



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA



PG-BGA

**PAPEL DAS VIAS ANGIOTENSINÉRGICAS NO VENTRÍCULO CARDÍACO
ESQUERDO DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTÉICA OU
DESNUTRIÇÃO GESTACIONAL**

Aluna: Marília Andreo

Instituto de Biociências-IBB, Curso Biologia Geral e Aplicada

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Campus de Botucatu

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Aline Boer

Instituto de Biociências-IBB, Departamento de Morfologia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Campus de Botucatu

Botucatu

2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**PAPEL DAS VIAS ANGIOTENSINÉRGICAS NO VENTRÍCULO CARDÍACO
ESQUERDO DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTÉICA OU
DESNUTRIÇÃO GESTACIONAL**

Marília Andreo

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Aline Boer

Colaborador: Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, área de concentração: “Biologia Celular Estrutural e Funcional”.

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO

DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Andreo, Marília.

Papel das vias angiotensinérgicas no ventrículo cardíaco esquerdo de ratos submetidos à restrição protéica ou desnutrição gestacional / Marília Andreo. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu, 2010

Orientador: Patrícia Aline Boer

Assunto CAPES: 20801017

1. Hipertensão arterial
2. Desnutrição na gravidez

Palavras-chave: Angiotensina II; Baixo peso ao nascer; Desnutrição; Hipertensão arterial; Hipertrofia do ventrículo esquerdo

Botucatu, 03 de março de 2010.

**PAPEL DAS VIAS ANGIOTENSINÉRGICAS NO VENTRÍCULO CARDÍACO ESQUERDO DE
RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTÉICA OU DESNUTRIÇÃO GESTACIONAL**

Banca Examinadora

Orientadora: Prof^a Dr^a Patrícia Aline Boer

Membros

Prof^a Dr^a Glaucia Monteiro de Castro

Prof. Dr. Robson Francisco de Carvalho

Dedico este trabalho ao Prof. Dr. Hugo M.
G. de Paula (*in memoriam*), e não poderia
ser de outra forma.

Agradecimentos

À minha mãe – Alcina – pela pessoa que ela é e pelo que ela representa na minha vida, e à minha irmã – Cecília – por ser sempre tão amiga, compreensiva, por me dar apoio e revisar meus textos. Meu orgulho e admiração por elas são imensos.

A toda a minha família, tios e tias, primos, primas e “agregados”, e em especial ao meu avô que é sem dúvida o melhor exemplo de vida e conduta moral, não apenas para mim, mas para todos que o conhecem.

Aos meus professores e orientadores da graduação, que mesmo me definindo como “ambiciosa e idealista”, sempre apostaram em mim e no meu futuro, me ajudando a manter o foco na carreira que eu sempre desejei.

Aos meus amigos, e meu Deus, o que seria de mim sem eles? Eliane, minha comadre tão amada, e meu afilhado Pedro, pessoinha tão especial. Ligianne, brilhando e iluminando a Itália, e ainda assim sempre comigo. Amigos de faculdade: Luana, Gisele, Woody, Juliana Pereira e Juliana de Oliveira, Vinícius, Cláudia, Rodrigo, Júlia, Luciene, Vagner, Gabriel, Flávia, André, Fernanda, Elisa, Fábio... Amigos do diurno: Leopoldo, Bruna, Carolzinha e Carol, Denis, Márcio, Fernanda... Meus alunos especiais da Ed. Física, tanta gente, tantas recordações, foi muito especial ser monitora de cada turma por todos esses anos. Bauru é f*** e eu amo MUITO vocês!

Às moradoras da república mais habitada, mais animada e mais gulosa de Bauru, entre todos os moradores passaram por aquela casa mais de 25

peças, é gente demais, não poderia citar nomes sem correr o risco de ser injusta. Às moradoras da minha atual residência: Angela, amiga e psicóloga a domicílio, desde os tempos de Bauru; Evelise e Larissa, pessoas muito especiais.

Ao Laboratório de Programação Fetal (LPF) e todos os seus integrantes. Prof^a. Patrícia, por ter aceitado essa orientação “bomba-relógio”, acreditar em mim e me dar muita liberdade para eu trabalhar com o que eu mais amo na vida – o sistema cardiovascular. Samuel e Bárbara, primeiros membros da equipe de desnutrição, profissionais exemplares e amigos pra vida inteira, se Deus assim permitir. Dani e Agnes, sempre ao meu lado, amigas e profissionais pra qualquer hora e sem dúvida abrilhantando o grupo. Maurício, pela ajuda intelectual, pelo apoio pessoal e pela paciência inesgotável, a qualquer hora do dia. Trabalhar ao lado de vocês é um privilégio enorme.

Aos colegas da UNICAMP, que nos ajudam a desenvolver esse trabalho maravilhoso. Prof. Gontijo, contribuinte essencial em todas as nossas discussões. Flávia, membro ilustre da equipe, por toda a ajuda profissional e pessoal que sempre nos deu. Ize e Rafael, por cada *western blotting* realizado. E aos outros integrantes que não estão diretamente ligados ao meu trabalho, mas contribuem muito para o sucesso do grupo.

E por último agradeço a Deus, por cada novo dia e cada nova vitória, mesmo que eu nem sempre esteja apta a compreender os seus desígnios.

RESUMO

A restrição proteica materna pode levar à redução no número de cardiomiócitos da prole, um importante fator de risco para desordens cardiovasculares na vida adulta. No coração, todos os componentes do sistema renina-angiotensina (SRA), incluindo a angiotensina II (ANG II) e seus receptores – AT1R e AT2R – são expressos. Este estudo investigou comparativamente, em modelos idênticos, variando apenas a dieta materna em restrição proteica (artigo I) ou desnutrição (artigo II), a expressão e localização dos receptores AT1 e AT2, e de suas vias de sinalização, no ventrículo esquerdo de ratos adultos. Paralelamente, investigamos a possível hipertrofia ventricular esquerda em machos adultos, além dos valores pressóricos da 6ª à 16ª semanas de vida.

O presente estudo demonstrou que a desnutrição materna tem efeitos mais severos quando comparada à restrição proteica no que diz respeito à perda de peso da prole no nascimento e à elevação da pressão arterial. Tanto a restrição proteica quanto a desnutrição materna durante o período gestacional leva à elevação da pressão arterial, na prole de machos em idade adulta, e modificações significativas na expressão dos receptores de ANG II e nas suas vias de sinalização. No modelo de restrição proteica sugerimos a participação da transativação de vias de crescimento pelo receptor AT1 culminando em aumento da expressão de ERK, já que a expressão de AT2 não foi alterada. Já no modelo de desnutrição, além desta transativação sugerida no outro modelo, hipotetizamos que haja a participação do receptor AT2, altamente expresso, causando hipertrofia constitutiva nos cardiomiócitos por uma via independente de ERK 1/2.

ABSTRACT

Maternal protein restriction may lead to reduced cardiomyocyte offspring, which can be considered an important factor to cardiovascular diseases in adulthood. In the heart, all the renin-angiotensin system (RAS) compounds, including angiotensin II (ANG II) and its receptors – AT1 and AT2 – are expressed. This study investigated comparatively, varying only maternal diet in protein restriction (paper I) or undernutrition (paper II), expression and localization of AT1 and AT2 receptors, and their signaling pathways, in heart's left ventricle in male adult rats. As additional results, we also investigated heart's left ventricle hypertrophy in male offspring, besides systolic blood pressure (SBP) values from 6th to 16th week of age.

The present study demonstrated that maternal undernutrition presents more severe effects when compared to protein restriction when we associate offspring birth weight and enhanced SBP in both models. Protein restriction and undernutrition *in utero* lead to higher levels of SBP in male offspring, and also to significant changes in ANG II receptors and their signaling pathways. In protein-restricted animals, we suggest the participation of growth pathways transactivation via AT1R, leading to enhanced ERK expression, since AT2 expression doesn't seem to be altered. The undernutrition model, for instance, seem to present the same transactivation pattern suggested by protein-restriction, associated to enhanced AT2R expression, and our hypothesis is that AT2 is related to constitutive hypertrophy in cardiomyocytes by an ERK 1/2-independent pathway.

LISTA DE ABREVIÇÕES

11 β -HSD – 11- β - hidroxisteróide desidrogenase

11 β -HSD1 – 11- β - hidroxisteróide desidrogenase tipo 1

11 β -HSD2 – 11- β -hidroxisteróide desidrogenase tipo 2

ACE – angiotensin converting enzyme

AGD – ano-genital distance

Akt/PKB – protein kinases B or Akt

AMPC – adenosina monofosfato cíclica

ANG II – angiotensin II

ASK1 - apoptosis signal regulating kinase 1

AT1/AT1R – angiotensin type I receptor

AT2/AT2R – angiotensin type II receptor

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (Centro de Bioterismo da UNICAMP)

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DAB – diaminobenzidine tetrahydrochloride

DNA – ácido desoxirribonucléico

DOHaD – Developmental Origins of Health and Disease

DTT - dithiothreitol

ECA – enzima conversora de angiotensina

ECM – extracellular matrix

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR – epidermal growth factor receptor

ERK1 – extracellular signal-regulated kinase 1

ERK2 - extracellular signal-regulated kinase 1

FR50 – 50% food-restriction

GC - glucocorticoids

GR – glucocorticoids receptor

HPA – hipotálamo-pituitária-adrenal

IMC – índice de massa corpórea

IRS – insulin receptor subunit

IRS-1 – insulin receptor subunit type 1

JAK2 – Janus kinase 2

JNK – c-JUN NH(2)-terminal kinase

LP – low protein

MAPK – mitogen-activated protein kinase

MCR – mineralocorticoids receptors

MEC – matriz extracelular

MMP – metaloproteinase

MR - mineralocorticoids

NF – normal food

NP – normal protein

PHAS-1 – inhibitor of eukaryotic initiation factor 4E

Pepck/Pck1- phosphoenolpyruvate carboxykinase 1

p-ERK – phosphorylated Tyr 204 of ERK 1 (identical to corresponding ERK2 sequence)

PI3K – phosphoinositide 3-kinase

p-JNK-1 – phosphorylated Thr 183 and Tyr 185 of JNK 1

p-JNK-2 – phosphorylated Thr 183 and Tyr 185 of JNK 2

PLC – phospholipase C

PKC – protein kinase C

PSMF - phenylmethylsulfonyl fluoride

RAS – renin-angiotensin system

STAT3 – signal transducers and activator of transcription 3

SBP – systolic blood pressure

SDS-PAGE - sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SRA – sistema renina-angiotensina

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

TGF-β1 – transforming growth factor beta 1

TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinases

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 – Representação esquemática da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos p. 21

Figura 2 – Representação esquemática de mudanças nas fibras colágenas na doença cardíaca hipertensiva (HHD) p. 22

Figura 3 – Representação esquemática das vias de sinalização relacionadas a ANG II p. 39

RESULTADOS

Figuras e tabelas organizadas conforme artigos.

DISCUSSÃO

Tabela 1 p. 98

ANEXOS

Fluxograma experimental p. 120

Gráfico Distância Ano-Genital p. 121

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
Hipertrofia ventricular cardíaca	20
Programação fetal e alterações cardíacas	24
Injúrias e estímulos da programação fetal	26
Glicocorticóides e programação fetal.....	28
Manipulação da dieta materna	31
Principais mecanismos do estado hipertensivo	35
O sistema renina-angiotensina.....	37
Justificativa.....	41
OBJETIVOS	43
Objetivos Gerais.....	44
Objetivos Específicos	44
RESULTADOS	45
Artigo I	45
Artigo II	71
DISCUSSÃO.....	93
CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
ANEXOS.....	119

INTRODUÇÃO

Alterações na nutrição do feto e no seu estado endógeno resultam no desenvolvimento de adaptações que modificam permanentemente sua estrutura fisiológica e metabólica, predispondo-o assim a doenças metabólicas, endócrinas e cardiovasculares na vida adulta (BARKER, 1998). Animais submetidos à desnutrição em períodos críticos do desenvolvimento apresentam redução do crescimento dos órgãos e modificações permanentes em seu metabolismo e/ou estrutura (GLUCKMAN e HANSON, 2004; DESAI e HALES, 1997; DESAI *et al.*, 1996).

A plasticidade fetal permite sua adaptação a condições adversas nutricionais maternas reduzindo o crescimento e desenvolvimento da prole (DESAI *et al.*, 1996; WIDDOWSON e MCCANCE, 1975; WINICK e NOBLE, 1966). Essas alterações podem ter efeitos benéficos em curto prazo, embora acarretem prejuízos à saúde pós-reprodutiva (BARKER, 1998). Evidências clínicas e experimentais associam o retardo no crescimento intra-uterino à maior ocorrência de doenças cardiovasculares, hipertensão e obesidade na idade adulta (BARKER *et al.*, 1993; HANSON, 2002; DESAI e HALES, 1997).

O uso de modelos animais aumentou o entendimento das relações entre o ambiente materno deficiente e a saúde da prole ao longo da vida. A natureza dos estudos em animais foca tipicamente na alteração de aspectos específicos da nutrição materna (redução do conteúdo proteico, restrição alimentar global ou menor consumo de calorias) durante períodos críticos do desenvolvimento (início do desenvolvimento, períodos de organogênese, crescimento fetal) e os

resultados destas alterações na saúde e fisiologia da prole (WATKINS e FLEMING, 2009).

Em resposta a essas descobertas, tanto em estudos com humanos quanto com animais, foi criada uma sociedade científica, denominada DOHaD (*Developmental Origins of Health and Disease* – Origens do Desenvolvimento da Saúde e Doença) que investiga a hipótese de que o feto pode adaptar seu próprio desenvolvimento em resposta direta ao ambiente uterino, mediado por fatores como nutrição e fisiologia maternas (GLUCKMAN e HANSON, 2004; McMILEEN e ROBINSON, 2005; HANSON e GLUCKMAN, 2008). A resposta à dieta materna permite que o feto faça ajustes em seu crescimento e metabolismo, de forma que suas propriedades e seu tamanho sejam compatíveis com a disponibilidade pós-natal de nutrientes sugerida pelo ambiente uterino. No entanto, as adaptações desenvolvidas sob condições de desnutrição materna podem se tornar maléficas caso o ambiente pós-natal seja provido de abundância relativa de nutrientes. Nessas condições, existe uma discordância entre a ingestão de nutrientes, o processo de homeostase e a regulação do consumo de energia, levando ao risco aumentado de doenças cardiovasculares e metabólicas (GLUCKMAN e HANSON, 2004; McMILEEN e ROBINSON, 2005; HANSON e GLUCKMAN, 2008).

Diversos estudos foram conduzidos no intuito de demonstrar os efeitos deletérios da falta de nutrientes durante a gestação. Estudos epidemiológicos em populações distintas demonstram associação entre baixo peso ao nascer e desenvolvimento subsequente de hipertensão, resistência à insulina, diabetes

tipo 2 e doenças cardiovasculares (BARKER, 1998). Essa associação parece ser independente de fatores de risco ligados ao estilo de vida, tais como consumo de cigarros e/ou álcool, peso, classe social e sedentarismo – hábitos de efeito aditivo secundário (BARKER *et al.*, 1993). Estudo recente verificou que a prole de ratas submetidas à desnutrição gestacional apresentou alterações permanentes no crescimento relativo dos rins e do coração, podendo aumentar os riscos de desenvolverem doenças na idade adulta (DESAI *et al.*, 2005). Uma série de resultados em humanos associa o baixo peso ao nascer ao conseqüente aumento do risco de morte por complicações cardiovasculares (RICH-EDWARDS *et al.*, 1997; BARKER *et al.*, 1989). Adicionalmente, estudos sugerem que o rápido ganho de peso pós-natal pode predizer riscos de doenças cardiovasculares na vida adulta (BARKER *et al.*, 1993; ERIKSSON *et al.*, 1999; LAW *et al.*, 1993). Esses resultados refletem não apenas o aumento dos fatores de risco cardiovascular, mas as conseqüências da programação primária cardíaca.

Hipertrofia ventricular cardíaca

A hipertrofia ventricular cardíaca é um processo de remodelação primária que ocorre no miocárdio em resposta a sobrecarga pressórica (WEBER *et al.*, 1987; JANICKI *et al.*, 2004; FUNCK *et al.*, 1997). Alguns eventos estruturais deste remodelamento envolvem alterações na estrutura e composição da matriz extracelular (MEC) (WEBER *et al.*, 1987; JANICKI *et al.*, 2004; FUNCK *et al.*, 1997). A MEC é um arcabouço proteico, constituído

principalmente por colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, fatores de crescimento e enzimas que coletivamente modulam a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. Alterações na arquitetura normal do miocárdio, induzidas pela hipertrofia ventricular cardíaca, principalmente com aumento na deposição de colágeno na MEC, podem levar à desorganização dos cardiomiócitos, dificultando a transmissão das forças de contração ao longo do miocárdio (de SIMONE e DE DIVITIIS, 2002).

Na doença cardíaca hipertensiva ocorrem modificações no ambiente hormonal e celular que levam a alterações no *turnover* de elementos da MEC e, conseqüentemente, a um estado pró-fibrótico. Berk *et al.* (2007) propõem um modelo para o desenvolvimento da doença cardíaca hipertensiva cuja gênese envolve a transdiferenciação de fibroblastos cardíacos em miofibroblastos (Fig. 1). A ativação de miofibroblastos promove aumento na síntese dos componentes da MEC e de enzimas que participam da remodelação estromal. Tais alterações

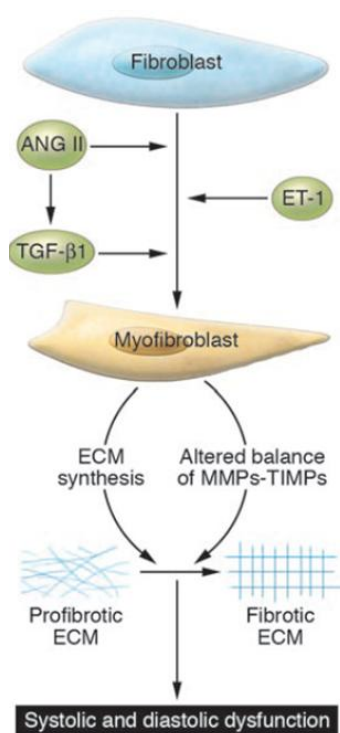


Fig. 1 – representação esquemática da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. Retirado de Berk et al, 2007.

acarretam mudança nos sinais recebidos pelos cardiomiócitos de seu microambiente, o que induz a expressão de genes associados à hipertrofia e disfunção contrátil. Finalmente, a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e aumento nos níveis de TGF-β1 ativo levam ao recrutamento de células musculares lisas, monócitos e fibroblastos, estimulando uma

programação gênica de reparo tecidual com deposição e conseqüente fibrose perivascular e amplificação do estado pró-fibrótico (Fig. 2).

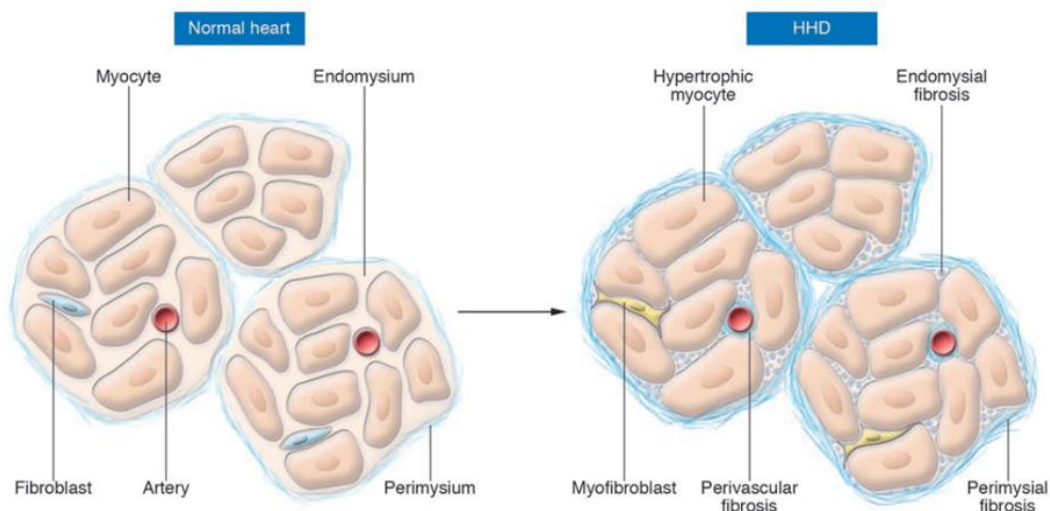


Fig. 2 – Representação esquemática de mudanças nas fibras colágenas na doença cardíaca hipertensiva (HHD). Retirado de Berk et al, 2007.

Apesar da sobrecarga no ventrículo esquerdo ser apontada como o principal fator responsável pela remodelação tecidual durante a hipertensão sistêmica (KANNEL *et al.*, 1987), os determinantes moleculares desse processo são desconhecidos. Uma via importante de alterações na estrutura e composição da MEC é a ativação de uma família de proteases conhecidas como metaloproteinases (MMPs) (JANICKI *et al.*, 2004).

As MMPs desempenham importante papel para a manutenção da homeostase tecidual. São responsáveis, por exemplo, pela erupção dental, implantação do embrião, involução da mama e reabsorção óssea. Entretanto, níveis elevados de expressão das MMPs estão correlacionados a diversas patologias em que a degradação ou remodelação da MEC são eventos críticos,

tais como invasão tumoral e doença cardíaca hipertensiva (Murray, 2001; Berk *et al.*, 2007).

Todas as MMPs são sintetizadas na forma de um precursor latente, que necessita sofrer um processamento proteolítico (remoção do pró-peptídeo) para se tornar ativo. Adicionalmente, a atividade catalítica das MMPs é regulada por uma família de quatro glicoproteínas conhecidas como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs - 1 a 4) (CHIRCO *et al.*, 2006). A ativação e a inibição das MMPs são eventos moleculares complexos e dependentes da interação entre as MMPs e os TIMPs. Estudos *in vitro* demonstram que alterações nos padrões de tensão e pressão podem induzir modificações no padrão de expressão e atividade das MMPs e TIMPs na MEC (ASANUMA *et al.*, 2003).

Outro fator envolvido na síntese de MEC é a angiotensina II. Mehta e Griendling (2007) sugerem a existência de três vias de sinalização rápidas ativadas pela angiotensina II. Essas vias levam ao aumento na expressão de genes que codificam componentes da MEC.

A angiotensina II exerce seu efeito diretamente via ativação do receptor AT1 e/ou indiretamente pela indução de TGF- β 1 (WEBER *et al.*, 1999). A ativação do receptor de angiotensina II ocorre com a hipertensão arterial e influencia na síntese de MEC. Além disso, a ativação de AT1 regula a síntese e secreção de MMPs da MEC. No entanto, são necessários estudos adicionais em tecidos e órgãos para avaliar se essa alteração está envolvida na

remodelação cardíaca, gênese e manutenção da hipertensão arterial ou se é consequência da sobrecarga no modelo.

Diversos estudos indicam que, quando o coração está sofrendo hipertrofia, os receptores de angiotensina II, particularmente AT1, têm sua expressão aumentada no tecido cardíaco de ratos durante o período neonatal. Tanto o RNAm quanto o número de sítios de ligação para angiotensina II são elevados de duas a quatro vezes em relação ao número encontrado em um adulto normal (MIYATA e HANEDA, 1994; WANG *et al.* 2004; BAKER *et al.* 2004).

Programação fetal e alterações cardíacas

Conforme descrito anteriormente, a hipótese de “programação fetal” foi proposta como o mecanismo de associação entre o baixo peso ao nascer, o crescimento infantil e as doenças subseqüentes. Essa hipótese descreve o processo pelo qual um estímulo ou injúria durante períodos críticos do crescimento e desenvolvimento podem alterar permanentemente estruturas e funções teciduais (LUCAS, 1991). Programação fetal, portanto, é o processo pelo qual o ambiente encontrado antes do nascimento ou na infância molda o controle, em longo prazo, da fisiologia dos tecidos e da homeostase corporal (LANGLEY-EVANS, 2004).

Essa programação fetal determina o perfil da saúde e as doenças que irão acometer um indivíduo ao longo de sua vida. As primeiras evidências de programação datam de 1964, quando Rose notou alto risco de isquemia

cardíaca em indivíduos cujos irmãos foram abortados ou morreram na infância. Fordshal, em 1967 percebeu que regiões da Noruega com alto nível de mortalidade infantil apresentavam também índices elevados de morte por doenças cardiovasculares. A década de 1980 é rica em estudos associando mortalidade cardiovascular e eventos ocorridos na primeira fase da infância. No entanto, o termo foi usado pela primeira vez em 1991, por Alan Lucas, que define programação como “a resposta permanente de um organismo a um estímulo ou insulto durante um período crítico do desenvolvimento”.

Em 1973, Anders Forsdahl sugeriu que o ambiente fetal poderia ser considerado um fator-chave para a etiologia de doenças cardiovasculares na vida adulta. Seus estudos indicam que condições sociais precárias atuam como um estímulo adverso durante a infância e a adolescência, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (FORSDAHL, 2002). Antes disso, a observação da relação inversa entre peso ao nascer e doenças coronarianas levou Barker a interpretar o ambiente fetal como um novo componente na etiologia das doenças cardiovasculares (BARKER *et al.*, 1989). De acordo com sua hipótese, determinadas doenças na idade adulta desenvolvem-se como resposta ao desequilíbrio entre as demandas fetais e a disponibilidade de nutrientes na gestação (BARKER *et al.*, 1988). As alterações moleculares e fisiológicas resultantes desse desequilíbrio nutricional permitem a sobrevivência da prole, embora seus efeitos, em longo prazo, promovam alterações na estrutura cardiovascular, renal, respiratória, endócrina e nos componentes do sistema nervoso central (BARKER *et al.*, 1995; FOWDEN *et al.*, 2006).

Injúrias e estímulos da programação fetal

Em 2002, Huxley *et al.* sugeriram que fatores adversos durante a vida fetal ou na primeira fase da infância podem predispor ou programar o indivíduo a sofrer algumas doenças específicas na idade adulta (LANGLEY-EVANS, 2004). Evidências sugerem que fisiopatologias no adulto podem ser induzidas pela manipulação do ambiente fetal (BARKER, 1998; NYIRENDA *et al.*, 1998) e ainda comprovam que, quando um feto ou neonato é exposto a um ambiente não usual durante rápida fase de crescimento, os resultados das respostas adaptativas podem se tornar fixos. Ratas prenhes alimentadas com dieta de baixa proteína, por exemplo, originam prole com pressão arterial elevada ao longo da vida (LANGLEY-EVANS *et al.*, 1996a), além de balanço alterado entre a produção de glicose hepática e sua utilização (DESAI *et al.*, 1996).

Outros efeitos notáveis em longo prazo, provenientes de alterações na nutrição materna, incluem mudanças no metabolismo do colesterol, na secreção de insulina e no desenvolvimento renal (BARKER, 1998). Estudos apontam ainda que as implicações da manipulação do ambiente fetal podem não estar limitadas à primeira geração, prolongando os efeitos da programação pelas gerações subseqüentes (DRAKE e WALKER, 2004).

No entanto, nem todos os órgãos apresentam o mesmo período crítico em relação à fisiologia e risco de doenças. Embora o primórdio de todas as estruturas internas e externas ocorra no período embrionário, em alguns órgãos (coração, cérebro e fígado, por exemplo), o período crítico ocorre durante a fase fetal, etapa na qual serão diferenciados em sistemas. Além do

período de desenvolvimento, a duração da exposição a condições adversas também é importante. Fetos que sofreram desnutrição durante o desenvolvimento fetal apresentam tendência a doenças cardíacas e retardo mental, porém rins e pulmões não são afetados. No entanto, se essa falta de alimento ocorrer durante a fase final da gestação, a prole apresenta predisposição a doenças renais e pode ou não ter órgãos comprometidos (LANGLEY-EVANS, 2004). Entretanto, estudos realizados em nosso laboratório por Mesquita *et al.* (dados não publicados) demonstram que a restrição proteica nos primeiros 14 dias de gestação já determinam a formação de cerca de 30% a menos de néfrons.

A hipótese de que o baixo peso ao nascer e sua associação com o número reduzido de néfrons poderia aumentar o risco de hipertensão e doenças renais crônicas no adulto foi primeiramente proposta por Brenner e Chertow (1994). Estudos com autópsias de crianças com crescimento intra-uterino retardado demonstrou associação com o número reduzido de néfrons (HINDCHCLIFFE *et al.*, 1991, 1992), embora em várias espécies a desnutrição materna ou insuficiência placentária não puderam ser experimentalmente relacionadas com esse tipo de alteração renal (JONES *et al.*, 2001; WOODS *et al.*, 2005; BAUER *et al.*, 2002; GILBERT *et al.*, 2005), apesar da ocorrência de aumento nos valores pressóricos (WOODS *et al.*, 2005; GILBERT *et al.*, 2005). No entanto, muitos estudos demonstram aumento dos valores de pressão arterial na ausência de modificações significativas no número de glomérulos (ORTIZ *et al.*, 2003; PLADYS *et al.*, 2005; WOODS *et al.*, 2005). Embora não tenham encontrado alterações no número de glomérulos em resposta à

restrição proteica durante o período pré-implante, Watkins *et al.* (2008b) observaram tamanho reduzido dos rins e aumento do número de glomérulos em fêmeas submetidas à restrição proteica durante a fase de maturação do ovócito, além de hipertensão relativa. Como os rins se desenvolvem mais tardiamente no período gestacional, e o desafio nutricional periconceitual na verdade precede o início do desenvolvimento, o aumento no número de glomérulos pode ser considerado uma resposta compensatória contra as adversidades da programação, embora os mecanismos desta resposta ainda não sejam conhecidos (WATKINS e FLEMMING, 2009).

Glicocorticóides e programação fetal

Embora alguns efeitos nutricionais sejam consequência direta da alteração na disponibilidade de substrato, parte desses resultados se deve à mediação hormonal, que pode alterar o desenvolvimento de tecidos fetais específicos em períodos críticos do desenvolvimento, levar a mudanças permanentes na secreção hormonal ou à sensibilidade tecidual a hormônios (BARKER, 1998). Um exemplo é a ação de andrógenos, que no período neonatal programam a expressão de enzimas esteróides de metabolização hepática, o desenvolvimento de dimorfismo sexual de estruturas cerebrais e o comportamento sexual (ARAI e GORSKI, 1968; GUSTAFSSON e STENBERG, 1974). Esses efeitos podem ser exercidos apenas durante um período perinatal específico, mas ainda assim persistirem a vida toda, independente de qualquer manipulação subsequente de esteróides sexuais.

Glicocorticóides fisiológicos (cortisol em humanos, corticosterona em ratos e camundongos) são sintetizados no córtex da adrenal. Muitas características da exposição excessiva a glicocorticóides sugerem possível papel da programação infantil em desordens metabólicas e cardiovasculares. Glicocorticóides exógenos retardam o crescimento fetal em humanos e animais, incluindo primatas (REINISCH *et al.*, 1978; NOVY e WALSH, 1983; MOSIER *et al.*, 1982; BERRY *et al.*, 1997). Em humanos, níveis de cortisol fetal são aumentados no retardo do crescimento intra-uterino, tanto idiopático quanto causado por pré-eclampsia (GOLAND *et al.*, 1993; 1995).

Glicocorticóides pré-natais alteram a taxa de maturação de vários órgãos, como coração, rins e intestino (SECKEL *et al.*, 2000). Alguns efeitos são temporários, enquanto outros persistem ao longo da vida. Glicocorticóides pré-natais ou estresse programam efeitos específicos no cérebro, notavelmente no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e no sistema motor dopaminérgico (MEANEY *et al.*, 1989; HENRY *et al.*, 1994; DIAZ *et al.*, 1997; WEINSTOCK *et al.*, 1992). Glicocorticóides também programam o sistema imune (REDEI, 1993) e os rins (CELSI *et al.*, 1998). Os receptores de glicocorticóides são altamente expressos em quase todos – senão todos – os tecidos fetais a partir do meio da gestação ou mais cedo (DIAZ *et al.*, 1998; COLE *et al.*, 1995), assim como na placenta e nas membranas fetais.

Os glicocorticóides aumentam a pressão arterial e os níveis de glicose no sangue em adultos (TONOLO *et al.*, 1988). O cortisol ainda eleva a pressão arterial fetal quando injetado diretamente no útero de ovelhas (TANGALAKIS *et*

al., 1992) e no momento do nascimento em humanos e ovelhas (BERRY *et al.*, 1997; KARI *et al.*, 1994). A exposição pré-natal a glicocorticóides eleva crucialmente a pressão arterial da prole quando adulta. O tratamento de ratas prenhes com baixas doses de dexametasona, um glicocorticóide sintético usado na prática da obstetrícia, reduz o peso ao nascer e eleva a pressão arterial sanguínea na prole adulta (BENEDIKTSSON *et al.*, 1993). Mesmo exposições curtas a glicocorticóides no último período de gestação aumentam a pressão arterial em ratos adultos (LEVITT *et al.*, 1996). A administração de dexametasona no último período da gestação também “programa” permanentemente hiperglicemia e, particularmente, hiperinsulinemia na prole (NYIRENDA *et al.*, 1998). Em contraste, exposição pré-natal ou pós-natal precoce à dexametasona, enquanto reduz o crescimento fetal ou infantil, não promove efeitos persistentes na homeostase da glicose durante a vida adulta.

Embora glicocorticóides sejam em sua maioria lipofílicos e rapidamente atravessem a placenta, normalmente o feto tem níveis muito menores de glicocorticóides fisiológicos do que sua progenitora (BEITENS *et al.*, 1973; CAMPBELL e MURPHY, 1977). Essa diferença é garantida pela enzima 11- β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2), que catalisa o rápido metabolismo do cortisol e da corticosterona para inativá-las nas formas 11-keto (cortisona e 11-desidroxicorticosterona, respectivamente) (MURPHY *et al.*, 1974; LOPEZ-BERNAL *et al.*, 1980). Essa barreira enzimática placentária garante que a maioria, mas nem todos (BENEDIKTSSON *et al.*, 1997) os glicocorticóides maternos sejam inativados, de forma que o cortisol fetal

circulante seja, em teoria, apenas aquele derivado das adrenais do feto. No entanto, a eficiência da 11 β -HSD2 placentária varia consideravelmente tanto em humanos quanto em ratos (BENEDIKTSSON *et al.*, 1993; STEWART *et al.*, 1995). Sugere-se que a deficiência relativa de 11 β -HSD2 placentária, permitindo o acesso do feto aos glicocorticóides maternos, promove retardo no crescimento da prole, uma possível resposta de programação relacionada a doenças posteriores (EDWARDS *et al.*, 2005). De fato, em ratos, menor atividade da 11 β -HSD2 placentária e presumivelmente maior exposição fetal a glicocorticóides resultam em fetos menores com placentas maiores. Associação similar entre peso ao nascer e 11 β -HSD2 placentária foi realizada em humanos (STEWART *et al.*, 1995), embora nem todos os estudos tenham confirmado essa observação (ROGERSON *et al.*, 1997). No entanto, mutações deletérias do gene da 11 β -HSD2 em humanos estão associadas com baixo peso ao nascer (DAVE-SHARMA *et al.*, 1998). Além disso, marcadores bioquímicos de exposição fetal a glicocorticóides estão relacionados com a função da 11 β -HSD2 placentária próximo ao nascimento (BENEDIKTSSON *et al.*, 1995). Estudos com a 11 β -HSD carboxolona em ratas prenhes mostrou efeitos similares aos da dexametasona, com reduzido peso ao nascer, hipertensão e hiperglicemia na prole adulta (LINDSAY *et al.*, 1996a; 1996b). Esses efeitos da carboxolona são aparentemente independentes de mudanças na pressão arterial ou eletrólitos maternos, mas requisitam glicocorticóides maternos (os efeitos não foram vistos na prole de fêmeas adrenalectomizadas submetidas ao tratamento com carboxolona). De forma intrigante, a restrição

proteica durante a gestação atenua seletivamente a 11 β -HSD2, mas não outras enzimas da placenta (LANGLEY-EVANS *et al.*, 1996b), e promove hipertensão e hiperglicemia, entre outros efeitos. Assim, exposição a glicocorticóides parece ser parte integrante de uma série de mecanismos comuns ligando os fatores ambientais maternos ao crescimento e programação.

Manipulação da dieta materna

Análises históricas de dados obtidos de mulheres que ficaram grávidas durante a Fome Holandesa, período de cinco meses durante o inverno de 1944-45 em Amsterdã, demonstram que filhos de mulheres submetidas à escassez de alimentos durante o período embrionário e/ou início do desenvolvimento fetal mostravam níveis aumentados de doenças coronarianas, maior índice de massa corpórea e intolerância à glicose (RAVELLI *et al.*, 1999; PAINTER *et al.*, 2006; DE ROOIJ *et al.*, 2006). Interessante notar que filhos de mulheres que ficaram grávidas antes do período de escassez e foram submetidas à desnutrição apenas nos estágios finais da gestação apresentaram baixo peso ao nascer, porém se tornaram obesos quando adultos (RAVELLI *et al.*, 1999; McMILLEN e ROBINSON, 2005). Esses dados sugerem que períodos diferentes da gestação parecem ter sensibilidade diferenciada aos efeitos da desnutrição materna, considerando a natureza das modificações na saúde e fenótipo induzidos na prole (WATKINS e FLEMING, 2009).

O emprego de modelos animais permitiu o estudo do desenvolvimento fetal e pós-natal em resposta à manipulação precisa e controlada da dieta materna. Além dos constituintes da dieta, o uso de modelos de roedores e ovelhas permitiu restringir a desnutrição materna a períodos específicos do desenvolvimento embrionário e/ou fetal. Langley-Evans *et al.* (1996a) demonstraram que períodos diferentes da gestação originam diferentes severidades no estabelecimento da hipertensão em ratos submetidos à restrição proteica gestacional. A dieta de reduzida porcentagem proteica, quando administrada em discretos períodos de sete dias, ou ao longo de toda a gestação, resultou em hipertensão arterial na prole. No entanto, a magnitude da hipertensão foi maior nos animais em que a dieta de baixa proteína foi oferecida durante os últimos sete dias de gestação ou durante a gestação inteira (LANGLEY-EVANS *et al.*, 1996a).

Em diversos estudos, a restrição proteica gestacional, quando ocorre exclusivamente durante o estágio de pré-implantação, demonstra alteração no número de células do blastocisto, aumento da expressão de 11 β -HSD tipo 1 e do fosfoenolpiruvato carboxiquinase (*Pepck*, *Pck1*) – genes envolvidos na ativação de glicocorticóides no fígado do feto e na gliconeogênese, respectivamente, e que afetam o crescimento fetal e pós-natal, induzem hipertensão na prole quando adulta, além de aumentar os padrões de comportamento de ansiedade nos testes de campo aberto e o tamanho relativo dos órgãos (KWONG *et al.*, 2000, 2006, 2007; WATKINS *et al.*, 2008a). Em ovelhas, a desnutrição materna do primeiro ao 30/31º dia de gestação aumenta

os níveis de cortisol circulante no plasma na prole do sexo feminino e altera a função cardiovascular dos filhotes ao atingirem um ano de idade (GARDNER *et al.*, 2004, 2006), enquanto na prole adulta, há aumento da parede do septo interventricular e aumento médio da parede ventricular esquerda (CLEAL *et al.*, 2007). Deficiência materna de vitamina B e metionina durante o período periconceitual em ovelhas também induz uma prole com valores aumentados de peso e gordura corpórea associados à hipertensão, com evidências de mudanças epigenéticas associadas ao perfil de metilação do DNA de muitos genes (SINCLAIR e SINGH, 2007).

Dados de estudos com animais e humanos também relevaram a significância da dinâmica de crescimento do início do período pós-natal na saúde e fisiologia do adulto. Em humanos, crianças que nasceram e permaneceram menores até o primeiro ano de idade e, a partir de então, apresentaram rápido ganho de peso e índice de massa corpórea (IMC), mas não aumentaram a estatura, apresentaram maior prevalência de doenças coronarianas quando adultos, se comparados a adultos com valores médios de peso ao nascer (ERIKSSON *et al.*, 1999, 2001). Em camundongos, a prole de mães alimentadas exclusivamente com dieta de baixa taxa proteica durante o período pré-implantacional difere significativamente nas associações entre peso ao nascer e pressão arterial em relação ao grupo controle (WATKINS *et al.*, 2008a). Animais que eram menores até a terceira semana de vida desenvolveram pressão arterial elevada quando adultos, sendo que valores semelhantes foram encontrados também nos animais do grupo controle que apresentaram menor peso ao nascer. No entanto, o grupo submetido à

restrição proteica pré-implantacional apresentou associações positivas, como aumento do crescimento perinatal associado a maiores índices de pressão arterial na vida adulta, destacando-se o risco cardiovascular derivado do crescimento e ganho de peso excessivo nos períodos peri e pós-natal.

Não apenas os primeiros estágios de desenvolvimento parecem ser sensíveis aos efeitos da programação promovida pela desnutrição materna, mas também os desafios alimentares durante o período de maturação do ovócito podem resultar em modificações na saúde cardiovascular da prole. Em camundongos, dieta de baixa taxa proteica administrada apenas durante o período de maturação do ovócito resulta no desenvolvimento de prole adulta hipertensa (WATKINS *et al.*, 2008b). Em ovelhas, a desnutrição materna durante o período pré-concepção (entre 45 dias antes do nascimento até sete dias após) altera a dinâmica de crescimento materna, placentária e fetal, aumenta a pressão arterial fetal e potencializa a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (EDWARDS e McMILLEN, 2002a, 2002b; EDWARDS *et al.*, 2005; McMILLEN *et al.*, 2008).

Principais mecanismos do estado hipertensivo

As vias e mecanismos causais subjacentes ao estado hipertensivo e associados a doenças cardiovasculares em resposta ao desenvolvimento da programação parecem ser complexos e numerosos, sendo descritos por Langley-Evans (2001), Brawley *et al.* (2003a) e McMillen e Robinson (2005).

A disfunção periférica vascular é um dos mecanismos envolvidos. Por estar associada com, e geralmente anteceder, o desenvolvimento da hipertensão (BRAWLEY *et al.*, 2003a), é essencial que se compreenda o papel das respostas vasculares e endoteliais e a função do músculo liso na regulação homeostática da pressão arterial. A prole de mães submetidas à restrição alimentar mostrou aumento significativo nos valores de pressão arterial (LANGLEY-EVANS *et al.*, 1996a; KWONG *et al.*, 2000; TORRENS *et al.*, 2003, 2006; WATKINS *et al.*, 2008b) e, como resultado, numerosos estudos têm examinado a produção e a resposta de diversos componentes vasoativos. Artérias mesentéricas isoladas de camundongos machos expostos à restrição proteica intra-uterina exclusivamente durante o período de pré-implantação, ou durante toda a gestação, apresentam respostas atenuadas do agonista β -adrenorreceptor – isoprenalina – e do doador de óxido nítrico – nitroprussiato de sódio (WATKINS e FLEMING, 2009), sugerindo um defeito vascular na via de AMPc no músculo liso. Restrição proteica gestacional administrada exclusivamente durante a fase de maturação dos ovócitos resulta em resposta comprometida do vasodilatador endotelial acetilcolina e isoprenalina-dependentes, em artérias mesentéricas isoladas de machos (WATKINS *et al.*, 2008b). É importante notar que não foi observada diferença na vasoconstrição mediada pelo vasoagonista α -adrenérgico. Esses resultados corroboram os dados de estudos prévios com mães que receberam dieta reduzida em 50% durante a segunda metade da gravidez (HOLEMANS *et al.*, 1999) ou foram submetidas a restrição proteica ao longo de toda a gestação (BRAWLEY *et al.*,

2003b), e que não apresentaram diferença no vasoconstritor mediado pelo adrenorreceptor α_1 .

O sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina (SRA) desempenha um importante papel na regulação de processos fisiológicos do sistema cardiovascular, funcionando não apenas como um sistema endócrino, mas servindo localmente funções autócrinas e parácrinas em tecidos e órgãos. A primeira molécula efetora deste sistema, angiotensina II (ANG II), emergiu como um hormônio crítico, que afeta as funções de virtualmente todos os órgãos, incluindo coração, rins, sistema vascular e sistema nervoso, promovendo tanto efeitos benéficos quanto patológicos. A estimulação aguda da ANG II regula a homeostase dos líquidos corporais e a vasoconstrição, modulando a pressão arterial, enquanto a estimulação crônica promove hiperplasia e hipertrofia no músculo liso de células vasculares (GEISTEFER *et al.*, 1988; XI *et al.*, 1999). Exposição em longo prazo à angiotensina II também desempenha um papel essencial na hipertrofia e remodelação cardíacas, além de fibrose renal (MEHTA e GRIENGLING, 2007).

Os mecanismos que controlam a formação e degradação de angiotensina II são importantes na determinação de seu efeito fisiológico final. A ANG II é um octapeptídeo formado pela clivagem enzimática do angiotensinogênio em angiotensina I (ANG I) pela enzima renina, e subsequente conversão de ANG I em ANG II pela enzima conversora de

angiotensina (ECA), uma metalopeptidase identificada como principal componente do SRA (CORVOL *et al.*, 1995; COATES, 2003). Nguyen *et al.* (2002) mostraram recentemente que a ativação do receptor renina também aumenta a conversão de angiotensinogênio em ANG I, e apresenta como resultado a ativação das proteínas quinases mitógeno-ativadas (MAPKs); o subendotélio de artérias coronárias e renais apresentam altos níveis de RNAm de receptores de renina. O efeito específico dos níveis aumentados de ANG II e aumento da atividade do SRA em cada tecido dependem da expressão celular e ativação de AT1, um receptor crítico em fisiopatologias cardiovasculares e renais.

A maioria dos efeitos fisiológicos conhecidos da ANG II é mediada pelos receptores AT1, que estão largamente distribuídos em todos os órgãos. Uma vez que a ANG II se liga ao AT1R, ativa uma série de cascatas, que por sua vez regulam os vários efeitos fisiológicos da ANG II. Além de ativar vias clássicas mediadas pela proteína G, a ANG II também está envolvida com uma série de tirosina-quinases, via AT1R, incluindo receptores tirosina-quinase (EGFR, receptores de insulina e JAK, por exemplo). A via AT1 também ativa serinas/treoninas quinases como PKC e MAPK (incluindo ERK 1/2, p38MAPK e JNK), envolvidas no crescimento e hipertrofia celular (HUNYADY e CATT, 2006; SUZUKI *et al.*, 2005).

No entanto, embora a maioria dos efeitos vasoativos da ANG II ocorra via AT1R, os receptores AT2 parecem exercer efeito anti-proliferativo e anti-apoptótico nos vasos, e acredita-se que sua principal função seja de

antagonista de AT1. Tanto AT1 quanto AT2 se classificam como receptores de membrana sete passos, e apresentam 34% de similaridade. AT2R é altamente expresso nos tecidos fetais, e a queda na expressão pós-nascimento sugere que sejam receptores importantes no desenvolvimento fetal (SHANMUGAM *et al.*, 1996).

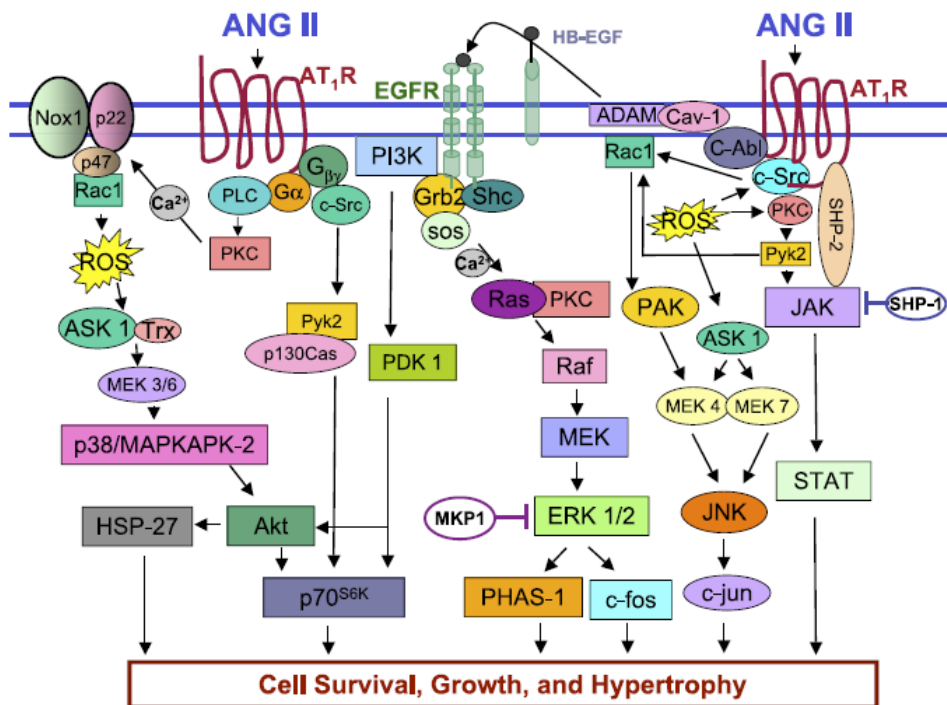


Fig. 3 – Representação esquemática das vias de sinalização relacionadas a ANG II. Retirado de Mehta e Griending, 2007.

Juntamente com a resposta cardiovascular, o SRA é sensível aos efeitos da programação no ambiente embrionário alterado.. Ao ligar-se com o receptor AT1, localizado nas células do músculo liso, rins, glândulas adrenais e encéfalo, a angiotensina II induz vasoconstrição, reabsorção de sódio e secreção de aldosterona e vasopressina (UNGER, 2002). A angiotensina II também está envolvida na disfunção endotelial por meio de sua habilidade de

aumentar o estresse oxidativo (MEHTA e GRIENGLING, 2007), embora a clivagem do vasodilatador bradicinina também contribua para o estabelecimento do estado hipertensivo (CORVOL *et al.*, 1995; COATES, 2003).

Camundongos desprovidos de ECA são hipotensos, com valores aproximadamente 30 mmHg menores em relação aos animais do grupo controle (ESTHER *et al.*, 1997; COLE *et al.*, 2000) enquanto, em humanos, os níveis séricos de ECA são significativamente maiores em sujeitos hipertensos (FORRESTER *et al.*, 1997). A atividade aumentada da ECA sérica e pulmonar foi observada em camundongos submetidos à restrição proteica gestacional exclusivamente durante o período de desenvolvimento pré-implantação ou durante toda a gestação (WATKINS e FLEMING, 2009). Atividade elevada da ECA também ocorre em camundongos e em culturas *in vitro*, em resposta a procedimentos de transferência de embriões (WATKINS *et al.*, 2007) e resposta *in vivo* à expressão de genes que contribuem para a sobrevivência do embrião (WATKINS *et al.*, 2006). O bloqueio do receptor AT1 com o agonista losartan (SHERMAN e LANGLEY-EVANS, 2000) ou o uso do inibidor da ECA captopril (LANGLEY-EVANS e JACKSON, 1995) reduzem significativamente a pressão arterial na prole de mães submetidas à restrição proteica gestacional. Em ovelhas, o aumento dos valores de pressão arterial em resposta ao estímulo do SRA por furosemida é observado na prole de mães submetidas à restrição nutricional no início da gestação (CLEAL *et al.*, 2007). Essa elevação na pressão arterial pode ser bloqueada pela administração prévia de captopril, indicando o papel do SRA no estado hipertensivo.

Justificativa

Evidências laboratoriais demonstram o período periconceitual como uma janela de sensibilidade aumentada para condições ambientais tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Essa sensibilidade torna emergente o conceito de que o embrião, mesmo antes da fase de implantação, responde a pistas maternas importantes na manutenção da regulação homeostática e fisiológica do metabolismo e a critérios de crescimento para a gestação. Watkins e Fleming (2009) sugerem que o sistema cardiovascular é particularmente vulnerável a adversidades da programação durante o período periconceitual. As respostas compensatórias de embriões identificadas em modelos animais também podem ocorrer em humanos, e podem ser a base de estudos epidemiológicos cujo foco seja tanto a origem quanto o desenvolvimento de doenças crônicas em adultos. Pesquisas posteriores são claramente necessárias, no sentido de identificar e compreender a extensão dos mecanismos que contribuem para a conexão entre o ambiente embrionário e a saúde do indivíduo adulto.

Modelos animais que mimetizam uma forte exposição do feto a glicocorticóides, como estresse maternal ou injeção de dexametasona durante a gestação, sugerem que a elevada concentração de esteróides pode ser a chave na programação fetal (SECKL e MEANEY, 2004). A produção excessiva de glicocorticóides é observada em grande número de patologias, como doenças metabólicas, cognitivas, imunológicas e inflamatórias, sugerindo que elas podem, pelo menos em parte, resultar da desnutrição materna e ter origem no desenvolvimento neurológico.

A exposição pré-natal a glicocorticóides altera o desenvolvimento de processos simpáticos e noradrenérgicos cardíacos (BIAN *et al.*, 1993), aumenta a reatividade da adenilato ciclase cardíaca (BIAN *et al.*, 1992) e altera alguns processos metabólicos cardíacos mediados pelo transportador 1 de glicose, AKT\PKB e receptores nucleares para ácidos graxos (LANGDOWN *et al.*, 2001a; 2001b). A exposição pré-natal a glicocorticóides aumenta a expressão da calreticulina no coração de adultos, proteína fortemente associada a disfunções cardíacas e morte (LANGDOWN *et al.*, 2003).

Experimentos realizados recentemente em nosso laboratório revelaram que ratos adultos cujas mães foram alimentadas com baixa concentração de proteína durante a gestação apresentam, na idade adulta, hipertensão arterial, redução do número de néfrons e alteração na expressão dos receptores AT1 e AT2 renais e adrenais.

Embora exista uma série de estudos experimentais relacionando a dieta gestacional alterada aos efeitos encontrados na prole durante a vida adulta, a comparação entre eles torna-se complicada devido à grande diferença metodológica entre os modelos, ou seja, diferentes períodos gestacionais, diferentes animais e diferença no tipo de dieta utilizada.

Além disso, sabendo-se que nestes modelos existe maior ativação do SRA, torna-se importante o estudo da expressão dos receptores de ANG II em órgãos-chave relacionados à gênese e/ou manutenção do estado hipertensivo.

OBJETIVOS

Objetivos Gerais

Neste trabalho, buscamos fazer uma análise comparativa entre modelos idênticos, variando apenas a dieta (restrição protéica e desnutrição gestacionais), na tentativa de elucidar seus efeitos no ventrículo esquerdo de ratos adultos.

Objetivos Específicos

Estudar comparativamente (anexo I)

- ↻ expressão e localização de receptores de angiotensina II e proteínas associadas com suas vias de sinalização;
- ↻ distribuição de colágeno na matriz extracelular;
- ↻ desenvolvimento da hipertensão arterial.

RESULTADOS

ARTIGO I

**DEVELOPMENTAL ORIGINS OF CARDIOVASCULAR DISEASE IN MATERNAL
PROTEIN-RESTRICTED RATS: EFFECT ON CARDIAC LEFT VENTRICLE
EXPRESSION OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM SIGNALING COMPOUNDS**

Marília Andreo¹, Flávia Fernandes Mesquita², Renan Brisolla da Silva¹,

José Antonio Rocha Gontijo² & Patrícia Aline Boer¹

¹Laboratório de Programação Fetal, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil e ²Disciplina de Medicina Interna, Laboratório de Metabolismo Hidro-salino, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Correspondence address:

Patrícia Aline Boer, BSC, PhD, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 18600-000 Botucatu, SP, Brazil

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

E-mail: alineboer@yahoo.com.br

ABSTRACT

Maternal protein restriction may lead to a reduction in the number of cardiomyocytes of the offspring and may be a risk factor for cardiovascular disorders in adulthood. In the heart all compounds of renin-angiotensin system (RAS), including angiotensin II and its receptors – AT1R and AT2R – are expressed. This study investigated if gestational protein restriction alters the expression and localization of AT1R and AT2R and its signaling pathway proteins (ERK1/2, PI3K, JAK2 and STAT3) in parallel with left ventricle hypertrophy and collagen distribution and systemic hypertension in male offspring. Dams were kept on normal (NP), or low (LP) protein diet over all pregnancy phase. Systolic blood pressure (SBP) of adults was measured from 6th to 16th week and then 16-wk-old rats had their left ventricle analyzed by immunoblotting and immunohistochemistry. LP offspring showed significant reduction in body weight and SBP increased significantly in LP since 6th week. Left ventricle mass and volume were also significantly higher in LP animals. Perivascular fibrosis widespread was not detected throughout the heart tissue. Analysis by immunoblotting confirmed by immunohistochemistry demonstrated a significantly enhance in cardiomyocyte expression of AT1R and ERK1 in LP offspring. Expression of PI3K in LP was significantly reduced in cardiomyocytes and intramural coronaries wall, instead of unchanged AT2R expression in LP group. Immunohistochemical analysis verified reduced LP expression of JAK2 and STAT3. Cardiomyocyte hypertrophy seems to happen early, and we may hypothesize a presumable AT1R transactivation as consequence of crosstalk between RAS and another growth factor pathway. These findings may contribute to elucidation of basic mechanisms of epidemiological studies and could indicate that maternal underfeeding associated with low birth weight offspring may result in increased risk of morbidity of cardiovascular diseases in adulthood.

Key words: Low weight; Arterial Hypertension; Protein Restriction; Angiotensin II; Hypertrophy Left Ventricle.

INTRODUCTION

Nutritional alterations and fetal endogen patterns lead to the development of physiological and metabolic changes, predisposing the individual to metabolic, endocrine and cardiovascular diseases in adult life [1]. Nutritional insults during embryonic and fetal periods can be associated to impaired maturation of physiological functions and cardiovascular diseases in adulthood. Alterations in nutrition and endocrine status during the embryonic, fetal and neonatal periods can trigger developmental predictive adaptive responses, causing permanent structural, physiological and metabolic changes, thereby predisposing and individual to cardiovascular, metabolic and endocrine diseases in adult life [2]. The rennin-angiotensin system (RAS) plays an important role in primary and secondary forms of hypertension. Components of the RAS, such as angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin II (termed the local cardiac RAS) are locally produced in the cardiac tissues [3], and are primary candidates for the factors promoting remodeling, mainly cardiac myocyte hypertrophy and increased extracellular fibrosis, thereby deteriorating cardiac functions [4]. Various experimental animal models have been developed to investigate the associations between fetal undernutrition and cardiovascular disease later in life [5, 6], and a possible commitment of a systemic RAS in the developmental origins of hypertension was reported [7]. The aim of this study was to investigate whether gestational protein restriction alters the expression and localization of AT1R and AT2R and RAS signaling pathway proteins (ERK1/2, PI3K, JAK2 and STAT3) in parallel with left ventricle hypertrophy and collagen distribution and systemic hypertension in 16- wk old male offspring.

MATERIALS AND METHODS

Animals - The experiments were conducted on age-matched, female offspring of sibling-mated Wistar Hannover rats (0,250-0,300 kg) allowed free access to water and normal rat chow. The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation. Our local colonies originated from a breeding stock supplied by CEMIB/Unicamp, Campinas, SP, Brazil. Immediately after weaning, at 3 weeks of age, animals were maintained under controlled temperature (25°C) and lighting conditions (0700h-1900h), with free access to tap water and standard rodent laboratory chow (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) and followed up to 12 weeks of age. After mating, the dams were maintained on isocaloric standard rodent laboratory (with normal protein content [NP] (17% protein) or low protein content [LP] (6% protein) chow *ad libitum* intake throughout the entire pregnancy. The day that sperm were detected in the vaginal smear was designated as day 1 of pregnancy. All groups returned to isocaloric standard chow intake after delivery. Food consumption was determined every day (subsequently normalized for body weight), and body weight was recorded once a week. The male pups were weighted, followed and maintained with normal chow until adulthood.

Blood Pressure Measurement - The systemic arterial pressure was measured in conscious 6, 8, 10, 12, 14 and 16-week-old rats (LP n=12 and NP n=12) by an indirect tail-cuff method using an electrospygmanometer (Narco Bio-Systems, Austin, TX) combined with a pneumatic pulse

transducer/amplifier. This indirect approach allowed repeated measurements with a close correlation (correlation coefficient = 0.975) compared to direct intra-arterial recording. The mean of three consecutive readings represented the blood pressure.

Tissue processing, histology and immunohistochemical procedures- Sixteen-week-old male rats from NP (n=5) and LP (n=5) groups were anesthetized with a mixture of ketamine (75 mg .kg⁻¹body weight, i.p.) and xylazine (10mg.kg⁻¹body weight, i.p.) and the level of anesthesia was controlled by monitoring the corneal reflex. The animals were perfused by the left carotid artery with saline containing heparin (5%) for 15 min under constant pressure. This procedure was followed by perfusion with 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) containing 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.1 mol/L (M) sucrose for 25 min. After perfusion, the cardiac left ventricles were removed and weighted, and representative samples were fixed in 4% phosphate-buffered formalin during 24 h for paraffin embedding. The paraffin blocks were cut into 5- μ m-thick sections and stained with Sirius Red to evaluate interstitial and perivascular fibrosis. For immunohistochemical analysis, anti-AT1, AT2, ERK1/2, PI3K, JAK2 and STAT3 antibodies were used. The expression of these proteins was immunohistochemically detected using the avidin–biotin–peroxidase method. Briefly, deparaffinized 5- μ m-thick heart sections on poly-l-lysine coated slides were treated with 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline for 15 min, nonfat milk for 60 min, primary antibodies for 60 min, and avidin–biotin–peroxidase solution (Vector Laboratories Inc, CA, USA, 1:1:50 dilution). Antigen retrieval was performed using 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) boiling in microwave oven

(1,300 W) twice for 5 min each. Chromogen color was accomplished with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma–Aldrich Co., St. Louis MO, USA) as the substrate to demonstrate the sites of peroxidase binding. The slides were counterstained with Harris's hematoxylin. No immunoreactivity was seen in control experiments in which one of the primary antibodies was omitted.

Tissue extracts – Sixteen-week-old male rats from the NP (n=5) and LP (n=5) groups had their neck dislocated, and the abdominal cavity was opened to cardiac left ventricles removal. The tissue was minced coarsely and homogenized immediately in 10 volumes of solubilization buffer (10 ml/L Triton-X 100, 100 mmol/L Tris[hydroxymethyl]amino-methane (Tris) pH 7.4, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF) and 0.1 mg/ml aprotinin at 4°C, using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA) operated at maximum speed for 20s. The tissue extracts were centrifuged at 11,000 rpm at 4°C for 40 min, and the supernatants used as sample.

Antibodies and chemicals- Protein quantification was performed using the Bradford method. For quantification, both tissue and total extract samples (250µg protein) were subjected to SDS-PAGE. After electrophoretic separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then blotted with specific antibody. The samples were treated with Laemmli buffer containing 100 mmol/l dithiothreitol (DTT), heated in a boiling water bath for 4 min and

subjected to 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a Bio-Rad minigel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad). Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membranes was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean), as described by Towbin *et al.*, 1979. The non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2 h at 22°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated at 4°C overnight with primary antibodies diluted in blocking buffer (3% non-fat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). Immunoreactive bands were detected using the enhanced chemiluminescence method (RPN 2108 ECL Western blotting analysis system; Amersham Biosciences) and were detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus intensifying screen (DuPont, Wilmington, DE) for 10 min. Images of the developed autoradiographs were scanned (Epson Stylus 3500) and band intensities were quantitated by optical densitometry (Scion Image Corporation) of the developed autoradiographs that were used at exposures in the linear range.

Statistical analysis - All data are reported as means \pm SEM. Data obtained over time were analyzed using appropriate ANOVA. *Post hoc* comparisons between selected means were done by Bonferroni's contrast test when initial ANOVA indicated statistical differences between experimental groups. Comparisons involving only two means within or between groups were

done using a Student's *t* test. A *P* value < 0.05 was considered to indicate significance.

RESULTS

The LP male pups birth weight was significantly reduced when compared to NP male pups (6.15 ± 0.16 g vs 6.72 ± 0.41 g - Figure 1). Systolic blood pressure (SBP) enhanced significantly more in LP than in NP rats from 6 to 16 weeks of age. Thus, LP pressure increased from 116.2 ± 6.5 mmHg to 137.9 ± 6.9 mmHg ($P < 0.05$) as compared with a slower and no significant rise from 114 ± 7.4 mmHg to 128.8 ± 8.7 mmHg in NP. LP group presented a significant rise in systolic blood pressure after 12 weeks of age (Figure 2).

Both weight and volume of left ventricle enhanced significantly in 16-wk old LP rats, an indicative of hypertrophy (Figure 3).

Sirius Red techniques have not revealed interstitial or perivascular fibrosis in the cardiac left ventricle of LP group at 16-wk old; conversely, there is a reduction in collagen content in both interstitium (Figure 4) and intramural coronary (Figure 5).

Western blot and immunohistochemical analysis of RAS signaling protein - Western blot analysis in male offspring of NP and LP cardiac left ventricle yielded a single band at the expected weight of corresponding proteins. Heart AT2R expression was unchanged when compared to NP group (NP 121.40 ± 0.974 vs. LP 120.2 ± 7.23 , $P=0.8$).

The analysis by immunoblotting confirmed by immunohistochemistry demonstrated significantly enhance in cardiomyocyte expression of AT1R in LP offspring (NP, 1227 ± 138.2 vs LP, 1998 ± 165.9 , $P=0.01$, Figure 6) and ERK1 (NP, 1403 ± 6.46 vs LP, 1623 ± 6.355 , $P=0.001$, Figure 7). On the other hand, the expression of PI3K in LP was significantly reduced in cardiomyocytes and intramural coronaries wall (NP, 20.52 ± 0.795 vs LP, 11.21 ± 0.34 , $P=0.008$, Figure 9). Immunohistochemical analysis verified that LP expression of JAK2 and STAT3 (STAT3 $174.10 \pm 2,56$ v 315.60 ± 7.45 in NP) are reduced in both cardiomyocytes and coronary endothelium (Figures 10 and 11).

DISCUSSION

Extensive experimentation on animals has demonstrated that alteration of the intrauterine environment can result in offspring that develop cardiovascular and/or metabolic disease later in life. The main animal model used has been the rat [9, 10, 11, 12], which is particularly susceptible to maternal protein or calorie deprivation, because the fetal rat grows and accretes protein at a rate that is close to 23 times that of the human fetus. This organizational phenomenon is termed 'early-life programming'. Here, in maternal protein-deprived offspring model, we focus on adult hypertension development associated with left ventricle impairment as an outcome and suggest that the heart is an organ in which there are permanent changes that underlie the developing hypertension. The present study confirms that the offspring birth weight in male rats was significantly reduced when compared to NP offspring. This effect was associated with a significant and progressive

enhance in arterial blood pressure in the LP group in parallel with the increase in left ventricular mass and volume.

Cardiac hypertrophy may increase the risk of cardiovascular events since there is an increased oxygen demand in the hypertrophic myocardial tissue, with reduction in coronary reserve, alterations in myocardial contractility and impairment of diastolic function (SILVA e KRIEGER, 2000). Our observation regarding the relative expression of AT1/AT2 receptors in the left ventricular maternal LP 16-wk-old offspring suggests that the rennin angiotensin system (RAS) could play a role in maternal underfeeding-induced fetal heart enlargement. In adult hearts, angiotensin appears to cause fibrosis and hypertrophy [13]; whereas infusion of angiotensin II (ANG II) in fetal sheep stimulates left ventricular growth [14], in cultures of ovine fetal cardiomyocytes, angiotensin II stimulates hyperplastic growth [15]. In the present study, however, the AT1/AT2 receptor expression ratio increases differs from that of Lumbers *et al.* [16] who found no significant change in expression in either of the receptors. Our data in adult hearts (at 16-wk-old rats) suggest that myocardial hypertrophy caused by ANG II was thought to be mediated by AT1 receptors. The AT2 receptor is traditionally believed to have anti-AT1 receptor-mediated effects, whereas the AT1 receptor is known to be pro-growth [17]. The striking findings of the present study show that myocardial hypertrophy is associated with increased AT1/AT2 ratio growth effect in response, at least in part, to maternal LP intake. It is also possible hypothesize that the rise in the AT1/AT2 ratio is related with progressive compensatory response to adult increased blood pressure. The role of AT2 receptors in fetal myocytes studies in rats is unclear;

in mice, disruption of AT2 receptors does not result in histological changes in the heart [18] and more studies are needed regarding the balance between actions mediated by AT1 and AT2 receptors on the late gestation myocyte and their role in LP-mediated heart growth.

There is some evidence that, during maternal undernutrition, maternal glucocorticoids (GC) increase as does the GC access to the fetus because of reduced placental inactivation by the enzyme 11 β -hydroxysteroid-dehydrogenase type 2 (11 β -HSD2); excess exposure of the fetus to such maternal GC constitutes at least part of the 'programming' stimulus [6, 9, 17]. Using immunohistochemistry, study has been demonstrated that mineralocorticoid (MCR) and glucocorticoid (GR) receptors, and 11 β -HSD1 are abundantly expressed in both myocytes and blood vessels within the fetal heart [18]. This suggested that glucocorticoid has access to both MR and GR within the fetal heart, and that when plasma GC levels in LP are increased, as supposal in the present study the action of GC at MR and GR in the heart would also increase.

Due to the unique ability of the fetal heart to grow through both hyperplasia and hypertrophy, either mechanism could account for the maternal LP-induced increases in fetal heart weight and wall thickness in our model. In early gestation, cardiac growth is mostly a result of the production of new myocytes originating through cell division and proliferation. Myocytes lose their ability to divide and proliferate shortly after birth in an event in which there is nuclear division without subsequent cell division [19]. Theoretically, GC could be stimulating growth through either hypertrophy or hyperplasia, or possibly even

both. However, the present study may not rule out also that the cardiac hypertrophy may have resulted from elevated blood pressure. Furthermore, in this study we observed no evidence within the fetal heart in support of interstitial collagen deposition, a symptom of cardiac hypertrophy in response to hypertension within the adult human heart [20].

Cellular protein synthesis and metabolism, transport, volume regulation, gene expression, and growth all depend on MAPKs. ANG II has been shown to activate signaling cascades that activate MAPKs, including extracellular signal regulated kinase (ERK1/2), JNK, and p38MAPK, which are implicated in myocytes differentiation, proliferation, migration, and fibrosis [21, 22]. The ERK pathway is the best characterized of the MAPK pathways. Binding of ANG II to AT1Rs activates ERK1/2, and that ERK 1/2 activity is blocked by inhibition of PLC, suggesting its dependency on calcium [23]. On the other hand, the phosphatases MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1) serves as a negative feedback control, inactivating ERK 1/2 [24]. Interestingly, stimulation of AT2Rs activates phosphatases that also block ERK-mediated activity [25, 26]. ERK has also been implicated in anti-apoptotic and pro-mitogenic effects, and activation of ERK1/2 has been shown to inhibit apoptosis [27, 28, 29]. Furthermore, ERK 1/2 has been implicated in ANG II-induced cellular growth and protein synthesis via regulation of PHAS-1 (inhibitor of eukaryotic initiation factor 4E).

In addition to activating ERK1/2, ANG II also stimulates MAP kinase that are associated with environmental stress, such as apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1), which subsequently induces JNK and p38MAPK related

signaling [30, 31]. In addition, p38MAPK also plays a role in ANG II-induced activation of Akt, a kinase with multiple downstream effects, including glucose metabolism and protein synthesis. These varied effects of ANG II-mediated MAPKs may provide more links between oxidant stress, hypertension, hyperlipidemia, and diabetes in the development of inflammation and atherosclerosis.

On the other hand, Folli *et al.* [32] showed that in rat aortic smooth muscle cells, AT1R stimuli impair insulin-mediated IRS-1 tyrosine phosphorylation and coupling of the insulin receptor to PI3K. ANG II has also been shown to increase serine phosphorylation of the insulin receptor subunit, and has a direct downregulation effect on PI3K activity by increasing serine phosphorylation of p85 [32]. Hypertension and diabetes often present together, indicating that interaction between ANG II and insulin signaling plays an important role in cardiovascular pathology. Interruption of IRS-1 signaling as response of maternal undernutrition by ANG II at multiple levels may explain the severity of vascular disease seen in diabetic patients.

Considering the fact that left ventricular hypertrophy involves increase in cardiomyocytes and interstitial fibrosis, we investigated the collagen distribution into the extracellular matrix (ECM). Surprisingly, our results demonstrate lower interstitial and perivascular concentration involving intramural coronary vasculature in adult offspring rats in the LP group when compared with NP age-matched group. This suggests that the mechanism of the enlargement of the fetal heart in the present study may be fundamentally different from what is

observed in adult rat pathologies. Kumar *et al.* [33] observed that isolated working rat hearts subjected to ischemia–reperfusion presented left ventricular hypertrophy and increase in p38, p-JNK-1, and p-JNK-2 expression. The authors also found that the improvement in left ventricle function is induced by AT2 blockade associated with a normalized expression of p-JNK-1 and a slight increase in p-38 expression. Beside this, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors not only decrease the production of ANG II but also decrease bradykinin degradation [34]. Bradykinin level increase can lead to fibrogenic expression and inflammatory factors such as connective tissue growth factor, collagen I, and TGF- β type II receptor [35]. We observed that experimental-group rats presented unchanged AT2R expression accompanied by greater ERK1/2 expression in the left ventricle of LP offspring compared with control-group rats. The roles that JNK and p38 MAPKs play in embryogenesis have been investigated, and inhibition of stress-activated ERK-1 has been shown to result in embryonic death by day 14 of gestation [36]. It has previously been shown that p-ERK is related to cell proliferation and differentiation whereas increased JNK-2 and p38MAPK expression and that these increases were associated with a higher number of apoptotic and inflammatory cells [33, 37, 38]. It is possible that enhanced AT2 receptor expression associated with higher ANG II production plays a role in this process during heart development. There is evidence that superior AT2R expression can also result in MAPK activation [33]. The absence of interstitial fibrosis and excessive collagen deposition in the current study might be at least partially attributable to the imbalance between ANG II receptor expressions, such as the increased in AT1R/AT2R ratio

expression and, consequently relative decrease of the AT2R effects. In conclusion, our data show that gestational LP unchanged ECM content associated to increasing cellular proliferation and hypertrophy. These alterations were accompanied by lower AT2R and ERK 1/2 expression and, at least in part, by lack of AT2R stimulation on MAPK family, attenuating the heart interstitial structure.

In conclusion, using a rat model of fetal protein restriction, we demonstrated that cardiomyocytes hypertrophy occurs early, at approximately four weeks of arterial hypertension development, despite an unaltered collagen deposition in the heart. In the current study, we may hypothesize a presumable AT1R transactivation as consequence of crosstalk between RAS and growth factor pathway. This finding confirm experimental and epidemiological studies and indicate that maternal underfeeding is associated with low birth weight offspring and may result in increased risk of cardiovascular morbidity in adulthood. Our data also suggest that changes in the RAS may play a role in the ventricular growth through changes in relative expression of AT1 to AT2 receptors. Further studies will be required to test these hypotheses.

FIGURES

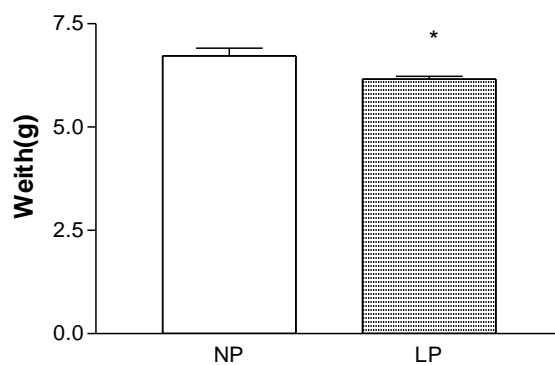


Figure 1. Weight of male pups. The data are reported as the means \pm SEM. * $P < 0.05$ versus control (Student's t test).

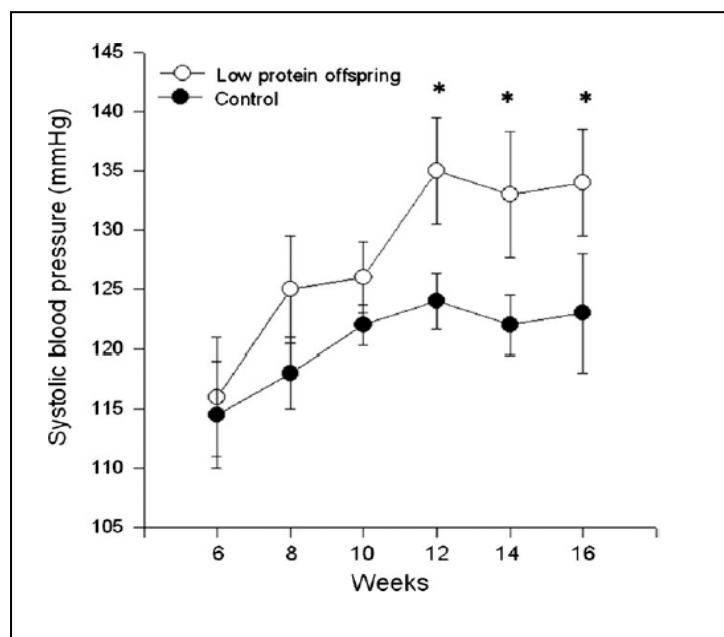


Figure 2. Effects of age on arterial pressure in male offspring of protein restricted and basal diet mothers during gestation. The data are reported as the means \pm SEM. * $P < 0.05$ versus control (Student's t -test).

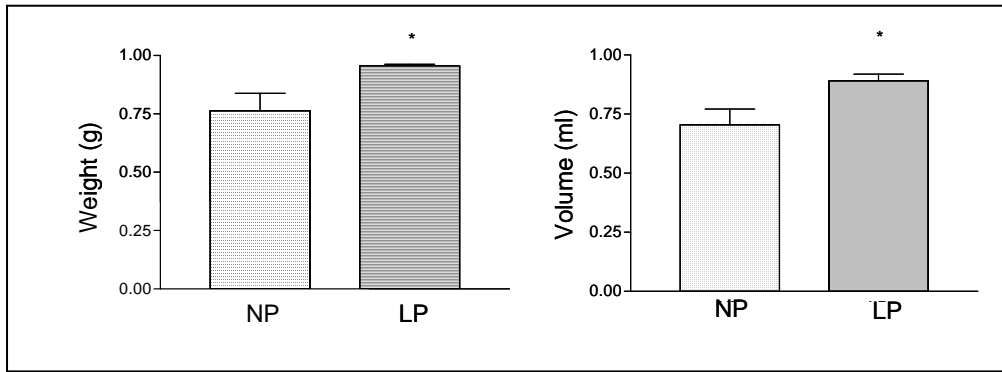


Figure 3. Weight and volume of left ventricle of 16 weeks male pups. The data are reported as the means \pm SEM. * $P < 0.03$ versus control (Student's t -test).

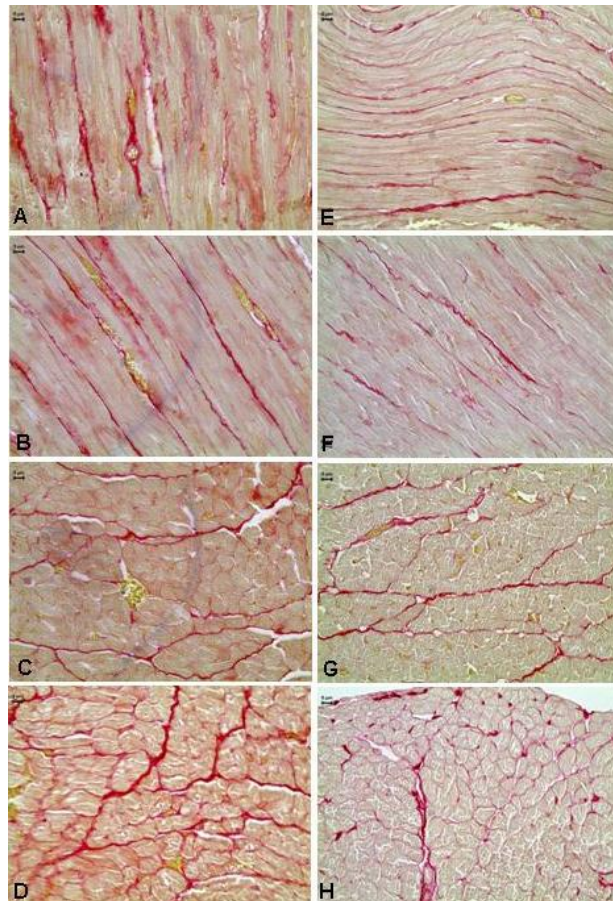


Figure 4. Cardiac left ventricle after Sirius Red. Collagen fibril was stained red and in NP we can see the normal distribution of collagen in longitudinal (A and B) and transversal sections (C and D). In LP is patent the reduction of these fibrils (E, F, G and H).

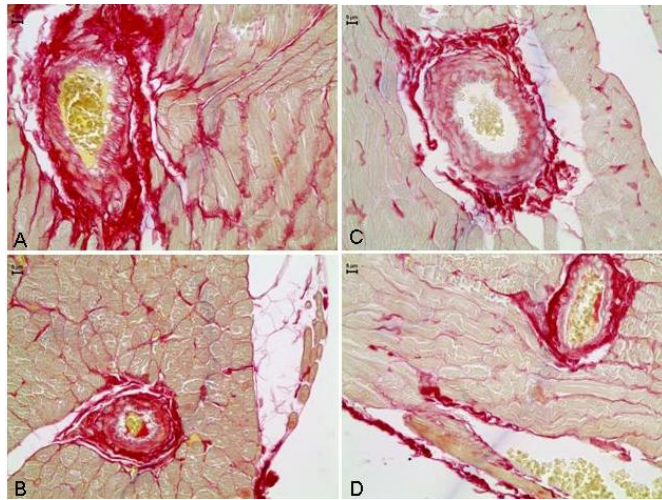


Figure 5. Representative cross-sections of intramural coronary perivascular fibres at 16 wk of age in a normal pattern (LP, A and B). The LP group presented diminution in perivascular collagenic content (C and D).

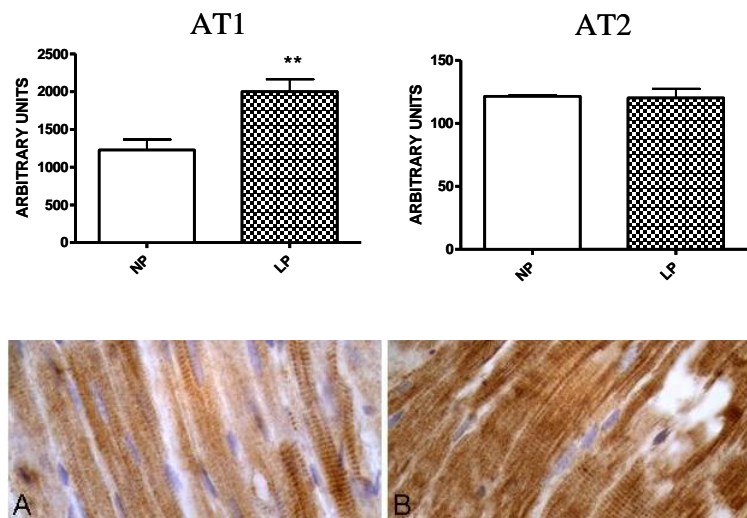


Figure 6. AT1 expression pattern in cardiac left ventricle. Western blot bands and densitometry quantification graphics in NP group were assumed as 100%. Columns and bars indicate Average \pm SEM * $P < 0.05$, NP vs. LP. A and B represent left ventricular tissue submitted to immunohistochemistry to AT1R. LP shows superior AT1R expression in cardiomyocytes (B) when compared to NP group (A).

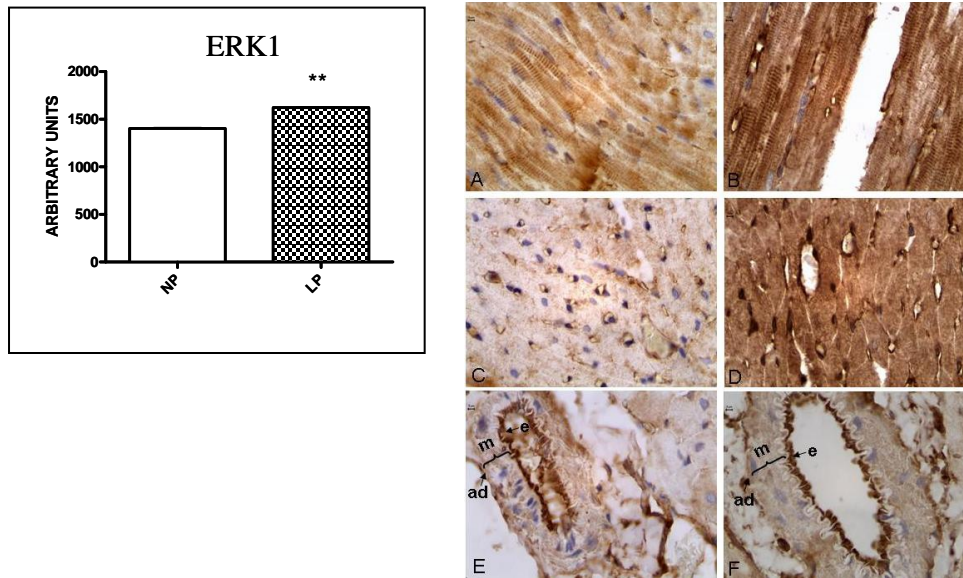


Figure 7. Cardiac left ventricle tissue submitted to immunohistochemistry to ERK1. A and C indicates protein distribution in NP cardiomyocytes (transversal and longitudinal sections, respectively). Blood vessels among cardiomyocytes presented an important ERK1 expression and are better viewed in C. LP group has shown enhanced ERK1 expression in cardiomyocytes, and transversal sections turns difficult to visualize blood vessels marks. NP (E) and LP (F) coronaries have not presented ERK1 expression alterations. Endothelium (e), Tunica media (m) and Tunica adventitia (ad).

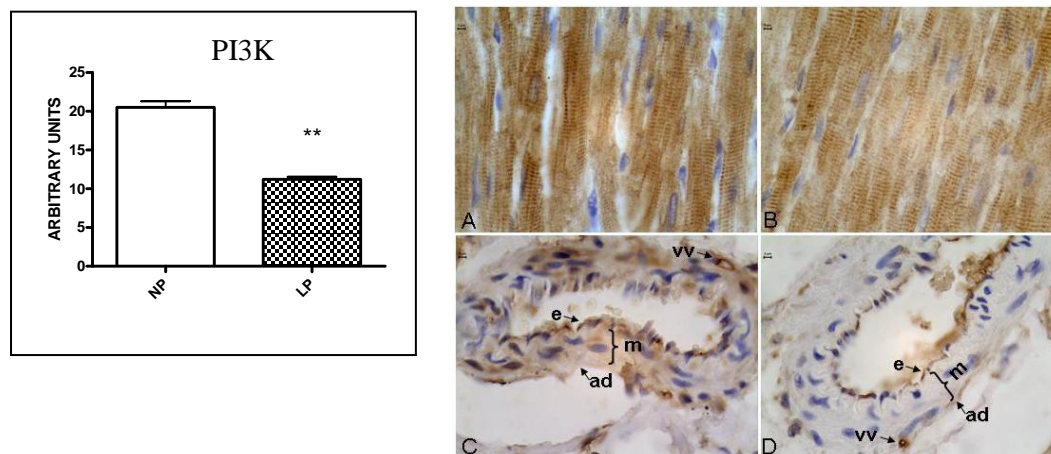


Figure 9. Cardiac left ventricle tissue submitted to immunohistochemistry to PI3K. A (NP) and B (LP) show cytosolic distribution of this protein in cardiomyocytes and apparent reduction in LP expression. Intramural coronary arteries in NP (C) express PI3K in endothelium (e), tunica media (m) and tunica adventitia (ad) and this expression becomes higher in *vasa vasorum* (vv). PI3K expression in coronary tunics are drastically reduced in LP animals (D) and becomes restricted to endothelium (e) and *vasa vasorum* (vv).

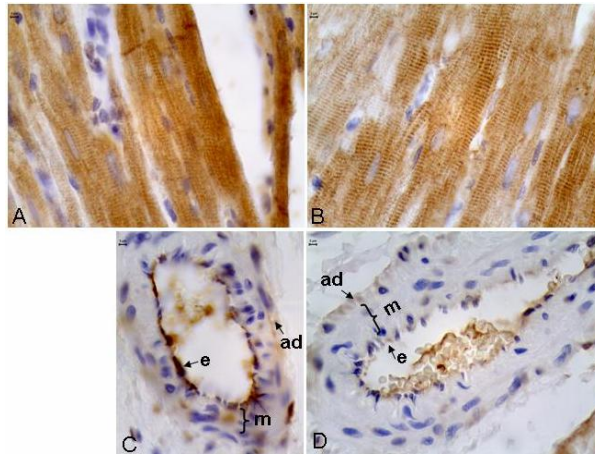


Figure 10. Cardiac left ventricle tissue submitted to immunohistochemistry to JAK2. A (NP) and B (LP) show cytosolic distribution of this protein in cardiomyocytes and apparent reduction in LP expression. In A it is possible to visualize intercalated disks intensively marked. NP group expression of JAK2 occurs in intramural coronary arteries (C), specifically in endothelium (e). LP animals (D) present a significant reduction of endothelium JAK2 expression. Tunica media (m) and Tunica adventitia (ad).

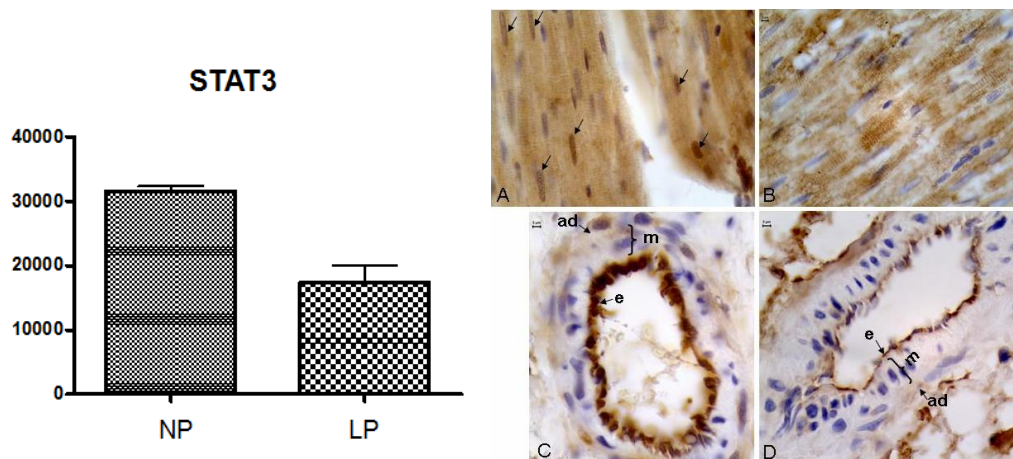


Figure 11. Cardiac left ventricle tissue submitted to immunohistochemistry to STAT3. A (NP) and B (LP) show distribution of this protein in cardiomyocytes and apparent reduction in LP expression. A indicates strong nuclear localization (arrows) of this protein in NP group, while in LP animals the nuclear expression was reduced. NP group expression of STAT3 occurs in intramural coronary arteries (C), strongly in endothelium (e). LP animals (D) present a significant reduction of endothelium STAT3 expression. Endothelium (e), Tunica media (m) and Tunica adventitia (ad).

REFERENCES

- 1 Barker D. In utero programming of chronic disease. *Clinical Science*. **95** (1998), pp. 115–128.
- 2 Unger T. Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade. *J Hypertens Suppl* **21** (2003), pp. S3–S7.
- 3 Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol*. **34** (2002), pp. 1435–1442.
- 4 Berecek KH, Reaves P, Raizada M. Effects of early perturbation of the renin-angiotensin system on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Vascul Pharmacol*. **42** (2005), pp. 93–98.
- 5 Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig*. **10** (2003), pp.392–399.
- 6 Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol*. **530** (2001), pp. 141–152.
- 7 Rasch R, Skriver E, Woods LL. The role of the RAS in programming of adult hypertension. *Acta Physiol Scand*. **181** (2004), pp. 537–542.
- 8 C.E. Bertram and M.A. Hanson. Animal models and programming of the metabolic syndrome. *Br. Med. Bull*. **60** (2001), pp. 103–121.
- 9 B.H. Breier *et al.*, Fetal programming of appetite and obesity. *Mol. Cell. Endocrinol*. **185** (2001), pp. 73–79.
- 10 A.L. Fowden and D.J. Hill , Intra-uterine programming of the endocrine pancreas. *Br. Med. Bull*. **60** (2001), pp. 123–142.

- 11** S.C. Langley-Evans , Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc. Nutr. Soc.* **60** (2001), pp. 505–513.
- 12** Mesquita, FF, Gontijo, JAR, Boer, PA. Expression of renin–angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol. Dial. Transplant.* **25** (2009), pp. 380-388.
- 13** Zhu YC, Zhu YZ, Lu N, Wang MJ, Wang YX, and Yao T. Role of angiotensin AT1 and AT2 receptors in cardiac hypertrophy and cardiac remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **30** (2003), pp. 911–918, 2003.
- 14** Segar JL, Dalshaug GB, Bedell KA, Smith OM, and Scholz TD. Angiotensin II in cardiac pressure-overload hypertrophy in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **281** (2001), pp. R2037–R2047.
- 15** Sundgren NC, Giraud GD, Stork PJ, Maylie JG, and Thornburg KL. Angiotensin II stimulates hyperplasia but not hypertrophy in immature ovine cardiomyocytes. *J Physiol.* **548** (2003), pp. 881–891.
- 16** Lumbers ER, Boyce AC, Joulianos G, Kumarasamy V, Barner E, Segar JL, and Burrell JH. Effects of cortisol on cardiac myocytes and on expression of cardiac genes in fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **288** (2005), pp. R567–R574.
- 17** Dostal DE. The cardiac renin-angiotensin system: novel signaling mechanisms related to cardiac growth and function. *Regul Pept.* **91** (2000), pp. 1–11.
- 18** Reini SA, Wood CE, Jensen E & Keller-Wood M. Increased maternal cortisol in late gestation ewes decreases fetal cardiac expression of 11 β -HSD2 mRNA and the ratio of AT1 to AT2 receptor mRNA. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology.* **21** (2006), pp. R1708–R1716.

- 19** Oparil S, Bishop SP & Clubb FJ Jr. Myocardial cell hypertrophy or hyperplasia. *Hypertension*. **6** (1984), pp. III38–III43.
- 20** Diez J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *Journal of Clinical Hypertension*. **9** (2007), pp. 546–550.
- 21** Sugden PH, Clerk A. Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal*. **9** (1997), pp. 337–351.
- 22** Taniyama Y, Ushio-Fukai M, Hitomi H, Rocic P, Kingsley MJ, Pfahnl C, Weber DS, Alexander RW, Griendling KK. Role of p38 MAPK and MAPKAPK-2 in angiotensin II-induced Akt activation in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. **287** (2004), pp. C494–C499.
- 23** Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T. Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem*. **271** (1996), pp. 14169–14175.
- 24** Bokemeyer D, Lindemann M, Kramer HJ. Regulation of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. **32** (1998), pp. 661–667.
- 25** Cui T, Nakagami H, Iwai M, Takeda Y, Shiuchi T, Daviet L, Nahmias C, Horiuchi M. Pivotal role of tyrosine phosphatase SHP-1 in AT₂ receptor-mediated apoptosis in rat fetal vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Res*. **49** (2001): 863–871.
- 26** Horiuchi M, Akishita M, Dzau VJ. Molecular and cellular mechanism of ngiotensin II-mediated apoptosis. *Endocr Res*. **24** (1998), pp. 307–314.
- 27** Lim SY, Kim YS, Ahn Y, Jeong MH, Hong MH, Joo SY, Nam KI, Cho JG, Kang PM, Park JC. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt

in a porcine myocardial infarction model. *Cardiovasc Res.* **70** (2006), pp. 530–542.

28 Allen RT, Krueger KD, Dhume A, Agrawal DK. Sustained Akt/PKB activation and transient attenuation of c-jun N-terminal kinase in the inhibition of apoptosis by IGF-1 in vascular smooth muscle cells. *Apoptosis.* **10** (2005), pp. 525–535.

29 Nishimura K, Li W, Hoshino Y, Kadohama T, Asada H, Ohgi S, Sumpio BE. Role of AKT in cyclic strain-induced endothelial cell proliferation and survival. *Am J Physiol Cell Physiol.* **290** (2006), pp.C812–C821.

30 Tobiume K, Matsuzawa A, Takahashi T, Nishitoh H, Morita K, Takeda K, Minowa O, Miyazono K, Noda T, Ichijo H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep.* **2** (2001), pp. 222–228.

31 Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* **275** (1997), pp.90–94.

32 Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest.* **100** (1997), pp. 2158–2169.

33 Kumar D, Menon V, Ford WR, Clanachan AS, Jugdutt BI. Effect of angiotensin II type 2 receptor blockade on mitogen activated protein kinases during myocardial ischemia-reperfusion. *Mol Cell Biochem.* **258** (2004), pp. 211–218

34 Gainer JV, Morrow JD, Loveland A, King DJ, Brown N. Effect of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting-enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. *N Engl J Med.* **339** (1998), pp. 1285–1292

- 35** Tan Y, Wang B, Kuem JS, Jaffa AA. Mechanisms of bradykinin induced glomerular injury in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* **288** (2005), pp. F483–F492
- 36** Yang D, Tournier C, Wysk M, Lu HT, Xu J, Davis RJ, Flavell RA. Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94** (1997), pp. 3004–3009
- 37** Omori S, Hida M, Ishikura K, Kuramochi S, Awazu M. Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development. *Kidney Int.* **58** (2000), pp. 27–37.
- 38** Choi BM, Yoo KH, Bae IS, Oh MH, Hong YS, Lee JW, Kim SK. Angiotensin II-converting enzyme inhibition modulates mitogenic-activated protein kinase family expressions in the neonatal rat kidney. *Pediatr Res.* **57** (2005), pp. 115–123.

RESULTADOS

ARTIGO II

UNDERNUTRITION *IN UTERO*: EXPRESSION AND LOCALIZATION OF ANGIOTENSIN SIGNALING PROTEINS IN THE HEART OF MALE OFFSPRING.

Marília Andreo¹, Maurício F. Silva Almeida Ribeiro¹, Flávia Fernandes Mesquita², José Antonio Rocha Gontijo² & Patrícia Aline Boer¹

¹Laboratório de Programação Fetal, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP- Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil e ²Disciplina de Medicina Interna, Laboratório de Metabolismo Hidro-salino, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

Correspondence address:

Patrícia Aline Boer, BSC, PhD, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 18600-000 Botucatu, SP, Brazil

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

E-mail: alineboer@yahoo.com.br

Abstract

Alterations in nutrition and endocrine status during the embryonic, foetal and neonatal periods can trigger developmental predictive adaptive responses, causing permanent structural, physiological and metabolic changes, thereby predisposing and individual to cardiovascular, metabolic and endocrine diseases in adult life. The rennin-angiotensin system (RAS) plays an important role in primary and secondary forms of hypertension. Components of the RAS, such as angiotensin converting enzyme (ACE) and angiotensin II (ANG II), are locally produced in the cardiac tissues, and are primary candidates for cardiac myocyte hypertrophy and increased extracellular fibrosis. The present investigated the effects in systolic blood pressure (SBP) and expression of different RAS compounds in adult rats submitted to undernutrition *in uteri* by maternal food restriction. Daily food supply of one group of dams was restricted to 50% (FR50) of the food consumed by the other (NF, normal food). AGD was measured in the day of birth and body weight of the pups was measured weekly. SBP was measured weekly, since 6th week of age. In the age of 12nd weeks, their hearts were sampled to western blotting and immunohistochemistry analysis. Both techniques analyzed the expression of AT1, AT2 receptors, JAK2, STAT3, ERK1 and PI3K receptors. FR50 male offspring presented significant reduction in body weight. SBP also increased from 6th to 12nd week. Expression of AT1R, AT2R and ERK1 were increased in FR50, while JAK2 and STAT3 presented lower levels. PI3K hasn't shown significant difference. SBP values confirm that RAS modifications in embryonic and early life may modulate adulthood blood pressure. Besides, such a high increase in AT2 expression may suggest RAS adaptive response, since AT1 and AT2 receptors plays antagonistic roles on hypertensive responses.

Key words: Low weight; Arterial Hypertension; Undernutrition; Angiotensin II; Hypertrophy Left Ventricle.

INTRODUCTION

Studies focused on the causes of coronary heart disease used to search for the acceleration process of destructive causes in adult life (such as atheroma, raised blood pressure, glucose intolerance). Barker [1, 2] and Eriksson *et al.* [3] turned to light the importance of fetal, infancy and childhood growth patterns to coronary heart diseases. The relation between fetal growth and future heart injuries has led to a new developmental model for the disease [1-3]. In 1998, Barker *et al.* [2] pointed to substantial body evidences showing that people who were small at birth remain biologically different to people who was born with higher weight values. The differences include an increased susceptibility to hypertension and type 2 diabetes mellitus, disorders closely linked to coronary heart disease [4-8]. Nutritional insults during embryonic and foetal periods can be associated to impaired maturation of physiological functions and cardiovascular diseases in adulthood [9]. Alterations in nutrition and endocrine status during the embryonic, foetal and neonatal periods can trigger developmental predictive adaptive responses [10], causing permanent structural, physiological and metabolic changes, thereby predisposing and individual to cardiovascular, metabolic and endocrine diseases in adult life. The rennin-angiotensin system (RAS) plays an important role in primary and secondary forms of hypertension [11]. Components of the RAS, such as angiotensin-converting enzyme (ACE) and angiotensin II are locally produced in the cardiac tissues [12], and are primary candidates for the factors promoting remodelling, mainly cardiac myocyte hypertrophy and increased extracellular fibrosis, thereby deteriorating cardiac functions [13]. The present study aims to

investigate the effects in arterial blood pressure (AP) and expression of different RAS compounds in adult rats submitted to undernutrition *in utero* by maternal food restriction.

MATERIAL AND METHODS

Animals - The experiments were conducted on age-matched, female offspring of sibling-mated Wistar Hannover rats (0,250-0,300 kg) allowed free access to water and normal rat chow. The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation. Our local colonies originated from a breeding stock supplied by CEMIB/Unicamp, Campinas, SP, Brazil. Immediately after weaning at 3 weeks of age, animals were maintained under controlled temperature (25°C) and lighting conditions (7:00 a.m. – 7:00 p.m.), with free access to tap water and standard rodent laboratory chow (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) and followed up to 12 weeks of age. Animals were then mated and the day that sperm were seen in the vaginal smear was designated as day 1 of pregnancy. The dams were divided into two groups: throughout entire pregnancy, the daily food supply of one group (FR50) was restricted to 50% of the food consumed by the other group (NF), fed *ad libitum*. All groups returned to the *ad libitum* chow intake after delivery. Body weight and food consumption was determined every day (subsequently normalized for body weight). The male pups were weighted, followed and maintained with normal chow *ad libitum* until adulthood.

Blood Pressure Measurement - The systemic arterial pressure was measured in conscious 6, 8, 9, 10, 11 and 12-week-old rats by an indirect tail-

cuff method using an electrospigmomanometer (Narco Bio-Systems, Austin, TX) combined with a pneumatic pulse transducer/amplifier. This indirect approach allowed repeated measurements with a close correlation (correlation coefficient = 0.975) compared to direct intra-arterial recording. The mean of three consecutive readings represented the blood pressure.

Tissue processing, histology and immunohistochemical procedures- Twelve-week-old male rats from the NP (n=5) and LP (n=5) groups were anesthetized with a mixture of ketamine (75 mg .kg⁻¹body weight, i.p.) and xylazine (10mg.kg⁻¹body weight, i.p.) and the level of anesthesia was controlled by monitoring the corneal reflex. The animals were then perfused by the left carotid artery with saline containing heparin (5%) for 15 min under constant pressure, followed by perfusion with 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) containing 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.1 mol/L (M) sucrose for 25 min. After perfusion, cardiac left ventricles were removed, weighted, and representative samples were fixed in 4% phosphate-buffered formalin during 24 h for paraffin embedding. For immunohistochemical analysis we use anti-AT1, AT2, JAK2 and STAT3 antibodies. Proteins expression was immunohistochemically detected using the avidin–biotin–peroxidase method. Briefly, deparaffinized 5-µm-thick heart sections on poly-l-lysine coated slides were treated with 3% H₂O₂ in phosphate-buffered saline for 15 min, nonfat milk for 60 min, primary antibodies for 60 min, and avidin–biotin–peroxidase solution (Vector Laboratories Inc, CA, USA, 1:1:50 dilution). Antigen retrieval was performed using 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) boiling in microwave oven (1,300 W) twice for 5 min each. Chromogen color was accomplished with 3,3'-

diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma–Aldrich Co., St. Louis MO, USA) as the substrate to demonstrate the sites of peroxidase binding. The slides were counterstained with Harris’s hematoxylin.

Tissue extracts – Twelve-week-old male rats from the NF (n=5) and FR50 (n=5) groups were used. The animal’s abdominal cavity was opened to cardiac left ventricles removal. The tissue was minced coarsely and homogenized immediately in 10 volumes of solubilization buffer (10 ml/L Triton-X 100, 100 mmol/L Tris[hydroxymethyl]amino-methane (Tris) pH 7.4, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF) and 0.1 mg/ml aprotinin at 4°C, using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA) operated at maximum speed for 20 s. The tissue extracts were centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 40 min, and the supernatants used as sample.

Antibodies and chemicals- Protein quantification was performed using the Bradford method. For quantification, both tissue and total extract samples (250µg protein) were subjected to SDS-PAGE. After electrophoretic separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then blotted with specific antibody. The samples were treated with Laemmli buffer containing 100 mmol/l dithiothreitol (DTT), heated in a boiling water bath for 4 min and subjected to 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a Bio-Rad minigel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad).

Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membranes was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean), as described by Towbin *et al.*, (1979) [21]. The non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2 h at 22°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated at 4°C overnight with primary antibodies diluted in blocking buffer (3% non-fat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). Immunoreactive bands were detected using the enhanced chemiluminescence method (RPN 2108 ECL Western blotting analysis system; Amersham Biosciences) and were detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus intensifying screen (DuPont, Wilmington, DE) for 10 min. Images of the developed radiographs were scanned (Epson Stylus 3500) and band intensities were quantified by optical densitometry (Scion Image Corporation).

Statistical analysis - All data are reported as means \pm SEM. Data obtained over time were analyzed using appropriate ANOVA. *Post hoc* comparisons between selected means were done by Bonferroni's contrast test when initial ANOVA indicated statistical differences between experimental groups. Comparisons involving only two means within or between groups were done using a Student's *t* test. A *P* value < 0.05 was considered to indicate significance.

RESULTS

FR50 offspring presented significant reduction in body weight (5.67 ± 0.16 v 6.84 ± 0.13 in NF, $p < 0.001$) (Figure 1). Systolic blood pressure also increased (Figure 2) from 6th to 12nd week (6th, 149.1 ± 3.4 v 125.1 ± 3.2 in NF, $p < 0.001$; 12nd, 164.4 ± 4.9 v 144.0 ± 3.3 in NF, $p = 0.02$).

Both weight and volume of left ventricle enhances significantly in FR50 rats with 12 weeks (weight, 0.985 ± 0.1367 v 1.599 ± 0.3362 in NF, $p = 0.0025$; volume, 0.763 ± 0.3765 v 1.547 ± 0.2081 in NF, $p = 0.0002$), possibly indicating hypertrophy (Figure 3).

Western blot and immunohistochemical analysis of RAS signaling protein - Western blot analysis in male offspring of NP and LP rat cardiac left ventricle yielded a single band at the expected weight of corresponding proteins. Expression of AT1, AT2 were increased in FR50 (AT1, 136.43 ± 8.66 v 89.32 ± 7.35 in NF; AT2, 79.26 ± 7.64 v 10.44 ± 4.35 in NF) (Figures 4 and 5). On the other hand, JAK2 and STAT3 reduced significantly in FR50 cardiomyocytes (JAK2, 116.40 ± 8.97 v 160.60 ± 7.35 in NF; STAT3, 25.980 ± 6.62 v 43.510 ± 3.149 in NF) (Figures 6 and 7). ERK 1 was increased in FR50 (200.80 ± 7.935 v 155.10 ± 9.820 in NF) (Figure 8). PI3K, however, hasn't show any significant difference (NF $121,50 \pm 7,098$ v FR50 $120.80 \pm 12,720$) (Figure 9).

DISCUSSION

An epidemiological approach to the study of cardiovascular programming has suggested that factors operating before birth are responsible for the establishment of a predisposition to hypertension and coronary heart disease in adult life. The hypothesis that a fetus can control his own development according to intrauterine environment suggests that the offspring adjust his growth and metabolism so their body size and properties are equivalent to postnatal predicted nutritional offering. However, the adaptations to undernutrition *in utero* may become deleterious whether there is abundance of nutrients after birth. The unbalance between food intake, homeostasis process and energy consumption leads to increased risk of cardiovascular and metabolic diseases [14-16].

There are several possible mechanisms linking an adverse intrauterine environment with higher blood pressure through an effect on fetal growth. Pressure in the fetal circulation might be raised as a method of maintaining placental perfusion, and the raised pressures may persist after birth [17]. Retardation of intrauterine growth may lead to accelerated postnatal growth that is accompanied by an accelerated increase in blood pressure [18].

The role of placental 11 β -HSD as a gatekeeper for glucocorticoid access to the fetal tissues is pivotal in the fetal programming of hypertension. Maternal nutritional status and synthetic glucocorticoid administration appear to determine long-term cardiovascular function through a common mechanism. Undernutrition perturbs the balance of glucocorticoids between the maternal and fetal compartments by down-regulating 11 β -HSD in placenta. The precise

regulation of this placental enzyme is not fully understood, but it certainly appears to be sensitive to nutritional status in sheep, as well as in rodents [19]. Glucocorticoids may also continue to act during postnatal life to mediate some of the programmed effects of fetal undernutrition. In this context, the observation of high circulating cortisol concentrations in humans with low weight at birth become of greater interest [20]. Increased glucocorticoid activity will promote an increase in blood pressure through a range of mechanisms. The one of most interest is the RAS, since glucocorticoids up-regulate this system and thus promote vasoconstriction and increased peripheral resistance. ANG II receptors have been shown to be subject to programming by undernutrition in kidneys of both sheep and rats [19].

Animal models of fetal programming induced by gestational protein undernutrition and placental insufficiency report common temporal alterations in the RAS [21-23]. Suppression of the intrarenal RAS at birth [21-23] is followed by later activation of the RAS including increased expression of renal AT1 receptors [24, 25] and renal ACE [26, 23]. Most of the known physiological effects of ANG II are mediated by AT1 receptors, which serve as a control point for regulating the ultimate effects of ANG II on its target tissue. Acutely, increase levels of ANG II lead to an increased level of AT1R; however, chronic exposure to ANG II down-regulates its own receptors [27-29]. Our findings support this hypothesis, since we found an inverse correlation between birth weight and blood pressure, heart mass and volume, which may indicate hypertrophy.

Left ventricular hypertrophy (LVH) is the major independent risk factor for premature death [30]. Extensive experimental and clinical evidence supports a role for the vasoactive hormone ANG II in the development of hypertension and the associated cardiomyocyte enlargement, which is hallmark of LVH. In parallel, we found up-regulation of ANG II receptors that has been shown to increase in cardiac hypertrophy [31] and may, then, enhance the cardiac actions of the angiotensin peptides. AT1 receptors are well characterized and mediate the established actions of ANG II. Once ANG II binds to AT1R, it activates a series of signaling cascades, which in turn regulate the various physiological effects of ANG II. The activated AT1 induces the JAK/STAT mitogenic pathway, although in this work we found a reduction of 72% in JAK2 and 59.7% in STAT3 expression. The other mechanism is the activation of serine/threonine kinases such as PKC and MAPKs (including ERK 1/2) that are implicated in cell growth and hypertrophy. The ERK pathway is better characterized by MAPK pathways. Binding of ANG II to AT1 activates ERK 1/2 within 5 minutes [32]. Activation of ERK1/2 MAPKs has been strongly associated with hypertrophy of cardiomyocytes [33]. Our results demonstrate that AT1 expression is enhanced in 52%, and ERK1 in 30.46%. ANG II-induced enhanced activation of vascular MAPKs such as ERK 1/2 has been implicated in hypertension and in micro- and macrovascular target-organ damage [33]. Curiously the most intensive enhanced expression found for us is in AT2 receptor (659% enhanced), since current theories favor a role of this receptor in opposing the actions of the AT1 receptor [34-38].

FIGURES

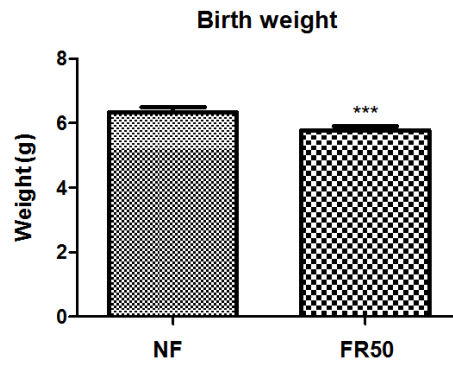


Figure 1. Birth weight in NF and FR50 groups.

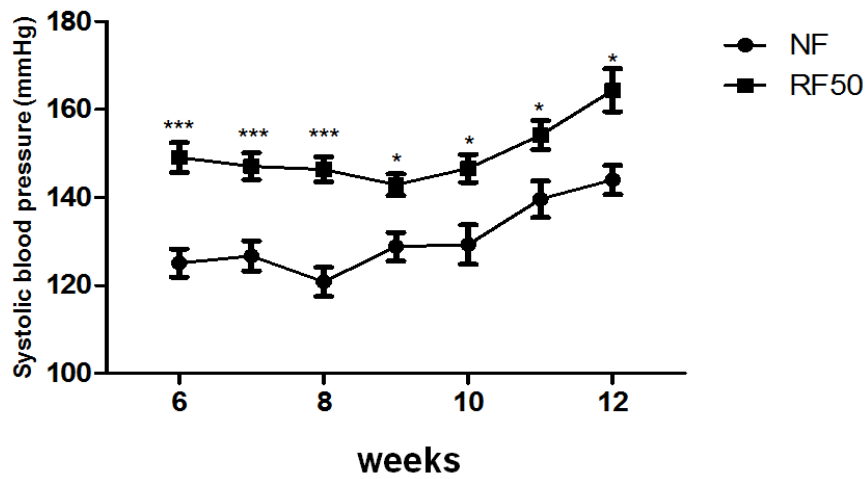


Figure 2. Systolic blood pressure in NF and FR50 animals from 6th to 12nd week of age.

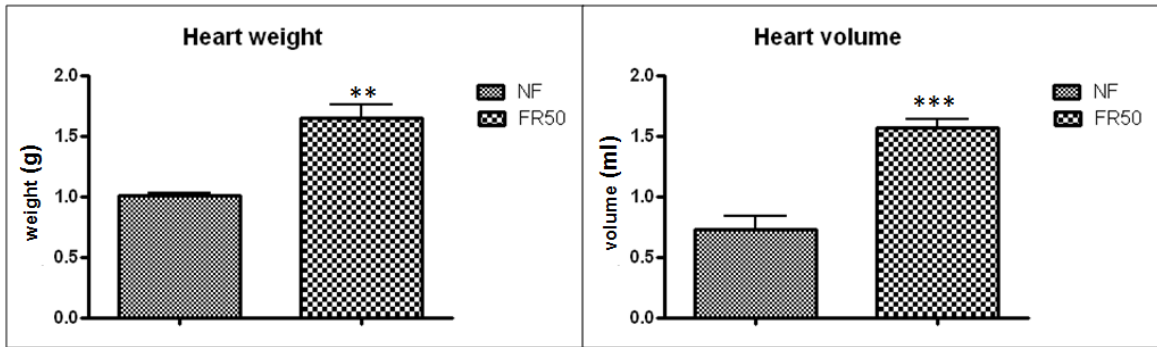


Figure 3. Heart weight and volume in NF and FR50 groups.

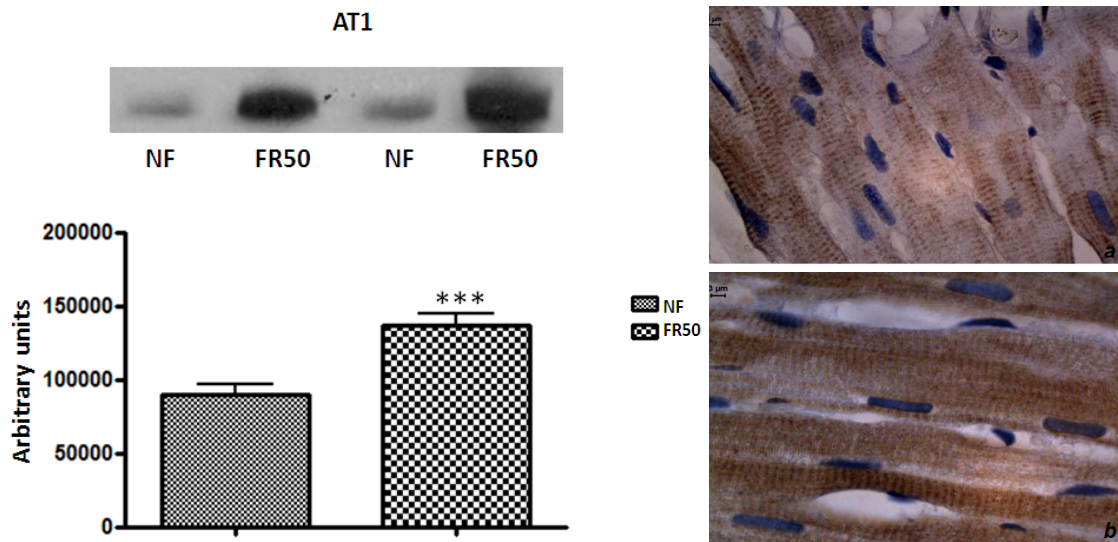


Figure 4. AT1 left ventricular expression by western blot in Normal Food (NF) and Food Restricted (FR50) and immunohistochemistry of the same protein receptor in left ventricle of NF (a) and FR50 (b) groups.

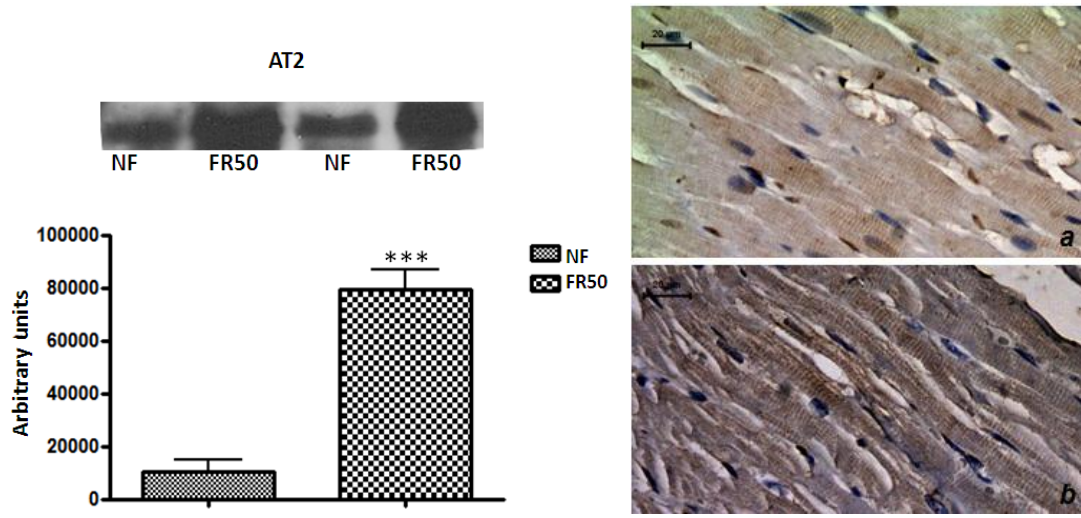


Figure 5. AT2 left ventricular expression by western blot in Normal Food (NF) and Food Restricted (FR50) and immunohistochemistry of the same protein receptor in left ventricle of NF (a) and FR50 (b) groups.

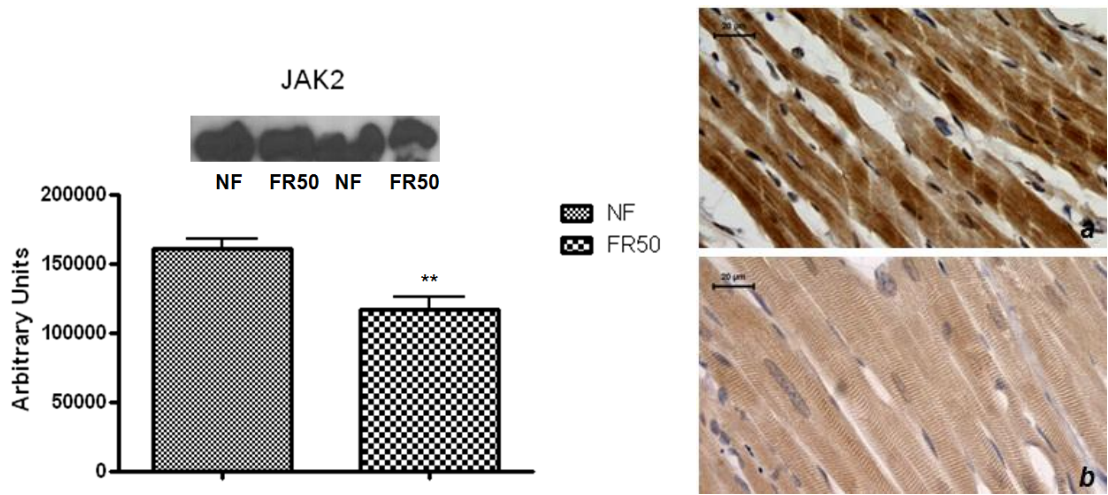


Figure 6. JAK2 left ventricular expression by western blot in Normal Food (NF) and Food Restricted (FR50) and immunohistochemistry of the same protein receptor in left ventricle of NF (a) and FR50 (b) groups.

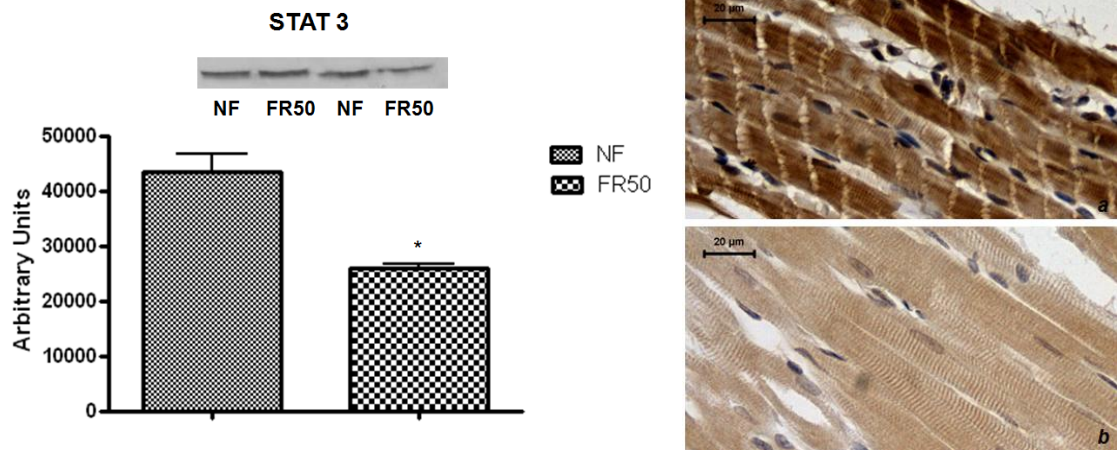


Figure 7. STAT3 left ventricular expression by western blot in Normal Food (NF) and Food Restricted (FR50) and immunohistochemistry of the same protein receptor in left ventricle of NF (a) and FR50 (b) groups.

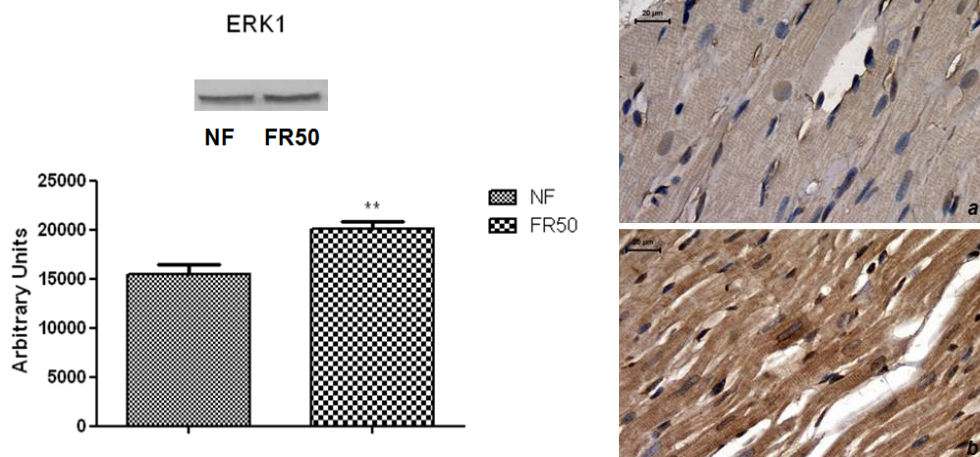


Figure 8. ERK1 left ventricular expression by western blot in Normal Food (NF) and Food Restricted (FR50) and immunohistochemistry of the same protein receptor in left ventricle of NF (a) and FR50 (b) groups.

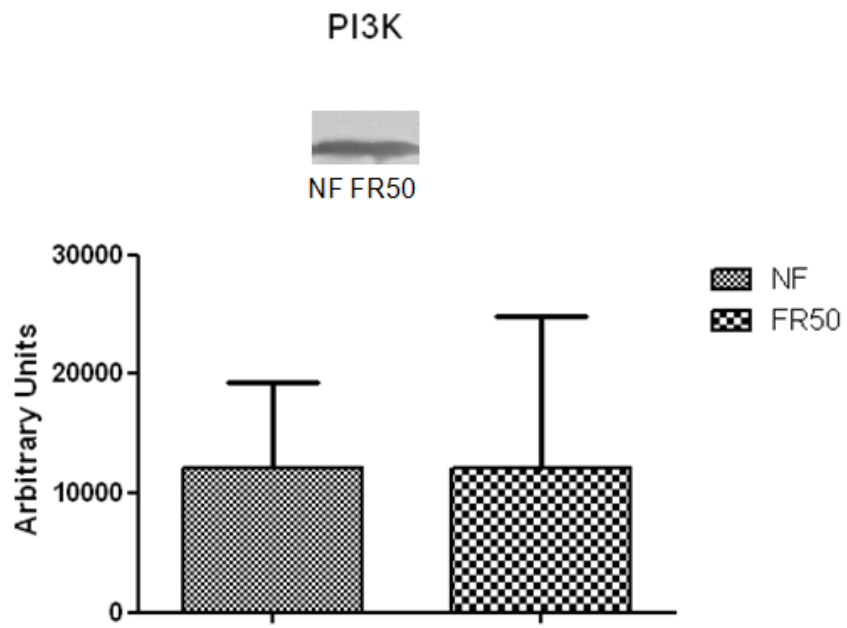


Figure 9. PI3K left ventricular expression by western blot in Normal Food (NF) and Food Restricted (FR50).

REFERENCES

- 1 Barker, D.J.P. (1995) Fetal origins of coronary heart disease. *Br. Med. J.* 311, 171–174
- 2 Barker, D.J.P. (1998) *Mothers, Babies and Health in Later Life* (2nd edn), Churchill Livingstone
- 3 Eriksson, J.G. *et al.* (2001) Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *Br. Med. J.* 322, 949–953
- 4 Eriksson, J.G. *et al.* (2000) Fetal and childhood growth and hypertension in adult life. *Hypertension* 36, 790–794
- 5 Curhan, G.C. *et al.* (1996) Birthweight and adult hypertension and obesity in women. *Circulation* 94, 1310–1315
- 6 Forsen, T. *et al.* (2000) The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann. Intern. Med.* 133, 176–182
- 7 Lithell, H.O. *et al.* (1996) Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50–60 years. *Br. Med. J.* 312, 406–410
- 8 Huxley, R.R. *et al.* (2000) The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J. Hypertens.* 18, 815–831
- 9 Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS (1993) Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 341:938–941
- 10 Gluckman PD, Hanson MA (2004) Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 305:1733–1736
- 11 Unger T (2003) Blood pressure lowering and renin-angiotensin system blockade. *J Hypertens Suppl* 21:S3–S7

- 12** Varagic J, Frohlich ED (2002) Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol* 34:1435–1442
- 13** Berecek KH, Reaves P, Raizada M (2005) Effects of early perturbation of the renin-angiotensin system on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Vascul Pharmacol* 42:93–98
- 14** Gluckman PD, Hanson MA. (2004) The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 15:183-7
- 15** McMillen IC, Robinson JS. (2005) Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 85:571-633
- 16** Hanson MA, Gluckman PD. (2008) Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:90-93
- 17** Gennser G, Rymark P, Isberg PE. (1988) Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br Med J.* 296:1498-9.
- 18** Ounsted MK, Cockburn JM, Moar VA, Redman CWG. (1985) Factors associated with the blood pressures of children born to women who were hypertensive during pregnancy. *Arch Dis Child.* 60:631-5.
- 19** Whorwood CB, Firth KM, Budge H, Symonds ME. (2001) Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin ii receptor in neonatal sheep. *Endocrinology.* 142(7):2854-64.
- 20** Phillips DI, Walker BR, Reynolds RM, Flanagan DE, Wood PJ, Osmond C, Barker DJ, Whorwood CB. (2005) Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentrations in adults from 3 populations. *Hypertension.* 35:1301-6.
- 21** Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, *et al.* (2001) Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res.* 49:460–467.

- 22** Grigore D, Ojeda NB, Robertson EB, *et al.* (2007) Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293:R804–811.
- 23** Riviere G, Michaud A, Breton C, *et al.* (2005) Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension.* 2005; 46:1169–1174.
- 24** Sahajpal V, Ashton N. (2003) Renal function and angiotensin AT1 receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. *Clin Sci (Lond).* 104:607–614.
- 25** Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, *et al.* (2004) Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287:F262–267.
- 26** Gilbert JS, Lang AL, Grant AR, *et al.* (2005) Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *J Physiol.* 565:137–147.
- 27** Griendling KK, Delafontaine P, Rittenhouse SE, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. (1987) Correlation of receptor sequestration with sustained diacylglycerol accumulation in angiotensin II-stimulated cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 262: 14555–14562.
- 28** Lassegue B, Alexander RW, Nickenig G, Clark M, Murphy TJ, Griendling KK. (1995) Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. *Mol Pharmacol.* 48: 601–609.
- 29** Touyz RM, He G, Deng LY, Schiffrin EL. (1999) Role of extracellular signal-regulated kinases in angiotensin II-stimulated contraction of smooth muscle cells from human resistance arteries. *Circulation.* 99: 392–399.

- 30** Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. *N Engl J Med.* 322(22):1561-6.
- 31** Reiss K, Capasso JM, Huang HE, Meggs LG, Li P, Anversa P. (1993) ANG II receptors, c-myc, and c-jun in myocytes after myocardial infarction and ventricular failure. *Am J Physiol.* 264(3 Pt 2):H760-9.
- 32** Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T. (1996) Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem.* 271(24):14169-75.
- 33** Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC. (1998) Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 82(1):7-12.
- 34** Carey RM. (2005) Cardiovascular and renal regulation by the angiotensin type 2 receptor. The AT₂ receptor comes of age. *Hypertension.* 45: 840–488.
- 35** Nakajima M, Hutchinson HG, Fujinaga M, Hayashida W, Morishita R, Zhang L, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ. (1995) The angiotensin II type 2 (AT₂) receptor antagonizes the growth effects of the AT₁ receptor: gain-of-function study using gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92: 10663–10667.
- 36** Masaki H, Kurihara T, Yamaki A, Inomata N, Nozawa Y, Mori Y, Murasawa S, Kizima K, Maruyama K, Horiuchi M, Dzau VJ, Takahashi H, Iwasaka T, Inada M, Matsubara H. (1998) Cardiac-specific overexpression of angiotensin II AT₂ receptor causes attenuated response to AT₁ receptor-mediated pressor and chronotropic effects. *J Clin Invest.* 101: 527–535.
- 37** Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M. (1998) Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell

apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life Sci.* 63: PL289–PL295.

38 Munzenmaier DH, Greene AS. (1996) Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. *Hypertension.* 27: 760–765.

Discussão

Na tabela 1 temos resultados comparativos quanto aos achados obtidos nos dois modelos de restrição alimentar gestacional (restrição proteica e desnutrição). A desnutrição resultou em proles bem menores quando comparadas àquelas provenientes de mães que receberam dieta hipoproteica. A elevação da pressão arterial na vida adulta foi muito maior nos animais provenientes de mães desnutridas quando comparados aos provenientes de mães gestacionalmente restritas a aporte protéico.

Nossos resultados demonstram que ratos machos adultos cujas mães foram alimentadas com baixa concentração de proteína, ou sofreram desnutrição durante a gestação, apresentam hipertensão arterial paralelamente a aumento da massa e volume ventricular esquerdo. O aumento da massa ventricular esquerda representa um marcador de falência do órgão em decorrência do longo efeito deletério da hipertensão arterial. A hipertrofia cardíaca pode aumentar muitas vezes os riscos de eventos cardiovasculares em função do aumento na demanda de oxigênio do tecido miocárdico hipertrófico, com diminuição na reserva coronária, do aumento e na prevalência e severidade das arritmias ventriculares, das alterações na contratilidade do miocárdio e finalmente ao prejuízo na função diastólica (SILVA e KRIEGER, 2000).

Atualmente as estratégias utilizadas para investigação do problema têm por objetivo identificar os fatores que desencadeiam esta resposta (fatores hemodinâmicos, neuro-humorais e primários ou genéticos), e as vias de transdução de sinais que estão sendo ativadas em face de um determinado

estímulo bem como os componentes da reprogramação gênica que levaria às transformações do coração (hipertrofia cardíaca) que resultarão em alterações estruturais e/ou funcionais. Como sabidamente a hipertrofia ventricular esquerda envolve aumento dos cardiomiócitos e fibrose intersticial, nós investigamos (Artigo I), pela técnica de picrossírius, a distribuição de colágeno na matriz extracelular. Nossos resultados demonstram que em ratos adultos submetidos à restrição proteica gestacional ocorre menor concentração colagênica intersticial e perivascular envolvendo a vasculatura arterial coronária intramural.

Em modelos animais de doença cardíaca hipertensiva, o aumento do colágeno intersticial está associado com a falência cardíaca diastólica, enquanto que a degradação de componentes do perimísio e endomísio é acompanhada pela dilatação ventricular e falência cardíaca sistólica (IWANAGA *et al.*, 2002). Estes dados sugerem que a transição, a partir da hipertrofia ventricular esquerda compensatória, para a falência cardíaca, está associada com a degradação da MEC (BERK *et al.*, 2007). Nas fases iniciais da doença cardíaca hipertrófica, o processo predominante é o aumento na síntese de proteínas dos cardiomiócitos e da matriz. A resposta natural do organismo ao aumento na síntese de elementos da MEC é aumentar a atividade e quantidade de enzimas que degradam estes elementos. Entretanto, no coração a degradação da MEC pode não ser benigna. Diez *et al.*, em 2001, verificaram degradação de colágeno em pacientes com doença cardíaca hipertrófica durante o processo de deterioração da função sistólica. No Artigo I, observamos que a elevação da pressão arterial teve início na 8ª semana de

vida e permaneceu até a 16ª semana. Desta forma, conseguimos avaliar um período no qual já houve degradação de colágeno.

Vários sinais interdependentes têm sido implicados na ativação da resposta hipertrófica, e tanto o crescimento cardíaco quanto a severidade da hipertrofia são totalmente dependentes da interação de forças mecânicas com uma variedade de fatores autócrinos e/ou parácrinos e/ou endócrinos (DOSTAL e BAKER, 1998). A habilidade de antagonistas de receptores AT1 em bloquear a resposta hipertrófica induzida por estiramento sugere fortemente que a angio II tem papel central na hipertrofia por sobrecarga mecânica (DOSTAL e BAKER, 1998).

Diversos estudos indicam que, quando o coração esta sofrendo hipertrofia, os receptores de ANG II, particularmente AT1, são altamente expressos. Assim, no tecido cardíaco de ratos, durante o período neonatal, tanto o RNAm quanto o número de sítios de ligação para a ANG II são elevados de 2 a 4 vezes em relação aos valores encontrados no indivíduo adulto (SUZUKI *et al.*, 2005). Em ratos espontaneamente hipertensos verificou-se aumento de RNAm de AT1b no ventrículo cardíaco (IWAI *et al.*, 1992). Após infarto do miocárdio, Li *et al.* (1993) encontraram hipertrofia celular no miocárdio não infartado, paralelamente a uma quantidade duas vezes maior de ANG II nestas células.

A ANG II exerce seu efeito diretamente via ativação do receptor AT1. No Artigo I demonstramos aumento na expressão de AT1 paralelamente aos níveis não alterados de AT2, antagonista funcional da resposta à ativação de AT1.

Este desequilíbrio na relação AT1:AT2 pode estar envolvido na hipertrofia miocárdica observada neste modelo. Entretanto, são necessários estudos adicionais em tecidos e órgãos, para avaliar se essa alteração está envolvida na remodelação cardíaca, gênese e manutenção da hipertensão arterial ou se é consequência da sobrecarga sofrida pela prole submetida à restrição proteica gestacional. De forma semelhante, no Artigo II verificamos aumento na expressão de AT1, entretanto a expressão de AT2 foi extremamente maior, o que hipoteticamente inativaria a resposta de AT1, se considerarmos a ação antagonista dos receptores. Embora se saiba que ativação de AT1 induz a via mitogênica JAK/STAT, em ambos os modelos houve redução de proteínas desta via, sugerindo que esta não seja a principal via envolvida na hipertrofia e hipertensão observadas nestes animais. Um outro mecanismo desencadeado pela ativação de AT1 envolve a ativação de MAPKs – como ERK1/2, que está fortemente associada à hipertrofia de cardiomiócitos (ISHIDA *et al.*, 1998). Nossos dados corroboram esta hipótese, visto que nos dois modelos verificamos aumento significativo na expressão de ERK1.

Um resultado bastante destoante e surpreendente foi o aumento na expressão de AT2 verificado no Artigo II. D'Amore *et al.* (2005) documentaram claramente que a hipertrofia de cardiomiócitos isolados dependente de AT1 não é afetada pela expressão de AT2. Usando um adenovírus expressando AT2, estes autores demonstraram que este receptor causa hipertrofia constitutiva nos cardiomiócitos por uma via independente de ERK 1/2. Tem sido descrita uma nova via pró-hipertrofica ativada pelo AT2 envolvendo a ligação deste receptor a uma proteína *zinc finger* promielocítica, que após

translocação para o núcleo ativa a síntese protéica (SENBONMATSU *et al.*, 2003).

Tabela 1 - Comparação entre os resultados obtidos nos dois modelos: restrição proteica (LP) e desnutrição (FR50).

	LP	FR50
Peso ao nascer	↓8,48%	↓17%
Pressão arterial 12 sem	↑2,79%	↑14,16%
Expressão de AT1	↑62,83%	↑52%
Expressão de AT2	=	↑659%
Expressão de ERK1	↑15,68%	↑30,46%
Expressão de PI3K	↓54,62%	=
Expressão de JAK2	↓somente imuno	↓72%
Expressão de STAT3	↓44,83%	↓59,7%

Quanto à gênese destes achados, existem muitos estudos com ratos demonstrando que a exposição fetal a dieta hipoproteica ou desnutrição está associada à anormalidade no crescimento do feto e no desenvolvimento dos órgãos. Entretanto existem controvérsias quanto aos mecanismos pelos quais a restrição protéica materna afeta o desenvolvimento cardíaco. Alterações endócrinas em virtude da baixa disponibilidade de nutrientes (ROSEBOOM *et al.*, 2000) e programação do eixo HPA devido ao estresse materno (SECKL, 2000) podem estar envolvidas. Alternativamente, tem sido proposto que a

exposição fetal a glicocorticóides de origem materna origina esta associação (LANGLEY-EVANS e NWAGWU, 1998). Corroborando esta hipótese, o tratamento neonatal com dexametasona em prole de ratos do 1º ao 3º dia de vida causa decréscimo permanente no peso do coração, bem como hipertrofia e degeneração precoce dos cardiomiócitos na vida adulta (DE VRIES *et al.*, 2002). Os glicocorticóides podem continuar atuando no período pós-natal, mediando efeitos adicionais de programação. Embora o aumento na atividade de glicocorticóide possa interferir no aumento pressórico por diversos fatores, nosso foco é o aumento na atividade do SRA causado pelos glicocorticóides, podendo promover vasoconstrição e aumento na resistência vascular periférica.

O presente estudo demonstrou que a desnutrição materna tem efeitos mais severos quando comparada à restrição protéica no que diz respeito ao peso da prole no nascimento e à elevação da pressão arterial ao longo da vida do animal. Tanto a restrição protéica quanto a desnutrição materna gestacionais levam à elevação da pressão arterial, em machos adultos da prole, e modificações significativas na expressão dos receptores de ANG II e nas suas vias de sinalização. No modelo de restrição protéica, sugerimos a participação da transativação de vias de crescimento pelo receptor AT1, culminando em aumento da expressão de ERK, já que a expressão de AT2 não foi alterada. Já no modelo de desnutrição, além da transativação sugerida no outro modelo, hipotetizamos que haja a participação do receptor AT2, altamente expresso, causando hipertrofia constitutiva nos cardiomiócitos por uma via independente de ERK 1/2.

CONCLUSÕES

Experimentos em animais relacionados à programação nutricional são importantes no sentido de corroborar a hipótese proposta por Barker *et al.* (1994), e permitem os primeiros passos em busca da identificação dos mecanismos da programação metabólica. Diversos estudos nesse sentido sugerem que a deficiência ou a total ausência de um único grupo de nutrientes é responsável pelos efeitos da programação pré-natal. Além disso, parece claro que qualquer desequilíbrio proveniente da dieta materna pode promover adaptações fetais importantes, e a ocorrência dessas alterações durante um período crítico do desenvolvimento de modo geral resultam em modificações permanentes na fisiologia e no metabolismo da prole.

Neste trabalho, verificamos que os receptores AT1 estão mais expressos em animais submetidos tanto à restrição proteica quanto à desnutrição durante o período gestacional. Entretanto, no caso de uma restrição mais severa (modelo de desnutrição *in utero*), os receptores AT2 encontram-se surpreendentemente alterados, sugerindo uma via alternativa à ANG II como causa da hipertrofia ventricular esquerda. O aumento de deposição de colágeno na MEC também foi observado, bem como os valores pressóricos de animais de ambos os modelos de subnutrição gestacional, corroborando nossa hipótese.

Adicionalmente, verificamos aumento na distância ano-genital de machos submetidos à desnutrição intra-uterina (Anexo II), o que sugere uma possível passagem de hormônios esteróides andrógenos pela placenta, pela desativação da enzima 11 β -HSD2.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asanuma K, Magid R, Johnson C, Nerem RM, Galis ZS. Uniaxial strain upregulates matrix-degrading enzymes produced by human vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H1778–H1784.
- Arai Y, Gorski RA: Critical exposure time for androgenization of the developing hypothalamus in the female rat. *Endocrinology*. 1968; 82:1010–1014.
- Baker KM, Chernin MI, Schreiber T, Sanghi S, Haiderzaidi S, Booz GW, Dostal DE, Kumar R. Evidence of a novel intracrine mechanism in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Regul Pept*. 2004 Aug 15;120(1-3):5-13.
- Barker D. *In utero* programming of chronic disease. *Clinical Science*. 1998; 95:115–128.
- Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today*. 1995; 1:418–423.
- Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Phipps K, Clark PMS. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 1993; 7:36-62.
- Barker DJP, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds, SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989. 577-580.
- Barker DJ, Osmond C. Low birth weight and hypertension. *Bmj* 1988; 297:134–135.
- Bauer R, Walter B, Bauer K, Klupsch R, Patt S, Zwiener U. Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets. *Acta Physiol Scand*. 2002; 176:83–90.
- Beitens IZ, Bayard F, Ances IG, Kowarski A, Migeon CJ: The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental

- passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr Res.* 1973; 7:509–519.
- Benediktsson R, Brennand J, Tibi L, Calder AA, Seckl JR, Edwards CRW: Fetal osteocalcin levels are related to placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Clin Endocrinol.* 1995; 42:551–555.
- Benediktsson R, Calder AA, Edwards CRW, Seckl JR: Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is the placental barrier to maternal glucocorticoids: Ex vivo studies. *Clin Endocrinol.* 1997; 46:161–166.
- Benediktsson R, Lindsay R, Noble J, Seckl JR, Edwards CRW. Glucocorticoid exposure in utero: A new model for adult hypertension. *Lancet.* 1993; 341:339–341.
- Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest.* 2007; 117(3):568-75. Review.
- Berry LM, Polk DH, Ikegami M, Jobe AH, Padbury JF, Ervin MG. Preterm newborn lamb renal and cardiovascular responses after fetal or maternal antenatal betamethasone. *Am J Physiol.* 1997; 41:R1972–R1979.
- Bian XP, Seidler FJ e Slotkin TA. Fetal dexamethasone exposure interferes with establishment of cardiac noradrenergic innervation and sympathetic activity. *Teratology.* 1993; 47 109–117.
- Bian XP, Seidler FJ e Slotkin TA. Promotional role for glucocorticoids in the development of intracellular signalling: enhanced cardiac and renal adenylate cyclase reactivity to β -adrenergic and non-adrenergic stimuli after low-dose fetal dexamethasone exposure. *Journal of Developmental Physiology.* 1992; 17 289–297.
- Brawley L, Poston L, Hanson MA. Mechanisms underlying the programming of small artery dysfunction: review of the model using low protein diet in pregnancy in the rat. *Arch Physiol Biochem.* 2003a; 111:23–35.

- Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker A, Bertram C, Poston L, Hanson M. Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr Res*. 2003b; 54:83–90.
- Brenner BM, Chertow GM. Congenital oligonephropathy and the etiology of adult hypertension and progressive renal injury. *Am J Kidney Dis*. 1994; 23:171–175.
- Campbell AL, Murphy BEP: The maternal-fetal cortisol gradient during pregnancy and at delivery. *J Clin Endocrinol Metab*. 1977; 45:435–440.
- Celsi G, Kistner A, Aizman R, Eklof AC, Ceccatelli S, Desan-tiago A, Jacobson SH. Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. *Pediatr Res*. 1998; 44:317–322.
- Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR. Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev*. 2006; 25:99-113.
- Cleal JK, Poore KR, Boullin JP, *et al*. Mismatched pre- and postnatal nutrition leads to cardiovascular dysfunction and altered renal function in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104, 9529–9533.
- Coates D. The angiotensin converting enzyme (ACE). *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35:769–773.
- Cole J, Ertoy D, Bernstein KE. Insights derived from ACE knockout mice. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2000; 1:137–141.
- Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, Schmid W, Aguzzi A, Schutz G: Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids*. 1995; 60:93–96.
- Corvol P, Williams TA, Soubrier F. Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol*. 1995; 248:283–305.
- D'Amore A, Black MJ, Thomas, WG. The angiotensin II type 2 receptor causes constitutive growth of cardiomyocytes and does not antagonize angiotensin

- II type 1 receptor-mediated hypertrophy. *Hypertension*. 2005; 46: 1347-1354.
- Dave-Sharma S, Wilson RC, Harbison MD, Newfield R, Azar M, Krozowski ZS, Funder JW, Shackleton CHL, Bradlow HL, Wei JQ, Hertecant J, Moran A, Neiberger RE, Balfe JW, Fat-tah A, Daneman D, Akkurt HI, Desantis C, New MI: Extensive personal experience: Examination of genotype and phenotype relationships in 14 patients with apparent mineralocorticoid excess. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83:2244–2254.
- De Rooji SR, Painter RC, Roseboom TJ, *et al*. Glucose tolerance at age 58 and the decline of glucose tolerance in comparison with age 50 in people prenatally exposed to the Dutch famine. *Diabetologia*. 2006; 49:637-643.
- de Simone G, de Divitiis O. Extracellular matrix and left ventricular mechanics in overload hypertrophy. *Adv Clin Path*. 2002; 6:3-10.
- de Vries WB, van der Leij FR, Bakker JM, Kamphuis PJ, van Oosterhout MF, Schipper ME, Smid GB, Bartelds B, van Bel F. Alterations in adult rat heart after neonatal dexamethasone therapy. *Pediatr Res*. 2002; 52(6): 900-906.
- Desai M, Crowther NJ, Lucas A, Hales CN. Organ-selective growth in the offspring of protein-restricted mothers. *Br J Nutr*. 1996; 76:591-603.
- Desai M, Gayle G, Babu J, Ross MG. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *Am J Obst Gynecol*. 2005; 193:1224-1232.
- Desai M, Hales CN. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev*. 1997; 72:329-48.
- Diaz R, Brown RW, Seckl JR: Ontogeny of mRNAs encoding glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and 11 β -hydroxy-steroid dehydrogenases in prenatal rat brain development reveal complex control of glucocorticoid action. *J Neurosci*. 1998; 18:2570–2580.

- Diaz R, Fuxe K, Ogren SO: Prenatal corticosterone treatment induces long-term changes in spontaneous and apomorphine-mediated motor activity in male and female rats. *Neuroscience*. 1997; 81:129–140.
- Dostal DE, Baker KM. Angiotensin and endothelium: messengers that couple ventricular stretch to the Na^+/H^+ exchanger and cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 1998; 83(8): 870-873.
- Drake AJ, Walker BR. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *Journal of Endocrinology*. 2004; 180:1–16.
- Edwards LJ, McMillen IC. Impact of maternal undernutrition during the periconceptual period, fetal number, and fetal sex on the development of the hypothalamo-pituitary adrenal axis in sheep during late gestation. *Biol Reprod*. 2002a; 66, 1562–1569.
- Edwards LJ, McMillen IC. Periconceptual nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002b; 283, R669–R679.
- Edwards LJ, McFarlane JR, Kauter KG, McMillen IC. Impact of periconceptual nutrition on maternal and fetal leptin and fetal adiposity in singleton and twin pregnancies. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288, R39–R45.
- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Winter PD, Osmond C, Barker DJ. Catch-up growth in childhood and death from coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ*. 1999; 318, 427–431.
- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ. Early growth and coronary heart disease in later life: longitudinal study. *BMJ*. 2001; 322, 949–953.

- Esther CR, Marino EM, Howard TE, Machaud A, Corvol P, Capecchi MR, Bernstein KE. The critical role of tissue angiotensin-converting enzyme as revealed by gene targeting in mice. *J Clin Invest.* 1997; 99:2375–2385.
- Forsdahl A. Observations throwing light on the high mortality in the county of Finnmark. Is the high mortality today a late effect of very poor living conditions in childhood and adolescence? *Int J Epidemiol.* 2002; 31:302–308.
- Fordshal S. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *British Journal of Preventive and Social Medicine.* 1967; 3:249–256.
- Forrester T, McFarlane-Anderson N, Bennett FI, *et al.* The angiotensin converting enzyme and blood pressure in Jamaicans. *Am J Hypertens.* 1997; 10:519–524.
- Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21:29-37
- Funck RC, Wilke A, Rupp H, Brilla CG. Regulation and role of myocardial collagen matrix remodeling in hypertensive heart disease. *Adv Exp Med Biol.* 1997; 432:35- 44
- Gardner DS, Pearce S, Dandrea J, *et al.* Peri-implantation undernutrition programs blunted angiotensin II evoked baroreflex responses in young adult sheep. *Hypertension.* 2004; 43, 1290–1296.
- Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth cells. *Circ Res.* 1988; 62: 749-756.
- Gilbert JS, Lang AL, Grant AR, Nijland MJ. Maternal nutrient restriction in sheep: hypertension and decreased nephron number in offspring at 9 months of age. *J Physiol.* 2005; 565:137–147.

- Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15:183-7.
- Goland RS, Jozak S, Warren WB, Conwell IM, Stark RI, Tropper PJ: Elevated levels of umbilical cord plasma corticotropin-releasing hormone in growth-retarded fetuses. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77:1174–1179.
- Goland RS, Tropper PJ, Warren WB, Stark RI, Jozak SM, Conwell IM: Concentrations of corticotropin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7:1227–1230.
- Gustafsson JA, Stenberg A: Neonatal programming of androgen responsiveness of liver of adult rats. *J Biol Chem.* 1974; 249:719–723.
- Hanson M. Birth weight and the fetal origins of adult disease. *Pediatr Res.* 2002; 52:473-4.
- Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 102:90-93.
- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S: Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol.* 1994; 6:341–345.
- Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. *Lab Invest.* 1991; 64:777–784.
- Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, Howard CV, van Velzen D. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992; 99:296–301.
- Holemans K, Gerber R, Meurrens K, De CF, Poston L, Van Assche FA. Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular

- function but not blood pressure of rat female offspring. *Br J Nutr.* 1999; 81:73–79.
- Hunyady L, Catt KJ. Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. *Mol Endocrinol.* 2006; 20: 953–970.
- Huxley R, Neil A, Collins R. Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birth weight and subsequent blood pressure? *Lancet.* 2002; 360:659-665.
- Ishida M, Ishida T, Thomas SM, Berk BC. Activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) by angiotensin II is dependent on c-Src in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.*1998; 82(1):7-12.
- Iwai N, Kurtz TW, Inagami T. Further evidence of the AS gene as a candidate gene contributing to the hypertension in spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 188(1):64-69.
- Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39(8): 1384-1391.
- Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Chancey AL, Stewart JA Jr. The dynamic interaction between matrix metalloproteinase activity and adverse myocardial remodeling. *Heart Fail Rev.* 2004; 9:33– 42.
- Jones SE, Bilous RW, Flyvbjerg A, Marshall SM. Intra-uterine environment influences glomerular number and the acute renal adaptation to experimental diabetes. *Diabetologia.* 2001; 44:721–728.
- Kannel WB, Dannenberg AL, Levy D. Population implications of electrocardiographic left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol.* 1987; 60: 851–931.

- Kari MA, Hallman M, Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M, Ikonen RS: Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: A randomized placebo-controlled multicenter study. *Pediatrics*. 1994; 93:730–736.
- Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*. 2000; 127:4195-4202.
- Kwong WY, Miller DJ, Ursell E, *et al.* Imprinted gene expression in the rat embryo-fetal axis is altered in response to periconceptual maternal low protein diet. *Reproduction*. 2006; 132:265-277.
- Kwong WY, Miller DJ, Wilkins AP, *et al.* Maternal low protein diet restricted to the preimplantation period induces a gender-specific change on hepatic gene expression in rats fetuses. *Mol Reprod Dev*. 2007; 74:48-56.
- Langdown ML, Holness MJ e Sugden MC. Effects of prenatal glucocorticoid exposure on cardiac calreticulin and calsequestrin protein expression during early development and in adulthood. *Biochemical Journal*. 2003; 371: 61–69.
- Langdown ML, Holness MJ e Sugden MC. Early growth retardation induced by excessive exposure to glucocorticoids in utero selectively increases cardiac GLUT1 protein expression and Akt/protein kinase B activity in adulthood. *Journal of Endocrinology*. 2001a; 169: 11–22.
- Langdown ML, Smith ND, Sugden MC e Holness MJ. Excessive glucocorticoid exposure during late intrauterine development modulates the expression of cardiac uncoupling proteins in adult hypertensive male offspring. *Pflugers Archiv – European Journal of Physiology*. 2001b; 442: 248–255.

- Langley-Evans SC. *Fetal nutrition and adult disease – Programming of Chronic Disease through Fetal Exposure to Undernutrition*. CABI Publishing, UK. 2004.
- Langley-Evans SC. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc*. 2001; 60:505–513.
- Langley-Evans SC, Jackson AA. Captopril normalises systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1995; 110:223–228.
- Langley-Evans SC, Nwagwu M. Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rats fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life Sci*. 1998; 63(7): 605-615.
- Langley-Evans SC, Philips G, Benediktsson R, Gardner D, Edwards CRW, Jackson AA, Seckl JR. Maternal dietary protein restriction, placental glucocorticoid metabolism and the program of hypertension. *Placenta*. 1996a; 17:169–172.
- Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)*. 1996b; 91:607-615.
- Law CM, de SM, Osmond C, Fayers PM, Barker DJ, Cruddas AM, Fall CH. Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. *BMJ*. 1993; 306:24–27.
- Levitt N, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR: Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology*. 1996; 64:412–418.
- Li P, Zhang X, Capasso JM, Meggs LG, Sonneblich EH, Anversa P. Myocyte loss and left ventricular failure characterize the long term effects of

- coronary artery narrowing or renal hypertension in rats. *Cardiovasc Res.* 1993; 27(6):1066-1075.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CRW, Seckl JR: Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension.* 1996a; 27:1200–1204.
- Lindsay RS, Lindsay RM, Waddell B, Seckl JR: Programming of glucose tolerance in the rat: Role of placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Diabetologia.* 1996b; 39:1299–1305.
- Lopez-Bernal A, Flint APF, Anderson ABM, Turnbull AC. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity (E.C.1.1.1.146) in human placenta and decidua. *J Steroid Biochem.* 1980; 13:1081–1087.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: Bock, G.R. and Whelan, J. (eds) *The Childhood Environmental and Adult Disease.* John Wiley e Sons, Chichester, UK, pp. 38-55. 1991.
- McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* 2005; 85:571-633.
- McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptual and foetal nutrition. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 102, 82–89.
- Meaney MJ, Aitken DH, Viau V, Sharma S, Sarrieau A: Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology.* 1989; 50:597–604.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292: C82–C97.

- Miyata S, Haneda T. Hypertrophic growth of cultured neonatal rat heart cells mediated by type 1 angiotensin II receptor. *Am J Physiol.* 1994;266 (6 Pt 2): H2443-51.
- Mosier HD Jr, Dearden LC, Jansons RA, Roberts RC, Biggs CS. Disproportionate growth of organs and body weight following glucocorticoid treatment of the rat fetus. *Dev Pharmacol Ther.* 1982; 4:89–105.
- Murray GI Matrix. metalloproteinases: a multifunctional group of molecules. *J Pathol.* 2001; 195: 135-137.
- Murphy BEP, Clark SJ, Donald IR, Pinsky M, Vedady DL. Conversion of maternal cortisol to cortisone during placental transfer to the human fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 1974; 118:538–541.
- Nguyen G, Delarue F, Burckle C, Bouzahir L, Giller T, Sraer JD. Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *J Clin Invest* 2002; 109: 1417–1427.
- Novy MJ, Walsh SW: Dexamethasone and estradiol treatment in pregnant rhesus macaques: Effects on gestation length, maternal plasma hormones and fetal growth. *Am J Obstet Gynecol.* 1983; 145:920–930.
- Nyirenda MJ, Lindsay RS, Kenyon CJ, Burchell A e Seckl JR. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *Journal of Clinical Investigation.* 1998; 15:2174–2181.
- Ortiz LA, Quan A, Zarzar F, Weinberg A, Baum M. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension.* 2003; 41:328–334.
- Painter RC, de Rooji SR, Bossuyt PM, *et al.* Early onset of coronary artery disease after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84:322-327.

- Pladys P, Sennlaub F, Brault S, Checchin D, *et al.* Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet in utero. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289:R1580–R1588.
- Ravelli AC, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70:811-816.
- Redei E, Halasz I, Li LF, Prystowsky MB, Aird F: Maternal adrenalectomy alters the immune and endocrine functions of fetal alcohol-exposed male offspring. *Endocrinology.* 1993; 133:452–460.
- Reinisch JM, Simon NG, Karwo WG, Gandelman R: Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intra-uterine growth. *Science.* 1978; 202:436–438.
- Rich-Edwards JW, Stampfer MJ, Manson JE, Rosner B, Hankinson SE, Colditz GA, Willett WC e Hennekens CH. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *British Medical Journal.* 1997; 315: 396-400.
- Rogerson FM, Kayes KM, White PC: Variation in placental type 2, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity is not related to birth weight or placental weight. *Mol Cell Endocrinol.* 1997; 128:103–109.
- Rose G. Familial patterns in ischaemic heart disease. *British Journal of Preventive and Social Medicine.* 1964; 18:75-80.
- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, Bleker OP. Link between prenatal exposure to the “Winter of Famine” and long-term medical consequences. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2000; 144(52): 2488-2491.
- Seckel, J.M., Meaney, M.J. Glucocorticoid programming. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1032: 63-84.

- Seckel JR, Cleasby M, Nyirenda MJ. Glucocorticoids, 11b-hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney International*. 2000; 57:1412-1417.
- Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price E Jr, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signalling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J*. 2003; 22: 6471–6482.
- Shanmugan S, Corvol P, Gasc JM. Angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in the developing cardiopulmonary system of the rat. *Hypertension*. 1996; 28: 91–97.
- Sherman RC, Langley-Evans SC. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci (Lond)*. 2000; 98:269–275.
- Silva GJJ, Krieger, JE. Hipertrofia ventricular esquerda na hipertensão arterial. *Hipertensão*. 2000; 3: 156-160.
- Sinclair KD, Singh R. Modelling the developmental origins of health and disease in the early embryo. *Theriogenology*. 2007; 67, 43–53.
- Stewart PM, Rogerson FM, Mason JI: Type 2, 11b-hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; 80:885–890.
- Suzuki H, Motley ED, Frank GD, Utsunomiya H, Eguchi S. Recent progress in signal transduction research of the angiotensin II type-1 receptor: protein kinases, vascular dysfunction and structural requirement. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005; 3: 305–322.
- Tangalakakis K, Lumbers ER, Moritz KM, Towstoles MK, Wintour EM: Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. *Exp Physiol*. 1992; 77:709–717.

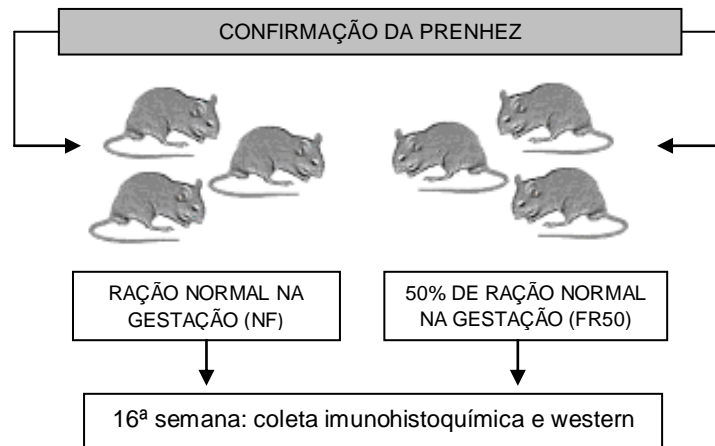
- Tonolo G, Fraser R, Connell JMC, Kenyon CJ: Chronic low-dose infusions of dexamethasone in rats: Effect on blood pressure, body weight and plasma atrial natriuretic peptide. *J Hypertens*. 1988; 6:25-31.
- Torrens C, Brawley L, Barker AC, Itoh S, Poston L, Hanson MA. Maternal protein restriction in the rat impairs resistance artery but not conduit artery function in pregnant offspring. *J Physiol*. 2003; 547:77–84.
- Torrens C, Brawley L, Anthony FW, *et al*. Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. *Hypertension*. 2006; 47:982–987.
- Unger T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2002; 89:3A–9A.
- Wang TL, Yang YH, Chang H, Hung CR. Angiotensin II signals mechanical stretch-induced cardiac matrix metalloproteinase expression via JAK-STAT pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Sep;37(3):785-94.
- Watkins A, Wilkins A, Osmond C, *et al*. The influence of mouse Ped gene expression on postnatal development. *J Physiol*. 2006; 571:211–220.
- Watkins AJ, Fleming TP. Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter. *Journal of Anatomy*. 2009; 215:52-59.
- Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, *et al*. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:5449–5454.
- Watkins AJ, Ursell E, Panton R, *et al*. Adaptative responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease. *Biol Reprod*. 2008a; 78:299-306.

- Watkins AJ, Wilkins A, Cunningham C, *et al.* Low protein diet fed exclusively during mouse oocyte maturation leads to behavioural and cardiovascular abnormalities in offspring. *J Physiol.* 2008b; 586, 2231–2244.
- Weber KT, Clark WA, Janicki JS, Shroff SG. Physiologic versus pathologic hypertrophy and the pressure-overloaded myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1987; 10 Suppl 6: S37–S50.
- Weber KT, Swamynathan SK, Guntaka RV, Sun Y. Angiotensin II and extracellular matrix homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31(3-4): 395-403. Review
- Weinstock M, Matlina E, Maor GI, Rosen H, McEwen BS. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary adrenal system in the female rat. *Brain Res.* 1992; 595:195–200.
- Widdowson EM, McCance RA. A review: new thoughts on growth. *Pediatr Res.* 1975; 9:154-6.
- Winick M, Noble A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr.* 1966; 89:300-6.
- Woods LL, Ingelfinger JR, Rasch R. Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 289:R1131–R1136.
- Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 73–82.

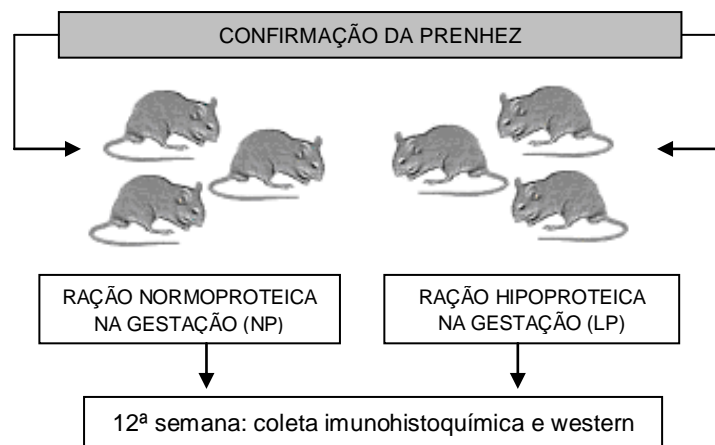
ANEXOS

I – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL

Modelo Desnutrição:



Modelo Restrição Proteica:



II – DISTÂNCIA ANO-GENITAL – MODELO DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA

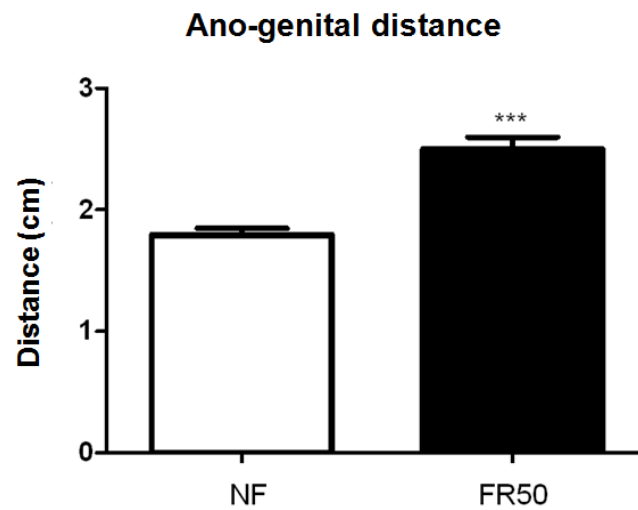


Gráfico representando a diferença entre os valores de distância ano-genital em ratos recém-nascidos submetidos à desnutrição intra-uterina (FR50, $2,56 \pm 0,11$ v $1,81 \pm 0,05$ in NF, $p < 0,001$)