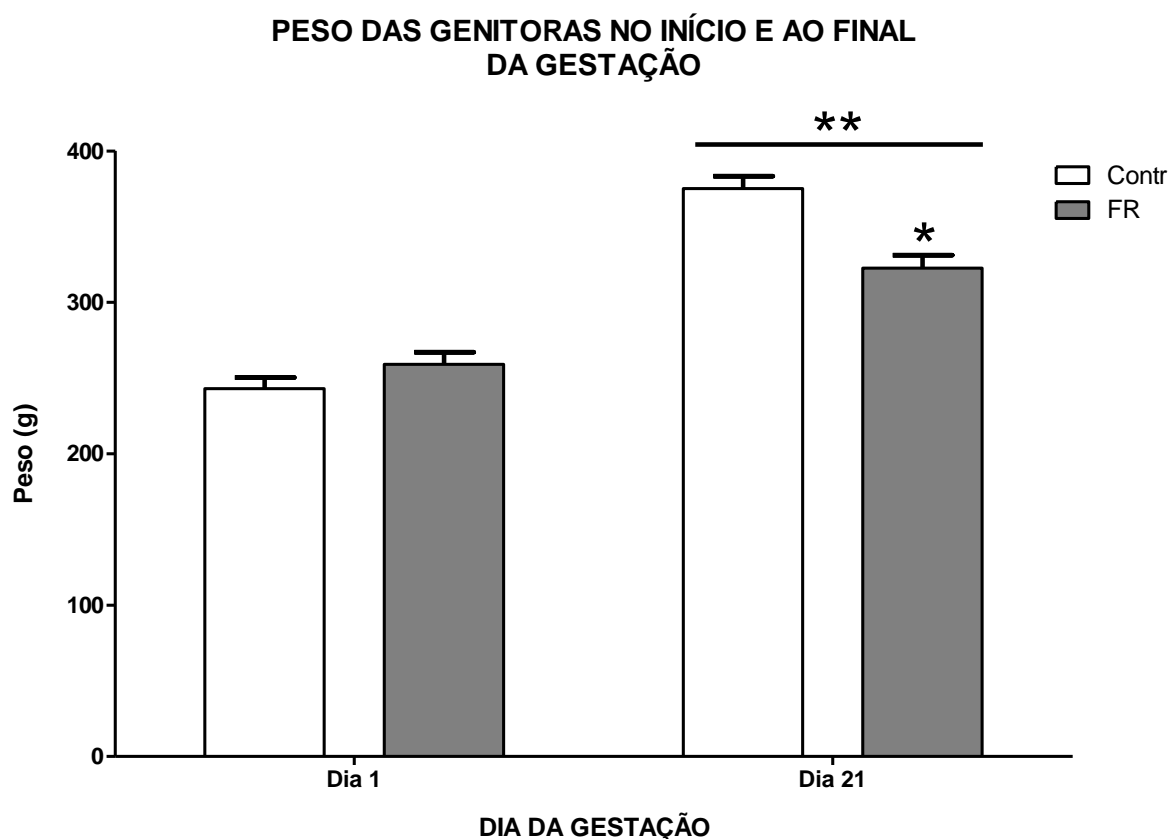


Figura 5: MÉDIA±E.P.M. do peso das genitoras do grupo controle (n=15) e FR (n=14) nos dias 1 e 21 da gestação. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de medidas repetidas e mostram efeito do tempo ($p<0,001$) e interação tempo*grupo ($p<0,001$). * Diferença significativa quando comparado ao grupo Contr. ** Diferença significativa em relação ao dia 1.

Quanto ao peso dos filhotes no dia do nascimento, a análise utilizando grupo e sexo como fatores e número de filhotes de cada ninhada como covariável mostrou efeitos do grupo [$F(1,336)=292,56$, $p<0,001$], sexo [$F(1,336) =16,03$, $p<0,001$] e ninhada [$F(1,336)=11,53$, $p=0,001$]. Isso demonstra que filhotes do grupo FR50% pesam menos que os filhotes do grupo controle no momento do nascimento. Além disso, filhotes do sexo feminino são em geral menos pesados que filhotes do sexo masculino e quanto maior o tamanho da ninhada, menor o peso individual dos filhotes. Contudo, não houve interação entre sexo e grupo [$F(1,336)=2,29$, $p=0,13$].

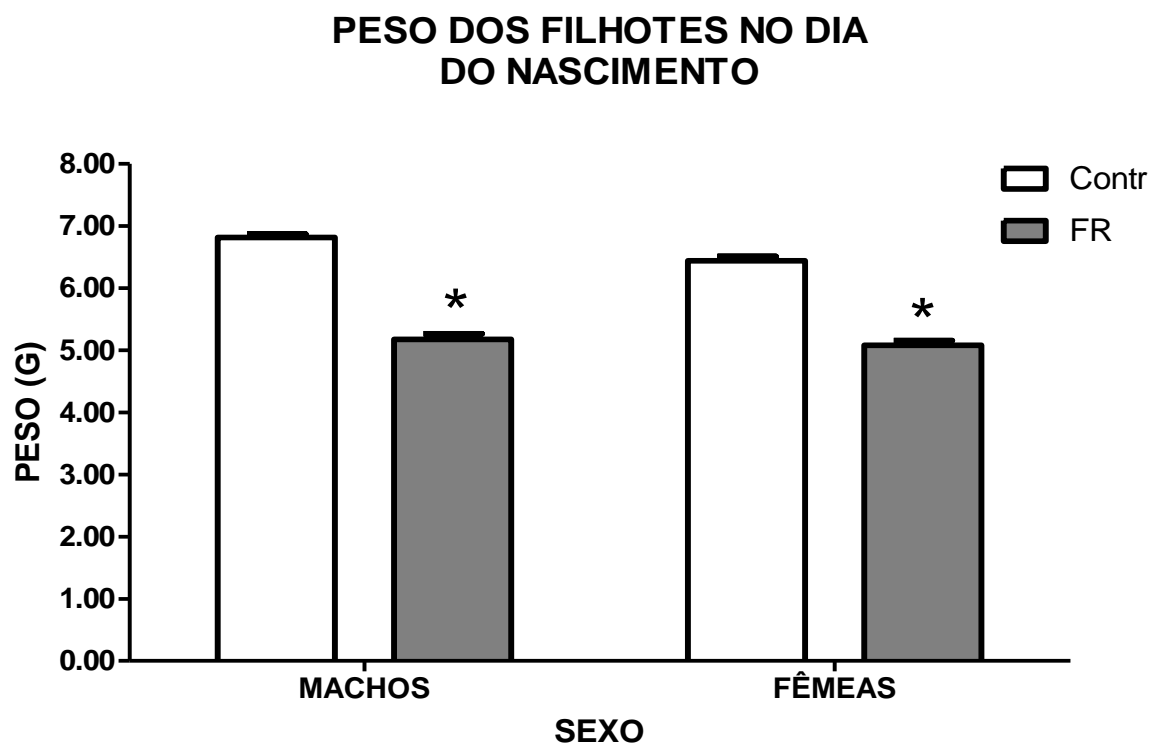


Figura 6. MÉDIA±E.P.M. do peso dos filhotes do grupo controle (n=78♂; 74♀) e FR50% (n=97♂; 92♀) no dia do nascimento. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias ajustada pelo tamanho da ninhada e mostram efeito do grupo e do sexo. * Diferença significativa quando comparado ao grupo Contr do mesmo sexo.

Curiosamente, as genitoras do grupo FR50% tiveram ninhadas com um número médio de filhotes significativamente maior que as fêmeas do grupo controle ($t_{29}=4.241$, $p<0,001$). Enquanto o número médio de filhotes no grupo controle ficou em $10,6 (\pm 0,6)$, nas ninhadas do grupo FR50% esta média foi de $13,89 (\pm 0,46)$ filhotes.

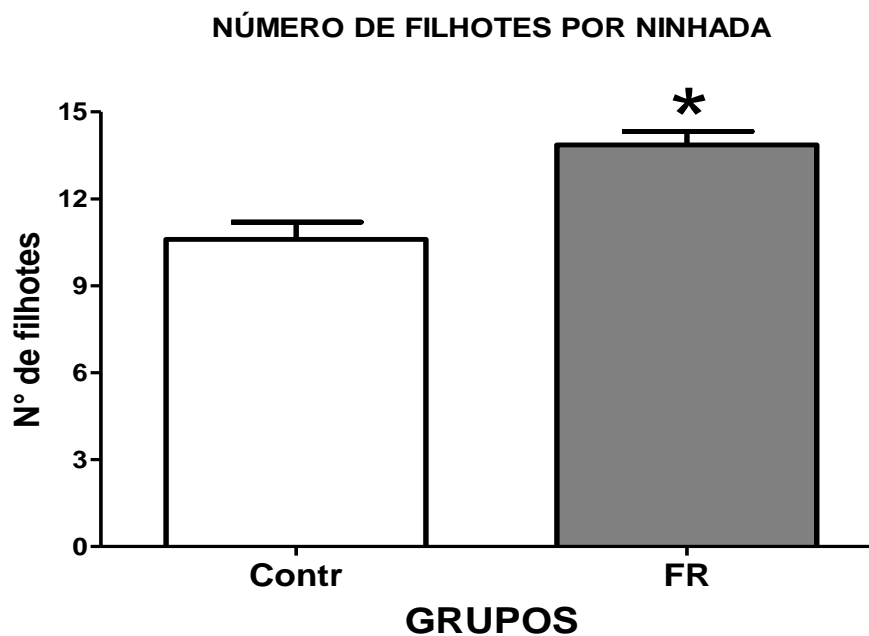


Figura 7. MÉDIA±E.P.M. do número de filhotes de cada ninhada do grupo controle (n=15) e FR50% (n=14) no dia do nascimento. Os dados foram analisados utilizando Test *t* de Student. *Diferença significativa quando comparado ao grupo Contr.

Além disso, o teste do Qui-quadrado mostrou que houve diferença no número de nascimentos ao longo dos turnos do dia entre os grupos, sendo que fêmeas do grupo FR50% tiveram a maior parte de seus filhotes na madrugada do dia do parto, enquanto as fêmeas do grupo Controle tiveram seus filhotes distribuídos entre a manhã e a tarde do mesmo dia (qui-quadrado, $p < 0,001$).

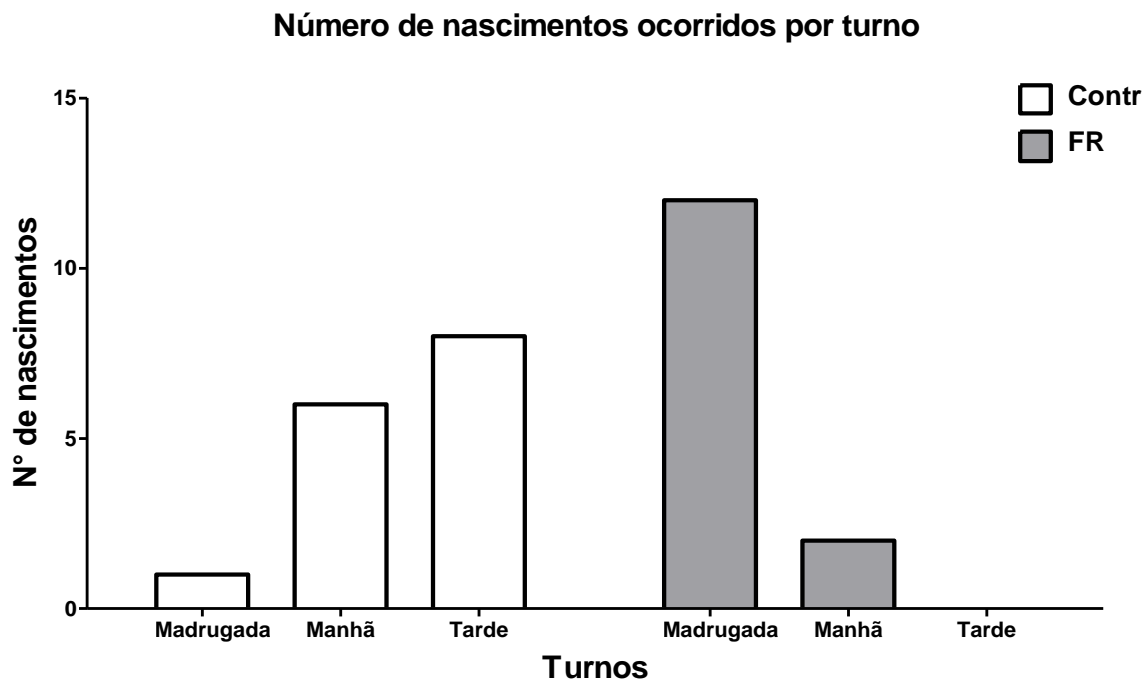


Figura 8. Distribuição dos nascimentos ao longo dos turnos do dia para os grupos controle (n=15) e FR50% (n=14). Os dados foram analisados utilizando o teste Qui-quadrado.

Cuidado Materno

Para o cuidado materno, o comportamento de lambar os filhotes (Licking/grooming - LG) foi calculado através da soma do número de registros deste comportamento ao longo das sessões de observação. Os comportamentos de amamentação e permanência da genitora fora do ninho foram calculados através da razão entre o número de observações de cada um destes comportamentos e o total de observações realizadas ao longo dos seis dias de registro, fornecendo assim uma porcentagem de ocorrência.

Fêmeas do grupo Controle apresentaram maior média de realização do comportamento de lambar os filhotes quando comparadas com as fêmeas do grupo FR50% [$F(3,24)=7,81$, $p=0,001$]. Este resultado foi independente do grupo em que pertenciam os filhotes, já que tanto fêmeas controle que adotaram filhotes controle (Controle/Controle), quanto fêmeas controle que adotaram filhotes FR50% (Controle/FR50%) realizaram mais deste comportamento que as fêmeas dos grupos FR50%/Controle e FR50%/FR50%.



Figura 9. MÉDIA±E.P.M. do número total de realizações do comportamento de lambe os filhotes durante os seis dias de registro nas fêmeas dos grupos Controle/Controle n=7), Controle/FR50% (n=6), FR50%/Controle (n=6) e FR50%/FR50% (n=6). Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de *post hoc* Bonferroni. *Diferença significativa em comparação com os grupos Contr/Contr e Contr/FR.

O percentual de tempo em que as fêmeas passaram amamentando seus filhotes nas posturas 1 e 2, consideradas menos eficazes, não diferiu entre os grupos [F(3,24)=1,11, p=0,36], tampouco foi encontrada diferença no percentual de tempo em que as fêmeas permaneceram amamentando seus filhotes nas posturas 3 e 4, consideradas as mais ativas e eficazes [F(3,24)=3,67, p=0,77].

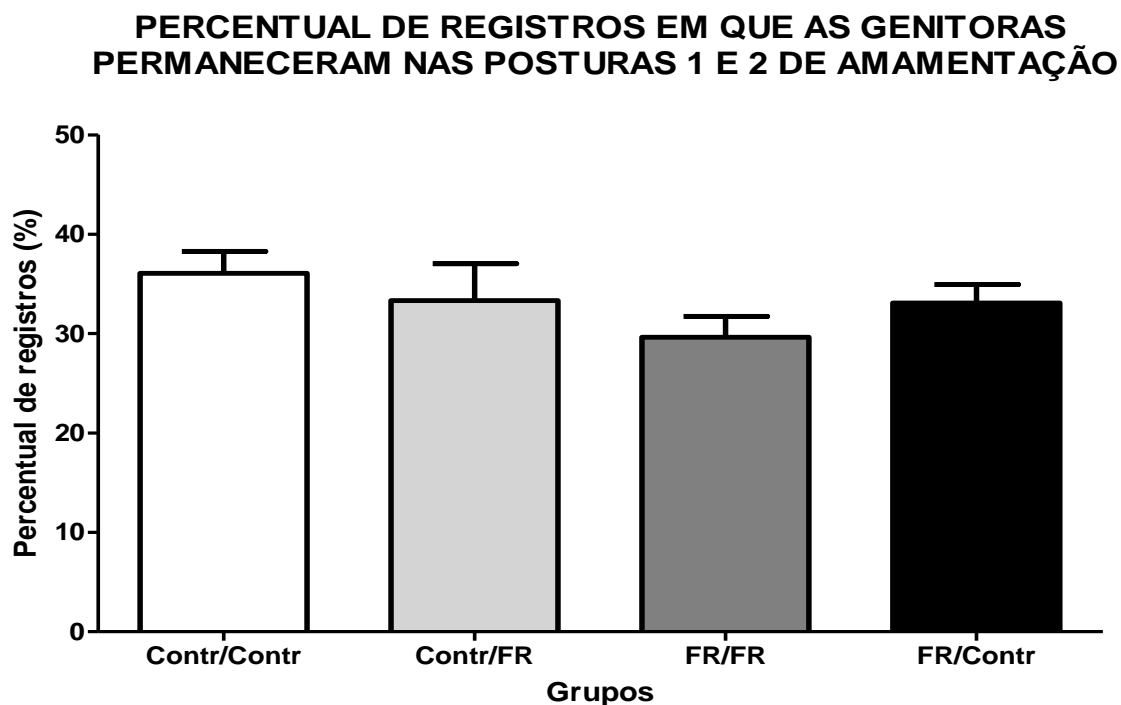


Figura 10. MÉDIA±E.P.M. do percentual de registros do comportamento de amamentar os filhotes nas posições 1 e 2 durante os seis dias de registro para as genitoras dos grupos Controle/Controle (n=7), Controle/FR50% (n=6), FR50%/Controle (n=6) e FR50%/FR50%(n=6). Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de *post hoc* Bonferroni.

PERCENTUAL DE REGISTROS EM QUE AS GENITORAS PERMANECERAM NAS POSTURAS 3 E 4 DE AMAMENTAÇÃO

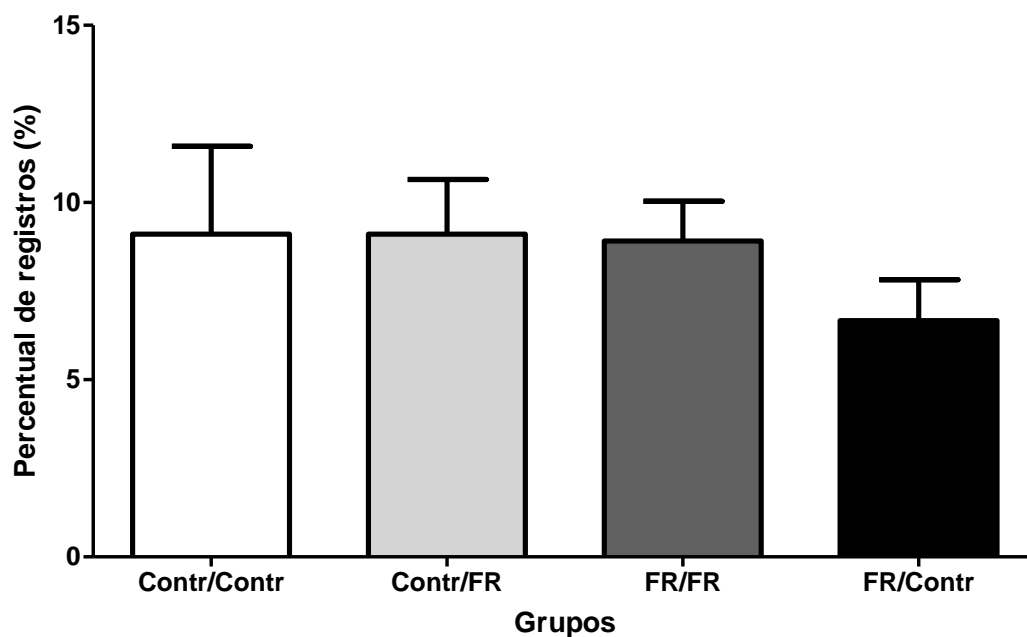


Figura 11. MÉDIA±E.P.M. do percentual de registros do comportamento de amamentar os filhotes nas posições 3 e 4 durante os seis dias de registro para as genitoras dos grupos Controle/Controle (n=7), Controle/FR50% (n=6), FR50%/Controle (n=6) e FR50%/FR. Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de *post hoc* Bonferroni.

Por último, não houve diferença no percentual de tempo em que as fêmeas permaneceram sem contato com seus filhotes [$F(3,24)=1,00$, $p=0,41$].

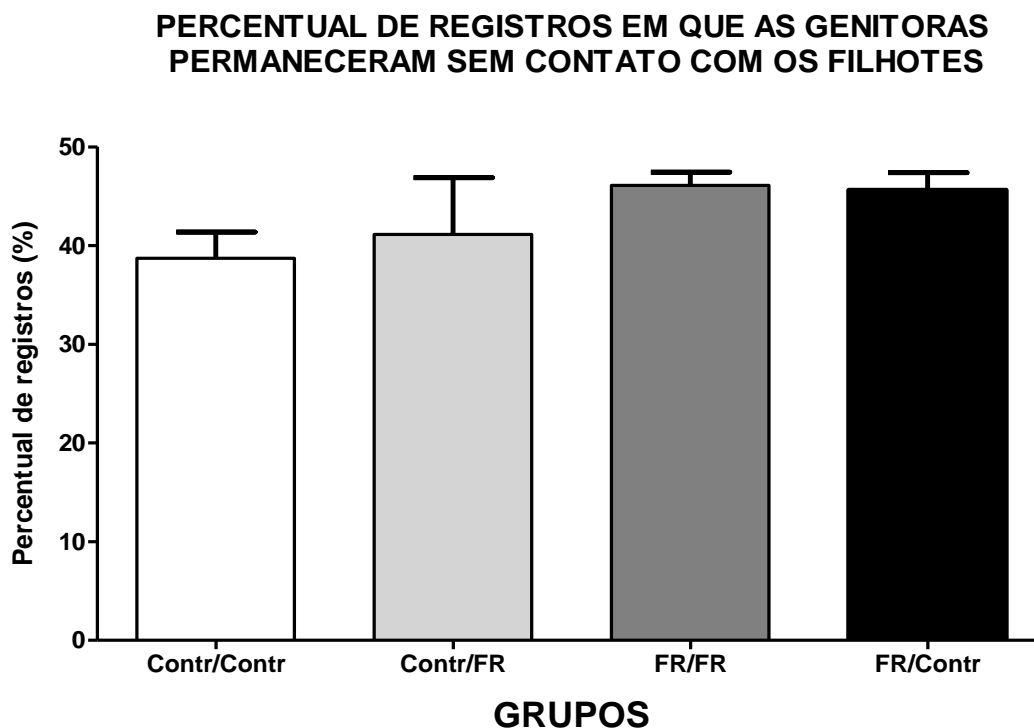


Figura 12. MÉDIA±E.P.M. do percentual de registros do comportamento de permanecer sem contato com os filhotes durante os seis dias de registro para as genitoras dos grupos Controle/Controle (n=7), Controle/FR50% (n=6), FR50%/Controle (n=6) e FR50%/FR50% (n=6). Dados analisados utilizando ANOVA de uma via seguida de *post hoc* Bonferroni. $P>0,05$

Juntos, os resultados do cuidado materno demonstram que fêmeas submetidas à restrição alimentar realizam o comportamento de lamber os filhotes em uma frequência menor que as fêmeas do grupo controle. Este resultado é encontrado tanto para genitoras que adotaram filhotes controle, quanto para as que adotaram filhotes FR50%. Esta redução na frequência de lambidas não é acompanhada de alterações nas posturas de amamentação ou no tempo em que a mãe fica sem contato com os filhotes.

Consumo Agudo de Alimento Palatável

No teste de consumo agudo de alimento palatável, foi encontrado efeito do grupo em machos [$F(3,18)=3.536$, $p=0,041$]. O teste de post hoc LSD mostrou que machos do grupo FR50%/Controle comem mais alimento doce que os machos dos outros grupos, em um efeito clássico da programação fetal ($p=0,031$, $p=0,011$ e $p=0,014$ em comparação com os grupos Contr/FR50%, FR50%/FR50% e Contr/Contr respectivamente). Nas fêmeas, não foi encontrado efeito do grupo [$F(3,21)=1.104$, $p=0,373$].

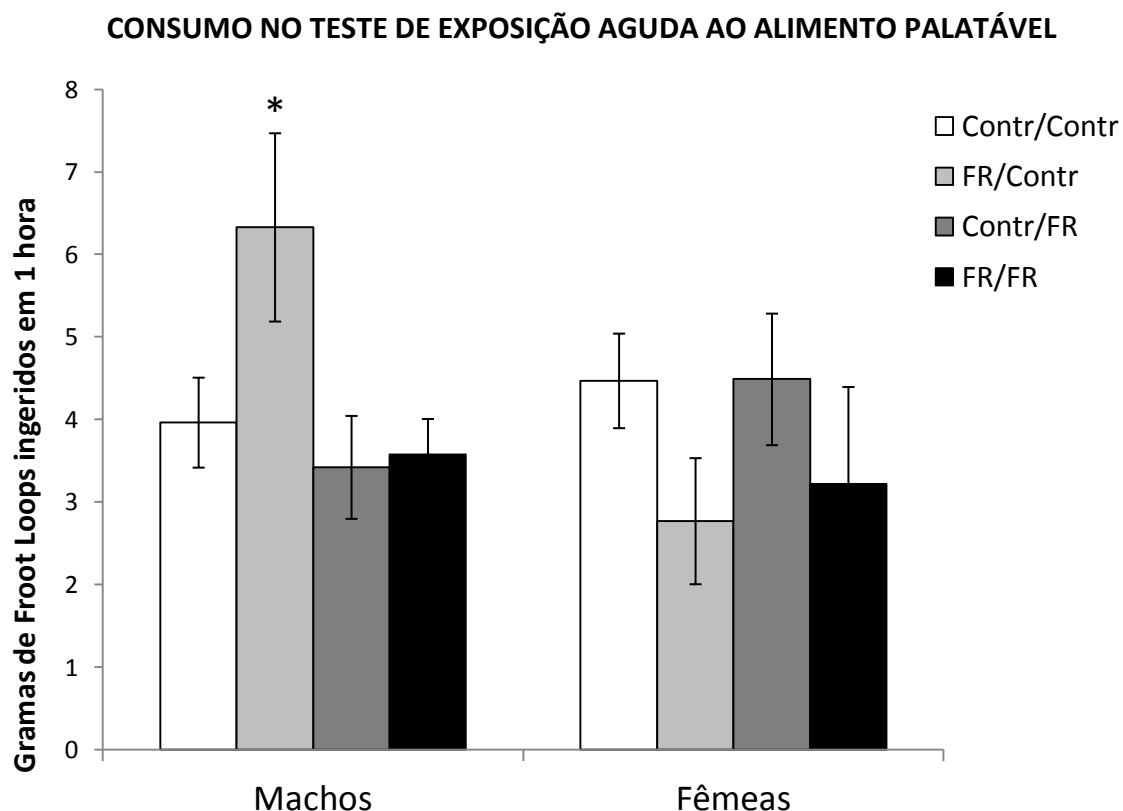


Figura 13. MÉDIA±E.P.M. do consumo de alimento doce durante o período de 1 hora para os grupos Contr/Contr (n=5♂; 5♀), Contr/FR50% (n=5♂; 5♀), FR50%/Contr (n=4♂; 6♀) e FR50%/FR50% (n=5♂; 6♀). ANOVA de uma via seguida de post hoc LSD. * Diferença significativa em relação aos outros três grupos.

Atividade Locomotora

Em relação à atividade locomotora dos animais na arena de teste, a realização de uma ANOVA de duas vias utilizando grupo e sexo como fatores mostrou não haver interação entre grupo e sexo [$F(1,36)=2,40$, $p=0,13$], ou efeito principal do grupo [$F(1,36)=0,087$, $p=0,77$]. Contudo, encontramos efeito principal do sexo [$F(1,36)=18,53$, $p<0,001$], mostrando que, embora não tenha havido diferença entre os tratamentos, as fêmeas naturalmente apresentam maior atividade locomotora que os machos sob estas condições.

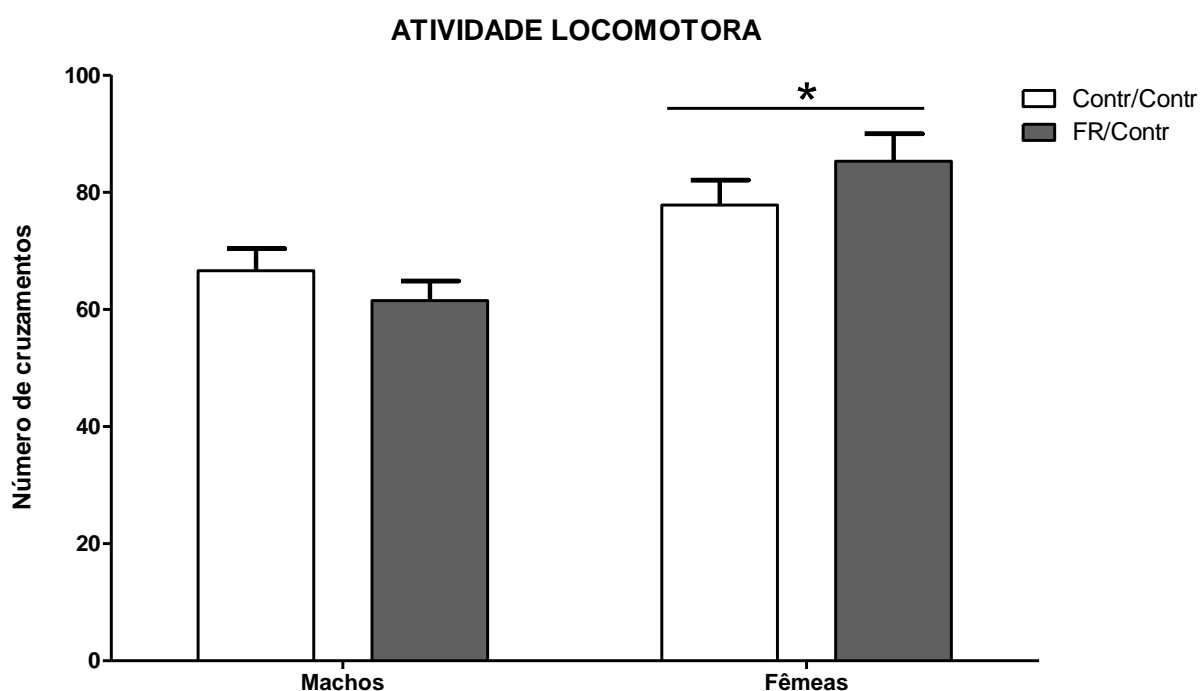


Figura 14. MÉDIA±E.P.M. do número de cruzamentos de quadrantes na arena de teste dos animais dos grupos Controle/Controle ($n=10♂$; $10♀$) e FR50%/Controle ($n=10♂$; $10♀$). Dados analisados utilizando ANOVA de duas vias. *Diferença significativa quando comparadas aos machos.

Tarefa de Flexibilidade Cognitiva

No Attentional Set-shifting Task, encontramos que as fêmeas necessitaram mais “trials” que os machos para atingir o critério de desempenho na fase extradimensional do teste [ANOVA de duas vias, $F(1,36)=4,480$, $p=0,042$]. Além disso, houve interação entre grupo e sexo na etapa de Reversão 2, onde fêmeas FR/Contr precisaram de menos “trials” que as fêmeas Controle/Controle para atingir o critério [ANOVA de duas vias, $F(1,36)=4,423$, $p=0,043$]. Não foram observadas diferenças para os machos, tampouco outros efeitos ou interações. Mesmo quando ajustado pelo escore de LG e/ou tamanho da ninhada, os resultados permaneceram os mesmos.

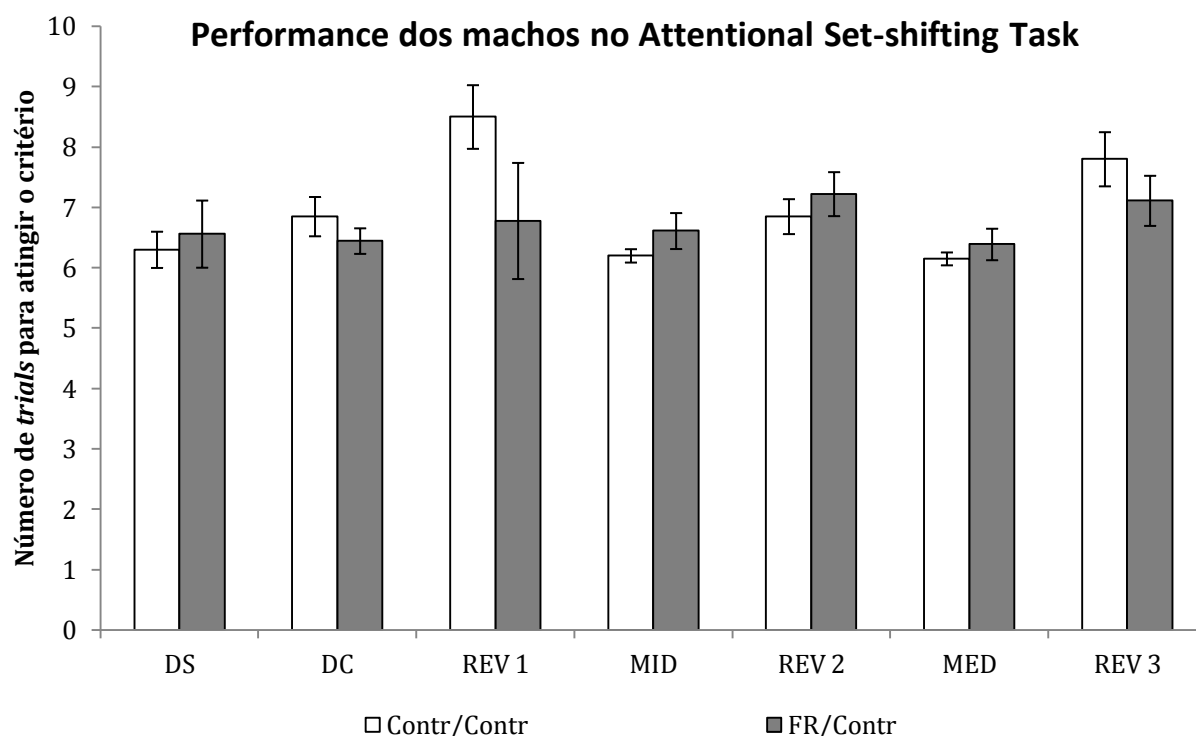


Figura 15. MÉDIA±E.P.M. do número de *trials* necessários para atingir o critério de desempenho em cada fase do teste em machos. ANOVA de duas vias realizada para cada fase da tarefa.

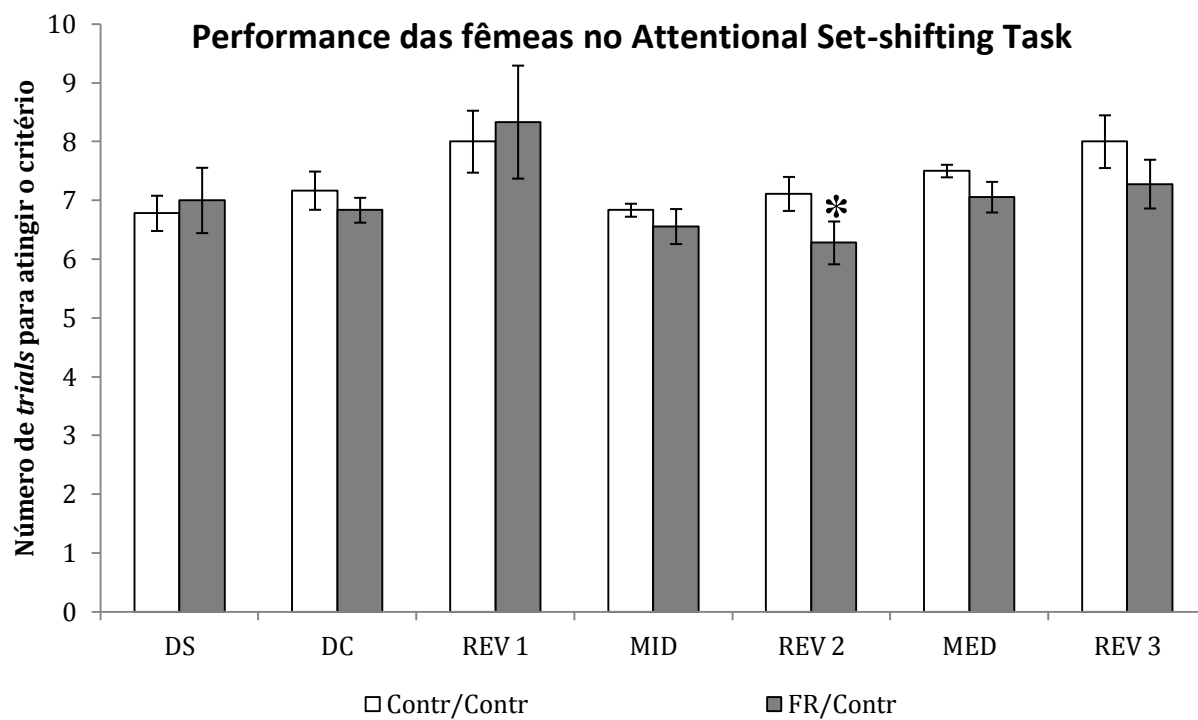


Figura 16 . MÉDIA±E.P.M. do número de trials necessários para atingir o critério de desempenho em cada fase do teste nas fêmeas. ANOVA de duas vias realizada para cada fase da tarefa. *Diferença significativa quando comparado ao grupo Contr/Contr na etapa de REV2.

Medidas Centrais

Em relação às análises bioquímicas centrais, as figuras a seguir mostram o conteúdo de TH no córtex orbitofrontal de machos e fêmeas. A ANOVA de duas vias utilizando grupo e status metabólico (jejum ou em resposta à ingestão de alimento doce) como fatores mostra que, em machos, não houve efeito do grupo [$F(1,21)=0,450$, $p=0,511$], status metabólico [$F(1,21)=0,001$, $p=0,975$], ou interação entre estes fatores [$F(1,21)=0,118$, $p=0,735$]. Por outro lado, em fêmeas houve efeito do grupo [$F(1,21)=4,471$, $p=0,049$], status metabólico [$F(1,21)=4,777$, $p=0,042$] e interação [$F(1,21)=5,039$, $p=0,038$], no qual o grupo FR/Controle demonstrou um aumento significativo nos níveis de TH em resposta ao consumo de alimento doce em comparação aos outros grupos (Análise *post hoc*, $p<0,006$).

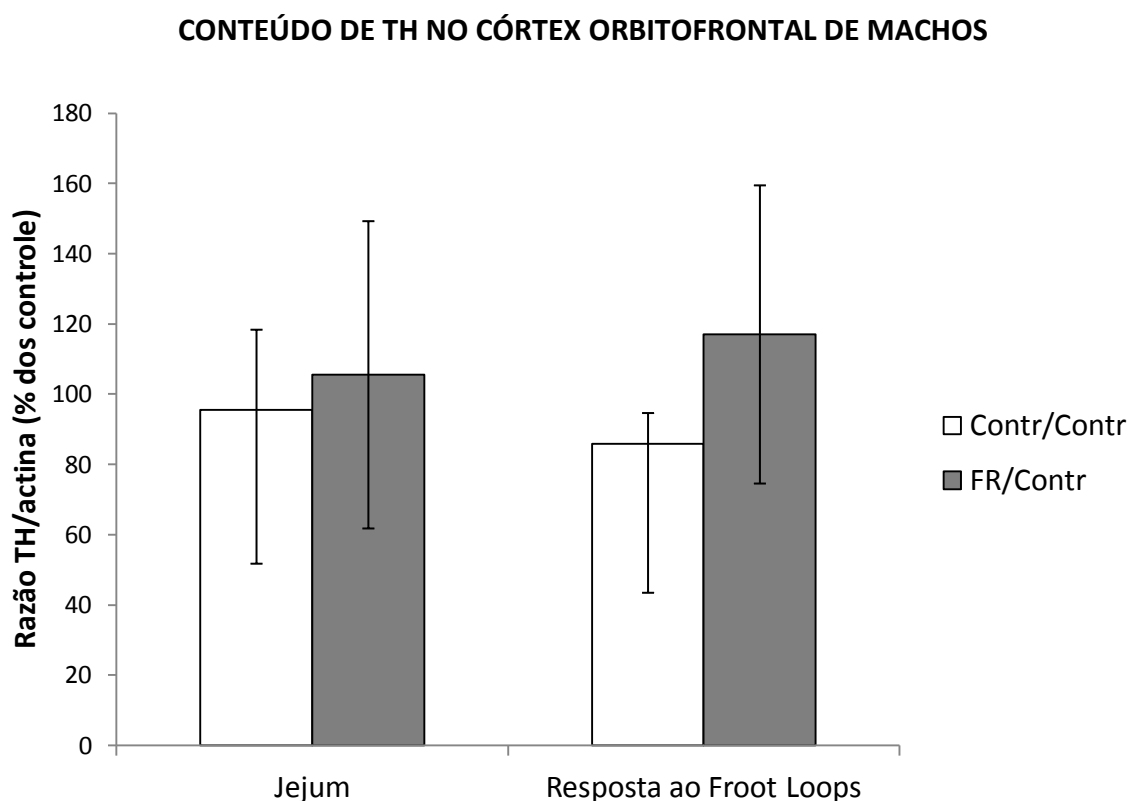


Figura 17. Conteúdo de tirosina hidroxilase no córtex orbitofrontal em jejum e em resposta ao consumo agudo de alimento doce em machos. Dados expressos em porcentagem do grupo controle. Não há efeitos principais ou interações.

CONTEÚDO DE TH NO CÓRTEX ORBITOFRONTAL DE FÊMEAS

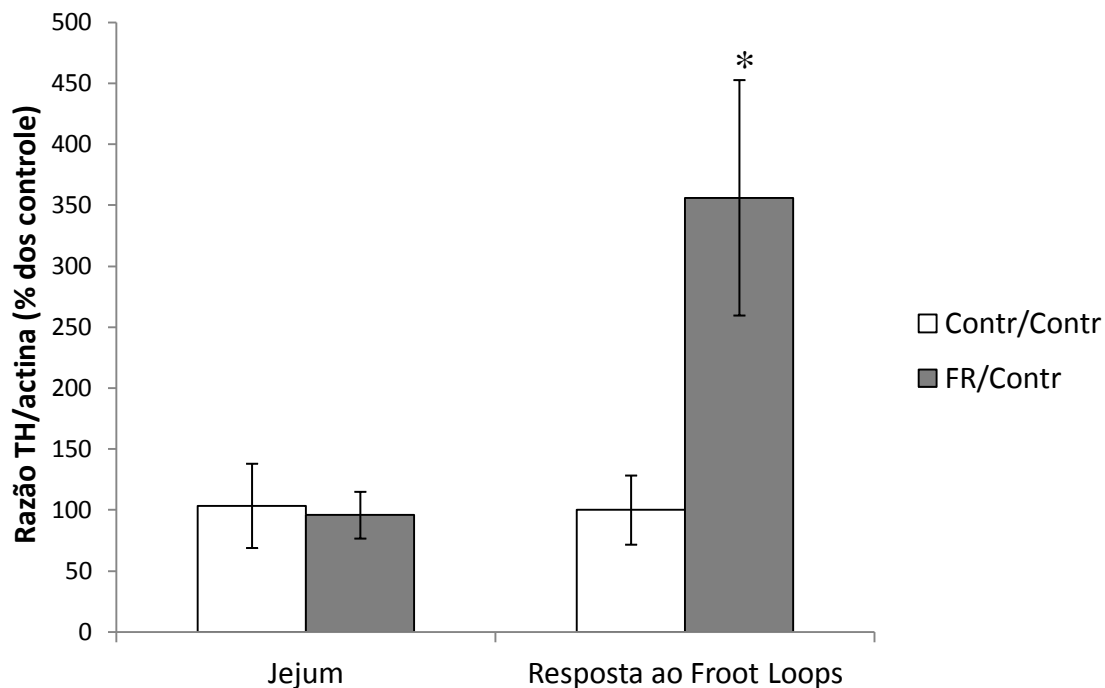


Figura 18. Conteúdo de tirosina hidroxilase no córtex orbitofrontal em jejum e em resposta ao consumo agudo de alimento doce em fêmeas. Dados expressos em porcentagem do grupo controle. Há efeito do grupo, status metabólico e interação. * O grupo FR/Controle demonstra um aumento significativo nos níveis de TH em resposta ao consumo de alimento doce em comparação aos outros grupos (*post hoc LSD*, $p < 0,006$).

Já as figuras 19 e 20 mostram o conteúdo de TH no núcleo accumbens de machos e fêmeas. Em machos, houve uma interação entre grupo e status metabólico [F(1,20)=5,432, p=0,032], no qual os animais do grupo FR/Contr apresentam aumento dos níveis de TH no núcleo accumbens no jejum; estes níveis não aumentam após a exposição ao doce, o que ocorre nos Contr/Contr. A análise *post hoc* mostra que o grupo Contr/Contr em jejum apresenta níveis significativamente menores de TH em comparação com os outros grupos (p<0,0001). Há também efeitos isolados do grupo [F(1,20)=10,164, p=0,005] e do status metabólico [F(1,20)=20,378, p<0,0001].

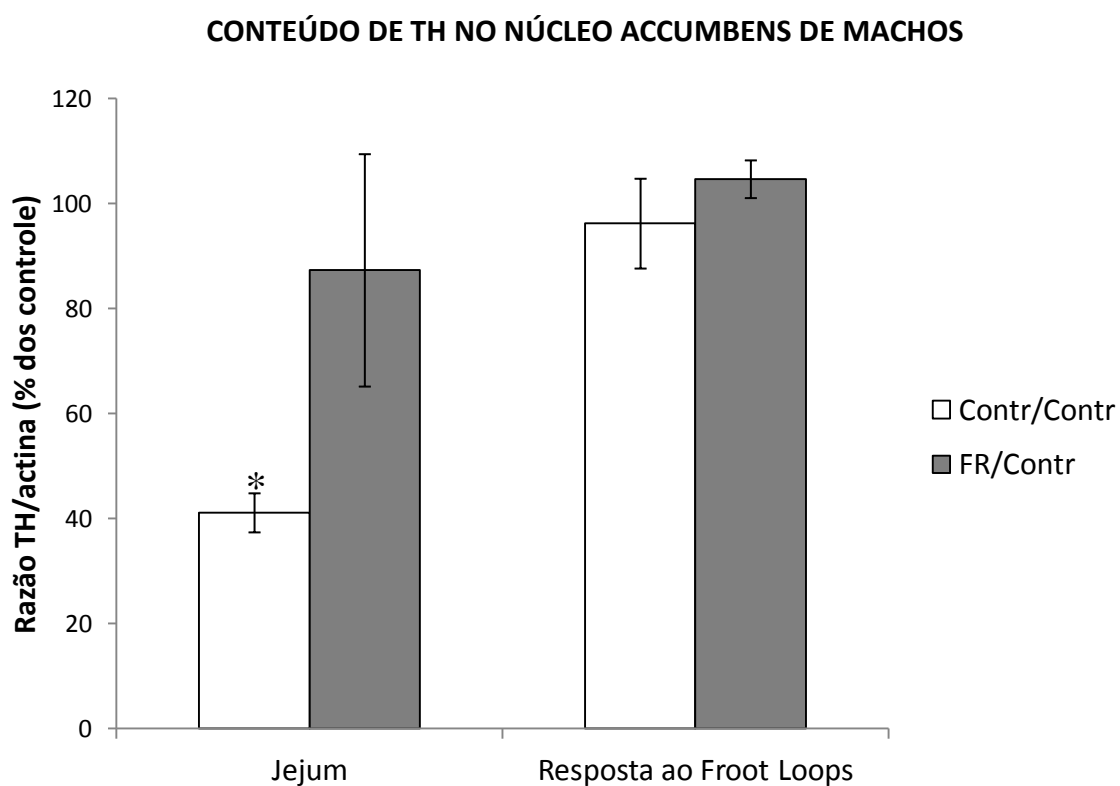


Figura 19: Conteúdo de tirosina hidroxilase no núcleo accumbens em jejum e em resposta ao consumo agudo de alimento doce em machos. Dados expressos em porcentagem do grupo controle. Há uma interação entre grupo e status metabólico, na qual os animais do grupo FR/Contr apresentam aumento dos níveis de TH no jejum; estes níveis não aumentam após a exposição ao doce, o que ocorre nos Contr/Contr. * *post hoc* LSD mostra que o grupo Contr/Contr em jejum apresenta níveis de TH significativamente menores em comparação com os outros grupos.

Para as fêmeas, há também uma interação entre grupo e status metabólico [$F(1,21)=11,018$, $p=0,004$], na qual o grupo FR/Contr apresenta um aumento nos níveis de TH em resposta ao doce, enquanto nos Contr/Contr o efeito é inverso. A análise *post hoc* mostra que após a exposição ao alimento doce, o grupo Contr/Contr apresenta níveis significativamente menores de TH em comparação aos outros grupos ($p<0,0001$). Há também efeitos isolados do grupo [$F(1,21)=22,615$, $p<0,0001$] e do status metabólico [$F(1,21)=4,761$, $p=0,04$].

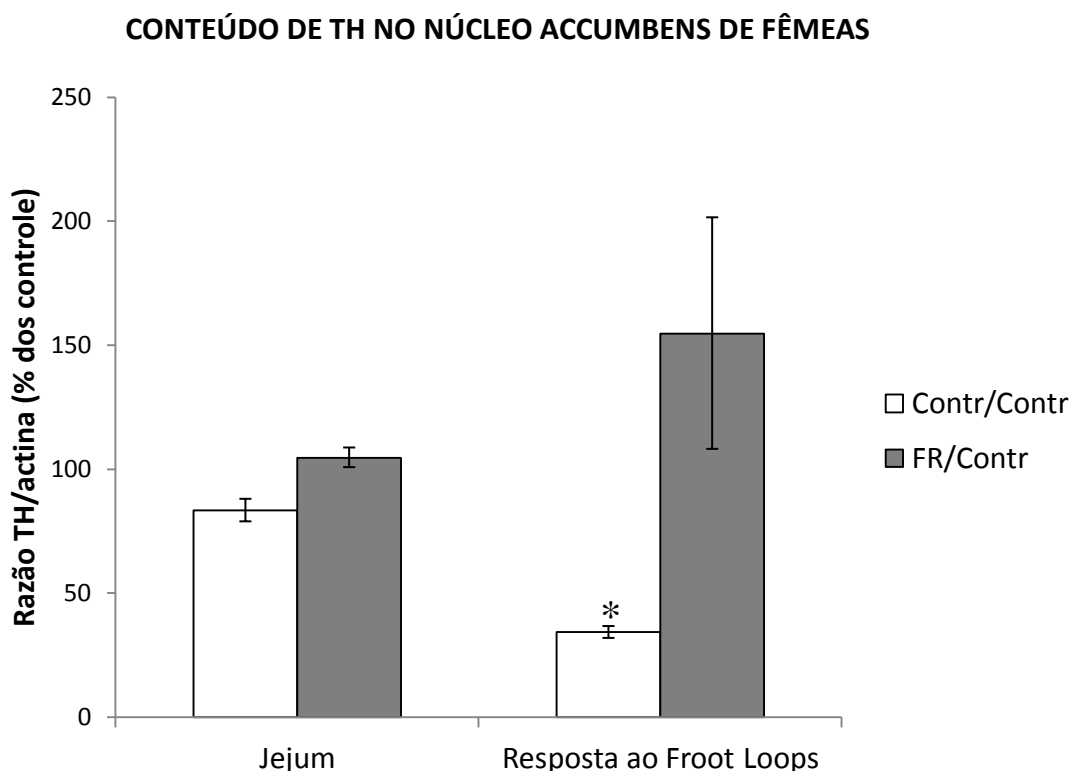


Figura 20: Conteúdo de tirosina hidroxilase no núcleo accumbens em jejum e em resposta ao consumo agudo de alimento doce em fêmeas. Dados expressos em porcentagem do grupo controle. Há uma interação entre grupo e status metabólico, na qual o grupo FR/Contr apresenta um aumento nos níveis de TH em resposta ao doce, enquanto nos Contr/Contr o efeito é inverso. * *Post hoc* LSD mostra que após a exposição ao alimento doce, o grupo Contr/Contr apresenta níveis significativamente menores de TH em comparação aos outros grupos.

DISCUSSÃO

Neste trabalho, verificamos que a desnutrição materna durante a gestação, induzida por uma redução de 50% na quantidade de ração oferecida às genitoras, foi capaz de levar a alterações relacionadas ao nascimento (como no peso das genitoras e dos filhotes e na duração da gestação) e no cuidado que estas fêmeas ofereceram a seus filhotes nos primeiros dias de vida. Nos filhotes, esta intervenção levou a alterações sexo-específicas na flexibilidade cognitiva, no consumo de alimento palatável e na sinalização dopaminérgica em áreas relacionadas a estes comportamentos.

Como esperado, observamos que a restrição alimentar durante a segunda metade da gestação resultou em genitoras que apresentaram menor ganho de peso ao longo da gestação. Além disso, esta intervenção levou a uma redução do peso corporal dos filhotes de ambos os sexos no momento do nascimento, indicando um retardo de crescimento fetal. Além de estarem de acordo com outros estudos utilizando esta metodologia (Belkacemi *et al.*, 2011; Desai *et al.*, 2005; 2007, Leonhardt, 2002), estes resultados mostram-se especialmente relevantes pois vão de encontro também com os resultados de um recente trabalho de nosso grupo, o primeiro a utilizar esta metodologia de indução de restrição de crescimento intrauterino em nosso meio (Cunha, 2013) Desta forma, podemos afirmar com maior convicção que este modelo de indução de RCIU através da restrição alimentar durante a gestação foi estabelecido com sucesso em nosso grupo.

Sabe-se que a privação nutricional durante o período perinatal desempenha um papel importante sobre o crescimento fetal e a patogênese de distúrbios metabólicos na vida adulta (Barker, 1995), e para explicar este “efeito programador”, dois mecanismos têm sido predominantemente propostos: a escassez de nutrientes vitais e a exposição precoce a níveis elevados de glicocorticoides (GC) (Barker, 2002; Seckl, 1998; Leonhardt, 2002). Obviamente, a má-nutrição materna pode ter impactos sobre o feto em desenvolvimento pela simples escassez de energia ou nutrientes essenciais (Prohaska, 2000). Em um cenário bastante simples, a falta de um aminoácido essencial poderia limitar o funcionamento da maquinaria de síntese proteica e desacelerar a biossíntese e o desenvolvimento (Prohaska, 2000), uma situação bastante provável em nossos animais expostos à redução na oferta de alimento.

Além de levar à carência de nutrientes, diversos estudos têm indicado que a desnutrição materna durante a gestação aumenta os níveis plasmáticos de

glicocorticoides e reduz a expressão de enzimas que oxidam e inativam a corticosterona (cortisol em humanos) (Lesage *et al.*, 2001, Belkacemi *et al.*, 2011, Stocker *et al.*, 2004; 2005, Basset *et al.*, 1996), expondo o feto a níveis elevados de GC e, desta forma, contribuindo para o comprometimento do crescimento fetal.

Mais do que isso, o excesso de GC apresenta um grande número de efeitos para o feto. Durante o desenvolvimento do sistema nervoso, os GC interferem no refinamento das ligações sinápticas em regiões importantes como o hipocampo e o córtex pré-frontal (Jacobson & Sapolsky, 1991; Spencer *et al.*, 2005), além de levarem a alterações no padrão de atividade do eixo HPA devido à expressão aumentada de receptores de GC no hipocampo dos filhotes (Henry *et al.*, 1994; Maccari *et al.*, 1995). Todas estas alterações influenciam o comportamento alimentar e a resposta ao estresse a longo prazo e estão intimamente relacionadas com a maior susceptibilidades destes indivíduos em apresentar distúrbios metabólicos e psiquiátricos ao longo da vida (Entringer *et al.*, 2009; Vallee *et al.*, 1997; Tamashiro *et al.*, 2009).

Surpreende o fato das genitoras do grupo FR terem gerado maior número de filhotes que as genitoras do grupo controle. Sabe-se que eventos estressantes afetam a reprodução em fêmeas, principalmente pela inibição do processo de implantação (Zhao *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2011), porém, no dia 10 da gestação (início do protocolo de restrição alimentar) diversos processos gestacionais importantes como a implantação já ocorreram, e a organogênese encontra-se em seu estágio final, estando o feto em início do processo de maturação (Sprague Dawley Booklet, 2010). Contudo, não podemos excluir a possibilidade de alterações nos processos de reabsorção fetal. De acordo com a escassa e antiga bibliografia encontrada sobre este tema, a reabsorção de filhotes não seria um processo confinado a algum período em particular, podendo ocorrer do começo ao fim da gestação (Telford, 1962). De qualquer forma, este achado sugere que apesar da redução de 50% na quantidade de alimento durante a gestação levar a desfechos desfavoráveis nos animais, este não seja um modelo tão agressivo para a fêmea e seus filhotes.

Encontramos também um padrão bem definido em relação à duração da gestação e ao turno de nascimento dos filhotes, onde as fêmeas FR50% pariram predominantemente durante a madrugada do dia do parto, enquanto nas fêmeas do grupo controle este padrão foi diurno. Este achado torna-se especialmente relevante no momento em que questionamos qual efeito desta antecipação sobre o desenvolvimento do feto já exposto à desnutrição intrauterina. Para uma gestação que dura 21 dias, talvez

algumas horas a menos de gestação já sejam o suficiente para alterar parâmetros fisiológicos nos filhotes, o que torna esta antecipação um importante ponto a ser considerado em trabalhos futuros.

Diferentes estudos afirmam que a parturição em ratos se dá predominantemente durante o período diurno, mesmo quando o ciclo claro-escuro é revertido (Plaut, 1970; Boer *et al.*, 1975, Lincoln & Porter, 1976), sendo este padrão em grande parte governado pela melatonina, um hormônio endógeno produzido principalmente pela glândula pineal e secretado de forma circadiana (Armstrong *et al.*, 1989).

Embora filhotes não possuam as enzimas pineais necessárias para sintetizar melatonina durante os primeiros dias de vida, ela é uma molécula hidrofóbica que facilmente atravessa a placenta e entra na circulação fetal sem sofrer alterações (Hardeland *et al.*, 1993; Menendez-Pelaez & Reiter, 1993; Levitan & Wendland 2013), transmitindo informações sobre a duração do dia e as fases circadianas para o feto (Williams *et al.*, 1991; Velazquez *et al.*, 1992, Simonneaux, 2011). Mais do que isso, a melatonina parece também possuir um papel importante no momento do parto (Takayama *et al.*, 2003 e Reiter, R.J 2009). Os níveis maternos de melatonina se elevam durante a gestação, alcançando seu nível máximo a termo e retornando aos níveis basais imediatamente após o parto (Takayama *et al.*, 2003), onde se acredita que sirvam como um sinal circadiano para o início das contrações uterinas (Olcese *et al.*, 2013, Sharkey *et al.*, 2009; 2010).

Alguns estudos têm demonstrado que os níveis plasmáticos de melatonina podem estar anormais em gestações afetadas pela restrição de crescimento intrauterino (Nakamura *et al.*, 2001; Maggioni *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2013), e ao que tudo indica, a restrição alimentar durante a gestação também poderia levar a alterações nos níveis deste hormônio, trazendo prejuízos à transferência de informações materno-fetais relacionadas ao fotoperíodo e causando este padrão alterado de parturição. Contudo, a secreção desregulada de outros hormônios envolvidos com o “timing” do parto (como a ocitocina e o hormônio liberador de corticotropina-CRH) em nossos animais expostos à restrição alimentar também poderia estar envolvida no estabelecimento do padrão de nascimentos encontrado.

Com relação aos resultados do cuidado materno, observamos que fêmeas expostas à restrição alimentar demonstram menos comportamentos de lambar os filhotes que fêmeas com disponibilidade de alimento *ad libitum*. Este padrão comportamental se mostrou independente do status nutricional dos filhotes, já que não

houve diferença entre fêmeas do grupo FR que criaram filhotes adotados de genitoras Controle ou FR. O mesmo foi válido para as fêmeas do grupo Controle, onde o fato do filhote ter sido bem ou mal nutrido durante a gestação também não levou a alterações na frequência do comportamento de lambidas.

Neste trabalho, focamos nossa atenção no cuidado materno devido à preocupação de que parte dos desfechos observados com o protocolo de restrição alimentar materna fosse, em grande parte, consequência da exposição a um cuidado materno inadequado durante os primeiros dias de vida dos filhotes. De fato, há um grande corpo de evidências mostrando que o cuidado materno pode alterar diferentes desfechos observados nos filhotes (Gunnar *et al.*, 1998; Meaney, 2001; Barha *et al.*, 2007), sendo que o comportamento da mãe em lamber seus filhotes teria a capacidade de interagir com os efeitos prejudiciais do estresse durante o período pré-natal, e desta forma, atenuar ou amplificar estes efeitos (Casolini *et al.*, 2007; Del Cerro *et al.*, 2010).

O fato de não ter havido diferença no LG recebido pelos filhotes Contr/Contr e FR/Contr sugere fortemente que os desfechos adversos que possam ser observados nos animais expostos a este protocolo de desnutrição pré-natal sejam causados, como discutido anteriormente, pela escassez de nutrientes e pela exposição aumentada aos GC durante a gestação. Por outro lado, desfechos adversos observados nos filhotes dos grupos Contr/FR e FR/FR podem ser atribuídos a uma interação entre os efeitos diretos da desnutrição pré e/ou pós-natal e a redução na frequência de lambidas recebidas.

Em relação aos outros comportamentos maternos avaliados, não encontramos diferença no percentual de tempo que as genitoras permaneceram nas diferentes posturas de amamentação, tampouco no tempo em que as genitoras permaneceram sem contato com os filhotes. Poderíamos esperar que as ratas que adotaram filhotes desnutridos se engajassem por mais tempo na amamentação de seus filhotes e ficassem mais tempo em contato para aquecê-los, porém não foi isso que aconteceu.

O cuidado materno se dá de forma recíproca, onde o comportamento afiliativo do filhote pode determinar em parte, como o cuidado materno será (Fleming *et al.*, 1999). Filhotes criados por mães mal nutridas durante a lactação apresentam déficits em comportamentos como movimentação na área do ninho e alimentação (Massaro *et al.*, 1974). Possivelmente, estes déficits sejam devido ao fato da produção ou composição do leite materno estar alterada pelo estado nutricional da genitora (McGuire *et al.*, 1995; Rogowitz 1996). Desta forma, não podemos excluir a possibilidade de que a má nutrição materna possa ter afetado a habilidade dos filhotes em induzir a realização

do cuidado materno. Neste sentido, ratas controle que adotaram filhotes restritos poderiam “querer” cuidar mais de seus filhotes, porém, na falta de um feedback destes animais desnutridos, o cuidado acabaria ficando equalizado entre os grupos.

Diversas intervenções ocorridas no período são capazes de alterar o cuidado materno. Protocolos de estresse crônico durante a gestação, por exemplo, reduzem o cuidado materno tanto em roedores, quanto em primatas (Liu *et al.*, 1997; Fleming *et al.*, 1997; Nomura *et al.*, 2002). A injeção de altas doses de corticosterona durante a gestação ou lactação apresenta efeitos bastante similares (Brummelte *et al.*, 2006). Por outro lado, intervenções como a manipulação neonatal tem a capacidade de aumentar o cuidado que a fêmea oferece a seus filhotes, também com um efeito bastante proeminente sobre o LG (Reis *et al.*, 2014; Garoflos *et al.*, 2008; Champagne *et al.*, 2003).

Já em relação às alterações do cuidado materno associadas a manipulações nutricionais, praticamente todos os métodos utilizados para produzir má-nutrição pós-natal estão associados com alterações no cuidado materno (Crnic, 1980; Galler *et al.*, 1984), porém, observamos que não há um consenso sobre qual estratégia uma rata lactante adota frente a escassez de alimento (Sabau & Ferkin, 2013).

Enquanto a restrição proteica durante a gestação e a redução na oferta de alimento têm sido mais associadas com um aumento nas posturas de amamentação ativas (Massaro *et al.*, 1974; Wiener *et al.*, 1977; Crnic, 1980; Smart & Preece, 1973), a adoção por fêmeas bem nutridas de filhotes expostos a restrição proteica parece estar associada a um aumento nas posturas passivas de amamentação (Tonkiss & Galler, 1991). Outro estudo verificou que a restrição calórica em 30% durante a lactação promove uma diminuição do comportamento de LG e das posturas de amamentação (Sabau & Ferkin, 2013).

De acordo com os estudos que temos até o momento, parece não haver um padrão geral para explicar os efeitos da desnutrição materna e/ou fetal sobre o cuidado materno, o que provavelmente deve-se a estudos utilizando diferentes métodos, dietas, graus de desnutrição e linhagens de animais. Até mesmo na outra ponta, a da exposição a uma dieta rica em gordura durante a gestação, não há consenso em relação ao efeito destas intervenções sobre o cuidado materno (Connor *et al.*, 2012; Jacobs; 2013) Deste modo, torna-se crucial identificar de que forma cada protocolo de intervenção perinatal afeta o padrão do comportamento materno, a fim de considerar este efeito no momento

de estabelecer relações entre o ambiente perinatal desfavorável e desfechos adversos nos filhotes.

No teste de consumo agudo de alimento palatável, observamos que machos do grupo FR50%/Controle consumiram mais gramas de *Froot Loops* que os machos dos outros grupos, sendo que não encontramos diferenças entre as fêmeas. Este resultado nos mostra um claro efeito da programação fetal. De fato, diversos estudos têm sugerido que eventos adversos ocorridos durante o período perinatal possam levar a comportamentos alimentares alterados durante a vida adulta (Silveira *et al.*, 2004; 2005). Em roedores, a restrição alimentar durante a gestação está associada a um comportamento hiperfágico dos filhotes ao longo da vida (Desai *et al.*, 2005). Bellinger demonstrou que a exposição a uma dieta pobre em proteínas durante a gestação promove uma preferência aumentada por alimentos ricos em gordura na prole em idade adulta. Estes efeitos foram mais evidentes em fêmeas e não estiveram presentes em animais mais velhos, sugerindo que a dieta pobre em proteínas possa programar o comportamento alimentar dos filhotes de uma forma sexo-específica e tempo dependente (Bellinger *et al.*, 2005; 2004), o que está em pleno acordo com o que encontramos em nosso estudo.

Em humanos, a má-nutrição pré-natal também está associada a uma preferência por alimentos ricos em gordura durante a vida adulta (Lussana *et al.*, 2008; Stein, 2009). Um estudo de nosso grupo mostrou que aos 24 anos de idade, mulheres nascidas com RCIU severo ingerem mais carboidratos e menos proteínas do que as mulheres nascidas com peso normal, sendo este achado persistente mesmo após o ajuste para fatores de confusão, incluindo IMC e atividade física (Barbieri *et al.*, 2009).

Apesar dos diferentes desfechos descritos nos vários estudos em humanos, os resultados como um todo sugerem que a qualidade do ambiente fetal influencia o desenvolvimento das preferências alimentares de forma persistente até a vida adulta. Em geral, a exposição a adversidades no período fetal se relaciona a escolhas alimentares menos saudáveis ao longo do desenvolvimento: alimentos ricos em gordura e/ou açúcares, e menos frutas e vegetais (Lussana *et al.*, 2008; Barbieri *et al.*, 2009; Kaseva *et al.*, 2013). Isso se torna muito importante considerando as origens desenvolvimentistas do sobrepeso, diabetes tipo II, doenças cardiovasculares e síndrome metabólica discutidas acima. A alteração persistente da preferência alimentar em indivíduos expostos à restrição de crescimento intra-uterino possivelmente contribui para o desenvolvimento destas doenças (Portella & Silveira, 2014).

Um possível mecanismo pelo qual o ambiente precoce poderia alterar o comportamento alimentar de forma permanente é através da programação da sensibilidade à recompensa (prazer) associada à ingestão de alimentos palatáveis (Portella *et al.*, 2012). Embora o apetite seja o maior determinante do consumo alimentar, mecanismos hedônicos também apresentam um papel importante na estimulação deste comportamento, e em roedores, sabe-se que a má-nutrição perinatal é capaz de alterar a resposta dos animais à recompensa (Caller & Tonkiss, 1991; Teegarden *et al.*, 2008).

A dopamina possui um papel bastante crítico na regulação do consumo alimentar (Ahima & Osei, 2001; Schwartz, 2001). Sua ação no hipotálamo, região tida como a mais importante na regulação do comportamento alimentar, tem a importante função de promover o consumo alimentar (Meguid *et al.*, 2000). Já a atividade dopaminérgica nas regiões pertencentes ao circuito de recompensa (área tegmental ventral (VTA), amígdala, córtex orbitofrontal (OFC) e Núcleo Accumbens (NAcc)) estaria mais associada ao processamento de informações relacionadas às características prazerosas dos alimentos (Killgore *et al.*, 2003; Rothmund *et al.*, 2007; Volkow *et al.*, 2011). Deste modo, torna-se bastante plausível que no presente estudo, a restrição alimentar durante a gestação tenha levado a alterações na sinalização dopaminérgica em áreas envolvidas com o prazer relacionado ao consumo de alimento palatável, o que fez com que os animais machos do grupo FR50%/Controle apresentassem um maior consumo. Estas alterações serão discutidas mais adiante neste trabalho.

O fato dos machos do grupo FR/FR não terem apresentado aumento no consumo de Froot Loops confirma achados de outros estudos em que o “*timing*” da exposição à má-nutrição, e a taxa de recuperação do crescimento pós-natal (catch-up growth) levam a diferentes fenótipos nos filhotes (Desai *et al.*, 2005; 2009, Bellinger & Langley-Evans 2005). Nos animais do grupo FR/Controle houve uma forte discordância entre o estado nutricional pré e pós-natal, certamente fazendo com que as adaptações fisiológicas adquiridas durante o período fetal se tornassem “desajustadas” para o ambiente nutricional que o filhote encontrou após o nascimento. Já para os animais do grupo FR/FR, o estado nutricional durante o período pré-natal foi semelhante ao estado pós-natal, provavelmente tornando as adaptações fisiológicas adquiridas durante o período fetal corretas para atenuar os efeitos da escassez de nutrientes após o nascimento (Gluckman & Hanson, 2004).

Além disso, a programação do eixo HPA também tem sido proposta como um possível mecanismo pelo qual a RCIU poderia levar ao estabelecimento de preferências alimentares alteradas (Seckl & Meaney, 2004). Crianças nascidas com RCIU apresentam uma resposta adrenocortical acentuada em resposta ao estresse (Jones *et al.*, 2006), e os glicocorticoides estimulam comportamentos mediados pelo circuito de recompensa, o que também poderia levar a um aumento no consumo de alimentos palatáveis (Epel *et al.*, 2001; Dallman, *et al.*, 2003; Barbieri *et al.*, 2009). Embora não tenhamos avaliado os níveis de glicocorticoides nos animais, uma grande variedade de trabalhos já demonstrou que ambientes precoces adversos alteram permanentemente o padrão de atividade do eixo HPA dos filhotes (Henry *et al.*, 1994; Maccari *et al.*, 1995), o que faz com que possamos inferir a possibilidade de que os níveis de GC também estivessem alterados nestes animais.

Ao longo deste trabalho, fica evidente a diferença entre os sexos em diversos desfechos. Estudos anteriores também encontraram resultados diferentes para o impacto da má-nutrição precoce entre machos e fêmeas (Freedman *et al.*, 1990; Desai *et al.*, 2005). Embora o mecanismo por trás destas diferenças sexo-específicas ainda seja pouco conhecido, padrões diferenciados de ativação do sistema de recompensa em resposta ao alimento palatável e/ou um padrão diferenciado de ativação do eixo HPA talvez possam explicar esta diferença nos resultados. Contudo, embora não tenhamos detectado diferença no consumo alimentar entre as fêmeas, isto não significa que estas diferenças não existam. A aplicação de testes mais elaborados, que monitorem o comportamento alimentar durante períodos maiores pode ser capaz de mostrar outras diferenças no comportamento alimentar destes animais.

Já em relação ao teste de atividade locomotora, não encontramos diferença entre os grupos. Fez-se importante a avaliação deste comportamento para termos certeza que possíveis diferenças entre os grupos no teste do ASST não fossem devido a alterações na atividade motoras dos animais. Por exemplo, os animais do grupo FR/Contr poderiam ser naturalmente menos ativos, o que levaria a prejuízos na realização da tarefa de cavar nos potes em busca das recompensas.

O resultado do ASST mostrou um efeito bastante isolado e, mais uma vez, sexo-específico, onde as fêmeas do grupo FR/Contr precisaram de menos *trials* para completar a etapa de reversão 2. Um estudo anterior de nosso grupo, que avaliou o cuidado materno e parâmetros atencionais em crianças com 18 meses de idade, mostrou que nascer pequeno para a idade gestacional e receber um cuidado materno de baixa

qualidade, estaria associado a prejuízos na capacidade destas crianças em alterar o foco de atenção de uma tarefa para outra, indicando certa rigidez cognitiva (Neuwald *et al.*, 2014) Logo, neste trabalho, também esperávamos que os animais do grupo FR/Contr apresentassem déficits no desempenho do ASST.

Excluindo diferenças evidentes entre os dois estudos (humanos Vs roedores; resposta a questionários Vs realização de tarefa), há também esta diferença em relação ao cuidado materno, pois como relatado anteriormente, os animais do grupo FR/Contr experimentaram um cuidado materno adequado de suas genitoras. Um interessante estudo demonstrou que filhotes de ratos criados artificialmente apresentam déficits em praticamente todas as fases do ASST quando o animal recebe pouca simulação de LG durante os primeiros dias de vida (Lovic & Fleming, 2004). Em outro estudo, a privação materna levou a déficits específicos na flexibilidade cognitiva (Baudin *et al.*, 2012). Contudo, parece muito pouco provável que os resultados divergentes com relação ao que encontramos entre os dois trabalhos do nosso grupo sejam devido somente às diferenças no cuidado materno recebido.

Além disso, enquanto em nosso estudo a causa da RCIU foi bem definida (restrição alimentar em 50% durante a gestação), diferentes causas podem ter levado as crianças a nascerem PIG no estudo de Neuwald e colaboradores, o que poderia causar uma grande variabilidade nos desfechos observados (Geva *et al.*, 2012)

Outra diferença importante entre os dois trabalhos é a idade. Artigos que investigaram o efeito da idade sobre o desempenho no ASST mostraram que ratos adolescentes (em torno de 40 dias de vida) apresentam pior desempenho que ratos em idade adulta (Newman & McGaughy 2011; Cain *et al.*, 2011). Visto que nossos animais eram adultos jovens (cerca de 70 dias de vida), torna-se interessante avaliar futuramente a ontologia deste comportamento em animais expostos desnutrição perinatal, e assim, verificar se este padrão comportamental é fixo ou sofre mudanças ao longo da vida dos animais. Mudanças e interações com o ambiente ao longo da vida poderiam fazer com que o animal que em idades precoces apresentava certa rigidez, na idade adulta apresente boa flexibilidade cognitiva

Assim como diversas intervenções precoces e tratamentos podem levar a déficits no ASST (Lovic & Fleming, 2004; Mohamed *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013; Chase *et al.*, 2012; Kantak *et al.*, 2008, McAlonan *et al.*, 2003; Butts *et al.*, 2013), diversos tratamentos são capazes de melhorar a performance dos animais neste teste. A injeção de nicotina instantes antes da realização do teste, por exemplo, melhora

significativamente a performance dos animais tanto na fase intra quanto na extradimensional (Allison & Shoaib, 2013). A injeção de metilfenidato também mostrou efeitos positivos sobre o ASST, revertendo prejuízos causados pela deficiência de ferro na dieta (Mohamed *et al.*, 2011; Cheng & Li, 2013). Assim como o tratamento com cafeína, que melhorou a performance dos animais em um teste de *attentional set-shifting* bastante semelhante ao que utilizamos (Pandolfo *et al.*, 2013). Embora o mecanismo por trás da melhora no desempenho seja pouco claro nos estudos acima citados, todos sugerem que alterações na regulação da ação das catecolaminas, principalmente a dopamina, estejam relacionadas às alterações encontradas.

Como descrito na introdução deste trabalho, estudos com lesões em roedores têm demonstrado que as mudanças intradimensionais, extradimensionais, e reversões são mediadas principalmente pelo córtex cingulado anterior (ACC), córtex pré-frontal medial (PFCm) e córtex orbitofrontal (OFC) respectivamente. Como observamos uma diferença entre os tratamentos na etapa de reversão, decidimos investigar a sinalização dopaminérgica no OFC para tentar entender parte do mecanismo subjacente a esta alteração.

A quantificação dos níveis de Tirosina Hidroxilase (TH) no OFC mostrou não haver diferença entre os animais do sexo masculino tanto na condição basal, quanto em resposta ao consumo de alimento doce. Por outro lado, nas fêmeas observamos um considerável aumento no conteúdo de TH após a exposição ao alimento doce no grupo FR/Contr. A nosso ver, este súbito aumento pode indicar que a pista associada ao alimento doce utilizada no ASST é percebida de forma diferenciada pelas fêmeas restritas, com concomitante aumento da liberação de dopamina no OFC e possivelmente favorecendo o desempenho destas fêmeas na etapa de reversão do ASST.

Estudos recentes destacam o papel da dopamina no OFC sobre o comportamento relacionado à atenção e impulsividade. Por exemplo, a injeção de um antagonista dopaminérgico no mPFC ou OFC aumenta a impulsividade em ratos (Pardey *et al.*, 2013). Além disso, o bloqueio da ação dopaminérgica no OFC reverte os benefícios do metilfenidato sobre o aprendizado reverso em um modelo animal de deficit de atenção (Cheng *et al.*, 2013). Logo, é possível que o aumento de TH em resposta à dica alimentar tenha favorecido o desempenho/atenção das ratas restritas através da modulação do comportamento impulsivo.

Além de ser considerada uma região crucial na alteração/adaptação do comportamento diante de desfechos inesperados, o OFC é uma área frontocortical

altamente integradora, particularmente importante para o processamento de informações relacionadas ao valor associado a recompensas (Bohn *et al.*, 2003; Schoenbaum *et al.*, 2002, Peters & Buchel, 2009) e aprendizado (Galvan *et al.*, 2005). Seus neurônios respondem à apresentação de recompensas alimentares ou simplesmente a estímulos que sinalizem futuras recompensas, e sua posição estratégica, na região mais ventral do córtex pré-frontal, faz com que também esteja envolvido na orientação motivacional do comportamento (Kubota & Komatsu, 1985; Schultz *et al.*, 2000).

Estudos de neuroimagem em humanos sugerem que o OFC e o NAcc demonstram alta conectividade durante o processamento de recompensas (Spicer *et al.*, 2007). Estados como a obesidade e a dependência química são caracterizados por alterações na conectividade entre o OFC e regiões relacionadas a recompensa como o giro frontal medial (Black *et al.*, 2014) e o Nacc (Lee *et al.*, 2013; Tanabe *et al.*, 2013). Sugere-se que estas alterações da neurocircuitaria envolvida na avaliação da recompensa e regiões do controle inibitório levem a um menor autocontrole e maior valor atribuído à recompensa, podendo tornar os indivíduos mais suscetíveis a dicas ambientais alimentares (p.ex. propagandas de alimentos em humanos, ou a presença do Froot Loops durante o teste atencional deste estudo). Logo, um *feedback* impróprio entre o OFC e o NAcc, devido a diminuição da integração funcional entre estas estruturas, poderia levar a uma avaliação aberrante da recompensa, resultando num aprendizado inicial anormalmente intenso (como visto nas fêmeas restritas durante a tarefa atencional) e dificuldade em modificar o comportamento a longo prazo (persistência comportamental), traços comportamentais caracteristicamente encontrados na dependência química.

A quantificação da TH no núcleo accumbens mostrou alterações consideravelmente mais complexas, mas que também fornecem bons indícios do que pode ter levado os machos do grupo FR/Contr a consumirem mais Froot Loops. Em comparação com o grupo Contr/Contr, machos FR/Contr apresentaram em geral níveis mais elevados de TH no NAcc. Interessantemente, ao mesmo tempo em que níveis elevados de DA no NAcc promovem um maior consumo de alimentos palatáveis, o próprio consumo provoca liberação de DA nesta área (Hajnal & Norgren, 2001; Swanson *et al.*, 1997, Liang *et al.*, 2006), o que explica o aumento de TH em ambos os grupos quando a quantificação foi feita após o consumo de Froot Loops. Desta forma, o maior nível de TH medido nos animais FR/Contr durante o jejum pode estar envolvido com o maior consumo destes animais ao serem expostos ao alimento doce.

Resultado semelhante foi encontrado nas fêmeas, com a análise estatística também demonstrando interação entre grupo e status metabólico. Porém, após o consumo de froot loops os níveis de TH aumentaram nas fêmeas do grupo FR/Contr, enquanto no grupo Contr/Contr houve uma diminuição nestes níveis. Apesar de não termos medido a conectividade entre o OFC e o NAcc neste estudo, as diferenças encontradas em animais FR/Contr em relação aos Contr/Contr na TH nestas duas estruturas no basal e em resposta ao doce, tanto em machos quanto em fêmeas, sugerem que a sensibilidade e/ou atribuição de valor à recompensa alimentar seja diferenciada nestes animais. Além disso, sugere-se que essa característica tenha influenciado o desempenho das ratas restritas na tarefa de flexibilidade cognitiva como visto neste estudo.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados que obtivemos neste trabalho, podemos concluir que o protocolo de restrição de crescimento intrauterino utilizado promoveu uma redução no ganho de peso das ratas genitoras, uma diminuição do período gestacional e ainda levou a um retardo no crescimento fetal dos filhotes. No período de lactação, este protocolo produziu alterações no cuidado materno, reduzindo o comportamento de lambe os filhotes sem alterar os comportamentos de amamentar e permanecer em contato com a ninhada. Estas alterações no cuidado materno se mostraram independentes do estado nutricional dos filhotes.

Na vida adulta, a restrição de crescimento intrauterino esteve associada com um maior consumo de alimento palatável nos machos e um melhor desempenho das fêmeas na etapa de reversão do *ASST*. Ao contrário do que esperávamos, não houve interação entre a RCIU e o cuidado materno sobre os resultados do teste de flexibilidade cognitiva.

O grande aumento nos níveis de TH no córtex orbitofrontal das fêmeas restritas em resposta ao consumo de alimento doce corrobora com a maior flexibilidade cognitiva encontrada nestes animais. Ao mesmo tempo, os níveis elevados de TH no núcleo accumbens em situação basal estão envolvidos com o maior consumo de alimento palatável nos machos. As concomitantes alterações na sinalização dopaminérgica nestas estruturas em resposta ao mesmo estímulo sugerem a possibilidade de haver uma alteração na conectividade funcional entre o OFC e o NAcc, o que também pode explicar em parte os desfechos encontrados. Assim sendo, o fato do teste de flexibilidade cognitiva utilizar pistas doces como recompensa parece ter desempenhado um papel determinante nos resultados obtidos.

Desta forma, mostramos que a RCIU causou alterações sexo-específicas no comportamento alimentar e em aspectos cognitivos dos animais em idade adulta, sendo que o padrão alterado de secreção de dopamina em áreas chave para esses comportamentos parece estar envolvido com os resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

- AHIMA, R.S., & OSEI, S.Y. Molecular regulation of eating behavior: New insights and prospects for therapeutic strategies. **Trends in Molecular Medicine**, 7, 205–213; 2001.
- ALLAERT, S. E. G.; CARLIER, S. P. K.; WEYNE, L. P. G.; *et al.* First trimester anesthesia exposure and fetal outcome. A review. **Acta anaesthesiologica Belgica**, v. 58, n. 2, p. 119–23; 2007.
- ALLISON, C.; SHOAIB, M. Nicotine improves performance in an attentional set shifting task in rats. **Neuropharmacology**, v. 64, p. 314–20; 2013.
- ANG, C.; HOWE, D.; LUMDSEN, M. Diabetes. In: James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B, editors. **High risk pregnancy management options**, p. 986–1004; 2006.
- ARMSTRONG, S. M. Melatonin and circadian control in mammals. **Experientia**, v. 45, 932-938; 1989.
- BAKER, S.; CHEBLI, M.; REES, S.; Effects of gestational stress: 1. Evaluation of maternal and juvenile offspring behavior. **Brain Research**, v. 1213, p. 98–110; 2008.
- BAKER, S.; REES, S.; CHEBLI, M.; *et al.* Effects of gestational stress: 2. Evaluation of male and female adult offspring. **Brain Research**, v. 1302, p. 194–204, 11; 2009.
- BAKOWSKA, J. C. & MORRELL, J. I. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat . **Journal of Comparative Neurology**, v. 386 , 161 – 177; 1997.
- BANSIL, P.; KUKLINA, E. V. Risk Factors for Adverse Outcomes in Developed Countries. in: **Role of Intrauterine Growth Restriction**. p. 159–175; 2012.
- BARBAZANGES, A.; PIAZZA, P.V.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. **Journal of Neuroscience**, v. 16:3943–49; 1996.
- BARBIERI, M. A.; PORTELLA, K.; BETTIOL, S. A.; AGRANONIK, M.; *et al.* Higher Spontaneous Carbohydrate Intake in Young Women. **Pediatric Research**, v. 65, n. 2, p. 215–220; 2009.
- BARHA CK, PAWLUSKI JL, GALEA LA. Maternal care affects male and female offspring working memory and stress reactivity. **Physiology Behavior**, 92:939–950; 2007.
- BARKER, D. J. The Wellcome Foundation Lecture, 1994. The fetal origins of adult disease. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 262, 37-43; 1995

BARKER, D.J.; ERIKSSON, J.G.; FORSEN, T.; et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **International Journal of Epidemiology**, 31:1235-9; 2002a.

BARKER, D. J. P.; FORSÉN, T.; ERIKSSON, J. G.; OSMOND, C. Growth and living conditions in childhood and hypertension in adult life: a longitudinal study. **Journal of Hypertension**, v. 20, n. 10, p. 1951-6; 2002b.

BASSETT NS, TONG PC, CURRIE MJ, WOODALL SM, BREIER BH, GLUCKMAN PD. Altered placental glucose transporter gene expression in maternal undernutrition and hypertension. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3–416; 1996

BAUDIN, A.; BLOT, K.; VERNEY, C.; *et al.* Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 98, n. 3, p. 207–14; 2012.

BELKACEMI, L.; JELKS, A.; CHEN, C.-H.; ROSS, M. G.; DESAI, M. Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 105; 2011.

BELLINGER, L., LILLEY, C. AND LANGLEY-EVANS, S. C. Prenatal exposure to a maternal low-protein diet programmes a preference for high-fat foods in the young adult rat. **British Journal of Nutrition**, v. 92, 513–520; 2004.

BELLINGER, L.; LANGLEY-EVANS, S. C. Fetal programming of appetite by exposure to a maternal low-protein diet in the rat. **Clinical Science**, v. 109, n. 4, p. 413–20; 2005.

BERTINO, E.; MILANI, S.; FABRIS, C.; DE CURTIS, M. Neonatal anthropometric charts: what they are, what they are not. **Archives of Disease in Childhood**, v. 92(1):F7-F10; 2007.

BEVERSDORF, D.Q.; MANNING, S.E.; HILLIER, A.; ANDERSON, S.L., NORDGREN, R.E.; WALTERS, S.E.; NAGAJARA, H.N.; COOLEY, W.C., GAELIC, S.E.; & BAUMAN, M.L. Timing of prenatal stressors and autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, v. 35, 471–478; 2005.

BIRRELL, J. M.; BROWN, V. J. Medial frontal cortex mediates perceptual attentional set shifting in the rat. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 11, p. 4320–4; 2000.

BISSONETTE, G. B.; POWELL, E. M.; ROESCH, M. R. Neural structures underlying set-shifting: roles of medial prefrontal cortex and anterior cingulate cortex. **Behavioural Brain Research**, v. 250, p. 91–101; 2013.

BISSONETTE, G., MARTINS, G., FRANZ, T., HARPER, E., SCHOENBAUM, G. & POWELL, E. Double dissociation of the effects of medial and orbital prefrontal cortical lesions on attentional and affective shifts in mice. **Journal of Neuroscience**, v. 28, 11124–11130; 2008

BLACK, W. R.; LEPPING, R. J.; BRUCE, A. S.; *et al.* Tonic hyper-connectivity of reward neurocircuitry in obese children. **Obesity**, v. 00, n. 00, p. 1–4; 2014.

BOER K, LINCOLN DW, SWAAB DF. Effects of electrical stimulation of the neurohypophysis on labour in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 65(2):163-176; 1975.

BOHN, I.,GIERTLER, C., HAUBER, W. Orbital prefrontal cortex and guidance if instrumental behaviour in rats under reversal conditions, **Behavioural Brain Research**, v. 143: 49–56; 2003

BOUHOURS-NOET, N.;MAY-PANLOUP, P.; COUTANT, R.; DE CASSON, F.B.; DESCAMPS, P.; DOUAY, O; REYNIER, P.; RITZ, P.; MALTHIERY, Y.; SIMARD, G. Maternal smoking is associated with mitochondrial DNA depletion and respiratory chain complex III deficiency in placenta. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 288:E171–7; 2005.

BOULOUGOURIS, V., CASTANE, A., AND ROBBINS, T.W. Dopamine D2/D3 receptor agonist quinpirole impairs spatial reversal learning in rats: investigation of D3 receptor involvement in persistent behavior. **Psychopharmacology**, v. 202, 611–620. doi: 10.1007/s00213-008-1341-2; 2009.

BRAUN, K.; LANGE, E.; METZGER, M.; POEGGEL, G. Maternal separation followed by early social deprivation affects the development of monoaminergic efferent systems in the medial prefrontal cortex of Octodon degus. **Neuroscience**, 309^318; 2000.

BRIDGES, R. S. Parenting and the brain: an overview. In: **The Neuroanatomical Basis of Maternal Behavior**, 29-36; 2008.

BROWN, A. S.; VAN, O. J.; DRIESSENS, C.; HOEK, H. W.; SUSSER, E. S. Further evidence of relation between prenatal famine and major affective disorder. **American Journal of Psychiatry**, v. 157:190–195; 2000.

BRUMMELTE, S., PAWLUSKI, J.L., GALEA, L.A. High post-partum levels of corticosterone given to dams influence postnatal hippocampal cell proliferation and behavior of offspring: a model of post-partum stress and possible depression. **Hormones & Behavior**, v. 50, 370–382; 2006.

BUSS, C.; LORD, C.; WADIWALLA, M.; *et al.* Maternal Care Modulates the Relationship between Prenatal Risk and Hippocampal Volume in Women But Not in Men. **The Journal of Neuroscience**, v. i, n. 10, p. 2592–2595; 2007.

BUTTS KA, WEINBERG J, YOUNG AH, PHILLIPS AG. Glucocorticoid receptors in the prefrontal cortex regulate stress-evoked dopamine efflux and aspects of executive function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108:18459–18464; 2011.

CAIN, R. E.; WASSERMAN, M. C.; WATERHOUSE, B. D.; MCGAUGHY, J. A. Atomoxetine facilitates attentional set shifting in adolescent rats. **Developmental cognitive neuroscience**, v. 1, n. 4, p. 552–9; 2011.

CALDJI, C., TANNENBAUM, B., SHARMA, S., FRANCIS, D., PLOTSKY, P., MEANEY, M.J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, 5335–5340; 1998.

CALDJI, C.; DIORIO, J. & MEANEY, MJ. Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. **Biological Psychiatry**, v. 48 (12):1164-74; 2000.

CALLER, J. R.; TONKISS, J. Prenatal Protein Malnutrition and Maternal Behavior in Sprague-Dawley. **Journal of Nutrition**, v. 33, p. 762–769; 1991.

CASOLINI, P., DOMENICI, M.R., CINQUE, C., ALEMA, G.S., CHIODI, V., GALLUZZO, M., MUSUMECI, M., MAIRESSE, J., ZUENA, A.R., MATTEUCCI, P., MARANO, G., MACCARI, S., NICOLETTI, F., CATALANI, A. Maternal exposure to low levels of corticosterone during lactation protects the adult offspring against ischemic brain damage. **Journal of Neuroscience**, v. 27, 7041–7046; 2007.

CASTANE, A., THEOBALD, D. E., AND ROBBINS, T. W. Selective lesions of the dorsomedial striatum impair serial spatial reversal learning in rats. **Behavioural Brain Research**, v. 210, 74–83; 2010.

CEASER, A. E., GOLDBERG, T. E., EGAN, M. F., MCMAHON, R. P., WEINBERGER, D. R., AND GOLD, J. M. Set-shifting ability and schizophrenia: a marker of clinical illness or an intermediate phenotype? **Biological Psychiatry**, 64, 782–788. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.05.009; 2008.

CHAMBERLAIN SR, MULLER U, BLACKWELL AD, CLARK L, ROBBINS TW, SAHAKIAN BJ. Neurochemical modulation of response inhibition and probabilistic learning in humans. **Science**, 311:861–3; 2006.

CHAMPAGNE, F. A; FRANCIS, D. D.; MAR, A.; MEANEY, M. J. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359–371; 2003.

CHASE, E. A.; TAIT, D. S.; BROWN, V. J. Lesions of the orbital prefrontal cortex impair the formation of attentional set in rats. **The European Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 3, p. 2368–75; 2012.

CHEN, Y.-C.; SHEEN, J.-M.; TIAO, M.-M.; TAIN, Y.-L.; HUANG, L.-T. Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 3, p. 5380–401; 2013.

CHENG, J.-T.; LI, J.-S. Intra-orbitofrontal cortex injection of haloperidol removes the beneficial effect of methylphenidate on reversal learning of spontaneously hypertensive rats in an attentional set-shifting task. **Behavioural brain research**, v. 239, p. 148–54, 15; 2013.

CLANCY, B.; FINLAY, B.L.; DARLINGTON, R.B.; ANAND, K.J. Extrapolating brain development from experimental species to humans. **Neurotoxicology**, v. 28, 931–937; 2007.

CLARKE, H.F., ROBBINS, T.W. & ROBERTS, A.C. Lesions of the medial striatum in monkeys produce perseverative impairments during reversal learning similar to those produced by lesions of the orbitofrontal cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 28, 10972–10982; 2008.

CONNOR, K. L.; VICKERS, M. H.; BELTRAND, J.; MEANEY, M. J.; SLOBODA, D. M. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. **The Journal of physiology**, v. 590, n. Pt 9, p. 2167–80, 1; 2012.

CRNIC, L. S. Models of Infantile Malnutrition in Rats: Effects on Maternal Behavior. Developmental Psychobiology, v. 13(6):615-28; 1980.

CUI, Z. H.; IKEDA, K.; KAWAKAMI, K.; GONDA, T.; MASUDA, J. & NABIKA, T. Exaggerated response to cold stress in a congenic strain for the quantitative trait locus for blood pressure. **Journal of Hypertension**, v. 22: 2103-2109; 2004.

CUNHA, F. S.; SILVEIRA, P. P. Similaridades nas desigualdades - um modelo animal para o estudo da vulnerabilidade ao sedentarismo. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do adolescente, Porto Alegre; 2013

DALLMAN M, PECORARO N, AKANA S, et al. Chronic stress and obesity: a new view of ‘comfort food’. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, 11696–11701; 2003.

DARNAUDERY, M., MACCARI, S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. **Brain Research Reviews**, 57, 571-85; 2008.

DEL CERRO, M.C., PEREZ-LASO, C., ORTEGA, E., MARTIN, J.L., GOMEZ, F., PEREZ-IZQUIERDO, M.A., SEGOVIA, S. Maternal care counteracts behavioral effects of prenatal environmental stress in female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 208, 593–602; 2010.

DESAI, M.; GAYLE, D.; BABU J.; ROSS M. G. The Timing of Nutrient Restriction During Rat Pregnancy/ Lactation Alters Metabolic Syndrome Phenotype. **Biomedical Research**, v. 196, n. 6, p. 1–13; 2009.

DESAI, M.; GAYLE, D.; BABU, J.; ROSS, M. G. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 288, n. 1, p. R91–6; 2005.

DIEGO, M. A.; JONES N. A.; FIELD, T.; HERNANDEZ-REIF, M.; SCHANBERG, S.; KUHN, C.; GONZALEZ-GARCIA, A. Maternal psychological distress, prenatal cortisol, and fetal weight. **Psychosomatic Medicine**, v. 68:747–53; 2006.

DIENI, S.; REES, S. BDNF and TrkB protein expression is altered in the fetal hippocampus but not cerebellum after chronic placental compromise. **Experimental Neurology**, 2004.

EIXARCH, E.; BATALLE, D.; ILLA, M.; *et al.* Neonatal neurobehavior and diffusion MRI changes in brain reorganization due to intrauterine growth restriction in a rabbit model. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e31497; 2012.

EPEL E, LAPIDUS R, MCEWEN B, BROWNELL K. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26:37–49; 2001.

FARACI, M.; RENDA, E.; MONTE, S.; *et al.* Fetal growth restriction: current perspectives. **Journal of Prenatal Medicine**, v. 5, n. 2, p. 31–3; 2011.

FERNÁNDEZ-CARROCERA, L. A.; CHÁVEZ-TORRES, R.; CASANUEVA, E.; HUMBERTO BARRERA-REYES, R.; MARTÍNEZ-CRUZ, C. Intrauterine growth retardation and neurodevelopment at one year of age in Mexican children. **Nutrition Research**, v. 23:1–8; 2003.

FIELD, T.; DIEGO, M.; HERNANDEZ-REIF, M. Prenatal depression effects on the fetus and newborn: a review. **Infant Behavior and Development**, v. 29:445–55; 2006.

FLEMING AS, MORGAN HD, WALSH C. Experimental factors in postpartum regulation of maternal care. In: Rosenblatt JS, Snowdon CT (eds) Parental care: evolution, mechanisms and adaptive significance. **Advances in the Studies of Behavior**, 25. Academic, San Diego, CA, pp 215–242; 1996.

FLEMING, A.S., O'DAY, D.H., KRAEMER, G.W. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, 673–85; 1999.

FLORESCO, S., & MAGYAR, O. Mesocortical dopamine modulation of executive functions: Beyond working memory. **Psychopharmacology**, v. 188(4), 567–585; 2006.

FRANCIS, D. D.; YOUNG, L. J.; MEANEY, M. J.; INSEL, T. R. Naturally occurring differences in maternal care are associated with the expression of oxytocin and vasopressin receptors: gender differences. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 14: 349–353; 2002.

FREEDMAN DS, JACOBSEN SJ, BARBORIAK JJ, SOBOCINSKI KA, ANDERSON AJ, KISSEBAH AH, SASSE EA, GRUCHOW HW. Body fat distribution and male/female differences in lipids and lipoproteins. **Circulation**, v. 81:1498–506; 1990.

FRIEDMAN, M.I.; BRUNO, J. P.; ALBERTS, J. R. Physiological and behavioral consequences in rats of water recycling during lactation. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 95:26-35; 1981.

SCHOENBAUM, G.; SETLOW, B.; SADDORIS, M.P. M. Encoding predicted outcome and acquired value in orbitofrontal cortex during cue sampling depends upon input from basolateral amygdala. **Neuron**. 39 855–867; 2003.

GALLER, J. R., RICCIUTI, H. N., CRAWFORD, M. A. & KUCHARSKI, L. T. The role of the mother-infant interaction in nutritional disorders. In: **Nutrition and Behavior** (Galler, J. R., ed.), pp. 269-304, Plenum Press, New York, NY; 1984

GALVAN, A., HARE, T.A., DAVIDSON, M., SPICER, J., GLOVER, G., CASEY, B.J. The role of ventral frontostriatal circuitry in reward-based learning in humans. **Journal of Neuroscience** 25, 8650–8656; 2005.

GAROFLOS E, STAMATAKIS A, RAFROGIANNI A, PONDIKI S, STYLIANOPOULOU F. Neonatal handling on the first postnatal day leads to increased maternal behavior and fos levels in the brain of the newborn rat. **Developmental Psychobiology**, v. 50:704–13; 2008.

GEVA, R.; LEITNER, Y.; HAREL, S. Children Born with Intrauterine Growth Restriction: Neurodevelopmental Outcome. In **Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease**, p. 193–208; 2012.

GHAHREMANI, D. G., MONTEROSSO, J., JENTSCH, J. D., BILDER, R.M., AND POLDRACK, R. A. Neural components underlying behavioral flexibility in human reversal learning. **Cerebral Cortex**, v. 20, 1843–1852; 2010.

GILBERT, S. J.; BURGESS, P. W. Executive function. **Current biology : CB**, v. 18, n. 3, p. R110–4, 12; 2008.

GLOVER, V.; O'CONNOR, T.G.; HERON, J.; & GOLDING, J. Antenatal maternal anxiety is linked with atypical handedness in the child. **Early Human Development**, 79, 107–118; 2004.

GLUCKMAN PD AND HANSON MA. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatric Research**, 56: 311–317; 2004.

GOMEZ-PINILLA, F.; VAYNMAN, S. A “deficient environment” in prenatal life may compromise systems important for cognitive function by affecting BDNF in the hippocampus. **Experimental Neurology**, v. 192, n. 2, p. 235–43; 2005.

GRAHAM, S., PHUA, E., SOON, C. S., OH, T., AU, C., SHUTER, B., ET AL. Role of medial cortical, hippocampal and striatal interactions during cognitive set- shifting. **Neuroimage**, 1359–1367; 2009.

GRUENWALD P. Growth of the fetus II: abnormal growth in twins and infants of mothers with diabetes, hypertension or isoimmunization. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 94:1120–32; 1966.

GUNNAR MR, BRUCE J, GROTEVANT HD. International adoption of institutionally reared children: Research and policy. **Development and Psychopathology**;(12):677–693; 2000.

HADOKE P.W.; MacDONALD L.; LOGIE, J.J.; SMALL, G.R.; DOVER, A.R. & WALKER, B.R. Intra-vascular glucocorticoid metabolism as a modulator of vascular structure and function. **Cell and Molecular Life Science** v. 63: 565–578; 2006.

HAJNAL, A; NORGREN, R. Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. **Brain research**, v. 904, n. 1, p. 76–84, 15; 2001.

HALES CN, BARKER DJ. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v. 60, 5–20; 2001.

HALES, C.N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (noninsulin-dependent diabetes) mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35:595–601; 1992.

HALPERN, L. F.; COLL, C. T. G.; MEYER, E.C.; BENDERSKY K. The contributions of temperament and maternal responsiveness to the mental development of small-for-gestational-age and appropriate-for-gestational-age infants. **Applied Developmental Psychology**, v. 22: 199-224; 2001.

HARDELAND, R., REITER, R. J., POEGGELER, B., AND TAN, D.-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 17, 347–357; 1993.

HAUGAARD, C. T.; BAUER, M. K. Rodent models of intrauterine growth restriction. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 28, n. 1, p. 10–22; 2001.

HEIM, C.; PLOTSKY, P.M. & NEMEROFF, C.B. Importance of studying the contributions of early adverse experience to neurobiological findings in depression. **Neuropsychopharmacology**, 29:641– 648; 2004.

HENDRIX, N.; BERGHELLA, V. Non-placental Causes of IUGR. In: **Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease**, 2012.

HENRY, C., KABBAJ, M., SIMON, H., LE MOAL, M., MACCARI, S. Pre-natal stress increases the hypothalamic–pituitary–adrenal axis response to stress in young and adult rats. **Journal of Endocrinology**, v. 6, 341–345; 1994.

HORNAK J, O'DOHERTY J, BRAMHAM J, ROLLS ET, MORRIS RG, BULLOCK PR, POLKEY CE. Reward-related reversal learning after surgical excisions in orbito-frontal or dorsolateral prefrontal cortex in humans. **Journal of Cognitive Neuroscience**, v. 16:463–478; 2004.

HULTMAN, C. M.; TORRANG, A.; TUVBLAD, C.; CNATTINGIUS S.; LARSSON, J. O.; LICHTENSTEIN, P. Birth weight and attention-deficit/hyperactivity symptoms in childhood and early adolescence: a prospective Swedish twin study. **Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry**, v. 46:370–377; 2007.

BOHN, C. GIERTLER, W. HAUBER. Orbital prefrontal cortex and guidance if instrumental behaviour in rats under reversal conditions, **Behavioral Brain Research**, v. 143; 49–56; 2003.

JACOBS, S. Consequências do consumo materno de dieta de cafeteria sobre o perfil endócrino e a função reprodutiva da prole. **Tese (Doutorado em Fisiologia)**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre; 2013.

JACOBSON L, SAPOLSKY RM. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology Reviews**, 12:118–134; 1991.

JANSSON, N.; NILSFELT, A.; GELLERSTEDT, M.; WENNERGREN, M.; ROSSANDER-HULTHEN, POWELL, T. L.; JANSSON, T. Maternal hormones linking maternal body mass index and dietary intake to birth weight. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87: 1743–9; 2008.

JANSSON, T.; POWELL, T. L. Placental nutrient transfer and fetal growth. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 500–2; 2000.

JONES A, GODFREY KM, WOOD P, OSMOND C, GOULDEN P, PHILLIPS DI. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91(5):1868-71; 2006.

KAFFMAN, A., & MEANEY, M. J. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: Clinical and research implications of molecular insights. **Journal of Child Psychology and Psychiatry**, 48, 224-244; 2007.

KAJANTIE, E.; FELDT, K.; RÄIKKÖNEN, K.; PHILLIPS, D. I.; OSMOND, C.; HEINONEN, K.; PESONEN, A. K.; ANDERSSON, S.; BARKER, D.J.; ERIKSSON, J. G. Body size at birth predicts hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to psychosocial stress at age 60 to 70 years. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92:4094–4100; 2007.

KANTAK KM, SINGH T, KERSTETTER KA, DEMBRO KA, MUTEBI MM, HARVEY RC, DESCHEPPER CF, DWOSKIN LP. Advancing the spontaneous hypertensive rat model of attention deficit/hyperactivity disorder. **Behavioral Neuroscience**, v. 122:340–357; 2008.

KAUFMAN, J.; PLOTSKY, P. M.; NEMEROFF, C. B.; CHARNEY, D. S. Effects of early adverse experiences on brain structure and function: clinical implications. **Biological psychiatry**, v. 48, n. 8, p. 778–90, 15; 2000.

KILLGORE W, YOUNG A, FEMIA L, et al. Cortical and limbic activation during viewing of high- versus low-calorie foods. **Neuroimage**. 19, 1381–1394; 2003.

KINNUNEN, A.K., KOENIG, J.I., BILBE, G. Repeated variable prenatal stress alters pre- and postsynaptic gene expression in the rat frontal pole. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, 736-48; 2003.

KLANKER, M.; FEENSTRA, M.; DENYS, D. Dopaminergic control of cognitive flexibility in humans and animals. **Frontiers in neuroscience**, v. 7, n. November, p. 201; 2013.

KOENIG, J.I.; ELMER, G.I.; SHEPARD, P.D.; LEE, P.R.; MAYO, C.; JOY, B.; HERCHER, E.; BRADY, D.L. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. **Behavioral Brain Research**, v. 156, 251-61; 2005.

KOFMAN, O. The role of prenatal stress in the etiology of developmental behavioural disorders. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 26, 457-70; 2002.

KRISTAL, M. B. The biopsychology of maternal behavior in nonhuman mammals. **Institute for Laboratory Animal Research Journal** v. 50:51–63; 2009.

KUBOTA K, KOMATSU H. Neuron activities of monkey pre- frontal cortex during the learning of visual discrimination tasks with go/no-go performances. **Neuroscience Research**, 3:106–129; 1985.

LEE R., BRADY D L., SHAPIRO R A., DORSA D M., KOENIG J I. Prenatal stress generates deficits in rat social behavior: Reversal by oxytocin. **Brain Research**; 2007

LEE, S.; LEE, E.; KU, J.; *et al.* Disruption of orbitofronto-striatal functional connectivity underlies maladaptive persistent behaviors in alcohol-dependent patients. **Psychiatry investigation**, v. 10, n. 3, p. 266–72; 2013.

LEONHARDT, M. Effects of Perinatal Maternal Food Restriction on Pituitary-Gonadal Axis and Plasma Leptin Level in Rat Pup at Birth and Weaning and on Timing of Puberty. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 2, p. 390–400, 17; 2002.

LESAGE J, BLONDEAU B, GRINO M, BREANT B, DUPOUY JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and

intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. **Endocrinology**, 142:1692-1702; 2001.

LEVITAN, R. D.; WENDLAND, B. Novel “thrifty” models of increased eating behaviour. **Current psychiatry reports**, v. 15, n. 11, p. 408; 2013.

LÉVY, F. Neural substrates involved in the onset of maternal responsiveness and selectivity in sheep. In: **The Neuroanatomical Basis of Maternal Behavior**. 23-37; 2008.

LI, M.; FLEMING, A. S. The nucleus accumbens shell is critical for normal expression of pup-retrieval in postpartum female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 145:99-111; 2003.

LIANG, N.; HAJNAL, A.; NORGREN, R.; SHAM, R. N. Sham feeding corn oil increases accumbens dopamine in the rat. v. 17033, p. 1236–1239; 2006.

LINCOLN DW, PORTER DG. Timing of the photoperiod and the hour of birth in rats. **Nature**, v. 260(5554):780-781; 1976.

LIU, D., DIORIO, J., TANNENBAUM, B., CALDJI, C., FRANCIS, D., FREEDMAN, A., SHARMA, S., PEARSON, D., PLOTSKY, P. M., AND MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, 277, 1659–1662; 1997.

LONSTEIN, J. S. & GAMMIE, S. C. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents . **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. v. 26 (8) , 869 – 888; 2002.

LONSTEIN, J. S. & MORRELL, J. I. Neuroendocrinology and neurochemistry of maternal motivation and behavior . In **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology**. Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology (A. Lajtha and J. D. Blaustein , Eds.) , pp. 195 – 245; 2007.

LOPES, V. P.; MAIA, J. A. R. Períodos críticos ou sensíveis: revisitar um tema polêmico à luz da investigação empírica. **Revista paulista de Educação Física**, São Paulo, v. 14(2):128-40; 2000.

LOVIC, V.; FLEMING, A. S. Artificially-reared female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task—reversal of effects with maternal-like licking stimulation. **Behavioural Brain Research**, v. 148, n. 1-2, p. 209–219; 2004.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. In **The Childhood Environment and Adult Disease** (Bock, G. R. and Whelen, J., eds.), pp. 38–55, Wiley, Chichester; 1991.

LUSSANA, F.; PAINTER, R. C.; OCKE, M. C.; BULLER, H. R.; BOSSUYT, P. M.; ROSEBOOM, T. J. Prenatal exposure to the Dutch famine is associated with a preference for fatty foods and a more atherogenic lipid profile. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 1648-52; 2008.

LYONS, P.. Intrauterine Growth Restriction. In **Obstetrics in Family Medicine: A Practical Guide (Current Clinical Practice)** p. 45–53; 2006.

M. GALLAGHER, R.W. MC MAHAN, G. SCHOENBAUM. Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning, **J. Neurosci.** 19, 6610–6614; 1999.

MACCARI S, PIAZZA PV, KABBAJ M, BARBAZANGES A, SIMON H, LE MOAL M. Adoption reverses the long-term impairments in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. **Journal of Neuroscience**, v. 15:110–116; 1995.

MACRI, S.; MASON, G. J.; WURBEL, H. Dissociation in the effects of neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, 1017–1024; 2004.

MAGGIONI, C.; CORNELISSEN, G.; ANTINOZZI, R.; *et al.* A half-yearly aspect of circulating melatonin in pregnancies complicated by intrauterine growth retardation. **Neuroendocrinology Letters** ISSN 0172-780X; 1999.

MAILLY, P., ALIANE, V., GROENEWEGEN, H. J., HABER, S. N., AND DENIAU, J. M. The rat prefrontostriatal system analyzed in 3D: evidence for multiple interacting functional units. **Journal of Neuroscience**. v. 33, 5718–5727; 2013

MALLARD, C.; LOELIGER, M.; COPOLOV, D.; REES, S. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea-pig following intrauterine growth-restriction. **Neuroscience** 100: 327–333; 2000.

MANALICH, R.; REYES, L.; HERRERA, M.; *et al.* Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. **Kidney International**, v. 58:770–773; 2000.

MANJARREZ-GUTIERREZ, G.; GONZALEZ-RAMIREZ, M.; BOYZO-MONTES DE OCA, A.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, J. Dihydropteridine reductase activity in the brainstem of intrauterine growth-restricted rats. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 28, n. 7, p. 621–4; 2010.

MANN, P. E. & BRIDGES, R. S. Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. **Progress in Brain Research**, v. 133, 251 – 262; 2001.

MANNING, F. A. General principles and applications of ultrasonography. **Maternal-fetal medicine: principles and practice**, Saunders; 2004.

- MASSARO, T. F.; LEVITSKY, D. A; BARNES, R. H. Protein malnutrition in the rat: its effects on maternal behavior and pup development. **Developmental psychobiology**, v. 7, n. 6, p. 551–61; 1974.
- MCALONAN, K.; BROWN, V. J. Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. **Behavioural Brain Research**, v. 146, n. 1-2, p. 97–103; 2003.
- MCGUIRE, M. K., A. W. LITTLETON, K. J. SCHULZE, AND K. M. RASMUSSEN. Pre- and postweaning food restrictions interact to determine reproductive success and milk volume in rats. **Journal of Nutrition** 125:2400–2406; 1995.
- MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annual Reviews of Neuroscience**, v. 24:1161–192; 2001.
- MEGUID MM, FETISSOV SO, VARMA M, SATO T, ZHANG L, et al. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. **Nutrition**, v. 16:843–857; 2000.
- MENENDEZ-PELAEZ, A., AND REITER, R. J. Distribution of melatonin in mammalian tissues: The relative importance of nuclear versus cytosolic localization. **Journal of Pineal Research**, v. 15, 59–69; 1993.
- MILLER, S. L.; SUTHERLAND, A. E.; SUPRAMANIAM, V. G.; *et al.* Antenatal glucocorticoids reduce growth in appropriately grown and growth-restricted ovine fetuses in a sex-specific manner. **Reproduction, fertility, and development**, v. 24, n. 5, p. 753–8; 2012.
- MILLER, S. L.; CHAI, M.; LOOSE, J.; CASTILLO-MELENDEZ, M.; WALKER, D. W.; JENKIN, G. & WALLACE, E. M. The effects of maternal beta-methasone administration on the intrauterine growth-restricted fetus. **Endocrinology** 148, 1288–1295. doi:10.1210/EN.2006-1058; 2007.
- MILLS, J. L.; GRAUBARD, B. I.; HARLEY, E. E.; RHOADS, G. G.; BERENDES, H. W. Maternal alcohol consumption and birth weight. How much drinking during pregnancy is safe? **The Journal of the American Medical Association**. v. 252:1875–9; 1984.
- MOHAMED, W. M. Y.; UNGER, E. L.; KAMBHAMPATI, S. K.; JONES, B. C. Methylphenidate improves cognitive deficits produced by infantile iron deficiency in rats. **Behavioural brain research**, v. 216, n. 1, p. 146–52, 1; 2011.
- MOLTZ, H.; LUBIN, M.; LEON, M.; NUMAN, M. Hormonal induction of maternal behavior in the ovariectomized nulliparous rat. **Physiology of Behavior**, v. 5, 1373–1377; 1970.

MULDER, E. J. H.; ROBLES DE MEDINA, P. G.; HUIZINK, A. C.; *et al.* Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. **Early human development**, v. 70, n. 1-2, p. 3–14; 2002.

NAKAMURA, Y.; TAMURA, H.; KASHIDA, S.; *et al.* Changes of serum melatonin level and its relationship to feto-placental unit during pregnancy. **Journal of pineal research**, v. 30, n. 1, p. 29–33; 2001.

NEMSADZE, K., SILAGAVA, M. Neuroendocrine foundation of maternal-child attachment. **Georgian Medical News**. 21-6; 2010.

NEUWALD, M. F.; AGRANONIK, M.; PORTELLA, A. K.; *et al.* Transgenerational effects of maternal care interact with fetal growth and influence attention skills at 18 months of age. **Early human development**, v. 90, n. 5, p. 241–6; 2014.

NEWMAN, L. A.; MCGAUGHY, J. Adolescent rats show cognitive rigidity in a test of attentional set shifting. **Developmental psychobiology**, v. 53, n. 4, p. 391–401; 2011.

NOMURA, Y., WICKRAMARATNE, P.J., WARNER, V., MUFSON, L., WEISSMAN, M.M. Family discord, parental depression, and psychopathology in offspring: ten-year follow-up. **Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry**, v. 41, 402–409; 2002.

NORA D. VOLKOW, GENE-JACK WANG, AND RUBEN D. BALER, A. Reward, dopamine and the control of food intake: implications for obesity. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 15(1): 37–46; 2012.

NUMAN, M. & INSEL, T. R. **The Neurobiology of Parental Behavior**. Springer-Verlag, New York; 2003.

NUMAN, M. Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. **Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews**, 163-190; 2006.

NUMAN, M.; STOLZENBERG, D. S. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. **Frontiers in neuroendocrinology**, v. 30, n. 1, p. 46–64; 2009.

OKAH, F. A.; CAI, J.; HOFF, G. L. Term-gestation low birth weight and health-compromising behaviors during pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 105:543–50; 2005.

OLCESE, J.; LOZIER, S.; PARADISE, C. Melatonin and the circadian timing of human parturition. **Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 20, n. 2, p. 168–74; 2013.

OSTERHOLM, E.A.; HOSTINAR, C.E.; GUNNAR, M. R. Alterations in stress responses of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in small for gestational age infants. **Psychoneuroendocrinology**, 37: 1719–1725; 2012.

PADOIN, M.J., CADORE, L.P., GOMES, C.M., BARROS, H.T.M., LUCION, A.B. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. **Behavioral Neuroscience**. v. 115, 1332–1340; 2001.

PAINTER, R. C.; DE ROOIJ, S. R.; BOSSUYT, P. M.; et al. Maternal nutrition during gestation and carotid arterial compliance in the adult offspring: the Dutch famine birth cohort. **Journal of Hypertension**, v. 25, 533–540; 2007.

PANDOLFO, P.; MACHADO, N. J. ; Köfalvi, A. ; Takahashi, R. N. ; Cunha, R. A. Caffeine regulates frontocorticostratial dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, p. 317-328; 2013.

PARDEY, M. C.; KUMAR, N. N.; GOODCHILD, A. K.; CORNISH, J. L. Catecholamine receptors differentially mediate impulsive choice in the medial prefrontal and orbitofrontal cortex. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 27, n. 2, p. 203–12; 2013.

PATIN, V., LORDI, B., VINCENT, A., THOUMAS, J.L., VAUDRY, H., CASTON, J. Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. **Developmental Brain Research**. 139, 1-8; 2002.

PEREIRA, M.; URIARTE, N.; AGRATI, D.; ZULUAGA, M. J.; FERREIRA, A. Motivational aspects of maternal anxiety in lactating rats . **Psychopharmacology**, 241 – 248; 2005.

PETERS, J., BUCHEL, C. Overlapping and distinct neural systems code for subjective value during intertemporal and risky decision making. **Journal of Neuroscience** 29, 15727–15734; 2009.

PIECH, R. M.; PASTORINO, M. T.; ZALD, D. H. All I saw was the cake. Hunger effects on attentional capture by visual food cues. **Appetite**, v. 54, n. 3, p. 579–82; 2010.

PILGAARD, K.; HAMMERSHAIMB, M. T.; GRUNNET L.; *et al.* Differential nongenetic impact of birth weight versus third-trimester growth velocity on glucose metabolism and magnetic resonance imaging abdominal obesity in young healthy twins. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96:2835–43; 2011.

PLAUT, S.M. Studies of undernutrition in the young rat: Methodological considerations. **Developmental Psychology**, v. 3: 157-167; 1970.

POEGGEL, G.; LANGE, E.; HASE, C.; et al. Maternal separation and early social deprivation in *Octodon degus*: Quantitative changes of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate- diaphorase-reactive neurons in the prefrontal cortex and nucleus accumbens. **Neuroscience** 94:497–504; 1999.

POLLACK, R. N.; DIVON, M. Y. Intrauterine growth retardation: definition, classification and etiology. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 35:99–107; 1992.

PORTELLA, A. K.; KAJANTIE, E.; HOVI, P.; *et al.* Effects of in utero conditions on adult feeding preferences. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 3, n. 03, p. 140–152; 2012.

PREVIC, F. H. *The Dopaminergic Mind in Human Evolution and History*. Cambridge University Press; 2009

PROHASKA, J. R. Long-term functional consequences of malnutrition during brain development: copper. **Nutrition**, v. 16, n. 7-8, p. 502–4; 2000.

PRUESSNER, J. C., CHAMPAGNE, F., MEANEY, M. J., AND DAGHER, A. Dopamine release in response to a psychological stress in humans and its relationship to early life maternal care: A positron emission tomography study using [¹¹C]raclopride. **Journal of Neuroscience**, v. 24, 2825–2831; 2004.

PRYCE, C.R., FELDON, J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**. 27, 57-71; 2003

PRYCE, C.R.; BETTSCHEN, D. & FELDON, J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. **Developmental Psychobiology** 38(4): 239-251; 2001.

RAVELLI, A. C.; VAN DER MEULEN, J. H.; OSMOND, C.; BARKER, D. J.; BLEKER, O. P. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70:811–6; 1999.

REES, S.; DE MATTEO, R.; HALE, N.; CARDAMONE, L.; TOLCOS, M.; PROBYN, M.; HARDING, R. Investigating erythropoietin as a neuroprotective agent in an ovine model of endotoxin induced brain damage. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**; 2007

REES, S.; HARDING, R.; WALKER, D. An adverse intrauterine environment: implications for injury and altered development of the brain. **International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 26, n. 1, p. 3–11; 2008.

REIS, A R.; AZEVEDO, M. S. DE; SOUZA, M. A DE; *et al.* Neonatal handling alters the structure of maternal behavior and affects mother-pup bonding. **Behavioural brain research**, v. 265C, p. 216–228, 2; 2014.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; PAREDES, S.D.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M. Melatonin and reproduction revisited. **Biology of Reproduction**, v. 81, 445–456; 2009.

REYNOLDS, R.M.; WALKER, B. R.; SYDDALL, H. E.; ANDREW, R.; WOOD, P. J.; PHILLIPS, D. I. W. Is there a gender difference in the associations of birthweight and adult hypothalamic-pituitary- adrenal axis activity? **European Journal of Endocrinology**, v. 303: 249–253; 2005.

RICE, D.; BARONE, S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental health perspectives**, v. 108 Suppl , p. 511–33; 2000.

ROBBINS, T. W. Dissociating executive functions of the prefrontal cortex. In A. Roberts, T. Robbins, & L. Weiskrantz (Eds.), **The prefrontal cortex** (pp. 117–130); 1998.

ROCHELSON, B.; KAPLAN, C.; GUZMAN. E.; ARATO, M.; HANSEN, K.; TRUNCA, C. A quantitative analysis of placental vasculature in the third trimester fetus with autosomal trisomy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 75:59–63; 1990.

RODRIGUEZ-JIMENEZ, R., HOENICKA, J., JIMENEZ-ARRIERO, M. A., PONCE, G., BAGNEY, A., ARAGUES, M., ET AL. Performance in the Wisconsin Card Sorting Test and the C957T polymorphism of the DRD2 gene in healthy volunteers. **Neuropsychobiology** **54**, 166–170; 2006.

ROGERS, R. D.; ANDREWS, T. C.; GRASBY, P. M.; BROOKS, D. J.; ROBBINS, T. W. Contrasting cortical and subcortical activations produced by attentional-set shifting and reversal learning in humans. **Journal of cognitive neuroscience**, v. 12, n. 1, p. 142–62; 2000.

ROGHAIR, R. D.; LAMB, F. S.; MILLER, F. J.; SCHOLZ, T. D. & SEGAR J.L. Early gestation dexamethasone programs enhanced postnatal ovine coronary artery vascular reactivity. **American Journal of Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288: R46–R53; 2005.

ROGOWITZ, G. L. Trade-offs in energy allocation during lactation. **American Zoologist** 36:197–204; 1996.

ROSENBLATT, J. S. & LEHRMAN, D. S. Maternal behavior in the laboratory rat. In 11. L. Rheingold (Ed.). **Maternal Behavior in Mammals**. New York: Wiley. Pp. 8-56; 1963.

ROTHERMUND Y, PREUSCHHOF C, BOHNER G, et al. Differential activation of the dorsal striatum by high-calorie visual food stimuli in obese individuals. **Neuroimage**. 37, 410–421; 2007.

SABAU, R. M.; FERKIN, M. H. Food restriction affects the maternal behavior provided by female meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). **Journal of Mammalogy**, v. 94, n. 5, p. 1068–1076; 2013.

SABOGAL, J. C.; WEINER, S. Fetal growth restriction. In: Berghella V, Editor. **Maternal-fetal evidenced based guidelines**. London and New York, NY: Informa Healthcare. pp. 286–93; 2007.

SANCHEZ, M.; LADD, C. & PLOTSKY, P. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology evidence from rodent and primate models. **Development & Psychopathology** v. 13:419– 449; 2001.

SCHOENBAUM, G., NUGENT, S.L., SADDORIS, M.P. & SETLOW, B. Orbitofrontal lesions in rats impair reversal but not acquisition of go, no-go odor discriminations. **NeuroReport**, v. 13:885–890; 2002.

SCHULTZ W, TREMBLAY L, HOLLERMAN JR. Reward processing in primate orbitofrontal cortex and basal ganglia. **Cerebral Cortex**, 10:272–283; 2000.

SCHWARTZ, J. E.; KOVACH, A.; MEYER, J.; McCONNELL C & IWAMOTO, H. S. Brief, intermittent hypoxia restricts fetal growth in Sprague- Dawley rats. **Biology of the Neonate**, v. 73:313-319; 1998.

SCHWARTZ, M.W. Brain pathways controlling food intake and body weight. **Experimental Biology and Medicine** (Maywood), 226, 978–981; 2001.

SCOTT, J.P. Critical periods in organizational process. In: FALKENER, F.; TANNER, J.M., eds. **Human growth**. New York, Plenum, v.1: Developmental biology, prenatal growth; 1986.

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

SECKL, J. R. Physiologic programming of the fetus. **Clinical Perinatology**, v. 25: 939–962; 1998.

SECKL, J. R.; & MEANEY, M. J. Glucocorticoid programming. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1032, 63–84; 2004.

SECKL, J. R.; MEANEY, M. J. Early life events and later development of ischaemic heart disease. **Lancet** 342:1236; 1994.

SHARKEY J, CABLE C, OLCESE J. Melatonin sensitizes human myometrial cells to oxytocin in a PKCa/ERK-dependent manner. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 95(6):2902-2908; 2010.

SHARKEY JT, PUTTARAMU R, WORD RA, OLCESE J. Melatonin synergizes with oxytocin to enhance contractility of human myometrial smooth muscle cells. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**; v. 94(2):421-427; 2009.

SHUGHRUE, P. J.; LANE, M. V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system. **The Journal of Comparative Neurology**, 388: 507-525; 1997.

SILVEIRA P, PORTELLA A, CLEMENTE Z, et al. Neonatal handling alters feeding behavior of adult rats. **Physiology & Behavior**. v. 80, 739–745; 2004.

SILVEIRA PP, PORTELLA AK, CLEMENTE Z, GAMARO GD, DALMAZ C. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 23(1):93-9; 2005.

SILVEIRA, P. P.; AGRANONIK, M.; FARAS, H.; *et al.* Preliminary evidence for an impulsivity-based thrifty eating phenotype. **Pediatric research**, v. 71, n. 3, p. 293–8; 2012.

SIMONNEAUX, V. Naughty melatonin: How mothers tick off their fetus. **Endocrinology**, 152, 1734–1738; 2011.

SIU, S.C.; COLMAN, J. M.; SORENSON, S.; SMALLHORN, J. F.; FARINE, D.; AMANKWAH, K. S.; SPEARS, J. C.; SERMER, M. Adverse neonatal and cardiac outcomes are more common in pregnant women with cardiac disease. **Circulation**; 105:2179–84; 2002.

SMART, J. L., AND J. PREECE. Maternal behavior of undernourished mother rats. **Animal Behaviour** 21:613–619; 1973.

SMITH, J.W., SECKL, J.R., EVANS, A.T., COSTALL, B., SMYTHE, J.W. Gestational stress induces post-partum depression-like behaviour and alters maternal care in rats. **Psychoneuroendocrinology**. 29, 227-44; 2004.

SPENCER, S. J., BULLER, K. M., AND DAY, T. A. Medial prefrontal cortex control of the paraventricular hypothalamic nucleus response to psychological stress: possible role of the bed nucleus of the stria terminalis. **Journal of Comparative Neurology**, v. 481, 363–376; 2005.

SPICER, J.; GALVAN, A.; HARE, T. A; *et al.* Sensitivity of the nucleus accumbens to violations in expectation of reward. **NeuroImage**, v. 34, n. 1, p. 455–61, 1; 2007.

STACK, E. C.; BALAKRISHNAN, R.; NUMAN, M. J. & Numan, M. A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. **Behavioral and Brain Research**. v. 131: 17 – 36; 2002.

STEIN AD, RUNDLE A, WADA N, GOLDBOHN RA, LUMEY LH. Associations of gestational exposure to famine with energy balance and macronutrient density of the diet at age 58 years differ according to the reference population used. **Journal of Nutrition**. v. 139:1555–6; 2009.

SUSSER, E.; ST CLAIR, D.; HE, L. Latent effects of prenatal malnutrition on adult health: the example of schizophrenia. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1136:185–192; 2008.

SWANSON CJ, HEATH S, STRATFORD TR, KELLEY AE. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 58: 933–945; 1997.

TAKAYAMA H, NAKAMURA Y, TAMURA H, *et al.* Pineal gland (melatonin) affects the parturition time, but not luteal function and fetal growth, in pregnant rats. **Endocrine Journal**; 50(1):37-43; 2003.

TALGE, N. M.; NEAL, C.; GLOVER, V. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? **Journal of child psychology and psychiatry, and allied disciplines**, v. 48, n. 3-4, p. 245–61; 2007.

TAMASHIRO KL, TERRILLION CE, HYUN J, KOENIG JI, MORAN TH. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. **Diabetes**. 58:1116–1125; 2009.

TANABE, J.; REYNOLDS, J.; KRMPOTICH, T.; *et al.* Reduced neural tracking of prediction error in substance-dependent individuals. **The American journal of psychiatry**, v. 170, n. 11, p. 1356–63, 1; 2013.

TANAKA, M.;NATORI, M.; ISHIMOTO, H.; MIYAZAKI, T.; KOBAYASHI, T. & NOZAWA, S. Experimental growth retardation produced by transient period of uteroplacental ischemia in pregnant Sprague- Dawley rats. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 171, 1231-1234; 1994.

TANAKA, S.; YOUNG, J. W.; GRESACK, J. E.; GEYER, M. A; RISBROUGH, V. B. Factor analysis of attentional set-shifting performance in young and aged mice. **Behavioral and brain functions : BBF**, v. 7, n. 1, p. 33; 2011.

TAPANAINAN, P. J.; BANG P.; WILSON, K.; UNTERMAN, T. G.; VREMAN, H. J.; ROSENFELD, R. G. Maternal hypoxia as a model for intrauterine growth retardation: effects on insulin-like growth factors and their binding proteins. **Pediatric Research**;36(2):152-8; 1994.

TCHANTURIA, K.; DAVIES, H.; ROBERTS, M.; *et al.* Poor cognitive flexibility in eating disorders: examining the evidence using the Wisconsin Card Sorting Task. **PLoS one**, v. 7, n. 1, p. e28331; 2012.

TEEGARDEN SL, NESTLER EJ, BALE TL. Delta FosB- mediated alterations in dopamine signaling are normalized by a palatable high-fat diet. **Biological Psychiatry**, 64:941–950; 2008.

TELFORD, I. R.; WOODRUFF, C. S.; LINFORD, R. H. Fetal resorption in the rat as influenced by certain antioxidants. **American Journal of Anatomy**, v. 110(1) 29-36; 1962.

URIARTE N, BREIGEIRON MK, BENETTI F, ROSA XF, LUCION AB. Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats. **Developmental Psychobiology**, v. 49(5):451-62; 2007.

VALLEE, M., MAYO, W., DELLU, F., LE MOAL, M., SIMON, H., & MACCARI, S. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: Correlation with stress-induced corticosterone secretion. **The Journal of Neuroscience**, 17, 2626–2636; 1997.

VAZQUEZ, V.; PENIT-SORIA, J.; DURAND, C.; BESSON, M. J.; GIROS, B.; DAUGE, V. Maternal deprivation increases vulnerability to morphine dependence and disturbs the enkephalinergic system in adulthood. **Journal of Neuroscience**. 25: 4453-4462; 2005.

VELAZQUEZ, E., ESQUIFINO, A. I., ZUECO, J. A., RUIZ ALBUSAC, J. M., AND BLAZQUEZ, E. Evidence that circadian variations of circulating melatonin levels in fetal and suckling rats are dependent on maternal melatonin transfer. **Neuroendocrinology**, v. 55, 321–326; 1992.

VERDEJO-GARCIA, A., BECHARA, A., RECKNOR, E. C., AND PEREZ-GARCIA, M. Executive dysfunction in substance dependent individuals during drug use and abstinence: an examination of the behavioral, cognitive and emotional correlates of addiction. **Journal International of Neuropsychology Society**, v.12, 405–415; 2006.

WALFISCH, A.; HALLACK, M. Hypertension. In: James DK, Steer PJ, Weiner CP, Gonik B, editors. **High risk pregnancy management options**. Philadelphia, PA: Elsevier; pp. 772–97; 2006.

WEERTH, C.; VAN HEES, Y.; BUITELAAR, J. K. Prenatal maternal cortisol levels and infant behavior during the first 5 months. **Early Human Development**, v.74:139–51; 2003.

WEINSTOCK, M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 32, n. 6, p. 1073–86; 2008.

WIENER, S. G., K. M. FITZPATRICK, R. LEVIN, W. P. SMOTHERMAN, AND S. LEVINE. Alterations in the maternal behavior of rats rearing malnourished offspring. **Developmental Psychology**. v. 10:243–254; 1977.

WIGGLESWORTH, J. S. Fetal growth retardation. Animal model: uterine vessel ligation in the pregnant rat. **American Journal of Pathology**, v. 77(2): 347-50; 1974.

WILLIAMS, L. M., MARTINOLI, M. G., TITCHENER, L. T., AND PELLETIER, G. The ontogeny of central melatonin binding sites in the rat. **Endocrinology**, v.128, 2083–2090; 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fetomaternal nutrition and low birth weight. http://www.who.int/nutrition/topics/feto_maternal/en/index.html; 2008.

WU, T.; DENG, S.; LI, W.-G.; *et al.* Maternal obesity caused by overnutrition exposure leads to reversal learning deficits and striatal disturbance in rats. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e78876; 2013.

YOSSUCK, P.; KRAPULSKI, M., SALM, A.K. Perinatal corticosteroid effect on amygdala and hippocampus volume during brain development in the rat model. **Early Human Development**, v.82, 267–272; 2006.

ZAGRON, G.; WEINSTOCK, M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. **Behavioral and Brain Research**, v.175, 323–328; 2006.

ZHANG, S. Y.; WANG, J. Z.; LI, J. J.; WEI, D. L.; SUI, H. S.; ET AL. Maternal restraint stress diminishes the developmental potential of oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 84: 672– 681; 2011.

ZHANG, T. Y., HELLSTROM, I. C., BAGOT, R. C., WEN, X., DIORIO, J., AND MEANEY, M. J. Maternal care and DNA methylation of a glutamic acid decarboxylase 1 promoter in rat hippocampus. **Journal of Neuroscience**, v. 30, 13130–13137; 2010.

ZHAO, L.-H.; CUI, X.-Z.; YUAN, H.-J.; *et al.* Restraint stress inhibits mouse implantation: temporal window and the involvement of HB-EGF, estrogen and progesterone. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e80472; 2013.