



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Bianca Martins Gregório

**Suplementação materna com óleo de peixe e efeitos
cardiovasculares na prole adulta de ratos submetidos
à restrição protéica perinatal**

Rio de Janeiro

2007

Bianca Martins Gregório

**Suplementação materna com óleo de peixe e efeitos
cardiovasculares na prole adulta de ratos submetidos à
restrição protéica perinatal**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Morfologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2007

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CB/A

G821 Gregório, Bianca Martins.
Suplementação materna com óleo de peixe e efeitos cardiovasculares na prole adulta de ratos submetidos à restrição protéica perinatal / Bianca Martins Gregorio. – 2007
55 p.: il.

Orientadora: Márcia Barbosa Aguilá.
Coorientador: Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda
Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Restrição protéica materna – Teses. 2. Óleo de peixe – Teses. 3. Sistema cardiovascular – Teses. I. Aguilá, Marcia Barbosa. II. Universidade do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título

CDU 618.2:613.2

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Bianca Martins Gregorio

**Suplementação materna com óleo de peixe e efeitos
cardiovasculares na prole adulta de ratos submetidos à
restrição protéica perinatal**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Morfologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 17 de janeiro de 2007.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Marcia Barbosa Aguila (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Ângela de Castro Resende
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Lúcia Marques Vianna
Universidade Federal do Estado do Rio – UniRio

Rio de Janeiro

2007

DEDICATÓRIA

Á toda a minha família, em especial mãe e avó, pela dedicação integral, pelo amor e incentivo constantes na realização desse trabalho.

Ao meu avô querido, que mesmo não estando mais entre nós, sempre lutou muito pelo meu sucesso.

A todos que fazem da pesquisa científica um elemento essencial da vida!!!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a virgem Maria por iluminarem e guiarem todos os passos da minha vida.

Aos meus pais e a minha família, a quem devo minha vida, meus valores e meus princípios.

Aos meus orientadores Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila e Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda; obrigada por construírem mais um pilar em minha vida! Sem o apoio incondicional dos senhores, esse trabalho não teria chegado ao fim!

Aos meus verdadeiros amigos de longa, longuíssima data, André e Vanessa. Obrigada por me aceitarem, principalmente nos momentos tensos, quando me torno extremamente tediosa (eu mesma reconheço!!!!) e por terem me apoiado sempre!! Digo e repito, vocês dois são os irmãos que não tive! Amo muito vocês!!!!!!!!!!!!!!

À Thatiany Marinho, que se tornou uma grande amiga nesses dois últimos anos!! Quantas conversas, quantos risos, quantas fotos nos momentos de descontração! Você realmente é o ápice!!! Agora falando sério, obrigada por todo o carinho e dedicação com o meu material!!!

A toda família LMMC, em especial aos amigos Fernanda Amorim, Rodrigo Neto e Vanessa Mello! Jamais vou esquecer o que vocês fizeram por mim quando fui obrigada a me ausentar por um mês!! Acho que o rompimento do tendão será inesquecível, né!? Valeu por tudo, e podem contar comigo sempre!!!

À inenarrável equipe sacrifício: Fernanda Amorim, Geraldo Silva, Thiago Torres (nosso fotógrafo oficial) e Vanessa Mello, e é claro aos nossos “mestres”, Caroline Fernandes e Leonardo Mendonça, que nos ensinaram tudo de eutanásia!!!! Obrigada meninos!

A todos os professores da Pós Graduação e por todos os outros que já passaram pela minha vida, em especial à Prof^a Lúcia Rodrigues, que me ensinou a crescer cada vez mais no mundo científico!

Quando a gente pensa que sabe todas as respostas, a vida vem e muda todas as perguntas.

Arquimedes

RESUMO

GREGÓRIO, Bianca Martins. *Suplementação materna com óleo de peixe e efeitos cardiovasculares na prole adulta de ratos submetidos à restrição protéica perinatal*. 2007. 67 f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Fêmeas Wistar foram alimentadas durante o período gestacional e a primeira metade da lactação (10 primeiros dias de lactação) com dieta normoprotéica (19 g proteína / Kg dieta) (grupo NP) e dieta restrita em proteínas (5 g proteína / Kg dieta) (grupo LP). Paralelamente a este esquema de alimentação, elas também receberam, diariamente, por gavagem, o óleo de peixe (Fo, rico em ácido graxo poliinsaturado- AGPi n-3). Os filhotes foram subdivididos em 4 grandes grupos: NP, NP-Fo, LP e LP-Fo, sendo acompanhados até os 6 meses de idade, data na qual ocorreu a eutanásia. No momento do sacrifício, o coração foi removido e devidamente preparado para a análise em microscopia de luz e estereologia. A partir do terceiro mês, os animais do grupo LP (ambos os gêneros) exibiram um aumento na pressão arterial sistólica (hipertensão moderada), mantendo esse comportamento até o final do experimento (6 meses de idade). No entanto, a suplementação materna com o Fo foi capaz de minimizar os efeitos da desnutrição sobre a pressão arterial. Não houve diferença significativa no índice corporal entre os grupos de mães suplementadas com o Fo. O ventrículo esquerdo do grupo LP (ambos os sexos) demonstrou maior espessura quando comparado ao grupo NP (+25% nos machos, $P=0,01$, +22% nas fêmeas, $P=0,001$); entretanto, o grupo LP-Fo manifestou menor espessura quando comparado com o grupo LP (-23% nos machos, $P=0,001$, -12% nas fêmeas, $P=0,02$). Os machos do grupo LP apresentaram significativamente menor vascularização intramiocárdica quando correlacionado ao grupo NP (-50%, $P=0,01$), enquanto os machos do grupo LP-Fo exibiram um incremento de 89% na microcirculação, quando comparados ao grupo LP ($P=0,004$). Ambos os gêneros do grupo LP manifestaram maior quantidade de fibrose intersticial quando comparados ao grupo NP. Vale ressaltar que a suplementação materna de Fo foi benéfica apenas no grupo LP. Sendo assim, nossos dados sugerem claramente que a suplementação materna com Fo, durante o período perinatal, é capaz de prevenir o remodelamento cardíaco adverso e a hipertensão provocados pela restrição protéica materna in útero e na lactação, tornando-se assim uma opção não farmacológica viável para a prevenção e/ou redução dos danos ocasionados pela programação em humanos.

Palavras-chave: Restrição protéica perinatal. Efeitos cardiovasculares. Óleo de peixe. Rato. Prole adulta.

ABSTRACT

Female Wistar rats fed in gestation and first 10 lactation days with normal protein diet (19 g protein/kg diet) (NP group) or low-protein diet (5g protein/kg diet) (LP group), also received daily fish oil supplement (Fo, n-3 PUFA rich) during same period. Offspring put in groups NP, NP-Fo, LP, LP-Fo, until sacrifice at 6-mo-old when hearts removed, prepared for light microscopy and stereology. There was mild hypertension in both LP genders from 3- until 6 mo-old. Blood pressure affected by undernutrition was minimized by maternal Fo supplementation. In body index between groups there was no significant difference with maternal Fo supplementation. The left ventricle was thicker in both genders of LP groups compared to counterpart NP groups (+25% in male LP group, $P=0.01$, +22% in female LP group, $P=0.001$); however, less thick in LP-Fo groups compared to LP groups (-23% in male LP-Fo group, $P=0.001$, - 12% in female LP-Fo group, $P=0.02$). Male LP group offspring had significantly smaller intramyocardial microcirculation than NP group (-50%, $P=0.01$), while male LP-Fo group had 89% higher microcirculation than LP group ($P=0.004$). Both gender LP group offspring had significantly higher interstitial fibrosis compared with NP groups. The maternal Fo supplementation has beneficial effects in LP , but not in NP offspring. In conclusion, our data clearly indicate postnatal hypertension and collateral cardiovascular adverse remodeling, programmed by low-protein diet in utero and lactation was prevented by perinatal supplementation with fish oil, n-3 PUFA rich, providing a viable non-pharmacologic option for preventing and/or reducing adverse programming outcomes in human.

Keywords: Perinatal protein restriction. Cardiovascular effects. Fish oil. Rat. Adult offspring.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Causas e conseqüências da programação intra-uterina	5
Figura 02	Formação dos eicosanóides a partir do AA e do EPA em diferentes tipos celulares ..	13

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Composição das duas dietas isocalóricas	17
Tabela 02	Composição dos ácidos graxos do óleo de peixe	19
Tabela 03	Massa corporal dos filhotes nos diferentes grupos ao nascimento	24
Tabela 04	Evolução da massa corporal dos diferentes grupos	25
Tabela 05	Evolução da pressão arterial sistólica- 3 aos 6 meses de idade	27
Tabela 06	Índice Gordura Corporal nos diferentes grupos aos 6 meses de idade	29
Tabela 07	Espessura da parede do ventrículo esquerdo nos diferentes grupos	31
Tabela 08	Foto da espessura da parede do ventrículo esquerdo	32
Tabela 09	Área seccional de cardiomiócitos A[cmi] nos diferentes grupos	34
Tabela 10	Relação artérias intramiocárdicas / cardiomiócitos [ima] / [cmi] nos diferentes grupos	35
Tabela 11	Densidade de comprimento de arterias intramiocárdicas nos diferentes grupos-Lv [ima]	36
Tabela 12	Densidade de volume interstício cardíaco nos diferentes grupos-Vv [int].....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidônico
A [cmi]	Área seccional média cardiomiócito
AG	Ácidos graxos NP Grupo normoprotéico
AGPi	Ácidos graxos poliinsaturados TNF-a Fator necrose tumoral a
ATP	Adenosina tri-fosfato
Cmi	cardiomiócito
CNA	Comprimento naso-anal
DCV	Doenças cardiovasculares IL Interleucina
DHA	Ácido docosahexaenóico NP-Fo Grupo normoprotéico com óleo de peixe
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EPA	Ácido eicosapentaenóico LP Grupo restrito em proteínas
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
11_-HSD-2	11 hidroxisteróide desidrogenase tipo 2
IGC	Índice de gordura corporal
ima	Artérias intramiocárdicas
[ima] / [cmi]	Razão vasos intramiocárdicos e cardiomiócitos
int	Interstício cardíaco
LP-Fo	Grupo restrito em proteínas com óleo de peixe
LT	Leucotrieno
Lv	Densidade de comprimento
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
NOS	Óxido nítrico sintase
ON	Óxido nítrico
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PG	Prostaglandina
PN	Peso ao nascer
PPAR	Peroxisome proliferatorsactivated receptors
PUFA	Ácidos graxos poliinsaturados
RCIU	Retardo crescimento intrauterino
SFA	Ácidos graxos saturados
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos

SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TL	Comprimento tibia
TX	Tromboxane
VE	Ventrículo esquerdo
Vv	Densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	1
1	OBJETIVOS	3
1.1	 Gerais	3
1.2	 Específicos	3
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	 Programação metabólica	4
2.2	 Óleo de peixe e a restrição protéica materna	10
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	 Animais e dieta	16
3.2	 Biometria dos animais	20
3.3	 Eutanásia	20
3.4	 Espessura do ventrículo esquerdo e estereologia	21
3.5	 Análise estatística	22
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43

INTRODUÇÃO

A desnutrição é um importante problema de saúde pública nos países subdesenvolvidos. Embora as doenças cardiovasculares estejam associadas com a prosperidade dos países desenvolvidos, estudos epidemiológicos mostram que, nos países pobres, as doenças cardiovasculares estão aumentando, principalmente na população de renda menor (Barker et al., 1993; Barker, 1998a).

Evidências crescentes demonstram que distúrbios nutricionais provocados durante o período gestacional resultam em baixo peso ao nascer e retardo de crescimento intra-uterino (Lobelo, 2005), podendo acarretar na prole maior susceptibilidade ao desenvolvimento futuro de hipertensão arterial sistêmica (HAS) e outros eventos cardiovasculares, uma vez que adaptações irreversíveis na estrutura e função dos órgãos pode ser induzida (Barker, 1998b; Falkner et al., 2004; Langley-Evans, 2004; Pires, 2006). É imperativo comentar que a hipótese da programação fetal de doenças crônicas detém importantes ramificações médicas e econômicas, e recentemente, tem sido proposto que intervenções durante a gestação e a lactação podem ser efetivas na prevenção da programação de doenças no adulto (Gluckman, 2004).

Sabe-se que durante a vida fetal, o crescimento do miocárdio é influenciado por condições nutricionais pré-natais, sendo acompanhado por intensos períodos de hiperplasia celular (proliferação do número de cardiomiócitos) (Almeida e Mandarim-de-Lacerda, 2005; Tappia e Gabriel, 2006). No entanto, a presença de um meio intra-uterino adverso (induzido, por exemplo, a partir da restrição protéica perinatal); modifica todo esse comportamento, ocasionando redução da proliferação de células cardíacas e trabalho intenso dos cardiomiócitos remanescentes, aumentando o seu tamanho (hipertrofia celular) e comprometendo a função cardíaca na vida pós-natal (Corstius et al., 2005; Desai et al., 2005; Catta-Preta et al., 2006; Tappia e Gabriel, 2006).

É relevante estudar o efeito da suplementação de nutrientes específicos, como os lipídios dietéticos, no tratamento ou prevenção das conseqüências da desnutrição materna. Os lipídios são compostos por ácidos graxos com cadeias de diferentes comprimentos e com diferentes graus de saturação. O grau de saturação dos diferentes lipídios é de grande interesse por causa dos seus efeitos na saúde. Os ácidos graxos são classificados em três famílias: ácidos graxos poliinsaturados, ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos saturados (Charnock et al., 1992).

No que concerne à terapêutica, estudiosos sugerem que os ácidos graxos poliinsaturados (AGP) n-3 têm a capacidade de prevenir as doenças cardiovasculares (DCV) (Lombardo et al., 1996; Engler et al., 2003; Kris-Etherton et al., 2003). O óleo de peixe é rico em AGP da família n-3, o ácido eicosapentaenóico (EPA – 20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA – 22:6n-3), que estão relacionados com várias reações biológicas no organismo, as quais culminam, por exemplo, com a redução da pressão arterial sistólica em animais (Aguila et al., 2004; Aguila et al., 2005b; Medeiros et al., 2005) e em humanos (Bonaa et al., 1990; Morris et al., 1993). Ademais, recentes estudos ainda questionam a possibilidade de que o aumento da ingestão desses AG durante o período gestacional pode ser capaz de elevar o peso ao nascer, e assim reduzir o risco de desenvolvimento de DCV, principalmente em proles oriundas de mães submetidas à restrição protéica perinatal (Allen e Harris, 2001; Banning, 2005; Olafsdottir et al., 2005). Nesse sentido, a comunidade científica sugere que o aporte adequado de AG n-3 durante a gestação e lactação seja determinante para o crescimento e desenvolvimento perinatal adequado, protegendo a criança de conseqüências adversas na vida pós-natal (Sattar, 1998).

O presente estudo se baseou na hipótese de que a suplementação com óleo de peixe (durante a gestação e lactação em ratas que receberam dieta hipoprotéica) poderia amenizar, ou mesmo evitar, que filhotes desenvolvessem doenças crônico-degenerativas na fase adulta. Nesta linha de pensamento, o óleo de peixe pode ser entendido como fator que pode vir a evitar o *imprint* metabólico.

OBJETIVOS DO TRABALHO

Gerais:

Estudar as alterações na morfologia e estereologia do miocárdio e na pressão arterial de ratos adultos Wistar aos seis meses de idade (estudando separadamente machos e fêmeas), cujas mães receberam dieta hipoprotéica durante a gestação e no início da lactação, e que foram tratadas com óleo de peixe por gavagem. Comparar os resultados do grupo experimental com o grupo controle.

Específicos:

- Acompanhar a evolução ponderal e da pressão arterial dos ratos dos grupos experimentais, cujas mães foram suplementadas com óleo de peixe ou não.
- Estudar a estrutura do miocárdio com ferramentas da estereologia, dos ratos dos grupos experimentais, cujas mães foram suplementadas com óleo de peixe ou não.

REVISÃO DA LITERATURA

Programação Metabólica

O período gestacional corresponde a um momento único na vida de qualquer mamífero, sendo heterogêneo em diversos aspectos (psicológicos, metabólicos, nutricionais e fisiológicos), e acompanhado desde o início de modificações nos compartimentos materno e fetal (Morais et al., 1997) . Sabe-se que modificações hemodinâmicas maternas que surgem durante a gestação consistem basicamente na expansão do volume plasmático e no aumento do débito cardíaco, os quais se encarregarão de fornecer nutrientes e oxigênio ao feto de forma satisfatória até o final da gravidez (Borges, 2001). Entretanto, alguns fatores de risco podem interferir no curso normal e esperado da gestação. Dentre eles, podemos citar a qualidade da dieta materna, que pode “programar” o bebê, e assim torná-lo mais susceptível ao surgimento de DCV na vida adulta (Barker et al., 2001).

Trabalhos experimentais (Langley-Evans, 2001; Falkner, 2002; Catta-Preta et al., 2006; Pires, 2006) e epidemiológicos (Barker et al., 2001) relatam que diversas desordens metabólicas manifestadas na vida adulta apresentam suas raízes datando de períodos embrionários. De fato, na vida fetal, os tecidos e órgãos do corpo passam por fases críticas de desenvolvimento, as quais coincidem com períodos de intensa divisão celular. Se, durante estas fases, adversidades estiverem presentes, todo organismo do feto é forçado a desenvolver mecanismos compensadores, o que chamamos de programação fetal ou programação metabólica (Godfrey e Barker, 2000). Nesse sentido, conforme observado na Figura 1, na carência de nutrientes ou de oxigênio todo o meio ambiente do feto (hormonal e metabólico) é alterado, implicando no aumento do risco cardiovascular (Fowden et al., 2006). O fator nutricional também é imperativo no epigenótipo. Evidências recentes já associam doenças futuras com alterações na expressão genética (Fowden et al., 2006).

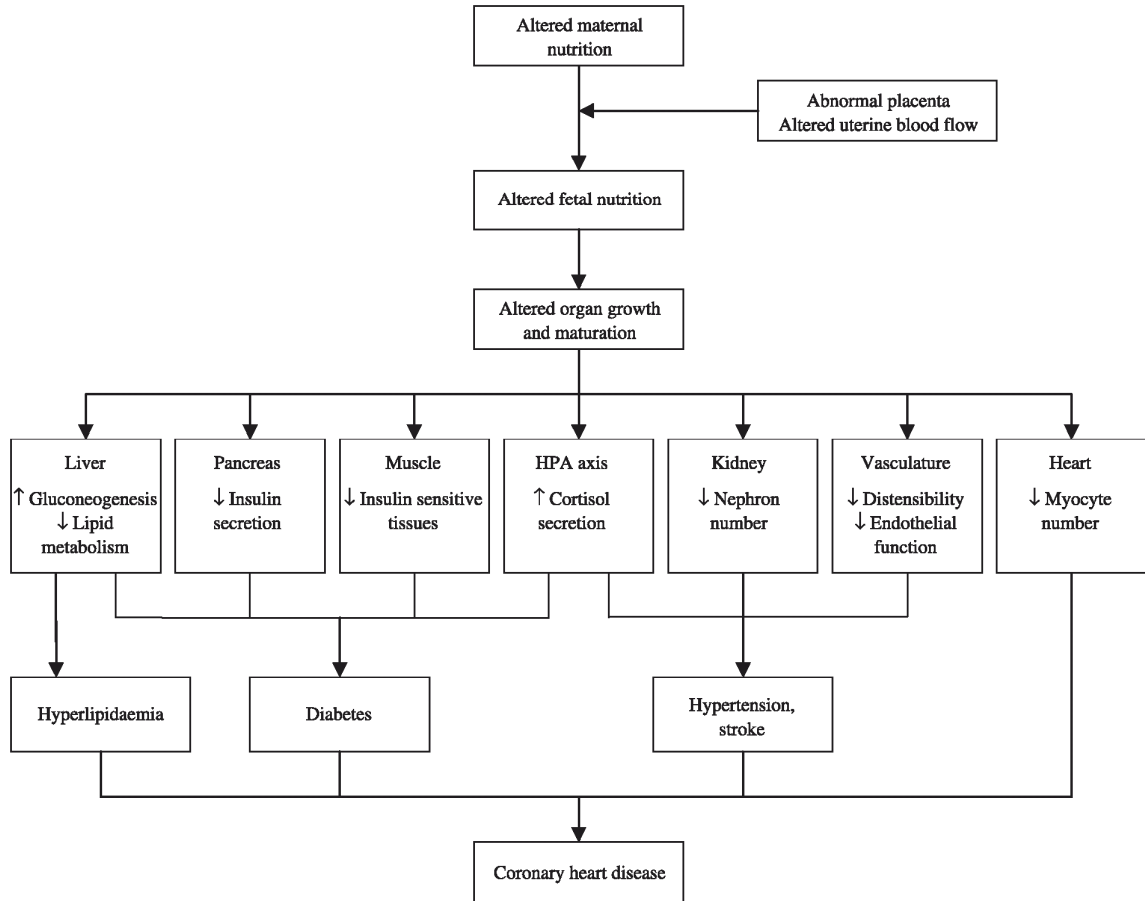


Figura 1 - Causas e conseqüências da programação intra-uterina (de Boo e Harding, 2006).

Este conceito de programação (*programming*) não é um dado recente. Um dos estímulos que deflagrou toda a pesquisa acerca da hipótese da “origem fetal” de doenças crônicas foi a observação dada a alguns acontecimentos que ocorriam em determinadas áreas da Inglaterra no início do século XX. O simples fato da população dessas regiões apresentar aumento nos índices de mortalidade neonatal (por retardo de crescimento fetal) e ter elevada taxa de doenças crônico-degenerativas, foi suficiente para elaboração de vários estudos retrospectivos

(Barker e Osmond, 1986). Nestes, Hales e Barker em 1992 lançaram a hipótese do fenótipo econômico (*thrifty phenotype*), promulgando que em momentos de privação nutricional o organismo do feto sofreria uma “adaptação”, a fim de maximizar a captação e a conservação de nutrientes (Hales e Barker, 1992). Posteriormente, outros trabalhos do mesmo grupo começaram a sugerir que a exposição a fatores adversos na vida intra-uterina ou na primeira infância poderia acarretar o baixo peso ao nascer e assim incrementar o risco de desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas na fase adulta (Barker et al., 1993; Barker, 1994).

Dentre os vários fenótipos considerados na hipótese da programação fetal, a pressão arterial (PA) é o que mais se relaciona com o peso ao nascimento, onde se elucida que os efeitos do peso sobre os níveis pressóricos são amplificados desde a infância até a idade adulta (Christensen et al., 2001; Manning e Vehaskari, 2001; Huxley et al., 2002). Alguns estudos consideram que, para cada aumento de 1 kg no peso ao nascer, ocorrem reduções diferenciadas na pressão arterial sistólica (PAS) nas diversas faixas etárias. Em crianças, é apontado um decréscimo na ordem de 1-2 mmHg, enquanto em adultos, observa-se uma diminuição de 5 mmHg na PAS, demonstrando assim uma correlação inversa entre peso ao nascer e PAS (Huxley, 1964; Christensen et al., 2001; Falkner et al., 2004). Modelos experimentais corroboram com esses achados. Em ratos, tanto a restrição protéica (moderada ou intensa) quanto a restrição energética global durante a gestação resultam em baixo peso ao nascer da prole e desenvolvimento de HAS na idade adulta (Langley-Evans, 1994; Vehaskari et al., 2001; Catta-Preta et al., 2006). Contudo, as alterações mostram-se mais proeminentes em machos que em fêmeas (Ozaki et al., 2001), uma vez que os primeiros exibem crescimento mais acelerado durante os períodos críticos de desenvolvimento (Woods et al., 2005). As fêmeas só são afetadas quando as restrições protéicas são muito intensas e quando se estendem também pelo período da lactação (Ozanne e Hales, 2004; Woods et al., 2004).

Na vigência desses fatos, alguns mecanismos são propostos para tentar explicar os efeitos hipertensivos mediados pelo desequilíbrio nutricional materno durante a gestação e a lactação.

Um dos pontos contemplados pelos autores e que pode se correlacionar com a programação da HAS, são as doenças vasculares. A disfunção endotelial vem sendo apontada como uma das conseqüências da desnutrição intra-uterina, onde a perda da função moduladora do endotélio pode ser considerada um estímulo ao desenvolvimento de HAS e de outros fatores de risco para DCV. As células endoteliais exercem função importante na parede dos vasos, regulando ativamente não só o tônus vascular como também a liberação de fatores relaxantes ou constrictores na parede do vaso (do Carmo Pinho Franco et al., 2003; Alexander, 2006).

Pesquisas em humanos e animais refletem que o baixo peso ao nascer pode ser correlacionado com a disfunção das células endoteliais (Franco Mdo et al., 2002b; Brawley et al., 2003; do Carmo Pinho Franco et al., 2003). Alguns investigadores propõem que a redução da massa corporal ao nascimento, induzida por dietas maternas restritas em proteínas intra-útero, pode prejudicar a síntese de elastina (Barker, 1998b), atenuar os níveis de GMP cíclico e reduzir a expressão da guanilato-ciclase (Lamireau et al., 2002; Brawley et al., 2003). Somando-se a isso, um meio intra-uterino sub-ótimo pode promover na prole redução da atividade da enzima óxido nítrico sintase (ONS) e diminuição significativa da expressão do gene que a codifica, amplificando o risco de desenvolvimento de HAS em fases tardias da vida (Franco Mdo et al., 2002a).

Além do mais, mudanças pressóricas manifestadas na prole podem estar vinculadas ao desenvolvimento atípico do rim (Ingelfinger e Woods, 2002). A literatura é vasta sobre o assunto. Brenner e colaboradores demonstraram que a estrutura renal, mais especificamente o número de néfrons, é um dos principais determinantes da PA e da função renal (Brenner et al., 1988). Devido a isso, a restrição materna de proteínas, principalmente durante o período

perinatal, pode influenciar negativamente a nefrogênese do feto, e assim desencadear DCV na vida pós-natal (Langley-Evans et al., 1999; Woods et al., 2001; Amann et al., 2004; Kett e Bertram, 2004; Rasch et al., 2004).

Em humanos, a nefrogênese, ou melhor, a organogênese é terminada antes do nascimento (por volta do terceiro trimestre gestacional) (Manalich et al., 2000) enquanto que em ratos e camundongos esse período é estendido até a primeira metade da lactação (Woods et al., 2004). Nesse sentido, presume-se que o tempo de indução do insulto pode estabelecer uma relação direta com o surgimento posterior de HAS, uma vez que modificações renais podem se fazer presentes durante essas fases. Além disso, é imperativa a questão do dimorfismo sexual, visto que os machos e as fêmeas comportam-se de formas distintas durante períodos críticos de desenvolvimento (Woods, 2000).

Estudos experimentais demonstram que a restrição intensa de proteínas no final da gestação estabelece aumento da PAS na fase adulta de machos e de fêmeas, não havendo nenhum tipo de mudança quando a mesma é administrada no início do período gestacional (Woods, 2000). Em contrapartida, Langley-Evans e colaboradores (Langley e Jackson, 1994; Langley-Evans et al., 1999) e Holemans e colaboradores (Holemans, 1999) encontraram que dietas moderadamente restritas em proteínas, durante o mesmo período, promovem alterações renais apenas nos machos. Já Ozanne e Hales comentam que o desequilíbrio no consumo materno de proteínas ou no consumo global de nutrientes, durante a fase de lactação, é mais prejudicial à prole (ambos os gêneros) do que restrições nutricionais durante a gestação (Ozanne e Hales, 2004; Desai et al., 2005).

Ressalta-se que em todos esses casos, o baixo peso ao nascer, induzido pela restrição protéica materna, é que vem sendo associado com o déficit no crescimento renal e menor número de néfrons (Mackenzie e Brenner, 1995). Os estudiosos descrevem que a diminuição do número de néfrons ou diminuição da filtração glomerular pode proporcionar excreção

reduzida de sódio e assim aumentar a PA sistêmica e a PA intra-glomerular (hipertrofia glomerular), de forma a tentar compensar a nefrogênese e manter a taxa de filtração glomerular (Vehaskari et al., 2001; Black et al., 2004). Em longo prazo, essa reação dos néfrons remanescentes pode predispor a prole ao desenvolvimento de glomeruloesclerose, com perda de função do glomérulo e manutenção do ciclo vicioso da hipertensão arterial (Langley-Evans et al., 1999; Ashton, 2000; Woods et al., 2001).

A restrição moderada de proteínas durante a vida intra-uterina também é capaz de promover redução nos níveis de renina plasmática e angiotensina II nos machos, o que sugere supressão da ação do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) e menor número de néfrons (Woods et al., 2001). Inversamente, a restrição intensa desse macronutriente, no mesmo período, exhibe modificações nos hormônios de origem renal em ambos os sexos, e conseqüentemente desenvolvimento de HAS em fases tardias (Manning e Vehaskari, 2001).

A partir de todo o exposto, um fator importante que não deve ser esquecido é que todos esses mecanismos hipertensores, promovidos pela restrição protéica materna, podem provocar alterações adversas na estrutura cardíaca da prole (Cuspidi, 2002). Dentre elas podemos citar hipertrofia do ventrículo esquerdo e fibrose miocárdica (Du Cailar, 2000; Struijker Boudier, 2003; Kenchaiah e Pfeffer, 2004). Na presença de remodelamento inadequado da estrutura miocárdica, os cardiomiócitos sofrem algumas modificações, como hipertrofia celular, apoptose e necrose. Acompanhando tal processo, também é verificado acúmulo progressivo de interstício fibroso (Weber, 1997) e hipertrofia cardíaca (Gonzalez et al., 2003) que se caracteriza por aumento da massa muscular, devido ao aumento dos cardiomiócitos e do colágeno intersticial presente na matriz extracelular (Yang et al., 1997).

Óleo de Peixe e a Restrição Protéica Materna

O interesse em estudar o óleo de peixe como componente nutricional de suma importância surgiu em meados da década de 70 (Vanschoonbeek et al., 2003). Pesquisas pioneiras conduzidas por cientistas dinamarqueses começaram a detectar que, o alto consumo de peixe por esquimós da Groenlândia os protegia das DCV, embora ingerissem quantidades significativas de gordura na dieta (cerca de 40% da ingestão calórica total) (Bang, 1980).

Já está bem descrito na literatura que as dietas típicas do mundo Ocidental são ricas em AGP da família n-6, gordura saturada e carentes em AGP da família n-3, o que eleva o percentual de morte por DCV nesses países (Banning, 2005; McCowen e Bistran, 2005). De acordo com estudos epidemiológicos, os AGP n-3 têm a capacidade de preveni-las (Sidhu, 2003; Ruxton et al., 2004). O óleo de peixe é rico nesses ácidos graxos, sendo os dois tipos mais comuns o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3), que são biologicamente mais potentes que o seu precursor, o ácido α -linolênico, e estão relacionados com várias reações biológicas (Lombardo et al., 1996). Dentre elas, destaca-se o seu papel hipotensor, particularmente em pacientes hipertensos (Geleijnse et al., 2002; Mori, 2003) e em ratos espontaneamente hipertensos (Aguila et al., 2004; Aguila et al., 2005a; Aguila et al., 2005b) ou programados metabolicamente para HAS (Catta-Preta et al., 2006).

Nesta linha de pensamento, um trabalho publicado no *Journal of Nutrition*, e que serviu de base para este estudo, sugeriu efeito favorável na bioquímica sanguínea da prole adulta de ratas que receberam dieta restrita em proteínas durante a gestação e que foram suplementadas com óleo de peixe (Joshi et al., 2003). Fato este bastante relevante num país como o nosso que ainda luta para combater os malefícios oriundos da desnutrição intra-útero.

As publicações que discutem a suplementação de AGP na gestação e lactação e sua relação com a prevenção de DCV são escassas no meio científico, principalmente quando envolvem animais de laboratório. Alguns estudos epidemiológicos relatam que o fornecimento de DHA, em baixas doses (200mg/dia), ou de α -linolênico, em altas doses (superior a 10g/dia), durante a gravidez não são capazes de promover incremento na composição de ácidos graxos do feto (Montgomery et al., 2003; de Groot, 2004; Sanjurjo, 2004). Inversamente, quando a suplementação de DHA é feita em altas doses (superior a 1g/dia), a quantidade perpassada ao feto torna-se significativa, aumentando inclusive o conteúdo do mesmo no leite materno (Dunstan, 2004; Dunstan et al., 2004).

Nesse sentido, fica claro que a disponibilidade de AGP no compartimento fetal é altamente dependente dos estoques maternos (Al et al., 2000; Decsi e Koletzko, 2005). Ademais, o período em que se inicia a suplementação também deve ser considerado. Alguns pesquisadores discutem que para haver benefícios no recém nato, o tratamento da mãe deve começar juntamente com o desenvolvimento da barreira placentária, ou seja, no início do período embrionário (Al et al., 2000). Em contrapartida, outros estudos postulam que o fornecimento de AGPI durante o último trimestre gestacional é mais promissor, uma vez que o acúmulo de DHA fetal ocorre neste período (Olsen, 1992; Makrides, 2000; Allen e Harris, 2001).

Quanto à influência da suplementação materna de AGP sobre o peso ao nascer, trabalhos epidemiológicos e experimentais relatam que o fornecimento de óleo de peixe durante o período gestacional pode elevá-lo, e com isso, reduzir as chances de desenvolvimento de DCV na vida adulta (Olsen, 1992; Allen e Harris, 2001; Banning, 2005; Olafsdottir et al., 2005). Alguns mecanismos tentam explicar tal benefício. Dentre eles, relata-se que o poder vasodilatador do DHA aumenta o fluxo placentário intra-uterino (Otto et al., 2001; Rogers et al., 2004) e conseqüentemente a avidez no fornecimento de nutrientes e oxigênio ao feto, o

que garantirá o aumento no peso nascer. Adicionalmente, outro mecanismo ligado à redução do risco cardiovascular condiz ao aumento do influxo placentário de EPA e DHA (Allen e Harris, 2001).

Como mencionado anteriormente, EPA e DHA estão relacionados com várias reações biológicas. A suplementação com AGP n-3 promove ações bioquímicas multifacetadas que se estendem de modificações estruturais na composição das membranas à inibição competitiva de eicosanóides inflamatórios (Wilde, 2003). Trabalhos desenvolvidos aqui mesmo no nosso laboratório já demonstraram ações benéficas do óleo de peixe, quando comparado a outros óleos, na estrutura e no remodelamento cardíaco, aórtico e renal de ratos espontaneamente hipertensos (Aguila et al., 2004; Aguila et al., 2005a; Aguila et al., 2005b).

No que concerne às ações vasodilatadoras e antitrombóticas dos AGP n-3, sabe-se que o EPA compete com o ácido araquidônico (AA), que também apresenta 20 átomos de carbono, como substrato para as enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase (5-lipoxigenase). Com isso, a síntese de tromboxane A_2 é inibida e a de tromboxane A_3 estimulada, fazendo com que haja um desvio favorável para uma condição mais vasodilatadora e antitrombótica (Chen et al., 1996). Somando-se a este fato, o EPA também inibe a síntese de mais dois potentes eicosanóides inflamatórios, a prostaglandina E_2 e o leucotrieno B_4 , além de estimular a produção de óxido nítrico e Prostaciclina I_2 nas células endoteliais, contribuindo assim para o aumento da capacidade vasodilatadora (Lee e Lip, 2003).

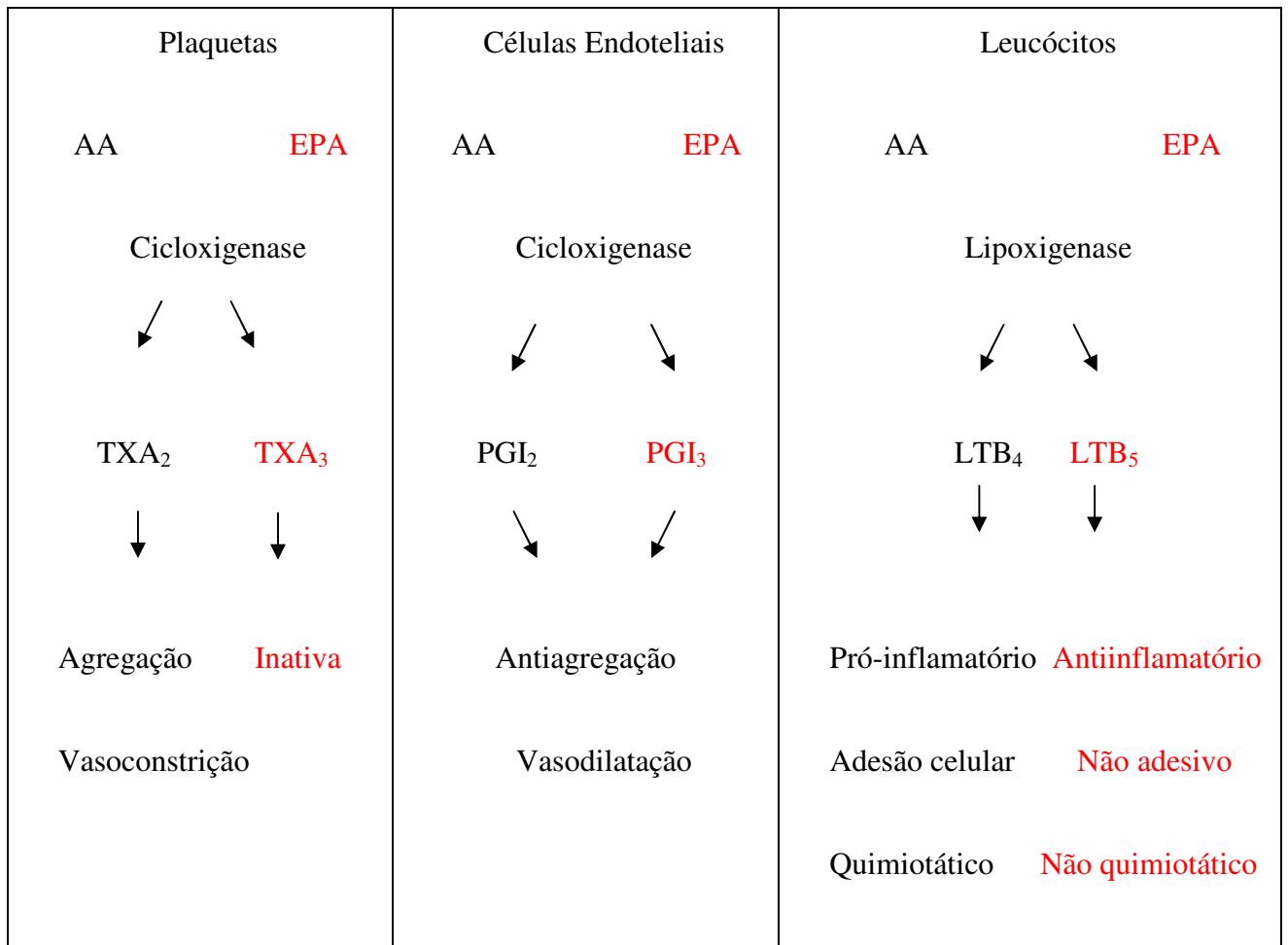


Figura 2 - Formação dos eicosanóides a partir do AA e do EPA em diferentes tipos celulares (Gester, 1995).

O DHA, ao contrário, não é considerado um substrato para essas enzimas. Algumas evidências sugerem inclusive, que este AGP, por si só, tenha efeitos mais hipotensores que o EPA (Engler et al., 2003). Isso porque ele é capaz de reduzir a reatividade vascular à norepinefrina (modulando a resposta vascular à estimulação nervosa simpática), abrandar o SRAA por meio da diminuição da síntese adrenal de aldosterona, mudar o metabolismo do AA renal, modular a liberação e o influxo de cálcio nas células musculares lisas, ativar os canais de potássio sensíveis a ATP e suprimir os níveis circulantes de produtos da ciclooxigenase com propriedades contráteis, como tromboxane A₂ (Engler et al., 1999a; Engler e Engler, 2000; Engler et al., 2003)

Além disso, a administração de DHA em ratos espontaneamente hipertensos resultou na incorporação de AGP n-3 nos tecidos vasculares e órgãos, substituindo os da família n-6. Esta característica pode afetar benéficamente o processo de contração cardíaca, que é imprescindível na regulação da PA (Engler et al., 1999b). Também é provável que o DHA exerça efeitos sobre a morfologia, devido à modificação na composição lipídica de membranas celulares. De acordo com a literatura, a HAS leva a uma redução da fluidez da membrana. Uma alteração nesse parâmetro pode afetar o transporte de íons, a atividade dos receptores e os potenciais elétricos da membrana, acarretando mudanças nos mecanismos contráteis e contribuindo para o decréscimo do risco cardiovascular (Engler et al., 2003).

Ainda com relação às propriedades anti-hipertensivas dos AG, foi descoberto nos últimos anos que algumas das suas ações podem ser mediadas pelos PPARs (*peroxisome proliferators-activated receptor*). O DHA é um dos ligantes naturais do PPAR α (Lin, 1999; Bishop-Bailey, 2000; Diep et al., 2000). Sabe-se que a família dos fatores de transcrição apresenta três isoformas: PPAR α , PPAR β e PPAR γ , onde a primeira é a predominante no coração e a que vem sendo apontada como preventiva no remodelamento cardíaco patológico (Schiffrin et al., 2003). Estudos mostram que o PPAR α ativado exerce poder antiinflamatório

no tecido cardíaco, uma vez que inibe a expressão do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e NF- κ B (inflamatórios), além de reduzir a expressão na síntese de colágeno tipo I e tipo III (Schiffrin et al., 2003).

EPA e DHA também podem ativar o PPAR- γ . Os autores sugerem que os ligantes de PPAR- γ inibem a expressão do TNF- α , interleucina-6 (IL-6) e IL-1 β em monócitos (Jiang C, 1998) e induzem a enzima óxido nítrico sintase, a metaloprotease-9 e a expressão fagocitária do receptor-A nos macrófagos (Ricote et al., 1998).

Mais recentemente, Serhan e colaboradores identificaram novos mediadores gerados a partir do EPA e do DHA (Serhan, 2000, 2002). Estes mediadores, identificados inicialmente em respostas inflamatórias nos exudatos inflamatórios, foram chamados de resolvinas e docosatrienos e parecem deter potentes bioações (antiinflamatória e imunoregulatória), as quais poderiam explicar, em parte, os efeitos benéficos dos AGP n-3 (Serhan, 2005). Assim sendo, essa nova idéia inerente ao poder antiinflamatório dos lipídios da família n-3 estimula a comunidade científica a estudar cada vez mais os efeitos terapêuticos desses nutrientes.

Material e Métodos

Animais e dieta

Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais, e o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEA/90/2005).

Ratos *Wistar*, os quais pertenciam às colônias mantidas no nosso laboratório na Universidade do Estado do Rio de Janeiro, foram alocados em caixas de polipropileno, com temperatura ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas ($60\pm 10\%$). O ambiente foi submetido a ciclos de 12 horas de claro e escuro (07:00h às 19:00h) e ciclo de exaustão de ar (15 min/hora), tendo livre acesso à comida e água.

As fêmeas (nulíparas) acasalaram com os machos ao longo da noite e com a confirmação da gestação, foram acondicionadas em gaiolas individuais e divididas em dois grandes grupos nutricionais: grupo normoprotéico (NP) e grupo restrito em proteínas (LP). Os animais do grupo NP receberam dieta normoprotéica (19g proteína/Kg dieta) e o grupo LP recebeu dieta com 5% de proteína (5g proteína/Kg dieta) ao longo de toda a gravidez e metade da lactação (10 primeiros dias de lactação). Ambas as dietas foram isocalóricas (19.000 kJ/Kg dieta, onde o baixo teor de proteínas foi compensado pela adição de carboidratos). O conteúdo de vitaminas e minerais foi o mesmo nas duas dietas e seguiu as recomendações da AIN-93 G (Reeves et al., 1993). Vale lembrar que as dietas experimentais foram confeccionadas pela Rhoster[®] (Rhoster, SP, Brasil, www.rhoster.com.br) e a composição encontra-se demonstrada na Tabela 1. A ingestão alimentar e a massa corporal das matrizes foram aferidos diariamente e as quantidades de ração e água das mesmas fornecidas *ad libitum*.

Tabela 1 - Composição das duas dietas isocalóricas. Mistura de vitaminas e minerais seguiram as recomendações para roedores da AIN 93G (Reeves et al. 1993).

Nutrientes	Dieta Normoprotéica	Dieta Hipoprotéica
	(%)	
Carboidratos		
Farinha de trigo	33,5	47,5
Sacarose	20,0	20,0
Caseína	19,0	5,0
Cistina	0,3	0,15
Colina	0,2	0,2
Lipídio (óleo de soja)	16	16
Fibra (celulose)	5	5
Mistura de minerais (AIN-93G)	1	1
Mistura de vitaminas (AIN-93G)	5	5
Energia (kJ/Kg de dieta)	19.000	19.000

Paralelamente a este esquema de alimentação foi administrado diariamente, via tubo gástrico (gavagem), suplemento de óleo de peixe (fonte de AGP n-3: EPA e DHA; Sigma-Aldrich Chemical Co, St. Louis, USA, Batch # 035K0184) na dose de 1,5g/Kg/ia, e assim sendo, os animais dos grupos NP e LP foram subdivididos em 4 grupos: i) grupo NP sem tratamento; ii) grupo NP-Fo com óleo de peixe; iii) grupo LP sem tratamento e iv) grupo LP-Fo com óleo de peixe. Os grupos sem tratamento receberam placebo (água) na mesma dose que o óleo de peixe. Ressalta-se que o tratamento com o óleo ocorreu durante todo o período de gestação e primeira metade da lactação (até o 10º dia). Durante este tempo, o óleo foi mantido em recipiente opaco apropriado e à temperatura ambiente, a fim de evitar a instalação de um processo de oxidação. A composição do suplemento encontra-se demonstrada na Tabela 2, e todo o teor de ácidos graxos do óleo de peixe utilizado nesse estudo foi determinado pela técnica de cromatografia gasosa de alta resolução (Hewlett Packard- 5890 GC-FID System, Houston, TX, USA) (Hartman, 1976).

Ao nascimento, o sexo dos filhotes foi identificado a partir da distância ânus-genital. A seguir, os filhotes machos e fêmeas foram pesados separadamente, e aqueles com pesos díspares foram excluídos. O tamanho da ninhada foi fixado, aleatoriamente, em 6 animais (3 machos e 3 fêmeas/mãe) a fim de padronizar o processo de lactação (Langley-Evans et al., 1996). A partir da segunda metade da lactação (11º dia) houve modificação no esquema alimentar das progenitoras, onde as mesmas passaram a receber dieta padrão própria para ratos (Nuvital, Nuvilab, PR, Brasil) e não foram mais suplementadas com o óleo de peixe.

Tabela 2 - Composição dos ácidos graxos do óleo de peixe (g ácido graxo por 100 g ácidos graxos totais). Abreviações: AGM = ácidos graxos monoinsaturados, AGP = ácidos graxos poliinsaturados, AGS = ácidos graxos saturados.

Ácido graxo	Óleo de peixe (menhaden)
12:0	0,11
13:0	0,05
14:0	8,30
14:1	-
15:0	0,69
16:0	17,14
16:1	10,90
17:0	0,53
17:1	1,37
18:0	3,09
18:1 trans	1,63
18:1 (Δ 9)	6,99
18:1 (Δ 11)	3,08
18:2cis/trans	0,95
18:2	0,31
18:3 trans	0,43
18:3	1,53
18:4	2,84
19:0	0,11
20:0	0,18
20:4	1,01
20:5	12,91
22:5	2,62
22:6	11,96
24:1	0,33
SFA	30,20
AGM	24,31
AGP	34,56
n-3AGP	26,83
n-6 AGP	2,27

Ao desmame (21 dias de idade), os filhotes machos (M) e fêmeas (F) foram separados de suas respectivas mães e também passaram a receber o mesmo tipo de dieta descrito acima (*ad libitum*) tendo livre acesso para água. As proles foram acompanhadas até os 6 meses de idade e os grupos de estudo foram formados da seguinte forma: MNP e FNP (filhotes machos e fêmeas oriundos de mães NP sem tratamento); MNP-Fo e FNP-Fo (filhotes machos e fêmeas provenientes de mães NP tratadas com o óleo de peixe); MLP e FLP (filhotes machos e fêmeas oriundos de mães LP sem tratamento); MLP-Fo e FLP-Fo (filhotes machos e fêmeas provenientes de mães LP tratadas com o óleo de peixe), configurando oito grupos de estudo (n = 5/grupo) e totalizando 40 animais.

Biometria dos animais

Desde o nascimento, os animais tiveram a massa corporal e o comprimento naso-anal (CNA) mensurados semanalmente, por meio de balança digital de precisão 0,01g (Marte A-1500) e régua graduada, respectivamente. A partir dos 3 meses iniciou-se a aferição da pressão arterial sistólica (toda sexta-feira pela manhã) utilizando o método não invasivo da pletismografia caudal (Letica LE 5100, Panlab, Barcelona, Spain). Cabe mencionar que para alcançar um resultado mais fidedigno dos níveis pressóricos, os ratos passaram por um processo de adaptação antes de completarem 3 meses de idade, onde foram aquecidos dentro de uma câmara contendo uma lâmpada artificial por aproximadamente 3 minutos, evitando maiores estresses no decorrer do experimento. Normalmente, três medidas foram determinadas, sendo a média das mesmas o valor pressórico oficial daquela semana.

Eutanásia

Na época prevista da eutanásia, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódio intraperitoneal. O tórax foi aberto e o sistema vascular foi perfundido, com pressão constante (90mmHg) por meio do ventrículo esquerdo (LV), primeiramente com

solução fisiológica e depois com fixador (1,27 mol/l formaldeído em 0,1M tampão fosfato, pH 7,2) até alcançar a rigidez do corpo do animal (Carson et al., 1973). Posteriormente, o coração foi removido e fixado com a mesma solução fixadora, por um período de 24 horas à temperatura ambiente.

Os depósitos de gordura (retroperitoneal e genital) foram completamente removidos e pesados. A gordura retroperitoneal corresponde àquela presente ao redor dos rins e ao longo dos músculos lombares. Em contrapartida, a gordura genital (ovariana para as fêmeas e epididimária para os machos) inclui o tecido adiposo presente ao redor do ureter, bexiga, epidídimo, ovário, oviduto e útero.

Espessura do ventrículo esquerdo e estereologia

Conforme mencionado anteriormente, no momento da eutanásia, o coração foi removido e o ventrículo esquerdo (VE) (juntamente com o septo interventricular) foi isolado dos outros compartimentos (átrios e ventrículo direito) sendo o seu respectivo volume determinado pelo método de Scherle (Scherle, 1970). A espessura da parede do VE foi medida utilizando-se um sistema de estereomicroscopia (Hund, Wetzlar, Germany). As medidas foram feitas em quatro pontos ortogonais, onde a média entre as mesmas representou a espessura da parede deste ventrículo. A fim de corrigir o índice de massa do VE com relação ao corpo do animal, o comprimento da tíbia esquerda foi mensurado (da ponta do côndilo ao maléolo medial) (Yin et al., 1982).

Posteriormente, o VE foi clivado para estudo microscópico. Para a obtenção dos fragmentos do miocárdio, optou-se pelo método de clivagem denominado “*orientator*”, uma vez que o tecido muscular cardíaco é considerado uma estrutura anisotrópica (Mattfeldt et al., 1990). A seguir, os fragmentos foram embebidos em Paraplast plus, seccionados com uma espessura de 5µm, e corados com *Hematoxylin-eosin* e *Picro sirius red*. As observações

microscópicas e as contagens estereológicas foram feitas com um sistema de vídeo-microscopia (microscópio de luz Leica modelo DMRBE acoplado a uma câmara de vídeo Kappa e um monitor Sony). Para tal, utilizou-se um sistema-teste com 36 pontos com uma área-teste conhecida e devidamente calibrada. Ainda para fins de quantificação, considerou-se que o miocárdio é composto por cardiomiócitos (cmi) e interstício, onde este último contém vasos, nervos e interstício. Dessa forma, foram analisados os seguintes parâmetros estereológicos (Gundersen et al., 1988a; Gundersen et al., 1988b): Densidade de volume (V_v) de cardiomiócitos (cmi), artérias intramiocárdicas (ima) e interstício (tc), onde V_v [estrutura] := P_p [estrutura]/ P_T (P_p corresponde aos pontos parciais que incidem sobre a estrutura estudada; e P_T corresponde aos pontos totais do sistema teste); área seccional média dos cardiomiócitos, onde A [cmi] := V_v [cmi]/ $2 \cdot Q_A$ [cmi] (Q_A [estrutura] = N [estrutura]/ A_T , sendo Q_A o número de perfis-estruturas- na área teste e A_T a área total, considerando as linhas proibidas). Para estudar a vascularização intramiocárdica, foi calculada a razão de vasos intramiocárdicos (ima) e cmi, onde V_v [ima]/ V_v [cmi] demonstra essa relação (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

Análise estatística

Os parâmetros biométricos foram testados por análise de variância (one way ANOVA) e *post-hoc test* of de Tukey. Os resultados estereológicos foram testados pelo teste não paramétrico *Kruskall-Wallis*, nos casos onde houve diferença foi usado o *pós-teste* de Dunn para identificar entre quais grupos as diferenças foram significativas. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de $p < 0,05$ (Zar, 1999). Todas as análises foram realizadas no programa de análise estatística *GraphPad Prism* versão 4.03 para *Windows* (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA).

Resultados

Massa corporal e consumo alimentar diário das progenitoras

Durante a gestação e a lactação, não houve diferenças no ganho de peso materno e no consumo alimentar das matrizes nos diferentes grupos de estudo.

Biometria da prole

Massa corporal

Ao nascimento, os animais dos grupos LP e LP-Fo (machos e fêmeas) apresentaram massa corporal inferior quando comparados com os filhotes dos grupos NP e NP-Fo (Figura 3). A massa corporal dos filhotes do grupo LP foi 23% menor em comparação com os filhotes do grupo NP ($p=0,01$); enquanto que os filhotes do grupo LP-Fo apresentaram diminuição de 43% na massa corporal em comparação com o grupo NP-Fo ($p=0,001$). A suplementação materna com o óleo de peixe não afetou a massa corporal da ninhada ao nascimento; porém, ao final do primeiro mês de vida, os filhotes machos e fêmeas do grupo NP-Fo apresentaram aumento na massa corporal em relação aos demais grupos de estudo, como ilustrado na Figura 4. Aos 6 meses de idade, os filhotes machos do grupo NP-Fo foram mais pesados quando comparados com os filhotes do grupo LP-Fo (+23%, $p=0,002$) e quando comparados com os filhotes do grupo NP (+13%, $p=0,02$). As fêmeas apresentaram o mesmo comportamento em relação à massa corporal.

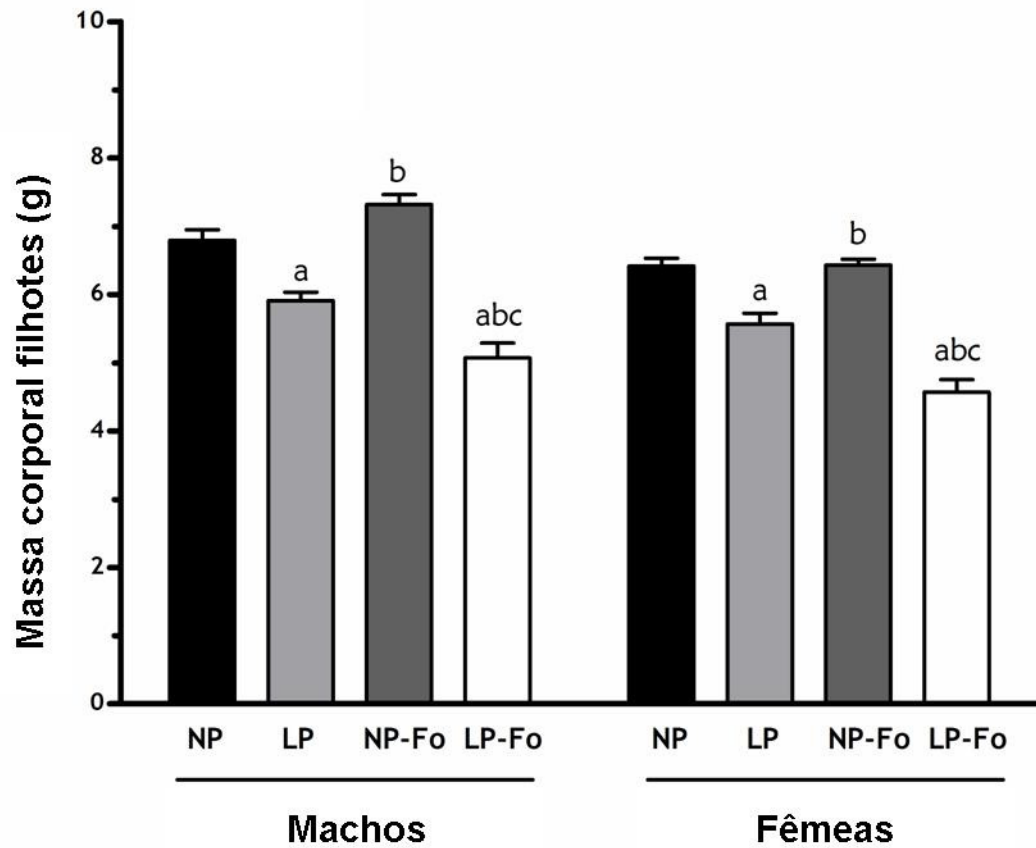


Figura 3 - Massa corporal dos filhotes nos diferentes grupos ao nascimento. Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo - normoprotéico suplementado com óleo de peixe; grupo LP - restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo - restrito em proteína suplementado com óleo de peixe. Valores representados em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: a \neq grupo NP, b \neq grupo LP e c \neq grupo NP-Fo.

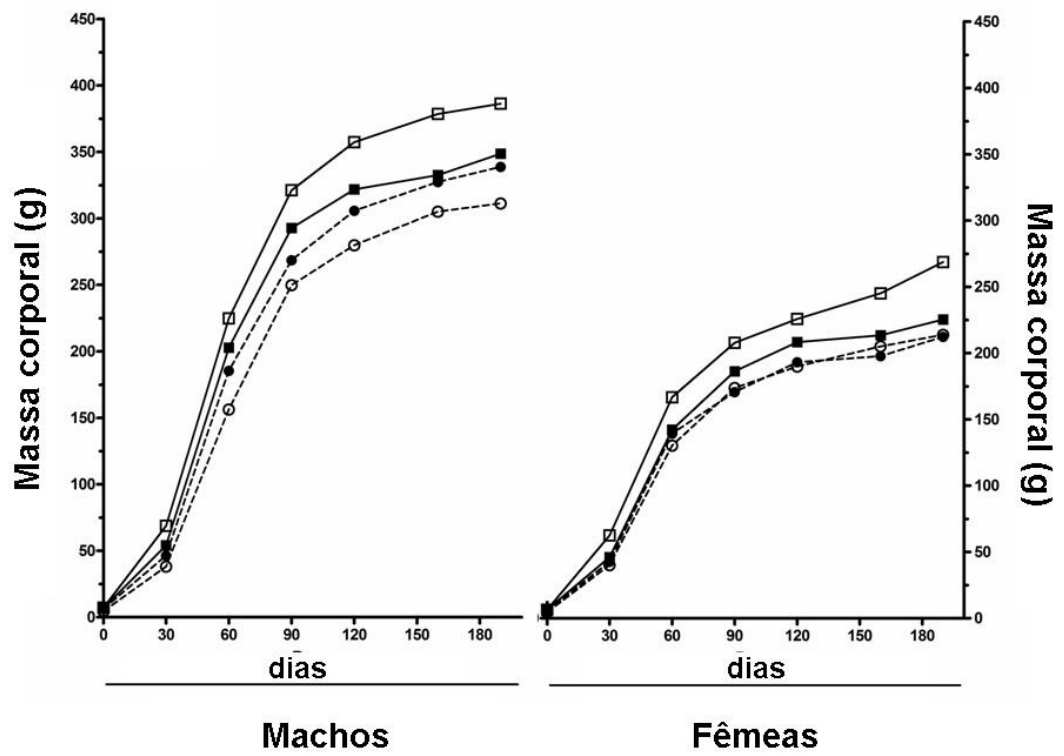


Figura 4 - Evolução da massa corporal dos diferentes grupos estudados, do nascimento aos 6 meses de idade (180 dias). Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo – normoprotéico com óleo de peixe; grupo LP - restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo - restrito em proteína com óleo de peixe.

Pressão arterial sistólica

Em relação à pressão arterial sistólica (PAS), foi observado um comportamento muito similar entre os machos e as fêmeas. A restrição protéica materna foi capaz de promover hipertensão moderada nos machos e nas fêmeas do grupo LP já aos 3 meses de idade. Em contrapartida, a suplementação materna com o óleo de peixe conseguiu minimizar os efeitos prejudiciais dessa restrição sobre os níveis pressóricos. Observou-se, ainda no terceiro mês de vida, diminuição de 10% da PAS em ambos os sexos do grupo LP-Fo quando comparados com o grupo LP. Assim sendo, percebe-se que ao final do estudo, os animais LP alcançaram os maiores valores na PAS, oscilando em torno de 160mmHg para os machos e 155mmHg para as fêmeas (Figura 5).

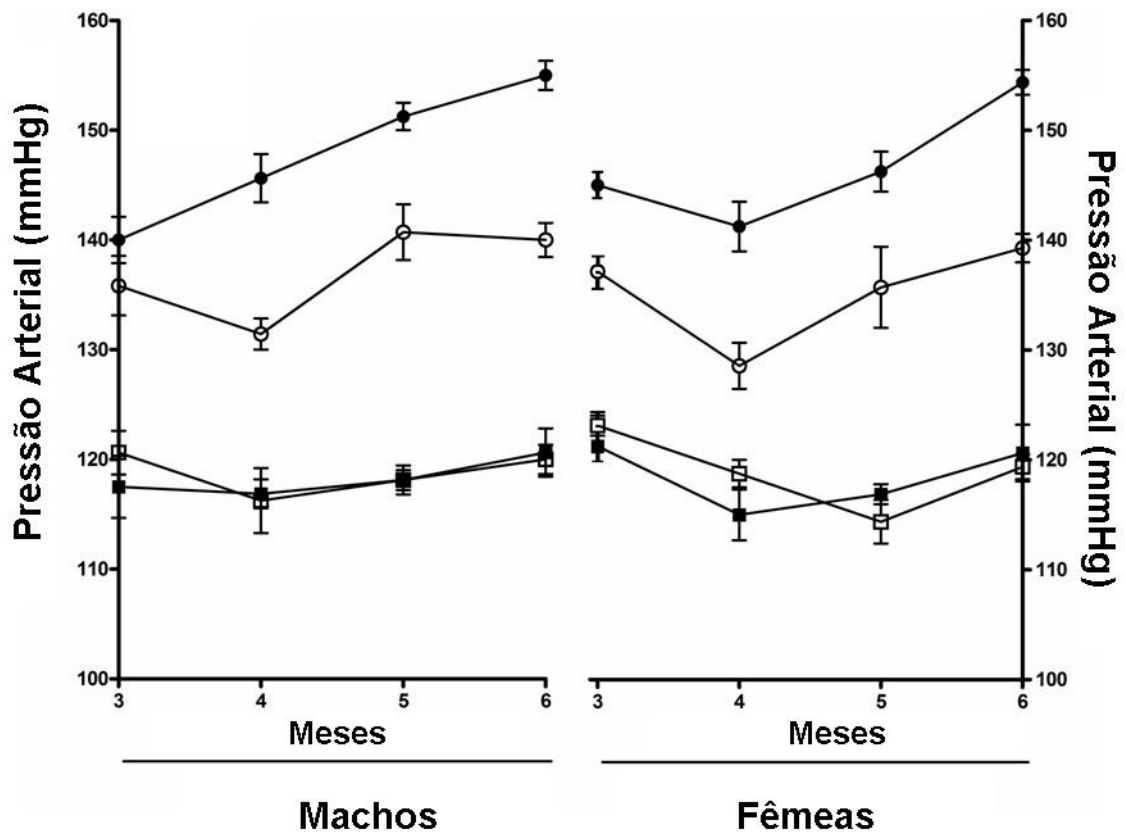


Figura 5 - Evolução da pressão arterial sistólica, dos 3 aos 6 meses de idade. Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo - normoprotéico com óleo de peixe; grupo LP - restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo - restrito em proteína com óleo de peixe.

Glicemia

No que concerne aos valores de glicose sanguíneos, constatou-se que os machos dos grupos LP e LP-Fo exibiram níveis um pouco mais elevados em relação aos seus respectivos controles (NP = $4,02 \pm 0,26$ mmol/L *versus* LP = $5,05 \pm 0,85$ mmol/L, +26%, $p=0,02$; NP-Fo = $4,06 \pm 0,63$ mmol/L *versus* LP-Fo = $4,82 \pm 0,52$ mmol/L, +19%, $p=0,04$), não havendo diferenças estatísticas entre as fêmeas (NP = $4,69 \pm 0,58$ mmol/L, LP = $4,93 \pm 1,12$ mmol/L, NP-

Fo = $426 \pm 0,13$ mmol/L, LP-Fo = $4,55 \pm 0,93$ mmol/L). Entretanto, todos os animais mantiveram seus valores de glicemia dentro dos padrões de normalidade.

Depósitos de gordura corporal

O índice de gordura corporal (IGC) foi calculado mediante a quantidade dos depósitos de gordura/100g de massa corporal do animal (Figura 6). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de mães suplementadas com o óleo de peixe, demonstrando que este tipo de tratamento não influenciou na quantidade de tecido adiposo da prole. Porém, os animais do grupo LP manifestaram menor IGC em relação aos do grupo NP. Tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram decréscimo de 30% na gordura corporal quando relacionados com seus respectivos controles NP ($p=0,03$ para os machos e $p=0,04$ para as fêmeas).

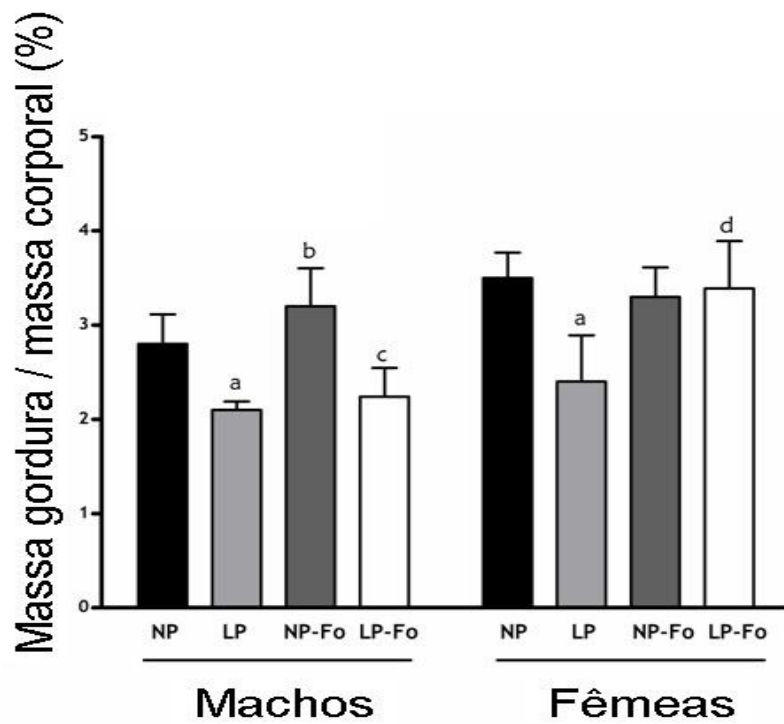


Figura 6 - Índice Gordura Corporal nos diferentes grupos aos 6 meses de idade. Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo - normoprotéico com óleo de peixe; grupo LP - restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo - restrito em proteína com óleo de peixe. Valores representados em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: a \neq grupo NP, b \neq grupo LP, c \neq grupo NP-Fo e d \neq gênero oposto.

Alterações estruturais do coração

Relação ventrículo esquerdo/ comprimento da tíbia (LV/TL)

A suplementação materna de óleo de peixe não afetou a razão LV/TL entre os machos (NP = $174,0 \pm 69,1$ mg/cm, LP = $164,1 \pm 21,1$ mg/cm, NP-Fo = $181,7 \pm 13,3$ mg/cm, LP-Fo = $160,1 \pm 26,9$ mg/cm), diferente do que aconteceu entre as fêmeas. No final do experimento, as fêmeas do grupo NP-Fo apresentaram maior relação LV/TL quando comparadas com as fêmeas do grupo NP (NP = $122,6 \pm 20,8$ mg/cm *versus* NP-Fo = $158,5 \pm 13,7$ mg/cm, +29%, $p=0,006$). Da mesma forma, também houve diferenças entre as fêmeas dos grupos LP-Fo e NP-Fo (LP-Fo = $134,8 \pm 13,8$ mg/cm *versus* NP-Fo = $158,50 \pm 13,7$ mg/cm, +15%, $p=0,01$).

Espessura da parede do ventrículo esquerdo

Em relação à parede do ventrículo esquerdo, observou-se que os animais do grupo LP apresentaram paredes mais espessas (+25% nos machos, $p=0,01$ e +22% nas fêmeas, $p=0,001$, respectivamente), quando relacionados aos machos e fêmeas do grupo NP. Entretanto, a suplementação materna com o óleo de peixe amenizou o aumento da espessura da parede do VE. Ambos os gêneros do grupo LP-Fo apresentaram diminuição da hipertrofia quando comparados aos respectivos LP sem tratamento, na ordem de 23%, $p = 0,001$ entre os machos e 12%, $p = 0,02$, entre as fêmeas (Figuras 7 e 8).

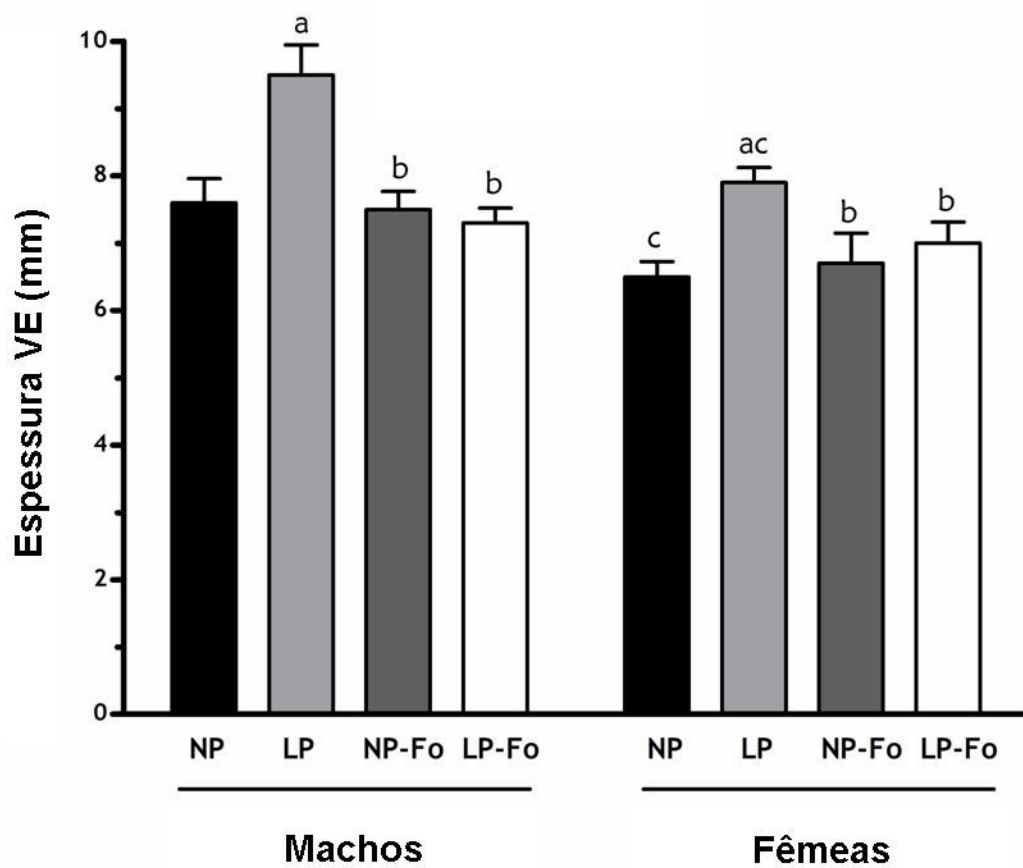


Figura 7 - Espessura da parede do ventrículo esquerdo nos diferentes grupos. Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo - normoprotéico com óleo de peixe; grupo LP- restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo- restrito em proteína com óleo de peixe. Valores representados em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: a \neq grupo NP, b \neq grupo LP, c \neq gênero oposto.

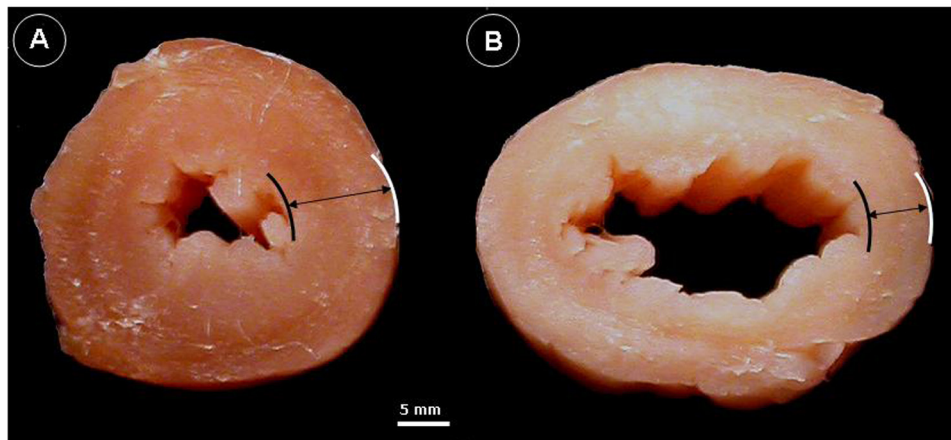


Figura 8: Espessura da parede do ventrículo esquerdo nos grupos LP e NP. A = grupo LP sem tratamento e B = NP sem tratamento.

Área seccional média dos cardiomiócitos)(A[cmi])

A[cmi] foi maior no grupo LP (+30%, $p=0,03$) em relação ao grupo NP (Figura 9) e a suplementação materna de óleo de peixe não foi capaz de modificar este parâmetro entre os diferentes grupos.

Relação de artérias intramiocárdicas/cardiomiócitos

A relação [ima]/cmi] foi significativamente menor nos machos do grupo LP em comparação com os animais do grupo NP (-50%, $p=0,01$), demonstrando pouca vascularização do miocárdio desses animais. Contudo, os machos do grupo LP-Fo exibiram maior relação [ima]/[cmi] quando comparados aos LP, caracterizando preservação da vascularização com o tratamento materno com o óleo de peixe (Figura 10).

Densidade de comprimento das artérias intramiocárdicas (Lv[ima])

Os machos LP e LP-Fo manifestaram menor Lv[ima] quando comparados com seus respectivos controles: NP (-45%, $p = 0,00002$) e NP-Fo (-24%, $p = 0,03$) (Figura 11).

Densidade de volume de interstício (Vv[int])

Vv[[int] cardíaco foi maior nos animais dos grupos LP em relação aos grupos NP de ambos os sexos. A suplementação materna com óleo de peixe promoveu efeitos benéficos nos animais LP, sem alterar o comportamento dos animais NP. Entre os machos, os animais do grupo LP apresentaram aumento de 133% no Vv[int] em comparação com o grupo NP ($p=0,003$); enquanto que os animais do grupo LP-Fo apresentaram aumento de 60% quando comparado aos animais do grupo NP-Fo ($p=0,04$). Entretanto, comparando-se os grupos LP e LP-Fo, verificou-se que este último apresentou diminuição de 36% neste parâmetro ($p=0,04$). A mesma tendência foi observada entre as fêmeas, onde o grupo LP apresentou maior quantidade de interstício em relação ao grupo NP (+114%, $p=0,0001$); enquanto que o grupo LP-Fo apresentou diminuição do Vv[int] em comparação com o grupo LP (-42%, $p=0,001$) (Figura 12).

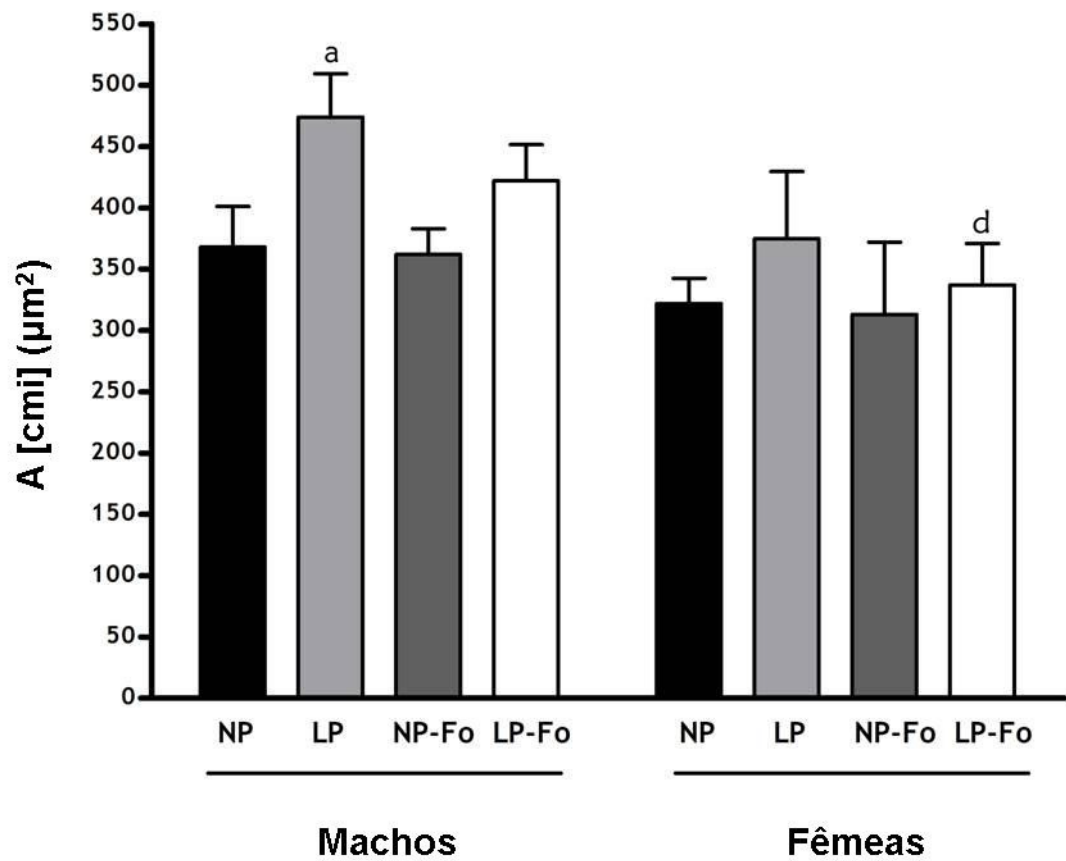


Figura 9: Área seccional média de cardiomiócitos A[cmi] nos diferentes grupos. Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo - normoprotéico com óleo de peixe; grupo LP - restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo - restrito em proteína com óleo de peixe. Valores representados em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: a \neq grupo NP, d \neq gênero oposto.

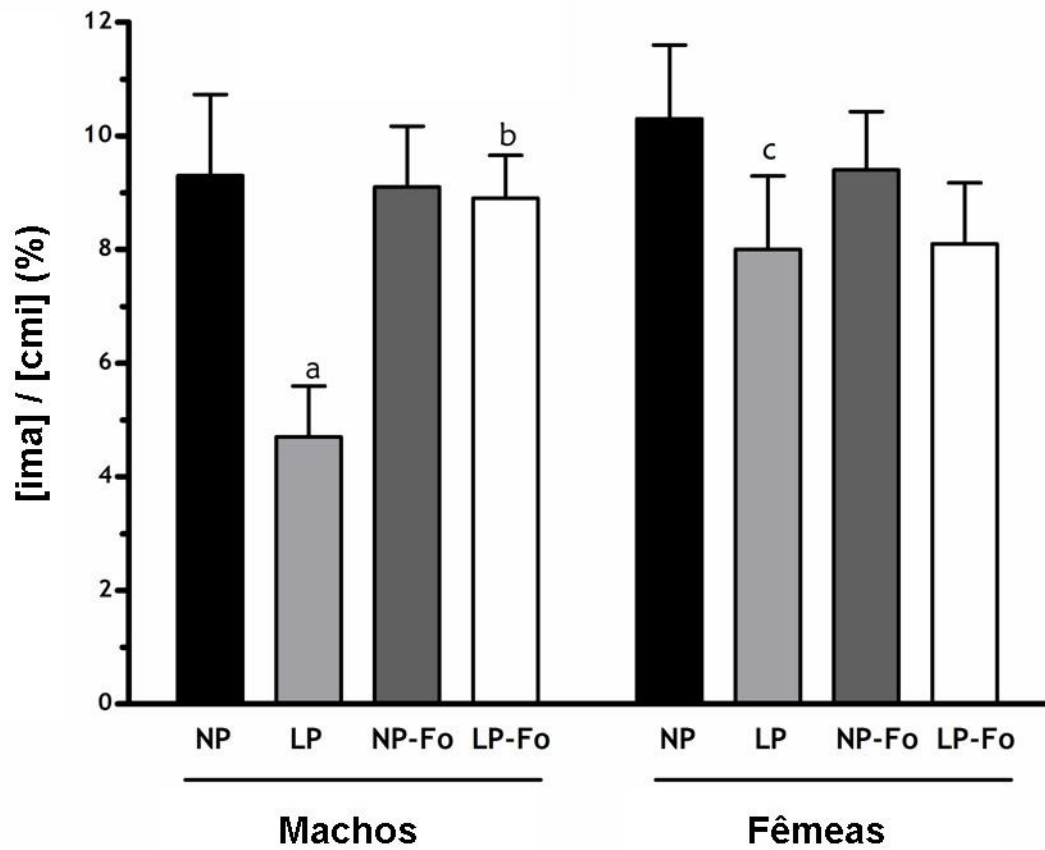


Figura 10 - Relação artérias intramiocárdicas/cardiomiócitos [ima]/[cmi] nos diferentes grupos. Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo - normoprotéico com óleo de peixe; grupo LP - restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo - restrito em proteína com óleo de peixe. Valores representados em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: a \neq grupo NP, b \neq grupo LP e c \neq gênero oposto.

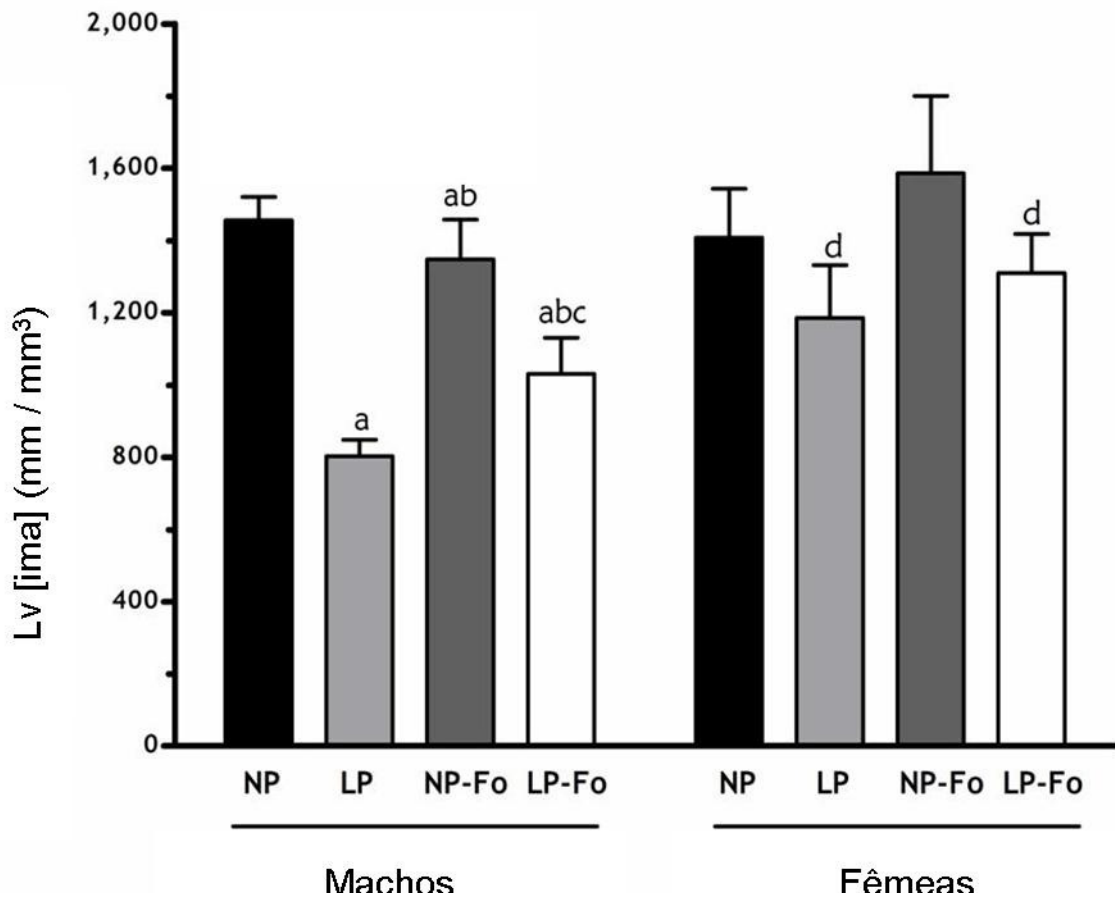


Figura 11 - Densidade de comprimento de artérias intramiocárdicas nos diferentes grupos - Lv [ima]. Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo - normoprotéico com óleo de peixe; grupo LP - restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo - restrito em proteína com óleo de peixe. Valores representados em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: a \neq grupo NP, b \neq grupo LP, c \neq grupo NP-Fo e d \neq gênero oposto.

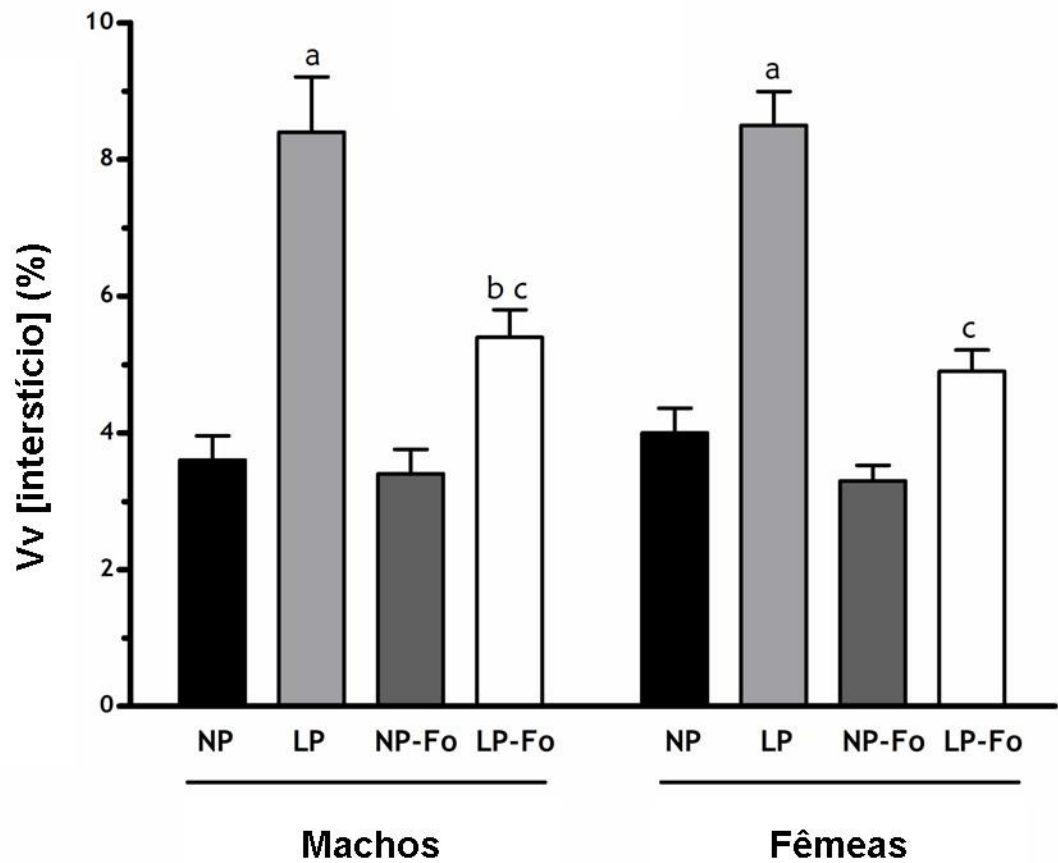


Figura 12 - Densidade de volume interstício cardíaco nos diferentes grupos - Vv [int]. Grupo NP - normoprotéico sem tratamento; grupo NP-Fo - normoprotéico com óleo de peixe; grupo LP - restrito em proteína sem tratamento e grupo LP-Fo - restrito em proteína com óleo de peixe. Valores representados em média \pm desvio padrão. Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: a \neq grupo NP, b \neq grupo NP-Fo, c \neq grupo LP.

Discussão

Neste estudo, nós utilizamos um modelo de programação de doenças crônicas em ratos, a partir da restrição materna proteínas (restrição intensa) durante os períodos da gestação e da lactação (primeira metade). Conseqüentemente, os filhotes apresentaram baixo peso ao nascer e desenvolveram aumento progressivo na PAS na vida pós-natal, sendo acompanhado, inclusive, por mudanças na estrutura miocárdica. A suplementação materna com óleo de peixe exerceu efeitos benéficos em ambos os gêneros oriundos de progenitoras restritas, favorecendo a redução da PAS, diminuição da hipertrofia cardíaca e da fibrose intersticial, assim como melhora da microcirculação miocárdica.

Outro prejuízo bastante comum observado em casos de restrição protéica materna é o crescimento acelerado no período pós-natal (*catch-up*), a fim de compensar o baixo peso ao nascer. Nesse sentido, os animais tornam-se mais susceptíveis ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (Hales e Ozanne, 2003). Concordando com esses dados, nós evidenciamos *catch-up* nos nossos animais. Porém, não foram observadas alterações no conteúdo total de gordura corporal, conforme demonstrado pelo IGC aos 6 meses de idade.

Trabalhos epidemiológicos e experimentais relatam que a suplementação de óleo de peixe durante o período gestacional pode elevar o peso ao nascer e com isso, reduzir as chances de desenvolvimento de DCV na vida adulta (McGregor, 2001; Banning, 2005; Olafsdottir et al., 2005). Alguns mecanismos tentam explicar tal benefício. Dentre eles, postula-se que o poder vasodilatador do DHA aumente o fluxo placentário intra-uterino (Rogers et al., 2004), e conseqüentemente a avidez no fornecimento de nutrientes e oxigênio ao feto, o que garantirá o aumento no peso nascer.

Ainda com relação aos prejuízos inerentes à restrição protéica, constatamos que a ingestão de dieta hipoprotéica durante períodos críticos de desenvolvimento (*in utero* e no primeiro período da lactação) promoveu a elevação dos níveis pressóricos dos animais na vida adulta. Contudo, a administração de óleo de peixe no período perinatal atenuou a hipertensão observada em ambos os gêneros. Estes achados são consistentes com vários mecanismos envolvidos na programação fetal da hipertensão arterial e com os efeitos benéficos dos AGP n-3, que já estão bem descritos na literatura (Aguila et al., 2004; Wyrwoll et al., 2006). Sabe-se que em modelos de programação, a reatividade vascular é adversamente afetada (Khan, 2003; Molnar, 2003) e a partir do fornecimento de AGP n-3 esse comportamento é invertido, com melhora da função endotelial (Abeywardena e Head, 2001). Embora o SRAA seja desregulado na programação fetal (McMullen et al., 2004), o fornecimento de AGP n-3 parece exercer efeitos positivos sobre a regulação da pressão arterial, via formação da angiotensina II (Das, 2004). Dessa forma, minimizar-se-ia o comprometimento cardíaco nos animais programados de mães suplementadas com o óleo de peixe, como verificado nesse estudo.

Os benefícios da suplementação materna com óleo de peixe sobre a estrutura miocárdica dos animais programados foram facilmente constatados, visto que os mesmos exibiram menor quantidade de fibrose intersticial e hipertrofia cardíaca com relação ao grupo não tratado. É consensual que o aumento na quantidade de fibrose intersticial pode sobrecarregar o trabalho cardíaco, diminuindo a contratilidade dos cardiomiócitos (Battista et al., 2005) e, assim induzir hipertrofia concêntrica no coração. A hipertrofia cardíaca, por si só, representa um aumento da massa miocárdica, em resposta à sobrecarga pressórica, e é altamente associada com o aumento do estresse oxidativo e à produção de espécies reativas de oxigênio, o que eleva o risco cardiovascular (Byrne, 2003). Normalmente, essas alterações cardíacas são mais pronunciadas em machos que em fêmeas. Trabalhos prévios desenvolvidos no nosso laboratório são capazes de demonstrar claramente o exposto (Almeida e Mandarim-de-

Lacerda, 2005; Catta-Preta et al., 2006), assim como outros existentes na literatura (Brawley et al., 2003; McMullen et al., 2004; Woods et al., 2005; Yi Xu, 2006).

Outro fator que pode tentar explicar as mudanças observadas no ventrículo esquerdo desses animais, e por conseqüência a redução na pressão arterial, é o fato do DHA ser um dos ligantes naturais do PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptors* - fatores de transcrição nuclear) (Bishop-Bailey, 2000; Diep et al., 2000). Sabe-se que a família dos fatores de transcrição apresenta três isoformas: PPAR α , PPAR β e PPAR γ , onde a primeira é a predominante no coração, e a que vem sendo apontada como preventiva no remodelamento cardíaco patológico (Iglarz, 2003; Schiffrin et al., 2003). Estudos mostram que o PPAR α ativado exerce um poder antiinflamatório no tecido cardíaco, uma vez que inibe a expressão de IL-1, IL-6, TNF- α e NF-k β (inflamatórios), além de reduzir a expressão na síntese de colágeno tipo I e tipo III (Blanquart et al., 2003; Benkirane, 2006). Assim sendo, poderíamos visualizar corações com menor área de fibrose intersticial, conforme verificado nos animais LP-Fo (machos e fêmeas) quando comparados àqueles cujas mães não foram tratadas com o óleo de peixe durante a gestação e a lactação (LP).

Cabe mencionar ainda que a redução da microcirculação no LV dos animais metabolicamente programados concorda com dados de outros trabalhos (Catta-Preta et al., 2006), alguns inclusive realizados com ratos espontaneamente hipertensos (Aguila et al., 2004). Nesse sentido, fica claro que uma das conseqüências funcionais mais importantes da diminuição relativa da vascularização é a redução da oxigenação do órgão, uma vez que, ela é acompanhada por um aumento concomitante do tamanho do cardiomiócito (Weber, 1992; Beltrami, 1994), podendo levar à hipóxia (Amann, 2000). Em contrapartida, no nosso modelo experimental, o tratamento da mãe com o óleo de peixe foi capaz de preservar as artérias intramiocárdicas, o que reduz os riscos desse animal na vida adulta.

Além do mais, diversos trabalhos postulam que os efeitos benéficos dos AGP n-3 também são notados na parede vascular e a nível endotelial. Várias propriedades dos AGP n-3 podem influenciar positivamente a função vascular, visto que são envolvidos na síntese de óxido nítrico e eicosanóides da série ímpar, que são mais vasodilatadores e antiagregadores plaquetários. Eles também são capazes de mudar o tônus vascular (via ação sobre canais iônicos específicos) e manter a integridade vascular (Schiffrin, 2004). Ademais, esses ácidos graxos inibem a proliferação de células musculares lisas na parede vascular e modificam a expressão de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão celular, o que melhora a função vascular (Abeywardena e Head, 2001).

À luz do exposto, percebe-se que hipertensão arterial pós-natal e o remodelamento cardíaco adverso, induzidos por restrição protéica materna *in utero* e na lactação, podem ser minimizados pela suplementação materna com óleo de peixe (rico em AGP n-3) no período perinatal. Assim, o óleo de peixe pode ser uma opção terapêutica não farmacológica altamente viável na prevenção e/ou redução dos efeitos adversos promovidos pela programação metabólica.

Conclusões

Neste estudo observamos que as características da remodelagem adversa cardiovascular, comuns em animais que sofreram restrição protéica intensa no período perinatal (redução da massa corporal da ninhada ao nascimento, hipertensão moderada, aumento da densidade do volume de interstício cardíaco), foram atenuadas pela suplementação materna com o óleo de peixe. Um dos parâmetros mais relevantes encontrados na prole adulta de mães suplementadas com óleo de peixe é o incremento da vascularização miocárdica.

Referências Bibliográficas

- Abeywardena MY, Head RJ. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovasc Res* 2001; 52:361-371.
- Aguila MB, Pinheiro AR, Aquino JC, Gomes AP, Mandarim-de-Lacerda CA. Different edible oil beneficial effects (canola oil, fish oil, palm oil, olive oil, and soybean oil) on spontaneously hypertensive rat glomerular enlargement and glomeruli number. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005a; 76:74-85.
- Aguila MB, Pinheiro AR, Mandarim-de-Lacerda CA. Spontaneously hypertensive rats left ventricular cardiomyocyte loss attenuation through different edible oils long-term intake. *Int J Cardiol* 2005b; 100:461-466.
- Aguila MB, Sa Silva SP, Pinheiro AR, Mandarim-de-Lacerda CA. Effects of long-term intake of edible oils on hypertension and myocardial and aortic remodelling in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 2004; 22:921-929.
- Al MD, van Houwelingen AC, Hornstra G. Long-chain polyunsaturated fatty acids, pregnancy, and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:285S-291S.
- Alexander BT. Fetal programming of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; 290:R1-R10.
- Allen KG, Harris MA. The role of n-3 fatty acids in gestation and parturition. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226:498-506.
- Almeida JR, Mandarim-de-Lacerda CA. Overweight is gender-dependent in prenatal protein--calorie restricted adult rats acting on the blood pressure and the adverse cardiac remodeling. *Life Sci* 2005; 77:1307-1318.
- Amann K, Plank C, Dotsch J. Low nephron number--a new cardiovascular risk factor in children? *Pediatr Nephrol* 2004; 19:1319-1323.
- Amann K, Ritz, E. Microvascular disease--the cinderella of uraemic heart disease. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15:1493-1503.

- Ashton N. Perinatal development and adult blood pressure. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:731-740.
- bang HO, Dyeberg, J. lipid metabolism in Greenland Eskimos. *Adv Nutr Res* 1980; 31:1-32.
- Banning M. The role of omega-3-fatty acids in the prevention of cardiac events. *Br J Nurs* 2005; 14:503-508.
- Barker DJ. Outcome of low birthweight. *Horm Res* 1994; 42:223-230.
- Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998a; 95:115-128.
- Barker DJ, Forsen T, Uutela A, Osmond C, Eriksson JG. Size at birth and resilience to effects of poor living conditions in adult life: longitudinal study. *Bmj* 2001; 323:1273-1276.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993; 341:938-941.
- Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986; 1:1077-1081.
- Barker DJP. In utero programming of chronic disease. . *Clinical Science* 1998b; 95:115-128.
- Battista MC, Calvo E, Chorvatova A, Comte B, Corbeil J, Brochu M. Intra-uterine growth restriction and the programming of left ventricular remodelling in female rats. *J Physiol* 2005; 565:197-205.
- Beltrami CA, Finato N., Rocco, M. et al. Structural basis of end-stage failure in ischemic cardiomyopathy in humans. *Circulation* 1994; 89:151-163.
- Benkirane K, Amiri, F., Diep, Q.N., El Mabrouk M., Schiffrin, E.L. PPAR-gamma inhibits ANG II- induced cell growth via SHIP2 and 4E-BP1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290:H390-397.
- Bishop-Bailey D. Peroxisome proliferator-activated receptors in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol* 2000; 129:823-834.
- Black MJ, Briscoe TA, Constantinou M, Kett MM, Bertram JF. Is there an association between level of adult blood pressure and nephron number or renal filtration surface area? *Kidney Int* 2004; 65:582-588.

- Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 85:267-273.
- Bonaa KH, Bjerve KS, Straume B, Gram IT, Thelle D. Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on blood pressure in hypertension. A population-based intervention trial from the Tromso study. *N Engl J Med* 1990; 322:795-801.
- Borges VTMea. Influência das alterações hemodinâmicas maternas sobre o desenvolvimento fetal. *RBGO* 2001; 23:147-151.
- 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* 2003; 54:83-90.
- Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens* 1988; 1:335-347.
- Byrne JAG, D.J.; Cave, A.C. and Shah, A.M. Oxidative stress and heart failure. *Arch Mal Coeur Vaiss* 2003; 96:214-221.
- Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol* 1973; 59:365-373.
- Catta-Preta M, Oliveira DA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilá MB. Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies. *Life Sci* 2006; 80:219-229.
- Charnock JS, McLennan PL, Abeywardena MY. Dietary modulation of lipid metabolism and mechanical performance of the heart. *Mol Cell Biochem* 1992; 116:19-25.
- Chen HW, Lii CK, Chen WT, Wang ML, Ou CC. Blood pressure-lowering effect of fish oil is independent of thromboxane A2 level in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996; 54:147-154.
- Christensen K, Stovring H, McGue M. Do genetic factors contribute to the association between birth weight and blood pressure? *J Epidemiol Community Health* 2001; 55:583-587.

- Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, Wreford NG, Black MJ. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res* 2005; 57:796-800.
- Cuspidi C, Macca, G., Michev, I., Fusi, V., Severgnini, B., Corti, C., Meani, S., Valerio, C., Sala, C., Magrini, F. and Zanchetti, A. Left ventricular concentric remodelling and extracardiac target organ damage in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2002; 16:385-390.
- Das UN. long-chain polyunsaturated fatty acids interact with nitric oxide, superoxide anion, and transforming growth factor-beta to prevent human essential hypertension. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58:195-203.
- de Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2006; 46:4-14.
- de Groot RH, Hornstra, G., Van Houwelingen, A.C., Roumen, F. Effect of alpha-linolenic acid supplementation during pregnancy on maternal and neonatal polyunsaturated fatty acid status and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 2004; 70:292-298.
- Decsi T, Koletzko B. N-3 fatty acids and pregnancy outcomes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8:161-166.
- Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Permanent reduction in heart and kidney organ growth in offspring of undernourished rat dams. *Am J Obstet Gynecol* 2005; 193:1224-1232.
- Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 2000; 36:851-855.
- do Carmo Pinho Franco M, Nigro D, Fortes ZB, Tostes RC, Carvalho MH, Lucas SR, Gomes GN, Coimbra TM, Gil FZ. Intrauterine undernutrition--renal and vascular origin of hypertension. *Cardiovasc Res* 2003; 60:228-234.
- Du Cailar G, Pasquie, J.L., Ribstein, J. and Mimran, A. Left ventricular adaptation to hypertension and plasma renin activity. *J Hum Hypertens* 2000; 14:181-188.

- Dunstan JA, Mori, T.A., Barden, A. et al. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in pregnancy on maternal and fetal erythrocyte fatty acid composition. *Eur J Clin Nutr* 2004; 58:429-437.
- Dunstan JA, Roper J, Mitoulas L, Hartmann PE, Simmer K, Prescott SL. The effect of supplementation with fish oil during pregnancy on breast milk immunoglobulin A, soluble CD14, cytokine levels and fatty acid composition. *Clin Exp Allergy* 2004; 34:1237-1242.
- Engler MB, Engler MM. Docosahexaenoic acid--induced vasorelaxation in hypertensive rats: mechanisms of action. *Biol Res Nurs* 2000; 2:85-95.
- Engler MM, Engler MB, Goodfriend TL, Ball DL, Yu Z, Su P, Kroetz DL. Docosahexaenoic acid is an antihypertensive nutrient that affects aldosterone production in SHR. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999a; 221:32-38.
- Engler MM, Engler MB, Kroetz DL, Boswell KD, Neeley E, Krassner SM. The effects of a diet rich in docosahexaenoic acid on organ and vascular fatty acid composition in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1999b; 61:289-295.
- Engler MM, Engler MB, Pierson DM, Molteni LB, Molteni A. Effects of docosahexaenoic acid on vascular pathology and reactivity in hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003; 228:299-307.
- Falkner B. Birth weight as a predictor of future hypertension. *Am J Hypertens* 2002; 15:43S-45S.
- Falkner B, Hulman S, Kushner H. Effect of birth weight on blood pressure and body size in early adolescence. *Hypertension* 2004; 43:203-207.
- Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21:29-37.
- Franco Mdo C, Arruda RM, Dantas AP, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, Carvalho MH, Tostes RC, Nigro D. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res* 2002a; 56:145-153.

- Franco Mdo C, Arruda RM, Fortes ZB, de Oliveira SF, Carvalho MH, Tostes RC, Nigro D. Severe nutritional restriction in pregnant rats aggravates hypertension, altered vascular reactivity, and renal development in spontaneously hypertensive rats offspring. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002b; 39:369-377.
- Geleijnse JM, Giltay EJ, Grobbee DE, Donders AR, Kok FJ. Blood pressure response to fish oil supplementation: metaregression analysis of randomized trials. *J Hypertens* 2002; 20:1493-1499.
- Gester H. The use of n-3 PUFA (fish oil) in enteral nutrition. *Int J Vitaminol Nutr Res* 1995; 65:3-20.
- Gluckman PD, Hanson, M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004; 305:1733-1736.
- Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1344S-1352S.
- Gonzalez A, Fortuno MA, Querejeta R, Ravassa S, Lopez B, Lopez N, Diez J. Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2003; 59:549-562.
- Gundersen HJ, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, et al. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988a; 96:857-881.
- Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis* 1988b; 96:379-394.
- Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 1992; 35:595-601.
- Hales CN, Ozanne SE. The dangerous road of catch-up growth. *J Physiol* 2003; 547:5-10.
- Hartman L, Lago, R.C.A. Composition of lipids from rice hulls and from surface of rice caryopsis. *J Sci Food Agr* 1976; 27:939-942.

- Holemans K, Gerber, R., Meurrens, K., De Clerk, F., Poston, L. and Van Assche, F.A. 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.
- Huxley AF. The Links between Excitation and Contraction. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1964; 160:486-488.
- Huxley R, Neil A, Collins R. Unravelling the fetal origins hypothesis: is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure? *Lancet* 2002; 360:659-665.
- Iglarz M, Touyz, R.M., Viel, E.C. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and receptor-gamma activators prevent cardiac fibrosis in mineralocorticoid-dependent hypertension. *Hypertension* 2003; 42:737-743.
- Ingelfinger JR, Woods LL. Perinatal programming, renal development, and adult renal function. *Am J Hypertens* 2002; 15:46S-49S.
- Jiang C TASB. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391:82-86.
- Joshi S, Rao S, Golwilkar A, Patwardhan M, Bhonde R. Fish oil supplementation of rats during pregnancy reduces adult disease risks in their offspring. *J Nutr* 2003; 133:3170-3174.
- Kenchiah S, Pfeffer MA. Cardiac remodeling in systemic hypertension. *Med Clin North Am* 2004; 88:115-130.
- Kett MM, Bertram JF. Nephron endowment and blood pressure: what do we really know? *Curr Hypertens Rep* 2004; 6:133-139.
- Khan IY, Taylor, P.D., Dekou, V. et al. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 2003; 41:168-175.
- Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23:e20-30.

- Lamireau D, Nuyt AM, Hou X, Bernier S, Beauchamp M, Gobeil F, Jr., Lahaie I, Varma DR, Chemtob S. Altered vascular function in fetal programming of hypertension. *Stroke* 2002; 33:2992-2998.
- Langley-Evans SC. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc* 2001; 60:505-513.
- Langley-Evans SC. Fetal nutrition and adult disease. Programming of chronic disease through fetal exposure to undernutrition. *Cambridge: CABI Pu* 2004.
- Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr* 1996; 126:1578-1585.
- Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* 1999; 64:965-974.
- Langley-Evans SCP, G.J. and Jackson, A.A. In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. *Clin Nutr* 1994; 13:319-324.
- Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)* 1994; 86:217-222; discussion 121.
- Lee KW, Lip GY. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease. *Qjm* 2003; 96:465-480.
- Lin QR, S.E.; Shaw, N.S.; Dong, D. and Noy, N. Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Biochemistry* 1999; 5:185-190.
- Lobelo F. Fetal programming and risk of metabolic syndrome: prevention efforts for high-risk populations. *Pediatrics* 2005; 116:519; author reply 519-520.
- Lombardo YB, Chicco A, D'Alessandro ME, Martinelli M, Soria A, Gutman R. Dietary fish oil normalize dyslipidemia and glucose intolerance with unchanged insulin levels in rats fed a high sucrose diet. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299:175-182.
- Mackenzie HS, Brenner BM. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis* 1995; 26:91-98.

- Makrides M, Gibson, R.A. Long-chain polyunsaturated fatty acid requirements during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 2000; 71 (suppl):307S-311S.
- Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* 2000; 58:770-773.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc* 2003; 75:469-486.
- Manning J, Vehaskari VM. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol* 2001; 16:417-422.
- Mattfeldt T, Mall G, Gharehbaghi H, Moller P. Estimation of surface area and length with the orientator. *J Microsc* 1990; 159 (Pt 3):301-317.
- McCowen KC, Bistrrian BR. Essential fatty acids and their derivatives. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21:207-215.
- McGregor JA, Allen, K.G., Harris, M.A. et al. The omega-3 story: nutritional prevention of preterm birth and other adverse pregnancy outcomes. . *Obstetrical & Gynecological Survey* 2001; 56:S1-13.
- McMullen S, Gardner DS, Langley-Evans SC. Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. *Br J Nutr* 2004; 91:133-140.
- Medeiros FJ, Mothe CG, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Long-term intake of edible oils benefits blood pressure and myocardial structure in spontaneously hypertensive rat (SHR) and streptozotocin diabetic SHR. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005; 78:231-248.
- Molnar J, Howe, D.C., Nijland, M.J., Nathanielsz, P.W. Prenatal dexamethasone leads to both endothelial dysfunction and vasodilatory compensation in sheep. *The journal of physiology* 2003; 547:61-66.
- Montgomery C, Speake BK, Cameron A, Sattar N, Weaver LT. Maternal docosahexaenoic acid supplementation and fetal accretion. *Br J Nutr* 2003; 90:135-145.

- Morais AA, Tavares GM, Pezzin AC, Moana AA, Galvao HP, Faintuch J. [Assessment of body composition in pregnant women at term]. *Rev Assoc Med Bras* 1997; 43:109-113.
- Mori TA, Woodman, R.J., Burke, V., Puddey, I.B., Croft, K.D., Beilin, L.J. Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-hypertensive type 2 diabetic subjects. *Free Radic Biol Med* 2003; 35:772.
- Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation* 1993; 88:523-533.
- Olafsdottir AS, Magnusardottir AR, Thorgeirsdottir H, Hauksson A, Skuladottir GV, Steingrimsdottir L. Relationship between dietary intake of cod liver oil in early pregnancy and birthweight. *Bjog* 2005; 112:424-429.
- Olsen SF, Sorensen, J.D., Secher, N.J. et al. Randomised controlled trial of effect of fish oil supplementation on pregnancy duration. *Lancet* 1992; 339:1003-1007.
- Otto SJ, van Houwelingen AC, Badart-Smook A, Hornstra G. Changes in the maternal essential fatty acid profile during early pregnancy and the relation of the profile to diet. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:302-307.
- Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol* 2001; 530:141-152.
- Ozanne SE, Hales CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* 2004; 427:411-412.
- Pires KMPA, M.B.; Mandarim-de-Lacerda, C.A. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. *Life Sciences* 2006; 79:2128-2134.
- Rasch R, Skriver E, Woods LL. The role of the RAS in programming of adult hypertension. *Acta Physiol Scand* 2004; 181:537-542.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391:79-82.

- Rogers I, Emmett P, Ness A, Golding J. Maternal fish intake in late pregnancy and the frequency of low birth weight and intrauterine growth retardation in a cohort of British infants. *J Epidemiol Community Health* 2004; 58:486-492.
- Ruxton CH, Reed SC, Simpson MJ, Millington KJ. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 2004; 17:449-459.
- Sanjurjo P, Ruiz-Sanz, J.I., Jimeno, P. et al. Supplementation with docosahexaenoic acid in the last trimester of pregnancy: maternal-fetal biochemical findings. *J Perinat Med* 2004; 32:132-136.
- Sattar NB, C.; Greer, I.A. Essential fatty acids in relation to pregnancy complications and foetal development. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105:1248.
- Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie* 1970; 26:57-60.
- Schiffrin EL. Remodeling of resistance arteries in essential hypertension and effects of antihypertensive treatment. *Am J Hypertens* 2004; 17:1192-1200.
- Schiffrin EL, Amiri F, Benkirane K, Iglarz M, Diep QN. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension* 2003; 42:664-668.
- Serhan CN, Clish, C.B. and Brannon, J. et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2- nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 2000; 192:1197-1204.
- Serhan CN, Clish, C.B. and Brannon, J. et al. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2005; 8:115-121.
- Serhan CN, Hong, S., Gronert, K., Colgan, S.P., Devchand, P.R., Mirick, G. and Moussignac, R. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. *J Exp Med* 2002; 196:1025-1037.
- Sidhu KS. Health benefits and potential risks related to consumption of fish or fish oil. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2003; 38:336-344.

- Struijker Boudier HA, Cohuet, G.M., Baumann, M. and Safar, M.E. The heart, macrocirculation and microcirculation in hypertension: a unifying hypothesis. *J Hypertens Suppl* 2003; 21:S19-23.
- Tappia PS, Gabriel CA. Role of nutrition in the development of the fetal cardiovascular system. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2006; 4:211-225.
- Vanschoonbeek K, de Maat MP, Heemskerk JW. Fish oil consumption and reduction of arterial disease. *J Nutr* 2003; 133:657-660.
- Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 2001; 59:238-245.
- Weber KT. Metabolic responses of extracellular matrix in tissue repair. *Ann Med* 1997; 29:333-338.
- Weber KT, Brilla, C.G., Campbell, S.E., Zhou G., Matsubara, L., Guarda, E. Pathologic hypertrophy with fibrosis: the structural basis for myocardial failure. *Blood Press* 1992; 1:75-85.
- Wilde MC, Hógyes, E., Kiliaan, A.J., Farkas, T., Luiten, P.G.M. and Farkas, E. Dietary fatty acids alter blood pressure, behavior, and brain membrane composition of hypertensive rats. *Brain Research* 2003; 988:9-19.
- Woods LL. Fetal origins of adult hypertension: a renal mechanism? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9:419-425.
- Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 2001; 49:460-467.
- 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:R1131-1136.
- Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int* 2004; 65:1339-1348.

- Wyrwoll CS, Mark PJ, Mori TA, Puddey IB, Waddell BJ. Prevention of programmed hyperleptinemia and hypertension by postnatal dietary omega-3 fatty acids. *Endocrinology* 2006; 147:599-606.
- Yang CM, Kandaswamy V, Young D, Sen S. Changes in collagen phenotypes during progression and regression of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1997; 36:236-245.
- Yi Xu SJW, Darryl O'Brien and Sandra T. Davidge. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring. *The FASEB Journal* 2006; 20.
- Yin FCP, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the ageing rat. *Am J Physiol* 1982; 243:H941-H947.
- Zar J. Biostatistical analysis. *Prentice-Hall, Upper Saddle River* 1999; 4 edn.