



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Diana de Freitas Serapião Moraes

Administração crônica de cafeína durante a gestação afeta o remodelamento cardíaco e expressão dos componentes do sistema renina angiotensina da prole adulta de camundongos C57BL/6

Rio de Janeiro

2012

Diana de Freitas Serapião Moraes

Administração crônica de cafeína durante a gestação afeta o remodelamento cardíaco e expressão dos componentes do sistema renina angiotensina da prole adulta de camundongos C57BL/6

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

Orientadora: Prof^ª. Dra Tatiane da Silva Faria

Rio de Janeiro

2012

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

M827 Moraes, Diana de Freitas Serapião.

Administração crônica de cafeína durante a gestação afeta o remodelamento cardíaco e expressão dos componentes do sistema renina-angiotensina da prole adulta de camundongos C57BL/6 / Diana de Freitas Serapião Moraes. – 2012.

94 f.

Orientadora: Tatiane da Silva Faria.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Cafeína – Efeitos adversos. 2. Efeitos tardios da exposição pré-natal. 3. Desenvolvimento fetal - Efeitos de drogas. 4. Remodelação ventricular - Efeitos de drogas. 5. Sistema renina-angiotensina - Efeitos de drogas. 6. Camundongos - Teses. I. Faria, Tatiane da Silva. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 615.711.62:618.231

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

Assinatura

Data

Diana de Freitas Serapião Moraes

Administração crônica de cafeína durante a gestação afeta o remodelamento cardíaco e expressão dos componentes do sistema renina angiotensina da prole adulta de camundongos C57BL/6

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

Aprovada em 30 de julho de 2012.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dra. Tatiane da Silva Faria (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Cristiane da Fonte Ramos
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^ª. Dra. Dayane Teixeira Ognibene
Centro Universitário da Zona Oeste - UEZO

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Ao meu querido esposo Alexandre Moraes Paiva
A minha tia Ilza Alcantara de Freitas Souza (*in memoriam*)
A minha orientadora Prof^ª. Tatiane da Silva Faria

AGRADECIMENTOS

Ao Deus, por nunca me desamparar e de uma modo maravilhoso me ajudar a fazer com que em apenas oito meses este trabalho se tornasse real. Foi um milagre.

Ao meu esposo Alexandre Moraes Paiva pelo incentivo, compreensão e carinho em todos os momentos deste trabalho. Sem o seu apoio esta caminhada seria muito mais difícil. “Te amo demais, Deus trouxe o sonho que eu sonhei...”

Ao meu irmão André de Freitas Serapião por sempre me socorrer, e por estar sentado na primeira fileira da arquibancada torcendo por mim. Conte comigo.

Aos meus amigos da “Era Luz”: D’Angelo Carlo Magliano, vulgo Fatini, se tudo der errado vamos formar uma bela dupla de sertanejo universitário! Débora Cristina Silva, minha amiga, confidente, sinto sua falta, volte logo! Fernanda Ornellas Cruz, minha amiga, irmã, sempre encontrava o equilíbrio em você. Thereza Bargut, compenetrada, autodidata, sempre foi exemplo de eficiência para mim.

À Eliete Dalla Corte Frantz por me inserir no laboratório e me acolher juntamente com o amigo Milton Vieira Costa. Guria, você é muito um exemplo de eficiência, inteligência e acima de tudo humanidade e abdicção.

À professora Vanessa Souza-Mello por ser sempre acessível e pronta a orientar. Divertida, mas sem deixar de ser profissional, mostrou que a associação entre humildade, inteligência e eficiência era possível.

Aos professores Geraldo de Oliveira Junior e Thiago Silva Torres por esclarecerem as minhas inúmeras dúvidas e auxiliarem em momentos distintos.

As técnicas do laboratório: Thatiany Marinho, Aline Penna que foi muito além da ajuda técnica, me auxiliando voluntariamente a cuidar dos meus animais na fase de biotério, me ajudando em praticamente todas as doses. Sua ajuda na fase do western blotting foi fundamental, não tenho palavras para agradecer. Ao amigo Willian Lannes.

A todos os colegas e amigos do LMMC que de forma direta ou indireta estiveram ligados a este trabalho. Muito obrigada a todos.

Aos professores Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda e Márcia Barbosa Águila por acreditarem em mim e no meu trabalho, me aceitando para integrar sua equipe tão competente e prestigiosa.

E finalmente a professora Tatiane Silva Faria, por aceitar o desafio de me orientar em uma linha de pesquisa nova para o laboratório.

CAPES, FAPERJ e CNPQ por financiarem este estudo.

Dá instrução ao sábio, e ele se fará mais sábio ainda;
ensina ao justo, e ele crescerá em prudência
Provérbios 9:9

RESUMO

SERAPIÃO-MORAES, Diana de Freitas. *Administração crônica de cafeína durante a gestação afeta o remodelamento cardíaco e expressão dos componentes do sistema renina-angiotensina da prole adulta de camundongos C57BL/6*. 2012. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Este estudo teve como objetivo avaliar o papel da administração crônica de cafeína durante a gestação de camundongos C57BL/6 sobre o remodelamento cardíaco e a expressão de componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) na prole macho adulta. Fêmeas C57BL/6 grávidas foram divididas em dois grupos (n = 10): grupo controle (C), progenitoras foram injetadas apenas com o veículo (solução salina NaCl 0,9%), e grupo cafeína (CF), progenitoras receberam diariamente uma injeção subcutânea contendo 20 mg/kg de cafeína (1 mg/ml de solução salina). Após o desmame, os filhotes tiveram livre acesso à ração padrão até 90 dias de idade quando foram sacrificados. Rim e ventrículo esquerdo (VE) foram coletados para análise estrutural e western blotting. O grupo cafeína mostrou uma redução significativa no ganho de massa corporal (MC) (-18%; P <0,0001). O grupo cafeína apresentou ainda um aumento da pressão arterial sistólica (+ 48%; P <0,0001) e frequência cardíaca (+10%; P <0,01) em relação ao grupo controle. A massa do VE corrigida pela MC no grupo da cafeína foi maior que no grupo C (+10%; P <0,01). O grupo cafeína apresentou um aumento na área de cardiomiócitos (+40%; P <0,05), e reduzida densidade capilar (-25%; P <0,05). No rim, as expressões de renina (128%; P <0,05) e dos receptores 1 da angiotensina II (AT1R) (88%; P <0,05) foram significativamente maiores nos animais do grupo cafeína. No VE, o grupo cafeína demonstrou aumento da expressão de ECA (+30%; P <0,05), angiotensina II (+60%; P <0,01), e AT1R (+77%; P <0,01) e diminuição da expressão do receptor 2 de angiotensina II (-46%; P <0,05). Em conclusão, a administração crônica de cafeína durante a gestação, possivelmente programa a expressão de componentes de sistema renina-angiotensina, levando à ativação persistente do SRA renal e cardíaco local, que por sua vez promove o aumento da pressão sanguínea, remodelação e efeitos cardíacos adversos.

Palavras-chave: Camundongo C57BL/6. Cafeína. Programação fetal. Remodelamento cardíaco. Sistema renina-angiotensina.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the role of caffeine chronic administration during gestation of C57BL/6 mice on cardiac remodeling and the expression of components of the renin-angiotensin system (RAS) in male offspring as adults. Pregnant C57BL/6 female mice were divided into two groups (n=10): Control group (C), dams were injected with the vehicle only (saline 0.9% NaCl), and Caffeine group (CF), dams received daily a subcutaneous injection containing 20 mg/kg of caffeine/day (1 mg/ml saline). After weaning, pups had free access to the standard chow until 90 days of age when they were killed. Kidney and left ventricle (LV) were collected for structural analysis and Western blot. Caffeine group showed a significant reduction in body mass (BM) gain (-18%; $P<0.0001$). Caffeine group had increased systolic blood pressure (+ 48%; $P<0.0001$) and higher heart rate (+10%; $P<0.01$) than control group. LV mass adjusted by BM in caffeine group was greater than in C group (+10%; $P<0.01$). Caffeine group had increase in the area of cardiomyocytes (+40%; $P<0.05$), and reduced capillary density (-25%; $P<0.05$). In the kidney, the expressions of renin (+128%; $P<0.05$) and angiotensin II receptor 1(AT1R) (+88%; $P<0.05$) were significantly greater in caffeine mice. In the LV, caffeine group showed increased expression of ACE (+30%; $P <0.05$), angiotensin II (+60%; $P<0.01$), and AT1R (+77%; $P<0.01$), and decreased expression of angiotensin II receptor 2 (-46%; $P<0.05$). In conclusion, chronic administration of caffeine during gestation possibly programs the expression of renin-angiotensin system components, leading to persistent activation of local renal and cardiac RAS, which in turn promotes increased BP and adverse cardiac remodeling.

Key-words: C57BL/6 mice. Caffeine. Fetal programming. Cardiac remodeling. Renin-angiotensin system.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ativação dos receptores de adenosina.....	20
Figura 2	Hipótese da programação fetal.....	24
Figura 3	Modelo da cascata do sistema renina-angiotensina.....	31
Figura 4	Estereologia do ventrículo esquerdo.....	40
Figura 5	Evolução da ingestão alimentar dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) a partir do desmame até o final do experimento	44
Figura 6	Evolução da massa corporal dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) por todo o experimento.....	45
Figura 7	Ganho ponderal dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento	46
Figura 8	Calorimetria indireta dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) na 11 ^a semana de vida	47
Figura 9	Avaliação da pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) durante o período de 4 semanas	48
Figura 10	Massas absolutas e relativas do coração (A e B) e do VE (C e D) dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.....	49
Figura 11	Fotomicrografia do VE dos animais dos grupos controle (a) e cafeína (b) ao final do experimento.....	50
Figura 12	Dados estereológicos do VE.....	51
Figura 13	Fotomicrografias da técnica de imunohistoquímica de angiotensina II	52
Figura 14	Análise por western blotting da expressão proteica de renina corrigida por beta-actina no rim dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.....	53
Figura 15	Análise por western blotting da expressão proteica de AT1 corrigida por beta-actina no rim dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.....	54
Figura 16	Análise por western blotting da expressão proteica de ECA corrigida por beta-actina no coração dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento	55
Figura 17	Análise por western blotting da expressão proteica de Angiotensina II corrigida por beta-actina no coração dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento	56

Figura 18	Análise por western blotting da expressão proteica de AT1R corrigida por beta-actina no coração dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento	57
Figura 19	Análise por western blotting da expressão proteica de AT2R corrigida por beta-actina no coração dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento	58

LISTA DE TABELA

Tabela 1 –	Receptores de adenosina e sua distribuição nos órgão e tecidos.....	21
Tabela 2 –	Principais estudos com cafeína em modelos humanos e animais.....	28
Tabela 3 –	Dados das progenitoras: ingestão alimentar, massa corporal e tamanho da ninhada	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A (cmi)-	área do cardiomiócito
A1AR -	receptor de adenosina A1
A2aAR-	receptor de adenosina A2a
A2AR -	receptor de adenosina A2
A2bAR-	receptor de adenosina A2b
A3AR -	receptor de adenosina A3
AMP -	adenosina monofosfato
AMPC -	adenosina monofosfato cíclico
Ang II -	angiotensina II
Ang III-	angiotensina III
Ang IV-	angiotensina IV
AT -	área teste
AT1R -	receptor de angiotensina 1
AT2R -	receptor de angiotensina 2
AT3 -	receptor de angiotensina 3
AT4 -	receptor de angiotensina 4
AUI -	aleatório universalmente isotrópico
C -	controle
Ca ²⁺ -	cálcio
cap -	capilar
CF -	caféina
cmi -	cardiomiócito
Cu -	cobre
CYP1A2-	citocromo P450
DAB -	diaminobenzidina
DM -	diabetes mellitus
ECA I -	enzima conversora de angiotensina
ECA 2 -	enzima conversora de angiotensina 2
EPM -	erro padrão da média
GABAA-	ácido gama-aminobutírico A
GE -	gasto energético

Gi	-	proteína G inibitória
Gs	-	proteína G estimulatória
HAS	-	hipertensão arterial sistêmica
HIF1 α		fator induzido por hipóxia
KCl	-	cloreto de potássio
MC	-	massa corporal
NaCl	-	cloreto de sódio (sal)
P1	-	receptor purinérgico
PA	-	pressão arterial
QA(ncmi)-		número de cardiomiócitos dentro da área teste
QR	-	quociente respiratório
SRA		sistema renina angiotensina
VCO2	-	volume de dióxido de carbono exalado
VE	-	ventrículo esquerdo
VO2	-	volume de oxigênio consumido
Vv	-	densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1	Cafeína	19
1.1.1	<u>Mecanismo de ação</u>	21
1.2	Programação fetal	23
1.3	Cafeína e programação fetal	26
1.4	O sistema renina angiotensina	29
1.4.1	<u>Controle da secreção de renina renal</u>	31
1.4.2	<u>Sistema renina-angiotensina cardíaco local</u>	33
2	OBJETIVOS	35
2.1	Geral	35
2.2	Específicos	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Animais	36
3.2	Obtenção da prole	36
3.3	Biometria da prole	37
3.4	Calorimetria indireta	37
3.5	Eutanásia	38
3.6	Microscopia de luz	39
3.7	Estereologia do miocárdio	39
3.8	Imunohistoquímica do ventrículo esquerdo	40
3.9	Western blotting do ventrículo esquerdo e rim	41
3.10	Análise de dados	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Ingestão alimentar, massa corporal e tamanho da ninhada das progenitoras	43
4.2	Ingestão alimentar e massa corporal das proles	44
4.3	Calorimetria indireta das proles	47
4.4	Pressão arterial e frequência cardíaca das proles	48
4.5	Massa do coração e ventrículo esquerdo das proles	49
4.6	Avaliação estereológica do ventrículo esquerdo das proles	50
4.7	Imunohistoquímica da expressão de angiotensina II do VE das proles	52

4.8	Expressão proteica de renina e AT1R no rim das proles.....	53
4.9	Expressão proteica de ECA, Ang II, AT1R e AT2R no ventrículo esquerdo das proles.....	55
5	DISCUSSÃO.....	59
6	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE – Artigo - <i>Maternal caffeine administration leads to adverse effects on adult mice offspring</i> submetido a <i>European Journal of Nutrition</i>.....	79
	ANEXO – Comitê de ética em pesquisa.....	101

INTRODUÇÃO

A cafeína é um composto químico naturalmente presente em uma grande diversidade de alimentos, tais como café, cacau ou chocolate, refrigerantes a base de cola e chás (Heckman, Weil et al. 2010). Ademais, é uma substância amplamente utilizada na farmacologia, na sua forma sintética, como adjuvante de outros compostos visando à analgesia (Sawynok 2011). Classificada quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina, a cafeína pertence ao grupo das xantinas. Metilxantinas são substâncias capazes de estimular o Sistema nervoso central, produzindo um alerta de curta duração, motivo este que leva a cafeína a alcançar o título de psicoativo mais consumido do mundo (Bjorklund, Kahlstrom et al. 2008; Heckman, Weil et al. 2010).

A alta frequência do consumo de cafeína pela população num contexto mundial despertou o interesse da comunidade científica sobre os efeitos fisiológicos deste composto, relacionando a sua ingestão aos níveis pressóricos ou ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares (Birkett and Logan 1988; Hartley, Lovallo et al. 2001; Winkelmayr, Stampfer et al. 2005). Contudo, o alto consumo de cafeína é relatado para todas as faixas etárias, o que inclui mulheres gestantes (Greenwood, Alwan et al. 2010). Pelo fato desse composto ser de natureza hidrofóbica e ser prontamente absorvido por membranas biológicas, o consumo durante a gestação implica a passagem da cafeína através da placenta, alcançando o feto (Kirkinen, Jouppila et al. 1983).

A cafeína e seus metabólitos atravessam facilmente a placenta com concentrações ligeiramente menores que os níveis maternos (Cnattingius, Ekblom et al. 2003). O pico de concentração de cafeína durante a gestação é em torno de 30-60 min após a administração (Porter and Rivkees 2001). A meia vida da cafeína em mamíferos adultos é em torno de 3 a 6h, aumentando para de 10 a 20h durante a gestação (Signorello, Nordmark et al. 2001). No feto, a meia vida da cafeína dura em torno de 80-100h sendo o feto incapaz de desmetilar a cafeína (Fredholm 1995). Logo, uma modesta ingestão de cafeína pela mãe pode ser muito mais significativa para o embrião (Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009).

A programação fetal foi inicialmente descrita a partir da restrição de nutrientes durante o período da segunda guerra mundial em populações europeias (Stein and Susser 1975; Stein and Susser 1975), esse fenômeno pode ser definido como insultos sofridos pela mãe durante períodos críticos de desenvolvimento fetal que irão alterar a trajetória de desenvolvimento de determinados órgãos, causando adaptações na morfologia, fisiologia e metabolismo do feto a

fim de assegurar a sobrevivência fetal frente às condições intrauterinas adversas (Barker 1990). Tais insultos englobam restrição de proteínas, insuficiências placentárias, restrição do fluxo sanguíneo placentário, restrição calórica e anemia materna (Godfrey and Barker 2000). Nessas condições órgãos como o coração, o rim e o fígado apresentam um menor número de células funcionais ao nascer, porém o cérebro é preservado por um redirecionamento do fluxo sanguíneo para este órgão nobre (Barker 1990; Godfrey and Barker 2000). Tais adaptações não comprometeriam a vida pós-natal do recém-nato desde que este fosse submetido às mesmas condições intrauterinas após o nascimento. No entanto, modificações nas condições nutricionais deflagram mecanismos de crescimento acelerado (*catch up*) que resultam em maior predisposição desse indivíduo a doenças crônicas na vida adulta, tais como obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes mellitus (DM) (Hales and Ozanne 2003; Ozanne and Hales 2004). Todas essas observações enquadram o consumo de cafeína durante a gestação no conceito de programação fetal.

Os mecanismos exatos pelos quais a cafeína atua no feto são inconclusivos. A cafeína pode atuar no feto de maneira direta, já que atravessa a barreira placentária sem ser metabolizada (Kirkinen, Jouppila et al. 1983), ou indireta, pela ação na progenitora. A literatura relata que a ação direta da cafeína nos receptores de adenosina fetais conduzem a um aumento do AMP cíclico por inibição da enzima fosfodiesterase, podendo interferir na divisão celular (Soyka 1979), e pela ação indireta através da mãe, a literatura sugere que a deficiência do fluxo sanguíneo útero-placentário, do fluxo sanguíneo feto-placentário, ou do fluxo de sangue das vilosidades, causado pelo efeito vasoconstrictor da cafeína, pode levar a retardo do crescimento intrauterino (Liu, Ostlund et al. 1995; Ghidini 1996) e ainda causar vasoconstrição uterina mediada por catecolamina (Soyka 1979).

O uso crônico de cafeína durante a gestação inibe a função dos receptores A1 de adenosina no cérebro de ratos por reduzir a regulação da proteína G inibitória (Gi) (Leon, Albasanz et al. 2005) e fetos expostos a cafeína apresentam uma reduzida função cardíaca (Buscariollo, Breuer et al. 2011) possivelmente devido ao fato do uso crônico de cafeína conduzir a uma redução nos receptores de glutamato metabotrópicos, o que pode alterar a fisiologia do coração (Iglesias, Leon et al. 2006).

No que tange ao coração, o retardo do crescimento intrauterino por restrição de proteínas na gestação e lactação conduz ao menor número de cardiomiócitos, aumento da fibrose cardíaca e redução da vascularização intramiocárdica (Gregorio, Souza-Mello et al. 2008). Estudos realizados com animais mostraram que o consumo de cafeína durante a gestação e/ou lactação resulta em baixos níveis de cobre (Cu) no plasma, leite e tecido

cardíaco dos filhotes, e que os baixos níveis deste micronutriente resultam em cardiomiopatia (Wink, Rossowska et al. 1999; Asadifar, Yazdani et al. 2005).

Na vigência de deficiência do fluxo sanguíneo uteroplacentário, o rim é um órgão grandemente acometido. No modelo de restrição materna de proteínas o rim apresenta reduzido número de glomérulos ao nascimento da prole (Woods 2000). Tal achado resultará em hipertrofia e hiperfiltração glomerular na vida adulta, culminando com HAS e glomeruloesclerose em longo prazo (Woods, Weeks et al. 2004; Woods 2007). O comprometimento do desenvolvimento renal é mediado por uma supressão do sistema renina angiotensina (SRA) durante o desenvolvimento fetal (Rasch, Skriver et al. 2004).

A associação entre o consumo de cafeína e o desenvolvimento de HAS não está bem estabelecida. O consumo agudo de cafeína em adultos, principalmente através do consumo de café, produz aumento da pressão arterial, dos níveis circulantes de norepinefrina, tônus vascular arterial e prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio, comprometendo a condução e contratilidade miocárdica (Hartley, Lovallo et al. 2001; Riksen, Smits et al. 2011). Esses efeitos são mediados pelo antagonismo dos receptores A1 e A2 da adenosina (A1AR e A2AR) e inibição das fosfodiesterases (Nurminen, Niittynen et al. 1999; Riksen, Smits et al. 2011).

Há uma relação íntima entre o aumento dos níveis pressóricos e alterações no sistema renina angiotensina (Patel and Schultz 2012). Esse sistema está criticamente envolvido no controle da pressão arterial e do volume homeostático, sendo composto por um componente tecidual local e um componente circulante (Danser 2003; Nguyen Dinh Cat and Touyz 2011). A enzima limitante renina, deriva do rim no SRA circulante e a partir de uma cascata de peptídeos resulta na angiotensina II (Ang II), a qual mediará a regulação da função cardiovascular pela ligação aos receptores de angiotensina II-1 (AT1R) e receptores de angiotensina II-2 (AT2R) no coração, rim e células vasculares (Paul, Poyan Mehr et al. 2006). O SRA tecidual pode operar independentemente do SRA circulante e pode ser ativado mesmo quando o SRA circulante está suprimido ou normal (Danser 1996).

O SRA cardíaco já se encontra caracterizado, ou seja, o angiotensinogênio, a enzima conversora de angiotensina (ECA), a angiotensina I (Ang I) e a angiotensina II são sintetizados localmente (Danser, Saris et al. 1999). Este apresenta como papel fisiológico principal a manutenção de um contingente celular adequado, estimulando e inibindo o crescimento e proliferação celulares assim como mediando respostas adaptativas ao estresse miocárdico, como por exemplo, após o estiramento do cardiomiócito (Lee, Bohm et al. 1993; Paul, Poyan Mehr et al. 2006).

Considerando que a cafeína é a droga mais consumida em todo o mundo e que quando consumida durante a gestação produz consequências diretas e indiretas no feto, esta prática pode ser uma das causas de HAS, doença com incidência crescente mundialmente e intimamente relacionado com outras doenças crônicas não transmissíveis. O SRA apresenta papel crucial na gênese da HAS, estando alterado sistemicamente a partir da circulação sanguínea e nos órgãos relacionados a esta (Rasch, Skriver et al. 2004; Giestas, Palma et al. 2010). A HAS apresenta repercussões sobre vários tecidos, porém o tecido cardíaco manifesta alterações marcantes resultante dessa condição. Diante do exposto, torna-se pertinente a avaliação da morfologia cardíaca assim como o estudo da expressão dos componentes do SRA local a fim de elucidar os efeitos do consumo crônico de cafeína materno sobre os níveis pressóricos e remodelamento cardíaco da prole.

Estas observações nos levaram a levantar a seguinte hipótese: a administração crônica de cafeína na gestação altera o sistema renina-angiotensina, resultando numa elevada pressão arterial e hipertrofia cardíaca na prole adulta. Para validar esta hipótese, estabelecemos um protocolo experimental onde avaliamos o rim e coração dos animais machos aos três meses de idade.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Cafeína

A cafeína é uma substância amplamente consumida, podendo ser encontrada em sua forma natural como no café, cacau ou chocolate, refrigerantes de cola, chá, etc., assim como também pode ser encontrada em sua forma sintética atuando como analgésico adjuvante em combinação com algumas drogas (Echeverri, Montes et al. 2010; Sawynok 2011). O seu consumo é tão amplo que 98% das mulheres em idade reprodutiva consomem regularmente cafeína, seja através da alimentação ou através de medicação, sendo que 72% dessas mulheres continuam usando cafeína durante a gravidez (James and Richardson 1991). Classificada quimicamente como 1, 3, 7-trimetilxantina, pertence ao grupo das xantinas. Metilxantinas são substâncias capazes de estimular o Sistema Nervoso Central, produzindo um alerta de curta duração, motivo este que leva a cafeína a alcançar o título de psicoativo mais consumido do mundo (Bjorklund, Kahlstrom et al. 2008; Heckman, Weil et al. 2010).

A cafeína e seus metabólitos atravessam facilmente a placenta com concentrações ligeiramente menores que os níveis maternos (Cnattingius, Ekblom et al. 2003). O pico de concentração de cafeína durante a gestação é em torno de 30-60 min após a administração (Porter and Rivkees 2001). A meia vida da cafeína em mamíferos adultos é em torno de 3 a 6h, aumentando para de 10 a 20h durante a gestação (Signorello, Nordmark et al. 2001). No feto, a meia vida da cafeína dura em torno de 80-100h sendo este incapaz de desmetilar a cafeína (Fredholm 1995). Logo, uma modesta ingestão de cafeína pela mãe pode ser muito mais significativa para o embrião (1999; Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009).

A cafeína atua como competidora antagonista pelos receptores de adenosina (Osswald and Schnermann 2011). A adenosina é um importante componente do sistema purinérgico e é encontrada em todos os tecidos, apresentando um papel modulatório de diversos processos fisiológicos. Suas principais ações descritas são: regulação das funções cardiovasculares como vasodilatação e diminuição da pressão sanguínea e modulação do sistema nervoso central através da regulação da liberação de neurotransmissores (Sato, Terata et al. 2005). Além disso, é capaz de produzir inibição da lipólise, broncoconstrição e cito proteção em episódios de isquemia e hipóxia o de stress oxidativo (Wardas 2002; Fan, Qin et al. 2003).

Os receptores de adenosina (a saber: A1AR, A2aAR, A2bAR e A3AR), compõem uma das maiores classes de receptores purinérgicos (P1) sendo estes ligados a uma proteína G estimulatória (Gs) ou inibitória, onde os receptores de adenosina A1 e A3 são inibidores da adenilil ciclase (a interação da adenosina com estes receptores leva a redução no acúmulo de AMPc, ativando a fosfolipase C e resultando na abertura de canais iônicos), e A2a e A2b estimuladores da adenilil ciclase. Uma vez que adenilil ciclase é estimulada (pela interação da adenosina aos seus receptores A2) ocorre o aumento do AMPc desencadeando uma série de eventos intracelulares, (Brown, Thoren et al. 2006; Rivkees and Wendler 2011) como ilustra a Figura 1.

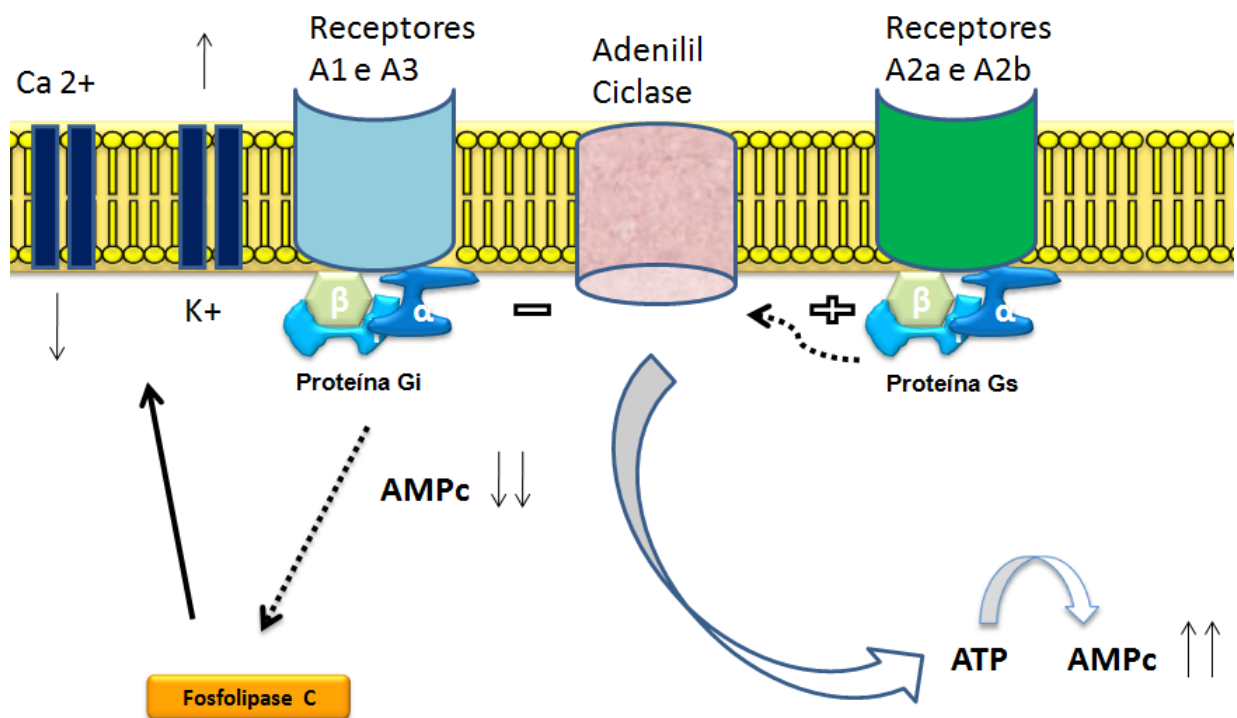


Figura 1. Ativação dos receptores de adenosina.

Os receptores de Adenosina A1R e A3R são acoplados a uma proteína G inibitória (Gi), sendo negativamente associados a adenilil ciclase, inibindo assim o acúmulo de AMPc ativando a Fosfolipase C e abrindo canais iônicos. Já os receptores de Adenosina A2a e A2b são acoplados a uma proteína G estimulatória (Gs), que uma vez estimulados, ativam adenilil ciclase levando ao aumento da síntese de AMPc.

Os receptores de adenosina encontram-se distribuídos em vários órgãos e tecidos, como mostra a Tabela 1:

Tabela 1: Receptores de adenosina e sua distribuição nos órgãos e tecidos

	Alta expressão	Expressão moderada	Baixa expressão
Receptor A1	Córtex (cérebro, cerebelo, hipocampo), corno dorsal da medula espinhal, olhos, glândula adrenal, átrios	Outras regiões do cérebro, músculo esquelético, fígado, rim, tecido adiposo, glândulas salivares, esôfago, cólon, testículo	Pulmão (mais provavelmente maior nos brônquios), pâncreas
Receptor A2a	Baço, timo, leucócitos (os linfócitos e granulócitos), plaquetas do sangue, neurônios GABAérgicos estriatopalidal, bulbo olfatório	Coração, pulmão, vasos sanguíneos, rim	Outras regiões do cérebro
Receptor A2b	Ceco, cólon, bexiga	Pulmão, vasos sanguíneos, olhos eminência mediana, mastócitos	Pulmão, baço, pineal, cerebelo e hipocampo
Receptor A3	Testículo e mastócito de ratos	Tecido adiposo, glândula adrenal, rim, fígado ovário, glândula pituitária	Tireóide, maior parte do cérebro humano, fígado, rim, coração, intestino

Modificado de (Fredholm, AP et al. 2001; Vallon, Muhlbauer et al. 2006).

1.1.1 Mecanismo de ação

A ação farmacológica da cafeína ocorre por meio de: antagonismo não seletivo dos receptores de adenosina; inibição de fosfodiesterases; ativação de receptores de rianodina, um canal liberador de Ca^{2+} intracelular; antagonismo de receptores GABAA (Fredholm, Battig et al. 1999; Solinas, Ferre et al. 2002). Por outro lado, além de agir como estimulante no sistema nervoso central (Fredholm, Battig et al. 1999), há evidências de que a cafeína pode apresentar efeitos neurotóxicos por si só (He, Ma et al. 2003). Os efeitos da cafeína têm sido estudados utilizando-se diferentes espécies de animais e tecidos, onde o uso crônico desta substância

pode ou não induzir alterações na funcionalidade dos receptores de adenosina do tipo A1 e A2 (Fredholm, Battig et al. 1999; Leon, Albasanz et al. 2002).

A cafeína tem um efeito vasoconstrictor periférico através da inibição de receptores vasculares de adenosina A2a, entretanto seu uso crônico leva ao aumento dos receptores de adenosina e/ou sensibilidade causando o “Fenômeno da tolerância”, que Buns et al. (1987) (Bruns RF 1987), descreveram como sendo a atenuação ou desaparecimento dos sintomas quanto ao uso crônico de cafeína. Em baixas doses, seus efeitos são conhecidos como aumento da vigilância subjetiva e desempenho da atenção em tarefas, já em altas doses ocorre um aumento da ansiedade, insônia, taquicardia e agitação psicomotora (Kennedy and Wightman 2011).

a) Rim

O rim exerce um importante papel na regulação dos fluidos do corpo e na pressão sanguínea. No rim o efeito da adenosina em seus receptores A1 produz uma vasoconstrição das arteríolas aferentes pelo aumento de cálcio nas células da musculatura lisa (Guimaraes and Albino-Teixeira 1996), levando a uma redução na filtração glomerular e do fluxo sanguíneo renal, o que tem sido considerado a chave para seu envolvimento na regulação da resposta ao *feedback* túbulo-glomerular (Sun, Samuelson et al. 2001). Estes receptores de adenosina também inibem a liberação de renina e existem evidências de que os receptores A1 têm parte na regulação da pressão sanguínea (Brown, Thoren et al. 2006). Sabendo que a cafeína atua como competidora antagonista destes receptores, o efeito esperado seria o oposto ao encontrado por agonistas de receptores A1, levando ao aumento da diurese (Ming and Lutt 2010). A cafeína não somente leva ao aumento da diurese como também ao aumento da natriurese, entretanto sem alterações na taxa de filtração glomerular ou fluxo sanguíneo renal. Ela pode ainda aumentar os níveis de renina plasmática em animais de laboratório, entretanto em humanos normotensos e hipertensos, doses moderadas de cafeína não aumentam os níveis de renina plasmática (Osswald and Schnermann 2011).

b) Coração

Relatos demonstram que indivíduos portadores de doença arterial coronariana quando submetidos à atividade física e em uso de cafeína, apresentaram reduzido fluxo sanguíneo no miocárdio, devido à possibilidade da cafeína influenciar tanto a repolarização ventricular

esquerda quanto a função diastólica, modificando assim o balanço simpático/parassimpático (Buscemi, Mattina et al. 2011). A cafeína combinada com a efedrina tem sido apontada a aumentar o risco de infarto e morte súbita. Em ratos expostos a um ou dois dias de cafeína combinada com efedrina resultou em hemorragia intersticial maciça com degeneração de miofibrilas, necrose do miocárdio secundário à vasoconstrição do sistema arterial coronário diminuindo assim a perfusão miocárdica, associando assim a efedrina e cafeína diretamente a patologia cardíaca (Nyska, Murphy et al. 2005).

1.2 Programação fetal

De forma sucinta, podemos descrever programação fetal (também chamada de programação metabólica) como uma modificação de caráter permanente no metabolismo, estrutura e fisiologia de um órgão devido a algum estímulo ocasionado no período de desenvolvimento embrionário (Lucas 1994).

A hipótese da programação fetal (ou *imprinting*) foi postulada por David Barker que observou a influência de fatores ambientais, particularmente a nutrição no início do desenvolvimento de forma a programar o feto ao risco de surgimento de doenças cardiovasculares e metabólicas na idade adulta, assim como morte prematura (Barker 1990). Um dos estudos pioneiros realizado na Inglaterra destacou que as mortes por doença isquêmica do coração eram em maior número em regiões pobres que apresentavam um maior índice de recém-natos com baixo peso ao nascimento, sugerindo que a má nutrição no início da vida aumentaria a suscetibilidade à morte prematura assim como morte por doença arterial coronariana (Barker and Osmond 1986).

O mecanismo pelo qual a exposição a este ambiente intrauterino subótimo leva a estas alterações permanentes no feto pode ser explicado como uma resposta adaptativa do embrião que gera efeitos duradouros por toda a vida. O ponto crucial desta teoria é o conceito de um período crítico no qual perturbações nutricionais específicas podem operar de maneira a promoverem mudanças no desenvolvimento que levariam a consequências de longo prazo (Lucas 1991; McMillen and Robinson 2005). De modo geral, o feto preserva o fluxo sanguíneo (oxigênio e suprimento de nutriente) para o desenvolvimento do cérebro e submete os demais órgãos a uma relativa redução do suprimento sanguíneo (e nutricional) para os outros órgãos (redistribuição do fluxo sanguíneo), resultando em retardo no crescimento

(Momi, Tinney et al. 2008). Os ambientes adversos são inúmeros, dentre eles os mais observados são a restrição proteica materna, insuficiência placentária, restrição calórica materna e anemia materna. Diante disto, o feto acaba sofrendo adaptações em seu ambiente intrauterino, levando a alterações na produção de hormônios e a sensibilidade dos tecidos aos hormônios, redistribuição do fluxo sanguíneo, e alterações do crescimento e desenvolvimento de órgãos e tecidos, o que culminará em baixo peso ao nascer. Quando então o feto é submetido a um ambiente ótimo, órgãos como fígado, pâncreas, músculo esquelético, tecido adiposo e coração, já foram alterados de modo permanente, que em adição ao estilo de vida e a idade vão resultar no surgimento de doenças crônicas na vida adulta (Martin-Gronert and Ozanne 2010), como mostra a Figura 2.

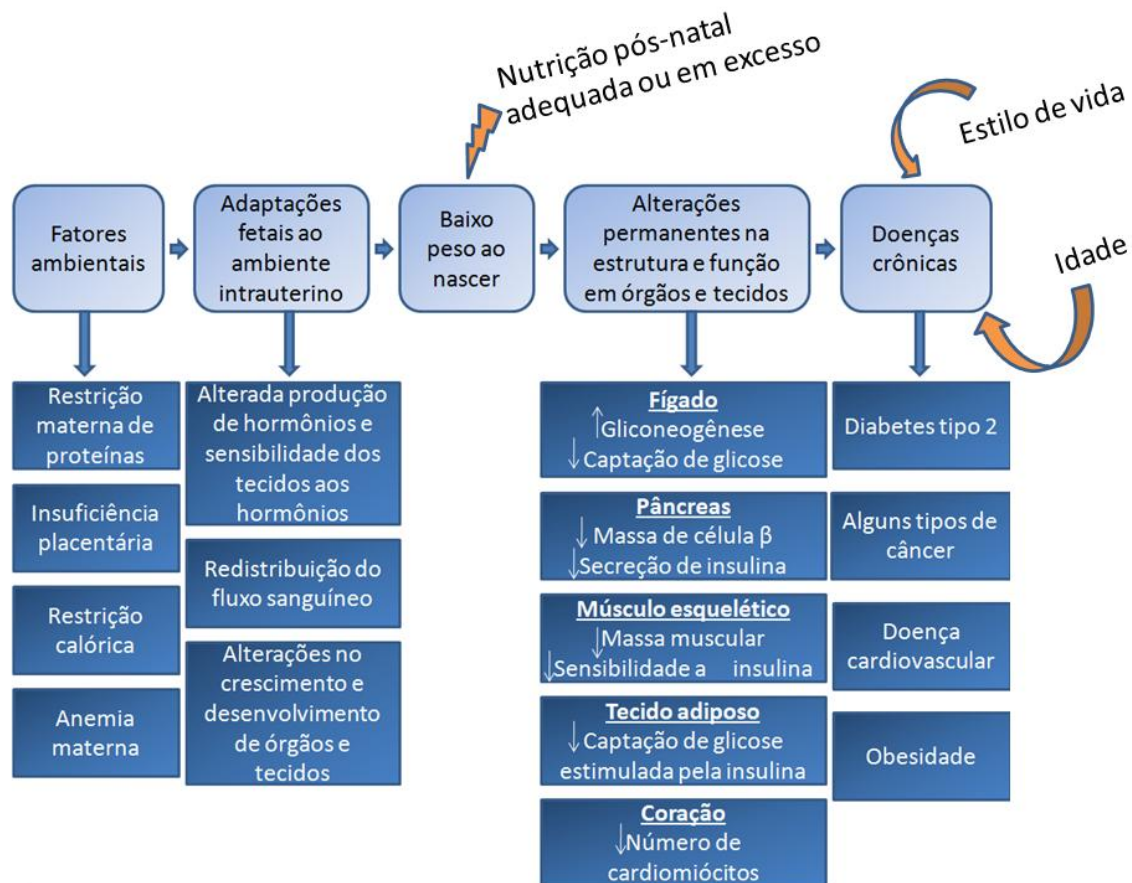


Figura 2. Hipótese da programação fetal.

Perturbações durante a gestação promovem um ambiente intrauterino inadequado resultando em adaptações do feto que culminam em retardo do crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer. Desenvolvem um fenótipo econômico e uma resposta adaptativa preditiva que se tornam prejudiciais quando adequada ou excessiva nutrição é vivenciada no ambiente pós-natal. Este conjunto de alterações morfológicas com o passar da idade e o estilo de vida culminam em disfunções no metabolismo e risco de doenças na vida adulta. Adaptado de Martin-Gronert, MS & Ozanne, SE (Martin-Gronert and Ozanne 2010).

Esta relação entre o ambiente intrauterino e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta está intimamente relacionada com a restrição alimentar materna e o crescimento fetal, pois bebês prematuros podem apresentar baixo peso ao nascimento e não necessariamente terem sido programados ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Godfrey and Barker 2000), por outro lado, um indivíduo pode nascer com peso normal e ter sofrido um insulto transitório durante a gestação, de modo que realizou um *catch-up* intrauterino (Godfrey and Barker 2000; Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009).

Diversas formas de programação em modelos experimentais têm sido propostas, tais como: ligadura da artéria uterina (Simmons, Templeton et al. 2001), restrição proteica (Faria Tda, Brasil Fde et al. 2008), diabetes gestacional (Van Assche, Holemans et al. 2001), exposição excessiva à glicocorticóides (Drake, Walker et al. 2005) e uma dieta com alto teor de gordura (Armitage, Taylor et al. 2005). Os resultados fenotípicos destes insultos são semelhantes, sugerindo que agem através de mecanismos comuns, sendo o modelo de restrição proteica o modelo experimental mais estudado (Langley-Evans 2009).

Além dos estímulos e/ou insultos supracitados, outros fatores adversos durante o desenvolvimento fetal são estudados. A exposição fetal a cocaína, tabagismo, exposição corticosteroide e hipóxia foram estudadas como sendo capazes de induzir programação fetal em modelos de humanos e animais, levando a um aumento do risco de doenças crônicas na vida adulta (Slotkin 1999; Seckl and Meaney 2004; Zhang 2005).

A hipóxia *in útero* é conhecida por causar desempenho cardíaco deprimido e cardiomiopatias que persistem na idade adulta (Tintu, Rouwet et al. 2009). Recentemente, pesquisadores têm utilizado modelos animais para elucidar o papel da hipóxia na programação intra-uterino. A hipóxia crônica na gravidez pode resultar em retardo de crescimento fetal intrauterino. Entre outros efeitos, a hipóxia crônica suprime a função cardíaca fetal, altera a expressão gênica cardíaca, aumenta a apoptose em miócitos e resulta em uma hipertrofia de cardiomiócitos e miócitos (Xiao, Ducsay et al. 2000; Bae, Xiao et al. 2003). Li et al. (2003), demonstraram que corações de ratos machos aos 6 meses de idade expostos a hipóxia pré-natal responderam menos favoravelmente do que animais controle, quando submetidos a isquemia simulada e lesão de reperfusão. Os animais hipóxicos exibiram uma diminuição persistente da recuperação pós- isquêmica, um aumento do infarto do miocárdio e cardiomiócitos maiores (Li, Xiao et al. 2003).

O consumo de cafeína tem recebido menor atenção na literatura, do mesmo modo que o estudo das mútuas relações entre programação fetal e administração de cafeína na determinação de doenças crônicas na vida adulta.

1.3 Cafeína e programação fetal

O consumo de cafeína durante a gestação tem sido estudado por muitos anos, mas evidências convincentes para a associação do uso de cafeína e o acometimento das proles permanecem indefinidas. A cafeína é uma das drogas mais consumidas, logo, de interesse para a saúde pública. O café é responsável pela maior porcentagem de cafeína total consumida (75%), seguido pelo chá (15%) e bebidas cafeinadas (10%) (Eskenazi 1999; Eskenazi, Stapleton et al. 1999).

Durante o primeiro mês de gestação, o consumo de cafeína é relatado por 60% das mulheres, sendo que 16% destas consomem 150mg de cafeína ou mais por dia (Browne 2006). Embora a cafeína não tenha demonstrado efeitos teratogênicos em seres humanos, o consumo durante a gestação é associado com um risco aumentado de abortos espontâneos e baixo peso ao nascer (Cnattingius, Ekblom et al. 2003; Rivkees and Wendler 2011). Em modelos murinos, a exposição a uma única dose de cafeína durante a embriogênese resultou em aumento da gordura corporal e alteração na função cardíaca do filhote adulto, indicando que a exposição a cafeína durante o desenvolvimento pode ter efeitos adversos de longa duração (Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009).

A cafeína atravessa facilmente a placenta do feto e o líquido amniótico, fazendo com que acreditemos que a concentração sérica materna de cafeína seja um indicador confiável da concentração sérica do feto (Goldstein and Warren 1962; Kirkinen, Jouppila et al. 1983). Este equilíbrio já ocorre na 7ª semana de gestação (Goldstein and Warren 1962). Uma vez que nem o feto e a placenta podem metabolizar a cafeína, o feto é exposto à cafeína e seus metabólitos por um período prolongado de vida uterina. A placenta humana não pode metabolizar a cafeína porque contém apenas o citocromo P450 1A1 (CYP1A1) e não, o citocromo P450 1A2 (CYP1A2) (Kalow and Tang 1991). O feto também não possui enzimas hepáticas

necessárias para metabolizar a cafeína, que não estão presentes até cerca do oitavo mês de idade (Santos, Victora et al. 1998).

Os mecanismos exatos pelos quais a cafeína pode prejudicar o desenvolvimento fetal permanecem desconhecidas. Entretanto, duas vias de ação podem ser sugeridas, primeiramente a cafeína pode atuar diretamente no feto inibindo a fosfodiesterase, enzima responsável pela degradação do AMP cíclico (Liu, Ostlund et al. 1995). Um aumento do AMP cíclico pode interferir com a divisão celular, ou causar vasoconstrição uterina mediada por catecolamina (Soyka 1979). Outra via proposta seria pela ação indireta da cafeína no feto, atuando através da mãe. Kirkinen et al. (1983) documentou uma diminuição do fluxo sanguíneo intervilo da placenta após a ingestão de apenas 200mg de cafeína pelas mães. Se o fluxo sanguíneo uterino é inadequado, a extração de oxigênio e nutrientes pelo feto aumenta até um ponto crítico durante a gestação que reduções no fluxo sanguíneo podem profundamente afetar a oxigenação fetal e nutrição (Ghidini 1996). A literatura sugere que a deficiência do fluxo sanguíneo útero-placentário, o fluxo sanguíneo feto-placentária, ou o fluxo de sangue das vilosidades pode levar a retardo do crescimento intrauterino (Liu, Ostlund et al. 1995; Ghidini 1996). A exposição a cafeína durante o terceiro trimestre pode ter um efeito semelhante sobre o crescimento fetal (Grosso and Bracken 2005). Alguns estudos indicaram que a cafeína aumenta a resistência vascular útero-placentária, possivelmente tanto através de antagonismo direto de receptores de adenosina vasculares quanto aumentando a liberação de catecolaminas (Kirkinen, Jouppila et al. 1983; Miller, Watson et al. 1994).

O elevado consumo de cafeína durante a gestação resulta em baixo peso ao nascimento, entretanto o mecanismo envolvido neste achado permanece desconhecido (Momoi, Tinney et al. 2008). Estudos realizados com roedores mostram que o consumo de cafeína durante a gestação e/ou lactação resulta em baixos níveis de cobre (Cu) no plasma, leite e tecido cardíaco dos filhotes, e que os baixos níveis deste micronutriente resultam em cardiomiopatia (Wink, Rossowska et al. 1999; Asadifar, Yazdani et al. 2005). O cobre é um micronutriente essencial para diversas funções orgânicas, como a mobilização do ferro para a síntese de hemoglobina. Durante a gestação há maior necessidade de síntese de hemoglobina para atender todo corpo e ao feto.

Outro estudo demonstrou que o consumo de uma única dose de cafeína durante a gestação foi associado ao insulto de hipóxia, pois provocou uma vasoconstrição da artéria placentária resultando assim em um retardo do crescimento intrauterino, quando adultos estes animais apresentaram sobrepeso e cardiomiopatia dilatada (Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009). A cafeína ainda seria responsável por desestabilizar a proteína fator induzido por

hipóxia 1α (HIF1 α), proteína esta que é estabilizada pela ação da adenosina em seus receptores, visto que a cafeína atua como antagonista destes, a atuação desta proteína acaba por ficar comprometida (Semenza 2007; Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009). A expressão de HIF1 α é constante, entretanto não se acumula em normoxia, já em situações de hipóxia encontra-se aumentada (Heyman, Rosen et al. 2011).

A seguir estão listados alguns trabalhos relacionados ao uso de cafeína durante a gestação e seus principais achados.

Tabela 2: Principais estudos com cafeína em humanos e animais.

Tipo de estudo	Título	Principal achado	Autores
Epidemiológico (humano)	Efeito da exposição a cafeína durante a gravidez sobre o peso ao nascer e a idade gestacional	Não houve associação entre consumo de cafeína e peso ao nascer, idade gestacional e relação peso ao nascer.	(Clausson, Granath et al. 2002)
Base populacional de caso controle (humano)	Consumo elevado de cafeína no 3 ^o trimestre da gravidez: sexo-específicos efeitos sobre o crescimento fetal	Consumo elevado de cafeína no terceiro trimestre pode ser um fator de risco para retardo do crescimento fetal, em particular no feto menino.	(Vik, Bakketeig et al. 2003)
Experimental (rato)	Exposição excessiva a cafeína durante a gestação é cataratogênico para lentes cristalinas em ratos neonatos: estudo biomicroscópico e histopatológico	Exposição excessiva a cafeína na gestação teve efeito sobre desenvolvimento cataratogênico e sobre a cristalina nos olhos de ratos recém-nascidos, tanto macroscópico quanto histopatológico.	(Evereklioglu, Guldur et al. 2004)
Experimental (rato)	Ingestão crônica de cafeína ou teofilina durante a gestação inibe a função dos receptores A1 no cérebro de rato	Ingestão crônica de cafeína/ teofilina durante a gestação causa uma perda da capacidade do sistema de resposta apenas no cérebro materno e causa baixo regulação da proteína Gi em ambos cérebros da mãe e do filhote.	(Leon, Albasanz et al. 2005)
Experimental (camundongo)	Cafeína perinatal, atua nos receptores A1 de adenosina materna, causando mudanças comportamentais em filhotes de camundongos	Cafeína perinatal, atua sobre adenosina A1 receptores na mãe, provoca mudanças de longa duração e comportamentais nos descendentes na segunda geração.	(Bjorklund, Kahlstrom et al. 2008)
Experimental (camundongo)	Exposição embrionária a cafeína induz a efeitos adversos no filhote adulto	Exposição a uma única dose de cafeína durante a embriogênese afetou o desenvolvimento do coração do feto e a função cardíaca do filhote adulto.	(Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009)

Epidemiológico (humano)	Ingestão de cafeína durante a gravidez, natimorto e morte perinatal	Mulheres cuja gravidez resultou em óbito fetal tardio ou aborto apresentaram maior ingestão de cafeína (145 mg /dia) do que com nascidos vivos (103 mg / dia).	(Greenwood, Alwan et al. 2010)
-------------------------	---	--	--------------------------------

1.4 O sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina é uma cascata hormonal envolvida no controle da pressão arterial (PA), volemia e equilíbrio eletrolítico. A desregulação do SRA desempenha um papel importante na patogênese de doenças renais, cardiovasculares e na hipertensão arterial. Os principais elementos da cascata englobam o angiotensinogênio, a renina, a Ang I, a ECA e a Ang II (Giestas, Palma et al. 2010).

O SRA é considerado sistema endócrino cuja substância ativa, Ang II, é produzida por clivagem sequencial enzimática dupla, a partir do substrato angiotensinogênio de origem hepática. A produção de renina se dá no aparelho justaglomerular renal e sua liberação decorre, principalmente em resposta a reduções da PA na circulação renal, alterações de sal na dieta (queda da concentração de NaCl nas células da mácula densa) e variações da intensidade da estimulação simpática do rim (Campbell 1987). Além destas vias, os mediadores humonais também exercem uma grande importância (Castrop, Hocheil et al. 2010). Na circulação sanguínea, a renina converte o angiotensinogênio circulante no decapeptídeo Ang I, em seguida a ECA, presente principalmente nas membranas das células endoteliais da circulação pulmonar converte a Ang I no octapeptídeo Ang II. A Ang II tem como funções contrair o músculo liso da parede vascular, aumentar a força de contração do coração, estimular a secreção de aldosterona e modular a filtração glomerular (Dinh, Frauman et al. 2001). A aldosterona ao ligar-se aos seus receptores distribuídos no organismo (miocárdio, vasos arteriais, rim) vai promover retenção de sódio e água contribuindo para a formação de edema em casos de hiperaldosteronismo. Favorece também a excreção de potássio e magnésio, o que aumenta a probabilidade de arritmias em situações de desregulação do SRA e estimula a deposição de colágeno causando fibrose do miocárdio e vasos (Dawson, Davies et al. 2004).

A Angiotensina II, peptídeo classicamente conhecido deste sistema, promove ações hipertensivas nos diferentes sistemas fisiológicos. Nos estudos de Bono e cols, (1962) a infusão endovenosa deste peptídeo em indivíduos normotensos sadios promoveu aumento na pressão arterial de repouso, sendo este aumento 50 vezes maior que o mesmo experimento com infusão de noradrenalina (Bono, Mapelli et al. 1962). Recentemente tem se mostrado que o papel da Ang II no controle da pressão arterial é o resultado da interação deste peptídeo com os diversos sistemas fisiológicos. Nos tecidos periféricos a Ang II promove redução da sensibilidade dos barorreceptores, o que reduz a eficácia no controle da variação da pressão arterial a cada ciclo cardíaco (Oparil, Narkates et al. 1988). Em adição, promove vasoconstrição potente e proliferação endotelial (Machado, Santos et al. 2000).

A angiotensina II exerce suas ações biológicas pela ligação de alta afinidade com dois subtipos de receptores distintos, o AT1 e o AT2. O receptor AT1 ativa rotas de promoção do crescimento, estimula a maioria dos efeitos da Ang II (tais como vasoconstrição, aumento da pressão arterial, contratilidade cardíaca, absorção de sódio pelos túbulos renais e proliferação celular) e efeitos adversos (tais como estresse oxidativo, disfunção endotelial, doenças cardiovasculares e inflamação) (Mehta and Griendling 2007). O receptor AT2, em contrapartida, é abundante durante o período fetal, mas seu número diminui após o nascimento. Sua ativação produz efeitos benéficos, como vasodilatação, anti-proliferação de fibroblastos, endotélio e miócitos, melhoria da função cardíaca e diminuição da reabsorção de sódio no tubo proximal (Hernandez Schulman, Zhou et al. 2007). A função dos receptores tipo 3 (AT3) não está bem esclarecida, mas os receptores tipo 4 (AT4) induzem a liberação do inibidor de ativador de plasminogênio 1 (IAP-1) através da ligação da Ang II e seus péptidos N terminais (Ang III e IV) (Stanton 2003). Existe ainda a Ang (1-7), um heptapéptido formado a partir da Ang I ou da clivagem da porção C-terminal da Ang II, por ação de carboxipeptidases, uma das quais possui homologia estrutural com a ECA, designando-se ECA-2, esta enzima leva à formação de péptidos com efeitos predominantemente vasodilatadores, e atua em receptores específicos (receptor Mas), que exercem uma ação vasodilatadora e cardioprotetora (Reudelhuber 2005). A Figura 3 mostra a cascata da ativação do sistema renina-angiotensina.

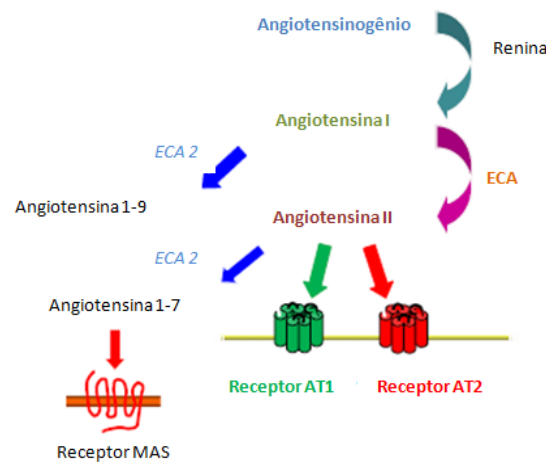


Figura 3. Modelo da cascata do sistema renina-angiotensina.

O angiotensinogênio é clivado em angiotensina I pela renina circulante que é convertida em angiotensina II pela ECA. A angiotensina II irá exercer seus efeitos pela interação com seus receptores. A ECA 2 irá clivar a angiotensina I e angiotensina II que não se ligam aos receptores em angiotensina 1-9 e angiotensina 1-7 que ao interagirem com os receptores MAS irão exercer um efeito cardioprotetor.

1.4.1 Controle da secreção de renina renal

O controle da secreção da renina pelas células justaglomerulares renais é efetuado predominantemente por três vias: duas com ação renal e outra ao nível do sistema nervoso central (Campbell 1987). Além destas vias, uma grande variedade de moduladores biológicos são conhecidos por influenciar síntese e liberação de renina (Castrop, Hocheil et al. 2010).

As três vias reguladoras da liberação de renina encontram-se integradas numa espécie de rede fisiológica. O incremento da secreção da renina leva ao aumento na produção de angiotensina II, sendo que esta estimula os receptores AT1 das células justaglomerulares. Da estimulação destes receptores resulta, por sua vez, a inibição da liberação de renina. Este sistema de *feedback* é designado de “mecanismo de *feedback* negativo alça-curta”. Além disto, a angiotensina II causa também um aumento na pressão arterial por estimulação direta dos receptores AT1 (Cody 1994). Este aumento na pressão sanguínea inibe a liberação da renina de três formas: (1) ativando os baroreceptores; (2) aumentando a pressão nos vasos pré-glomerulares e (3) reduzindo a reabsorção de cloreto de sódio nos túbulos proximais. A inibição da liberação da renina induzida pelo aumento da pressão arterial (promovido pela

angiotensina II) é designada como “mecanismo de *feedback* negativo alça-longa” (Brunner, Gavras et al. 1974).

Alguns destes mediadores possuem o papel de atuar localmente como a adenosina (Brown, Ollerstam et al. 2001; Kim, Mizel et al. 2006) e outros como angiotensina II (Hackenthal, Paul et al. 1990; Castrop, Klar et al. 2003; Castrop, Hocherl et al. 2010), e aldosterona (Castrop, Hocherl et al. 2010). Níveis circulantes de angiotensinas II exercem funções de *feedback* negativo com alça curta para inibir síntese e secreção de renina (Hackenthal, Paul et al. 1990). Numerosos estudos *in vivo* têm mostrado que inibição dos efeitos de Ang II com antagonistas do receptor AT1 ou a redução do nível de Ang II com inibidores ECA provocam um intenso aumento da síntese e liberação da renina (Hocherl, Wolf et al. 2001; Castrop, Klar et al. 2003).

a) Adenosina e cafeína

Além do controle da secreção da renina pelas vias supracitadas (Campbell 1987), a adenosina atua como um mediador hormonal exercendo uma grande importância nesse controle (Hackenthal, Paul et al. 1990; Castrop, Klar et al. 2003; Castrop, Hocherl et al. 2010).

De acordo com trabalhos publicados na literatura, a atividade da adenosina no rim é modulada por múltiplos sistemas neurohormonais. Os efeitos renais da adenosina são mediados através da ação de seus receptores A1, A2 e A3. A via de ação pelos receptores de adenosina A1 e A3 inibem a adenilil ciclase e estimula a fosfolipase C, enquanto que os receptores A2 estimulam a adenilil ciclase (Vallon, Muhlbauer et al. 2006). Tem sido investigado o papel da adenosina como moduladora da liberação de renina em resposta a uma variedade de estímulos (Kuan, Wells et al. 1990; Kim, Mizel et al. 2006; Vallon, Muhlbauer et al. 2006). Tofovic (1991) sugeriu um modelo pelo qual a adenosina, por interação com seus receptores A1 atuaria diretamente sobre as células justaglomerulares, inibindo a atividade da adenilil ciclase, dessa forma atuaria inibindo a liberação de renina (Tofovic, Branch et al. 1991). No momento de uma interrupção no sinal, a liberação de renina seria estimulada pela redução da pressão de perfusão renal, redução de cloreto de sódio na mácula densa e/ou ativação dos beta-adrenoreceptores justaglomerulares (Jackson 1991).

A cafeína é um eficaz bloqueador do receptor de adenosina. Assumindo como correta a hipótese sobre o papel da adenosina na liberação de renina, o fato da cafeína bloquear os receptores de adenosina pode ter importantes consequências sobre a secreção de renina.

Doenças como hipertensão renovascular, cirrose hepática e insuficiência cardíaca estão associadas com o aumento da secreção de renina (Tofovic, Branch et al. 1991).

O aumento da liberação de renina pela cafeína pode ser particularmente prejudicial porque, além do bloqueio dos receptores no rim, a cafeína pode ativar o eixo simpático adrenal (Nicholson 1989), e inibir as enzimas fosfodiesterases (Wells and Miller 1988; Liu, Lin et al. 1995). A capacidade da cafeína em inibir a fosfodiesterase é relevante na medida em que o AMPc é um secretagogo de renina (Jackson 1991). Portanto, a cafeína poderia aumentar a secreção de renina por: 1) inatividade da adenosina ao nível das células justaglomerulares; 2) ativação central potente e penetrante no cérebro do eixo simpático-adrenal; e 3) penetração nas células justaglomerulares e aumento dos níveis de AMPc por inibição das fosfodiesterases. Estes mecanismos de ação da cafeína na liberação de renina seriam provavelmente sinérgicos, em vez de simplesmente aditivos, porque a cafeína poderia ativar um estímulo pra liberar renina (mecanismo 2) enquanto, simultaneamente aumentaria as consequências bioquímicas daqueles estímulos (mecanismo 1 e 3) (Tofovic, Branch et al. 1991).

1.4.2 Sistema renina-angiotensina cardíaco local

O principal motivo do estudo da formação local dos componentes do sistema renina-angiotensina e seus receptores no coração está relacionado ao fato de que a Ang II pode promover danos ao tecido cardíaco sem exercer seus efeitos clássicos de elevação na pressão arterial sistêmica (Mazzolai, Nussberger et al. 1998).

Alguns estudos mostram que o tecido cardíaco tem uma alta eficiência em captar da circulação as enzimas e os demais componentes do sistema renina angiotensina. A renina, por exemplo, parece ser facilmente captada na circulação coronariana (Muller and Luft 1998). Entretanto, diversos estudos mostram a presença de um sistema renina-angiotensina local no coração (Campbell 1987; Lindpaintner, Jin et al. 1990; Schunkert, Dzau et al. 1990). Estudos mostram que a síntese de renina no coração está aumentada em condições patológicas como no infarto do miocárdio (Clausmeyer, Reinecke et al. 2000).

Outros estudos indicam que a Ang II funciona não somente como um vasoconstrictor circulante, causando hipertensão, mas também atua localmente como um hormônio parácrino e autócrino para promover o crescimento celular, apoptose, inflamação, estresse oxidativo e

danos no tecido, conduzindo finalmente à hipertrofia cardíaca, fibrose e insuficiência cardíaca (Paul, Poyan Mehr et al. 2006; Sun 2009).

Há evidências de que todos os componentes da SRA, incluindo os seus receptores, são encontrados no coração e encontram-se hiper-regulados na hipertrofia e isquemia (Serneri, Boddi et al. 2001; Danser 2003). Em animais com hipertensão, Ang II cardíaco, agindo através AT1R, aumenta o estresse oxidativo, inflamação e morte celular, contribuindo para a hipertrofia cardíaca e fibrose (Xu, Carretero et al. 2010). Sendo assim, podemos concluir que o SRA intrácrico é um importante componente do SRA local (Re and Cook 2008) e que está envolvido na indução de hipertrofia celular (Kumar, Singh et al. 2008), arritmias cardíacas bem como no controle do volume da célula cardíaca (De Mello 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos da administração crônica de cafeína durante a gestação no remodelamento cardíaco e na expressão proteica dos componentes do sistema renina-angiotensina da prole adulta de camundongos C57BL/6 machos.

2.2 Específicos

Analisar se a administração crônica de cafeína durante a gestação altera:

- a) A ingestão alimentar e massa corporal das progenitoras;
- b) O tamanho da ninhada das progenitoras;
- c) A ingestão alimentar e o desenvolvimento da massa corporal da prole adulta;
- d) A taxa metabólica da prole adulta;
- e) A pressão arterial e o remodelamento cardíaco adverso da prole adulta;
- f) A expressão proteica dos componentes do sistema renina-angiotensina da prole adulta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este estudo foram utilizados 20 camundongos fêmeas C57BL/6 virgens com 12 semanas de idade que foram selecionadas e mantidas em caixas de polietileno em ambiente com temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$) controladas, submetidos a um ciclo claro/escuro (luzes artificiais, 7h – 19h), e a um ciclo de exaustão de ar (15 min/h). Os protocolos de manuseio e experimentação foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEUA/029/2012). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os preceitos do “Guia para o uso de cuidado de animais de laboratório” (Publicação do NIH nº 85-23, revisada em 1996, USA).

As fêmeas foram acasaladas com machos *inbreeding* (razão de 1:1 macho e fêmea) e, no dia em que foi identificado o *plug* vaginal positivo, este foi considerado o primeiro dia da gestação. Fêmeas grávidas foram transferidas para caixas individuais e alocadas aleatoriamente em dois grupos experimentais (n= 10 por grupo): A) Grupo Controle (C)- As progenitoras receberam injeção apenas do veículo (solução salina 0,9% NaCl), e B) Grupo Cafeína (CF)- As progenitoras receberam diariamente a partir do primeiro dia de gestação e durante a fase escura do ciclo invertido do biotério, uma injeção subcutânea contendo 20mg/kg de cafeína (*Sigma caffeine ReagentPlus®*; 1mg/ml em solução salina). Esta dose corresponde a duas xícaras de café em humanos (Fredholm 1995).

A massa corporal das fêmeas foi aferida diariamente em balança digital de precisão 0,01g (Marte A-1500) para o ajuste da dose e, do mesmo modo, a diluição da droga foi preparada diariamente para garantir a padronização da administração.

3.2 Obtenção da prole

Ao 21º dia de gestação as progenitoras deram origem à prole por parto espontâneo. O tamanho da ninhada foi anotado no dia do nascimento e o peso dos filhotes aferido por

balança digital de precisão 0,0001g (Sartorius BL2105, Gottingen, Alemanha), para padronizar o suprimento de alimento, as ninhadas foram ajustadas em seis animais por mãe, razão de 1:1 entre os gêneros, quando possível (Fischbeck and Rasmussen 1987) e os demais animais reservados para outras análises. Com isso, a prole das mães do grupo controle foi nomeada como controle (C), e a prole das mães do grupo cafeína foi nomeada como cafeína (CF). Esta divisão foi mantida até o desmame, quando somente um filhote macho por ninhada foi separado aleatoriamente para dar prosseguimento ao estudo.

Os animais foram mantidos no biotério sendo avaliados diariamente quanto às condições de saúde. Durante todo o experimento os animais, tanto progenitoras quanto prole, receberam dieta padrão (19% proteínas, 64% hidratos de carbono, 17% de lipídios) seguindo recomendações da AIN-93G (Reeves, Nielsen et al. 1993) (www.pragsoolucoes.com.br) e água *ad libitum*.

3.3 Biometria da prole

A massa corporal (MC) foi aferida semanalmente em balança digital de precisão 0,01g (Marte A-1500). Após o desmame a ingestão alimentar foi acompanhada diariamente e seus valores anotados. A partir da 7^a semana de vida dos animais até a 13^a, quando ocorreu o sacrifício, a pressão arterial sistólica foi aferida semanalmente pelo método não invasivo de pletismografia da artéria da cauda em animais conscientes (Letica LE 5100, Panlab, Barcelona, Spain), sendo considerado o resultado válido o das quatro últimas semanas de vida do animal, pois as duas semanas anteriores à análise foram consideradas como período de adaptação e condicionamento dos animais ao exame. A média de no mínimo três medições em cada momento foi utilizada.

3.4 Calorimetria Indireta

Na 11^a semana de vida, os animais foram alocados individualmente por 26h (sendo consideradas para a análise as últimas 24h do ciclo claro/escuro) em um recinto isolado feito

de policarbonato, um circuito aberto de calorimetria indireta foi usado para estudar o metabolismo em roedores denominado Sistema *Oxylet* (Panlab, S.L., Barcelona, Espanha). O sistema permite o monitoramento do consumo de oxigênio (O₂) e produção de dióxido de carbono (CO₂) para cada gaiola sequencialmente, onde o quociente respiratório (QR) se dá pela equação conhecida: $QR = VCO_2 / VO_2$, e o gasto energético (GE) pela Equação de Weir: $GE = 1,44 \times VO_2 \times (3,815 + 1,23 \times QR)$ com todos estes valores em Kcal/dia/kg^{0.75}. A calibração da análise de O₂ e CO₂ foi aferida antes e depois da análise experimental, sendo determinados os seus valores de calibração como: *low* O₂= 20,17%, CO₂= 0,20% e *high* O₂= 48,42%, CO₂ 1,44%.

3.5 Eutanásia

Os animais foram acompanhados até a 13^a semana de vida quando então foram sacrificados. Os animais foram anestesiados com Thiopental (15 mg/kg, intraperitoneal), imobilizados e o tórax foi aberto amplamente. Rapidamente coletou-se sangue através da punção do átrio direito. Para garantir que todos os corações interrompessem os batimentos cardíacos em diástole, foi injetado cloreto de potássio (KCl) imediatamente após a punção. Em seguida os órgãos foram dissecados e retirados o coração e os rins. Estes foram completamente removidos de ambos os lados e seus volumes determinados por deslocamento líquido (método de *Scherle*) (Scherle 1970). Este método consiste na aferição do deslocamento de líquido de um órgão submerso em solução salina fisiológica, suspenso por um fio em um recipiente (sem tocar nas paredes do recipiente) apoiado sobre uma balança. Com este procedimento obtém-se o volume por meio da pesagem, posto que $volume = peso/gravidade$, como a gravidade específica (g) da solução fisiológica salina é 1,0048, considera-se então, que $volume \cong peso$ (Weibel 1979). Após aferida a massa bruta em balança digital de precisão 0,0001g (Sartorius BL2105, Gottingen, Alemanha) pelo método supracitado, o coração foi dissecado sendo retirados os átrios e o ventrículo direito, sendo novamente pesado. Os órgãos foram fixados em formalina (1,27 mol/L formaldeído em 0,1M tampão fosfato, pH 7,2) por 48 horas para posterior processamento histológico, e/ou congelados imediatamente em nitrogênio líquido, sendo posteriormente armazenado em freezer -80°C.

3.6 Microscopia de luz

O ventrículo esquerdo (VE) foi mantido no mesmo fixador citado acima durante 48h em temperatura ambiente. Após a fixação, o VE foi clivado ao meio e o fragmento do ápice de cada um dos animais foi separado seguindo a rotina de processamento, desidratados em álcoois de concentração crescente até alcançar o álcool absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A), com a face de corte para baixo para a formação dos blocos. Os blocos foram seccionados com 5 µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina. Imagens digitais do VE foram obtidas (câmera LC Evolution acoplada ao microscópio Olympus BX 51).

3.7 Estereologia do miocárdio

Imagens digitais do VE foram obtidas com um sistema consistindo de uma câmera LC Evolution acoplada ao microscópio Olympus BX51 (formato TIFF, 36-bit, 1280×1024 pixels). Para tanto foram considerados pontos octogonais do VE na tentativa de manter o corte aleatório uniformemente distribuído (AUI).

Para análise estereológica foi utilizado o sistema-teste produzido com o sistema baseado na web pelo STEPanizer (Figura 4). A densidade de volume (V_v) dos cardiomiócitos (cmi) e dos capilares intramiocárdicos (cap) foi estimada por contagem de pontos com um sistema-teste composto por 36 pontos-testes em pelo menos dez campos por animal, por ex. $36 \times 10 \times 3 = 1080$ pontos-teste por grupo. A área seccional média do cardiomiócito ($A[cmi]$) foi estimada como $V_v[cmi]/2.QA[ncmi]$ (μm^2) sendo $QA[ncmi] = N[ncmi]/AT$ ($N[ncmi]$ é o número de perfis de núcleos de cmi contados na área-teste, AT) (Mandarim-de-Lacerda 2003). Duas linhas consecutivas da área-teste foram consideradas como “linhas proibidas” para evitar superestimação. A razão $V_v[cmi]/V_v[cap]$ foi usada para avaliar a vascularização intramiocárdica.

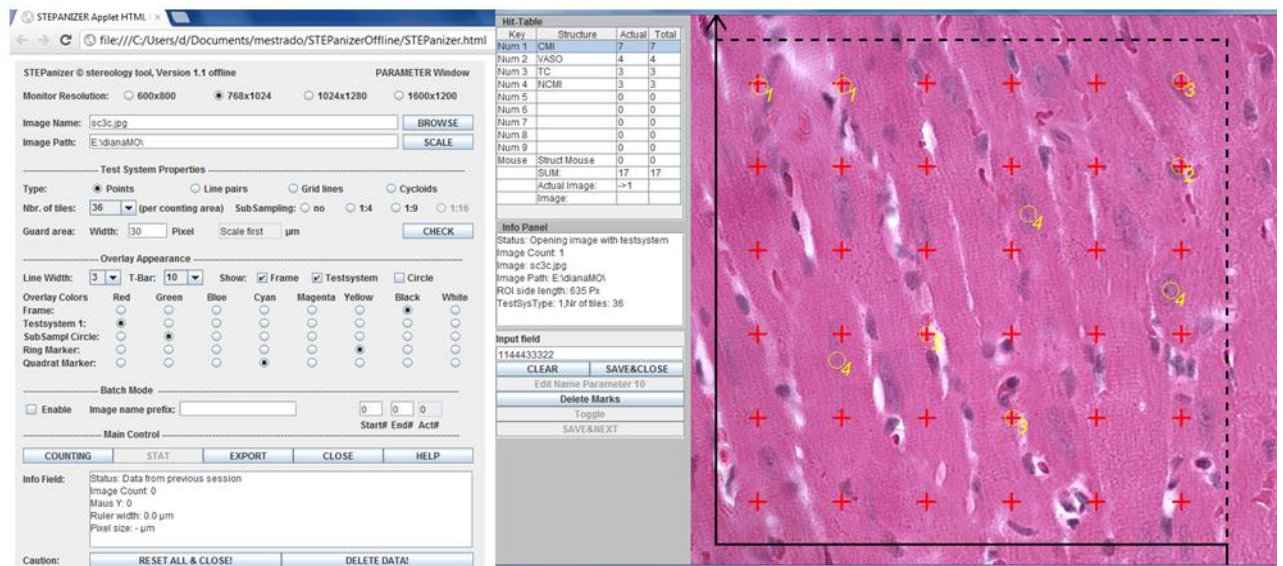


Figura 4 – Estereologia do ventrículo esquerdo.

A densidade de volume (V_v) dos cardiomiócitos (cmi) e dos capilares intramiocárdicos (cap) foi estimada por contagem de pontos com um sistema-teste composto por 36 pontos-testes, e o número de perfis de núcleos de cmi contados na área-teste, AT. O sistema-teste foi produzido com o sistema baseado na web pelo STEPanizer (www.stepanizer.com) e imagens digitais adquiridas para a análise.

3.8 Imunohistoquímica do VE

Os tecidos emblocados para a microscopia de luz também foram utilizados para a técnica de imunohistoquímica, onde foram utilizados cortes com 5 μm de espessura. As lâminas de vidro foram previamente tratadas com Poli L-lisina (Sigma) para garantir uma melhor aderência dos cortes histológicos durante os vários estágios da técnica.

A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato pH 6,0 a 60°C, posteriormente a peroxidase endógena foi inibida com peróxido de hidrogênio a 3%. Os cortes foram incubados com o seguinte anticorpo Angiotensina II (43 kDa; ab89892; abcam) na proporção de 1:1000. As lâminas permaneceram na câmara úmida durante duas horas, sendo posteriormente colocadas na geladeira a -20° e deixadas *overnight*. Passado esse tempo, as lâminas foram retiradas da geladeira e deixadas à temperatura ambiente por 30 min. Após essa fase, foram dados banhos com PBS, e depois as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário acoplado a molécula da peroxidase e, sua detecção foi feita através da formação do complexo peroxidase- estreptavidinabiotina (K0679, Universal DakoCytomation LSAB + Kit, Peroxidase, Glostrup, Denmark). Os cortes foram, então, lavados em PBS, e a imunorreação

positiva foi identificada após incubação com solução de 3,3'-tetrahydroclorito de diaminobenzidina (DAB) (K3466, DAB, Dako Cytomation) e com H₂O₂ como substrato. A revelação foi acompanhada no microscópio óptico (1-3 min). Depois de revelados, os cortes foram lavados e contra corados com Hematoxilina de Mayer por 1 min. Imagens digitais dos cortes corados foram obtidas (câmera LC Evolution e microscópio Olympus BX51, formato TIFF, 36-bit color, 1280x1024 pixels) e analisadas com software Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA).

3.9 Western blotting do VE e rim

As proteínas totais do VE foram extraídas utilizando tampão gelado para homogeneização contendo inibidores de proteases (cloreto de sódio a 150 mM, NP-40 a 1,0%, Tris a 50 mM, pH 8,0, 1 µg/ml de coquetel de inibidor de protease, Sigma-Aldrich, MO, USA), assim como também no rim (Tris 25mM/L, PMSF 100 ug/ml, EDTA 2 mM/L, 1% Triton 100 e inibidor de protease 1,0 ul/ml). O homogenato resultante do VE foi centrifugado a 8640 xg duas vezes por 15 min a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer -80° C, enquanto que o homogenato do rim foi centrifugado a 5000 xg por 20 min a 4°C, e o infranadante aliquoteado e armazenado em freezer -80° C. A quantidade total de proteína na amostra foi quantificada através do kit de avaliação BCA (Thermo Scientific, #23225, Rockford, IL, USA). Amostras contendo 10 µg/ml de proteínas foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS a 10%. Marcadores coloridos (BIO-RAD, Hercules, USA) foram usados como marcadores de pesos moleculares. As proteínas foram, então, transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF; Amersham Biosciences, PiCataway, NJ, USA), que foram incubadas em leite desnatado em pó a 25% (wt/vol) dissolvido em T-TBS (contendo Tris-HCL a 20 mM com pH 7,5, NaCl a 0,5 mM, Tween 20 a 0,05%) por 1,5 hora em temperatura ambiente para o bloqueio de sítios de ligações. Em seguida, as membranas foram incubadas com um dos seguintes anticorpos: anticorpo policlonal para renina anti-mouse (rim) (Santa Cruz, CA, USA); anticorpo anti-enzima conversora de angiotensina (VE) (Santa Cruz, CA, USA); anticorpo policlonal para angiotensina II anti-rabbit (VE) (Abcam, CA, USA); anticorpo policlonal para receptor AT1 anti-rabbit (VE e rim) (Santa Cruz, CA, USA), anticorpo policlonal para receptor AT2 anti-goat (VE) (Santa Cruz, CA, USA) em T-TBS durante toda a noite (*overnight*) a 4°C, com

todas as concentrações dos anticorpos a primários 1:1000. O anticorpo monoclonal para beta-actina anti-mouse (Santa Cruz, CA, USA) diluição 1:1000, foi usado para corrigir os valores das proteínas utilizadas no estudo. Após lavagem intensa em T-TBS, as membranas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-rabbit (1:20000), anti-goat (1:10000) ou anti-mouse (1:5000) em T-TBS, de acordo com a especificação do anticorpo primário. A membrana foi, então, incubada com reagente de detecção de quimioluminescência aumentada (ECL, Amersham BioCiencias, PiCataway, NJ, USA) e exposto a um filme de raio-x. A análise densiométrica das imunomarcações foi realizada através do software Image J (Download ImageJ 1.45).

3.10 Análise dos dados

Todos os dados são mostrados como média \pm erro padrão da média (EPM). Os dados foram testados para a normalidade e homogeneidades de variâncias, e então, as diferenças entre os grupos foram analisadas com o teste *t* de *Student* não pareado (com correção de Welch's quando necessário) (Prism versão 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da ingestão alimentar, da massa corporal e do tamanho da ninhada das progenitoras

A ingestão alimentar das progenitoras não apresentou diferença estatística entre os grupos estudados. A massa corporal foi mensurada semanalmente para afastar qualquer influência deste parâmetro nas alterações encontradas nas proles. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o ganho de massa corporal e o período gestacional entre os grupos controle (C) e cafeína (CF). O tamanho da ninhada também não apresentou diferença estatística. Dados expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Dados referentes à resposta materna ao uso crônico de cafeína durante a gestação: ingestão alimentar, massa corporal e tamanho da ninhada.

Dados	Período	C	CF	Valor P
Ingestão alimentar (g)	Gestação	3,33 ± 0,25	3,34 ± 0,08	p= 0,97
	Lactação	7,84 ± 0,36	8,03 ± 0,28	p= 0,70
Massa Corporal (g)	1ª semana	20,56 ± 0,61	20,61 ± 0,60	p= 0,95
	2ª semana	21,09 ± 0,52	21,29 ± 0,66	p= 0,82
	3ª semana	28,52 ± 0,80	27,62 ± 1,41	p= 0,59
	Periparto	34,72 ± 0,47	33,09 ± 1,37	p= 0,29
Tamanho da ninhada	Filhotes nascidos	8,60 ± 0,60	7,00 ± 0,63	p= 0,10

Valores apresentados em média ± erro padrão de 10 animais por grupo. Abreviaturas: g (grama), C (controle) e CF (cafeína).

4.2 Avaliação da ingestão alimentar e da massa corporal das proles

A ingestão alimentar da prole cujas mães foram submetidas à administração de cafeína na gestação está apresentado na Figura 5. Os animais do grupo CF apresentaram uma ingestão alimentar inferior em relação aos do grupo C, com redução significativa na 11^a e 13^a semanas ($p < 0,05$).

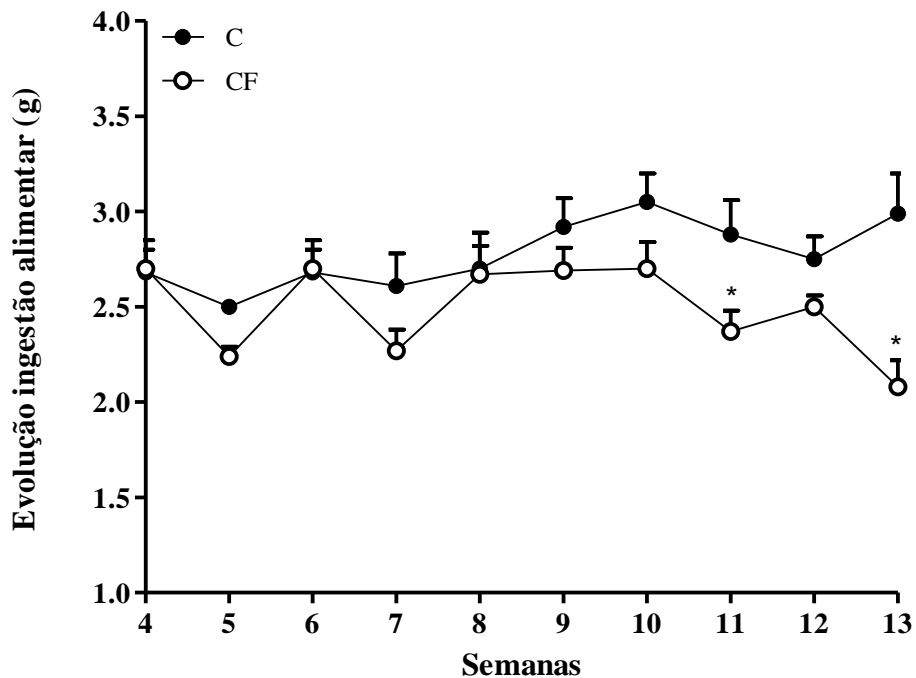


Figura 5. Evolução da ingestão alimentar dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) a partir do desmame até o final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram menor ingestão alimentar, com diferença estatística nas 11^a e 13^a semanas. Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo; * $p < 0,05$.

Durante a lactação não houve uma diferença significativa entre a massa corporal dos animais do grupo CF quando comparados ao grupo C. Já no período pós desmame, os animais cujas mães receberam cafeína na gestação apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) da evolução da massa corporal a partir da 6ª semana, mantendo esta redução por todo o experimento. Ao final do experimento, o grupo CF apresentou uma massa corporal 17% menor, em comparação ao grupo C ($p < 0,0001$) (Figura 6).

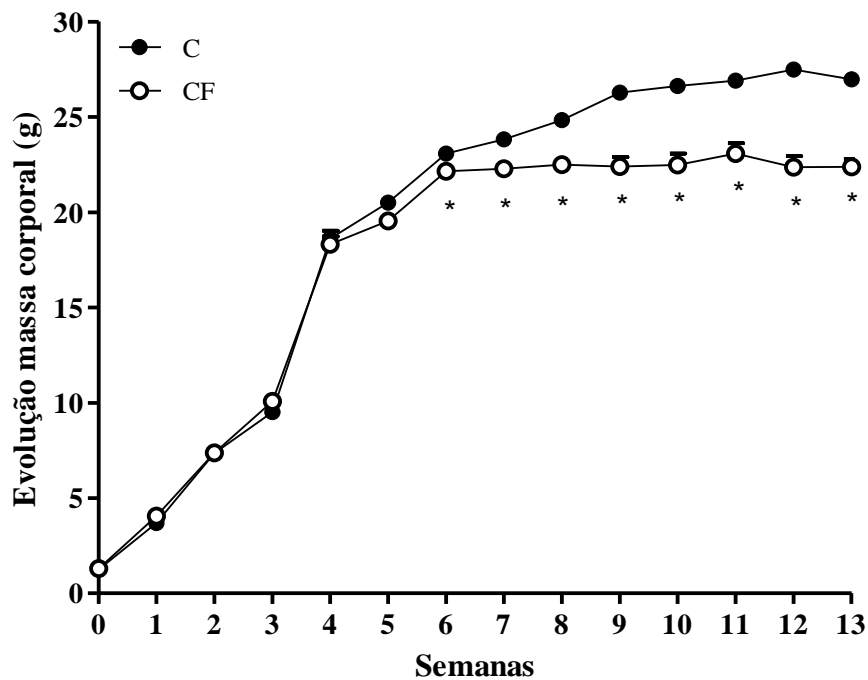


Figura 6. Evolução da massa corporal dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) por todo o experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram menor massa corporal a partir da 6ª semana, comparados com o grupo CF. Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo; * $p < 0,0001$.

Em relação ao ganho ponderal de todo o experimento, os animais do grupo CF apresentaram redução significativa (18% menor; $p < 0,0001$) quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 7).

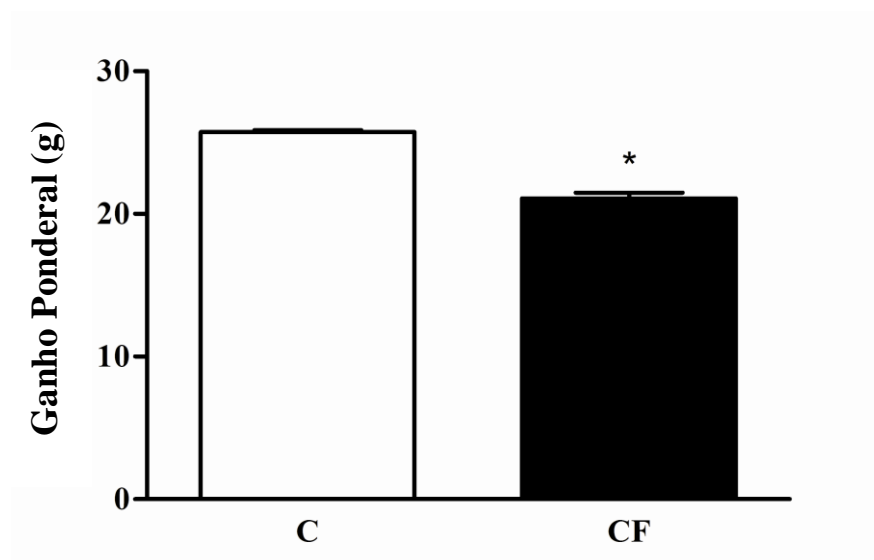


Figura 7. Ganho ponderal dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram um ganho ponderal significativamente inferior ao do grupo C. Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo; * $p < 0,0001$.

4.3 Avaliação do consumo de oxigênio, produção de gás carbônico, quociente respiratório e gasto energético das proles

Avaliação realizada na 11^a semana de vida dos animais. Os animais do grupo cafeína apresentaram aumento no consumo de oxigênio (VO₂) (7% maior; figura 8A; $p < 0,05$), e no gasto energético (GE) (7% maior; figura 8D; $p < 0,05$) em relação aos animais do grupo controle (Figura 8). No entanto, a produção de gás carbônico e o quociente respiratório não apresentaram diferença estatística.

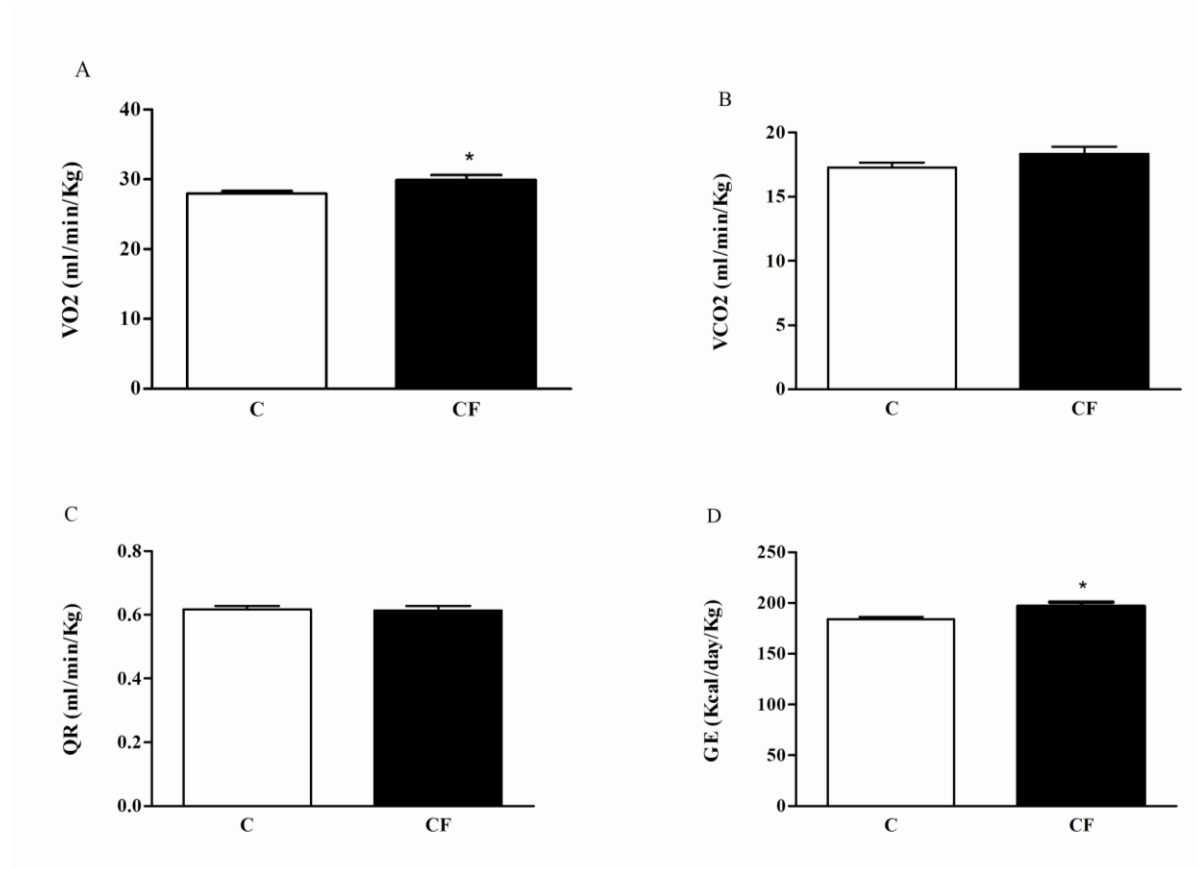


Figura 8. Calorimetria indireta dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) na 11^a semana de vida.

Foi analisado o VO₂ (A), VCO₂ (B), quociente respiratório (QR) (C) e o GE (D). O grupo CF apresentou uma maior taxa metabólica. Dados expressos como média \pm erro padrão de 5 animais por grupo; * $p < 0,05$.

4.4 Avaliação da pressão arterial e frequência cardíaca das proles

Os animais do grupo CF apresentaram uma elevada pressão arterial sistólica (48% maior; figura 9A; $p < 0,0001$) e frequência cardíaca (10% maior; figura 9B; $p < 0,01$) em relação aos animais do grupo controle.

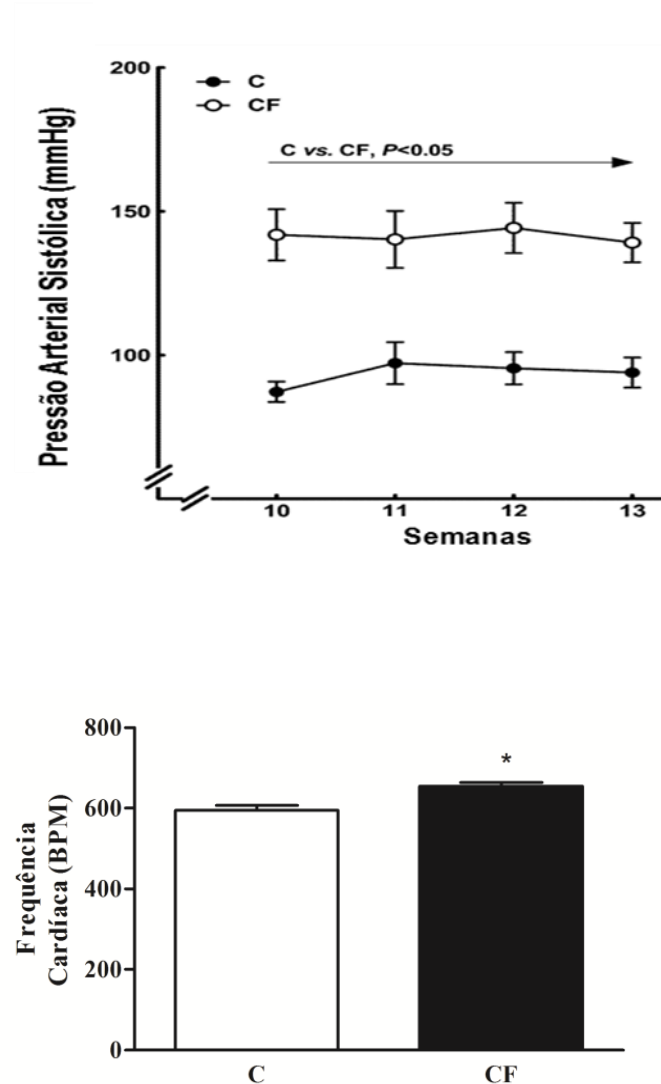


Figura 9. Avaliação da pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B) dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) durante o período de 4 semanas.

Os animais do grupo CF apresentaram uma elevada pressão arterial sistólica e frequência cardíaca. Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo; * $p < 0,01$.

4.5 Avaliação da massa do coração e do ventrículo esquerdo das proles

A Figura 10 apresenta a massa do coração e do VE. Os animais do grupo CF apresentaram uma redução significativa da massa absoluta do coração (17% menor; figura 10A; $p < 0,001$) e do ventrículo esquerdo (10% menor; figura 10C; $p < 0,01$) quando comparados aos animais do grupo controle. No entanto, após a correção pela massa corporal, a massa do VE foi significativamente maior (10% maior; figura 10D; $p < 0,01$), enquanto que a massa cardíaca não apresentou diferença significativa entre os grupos (3% maior; figura 10B; $p > 0,05$).

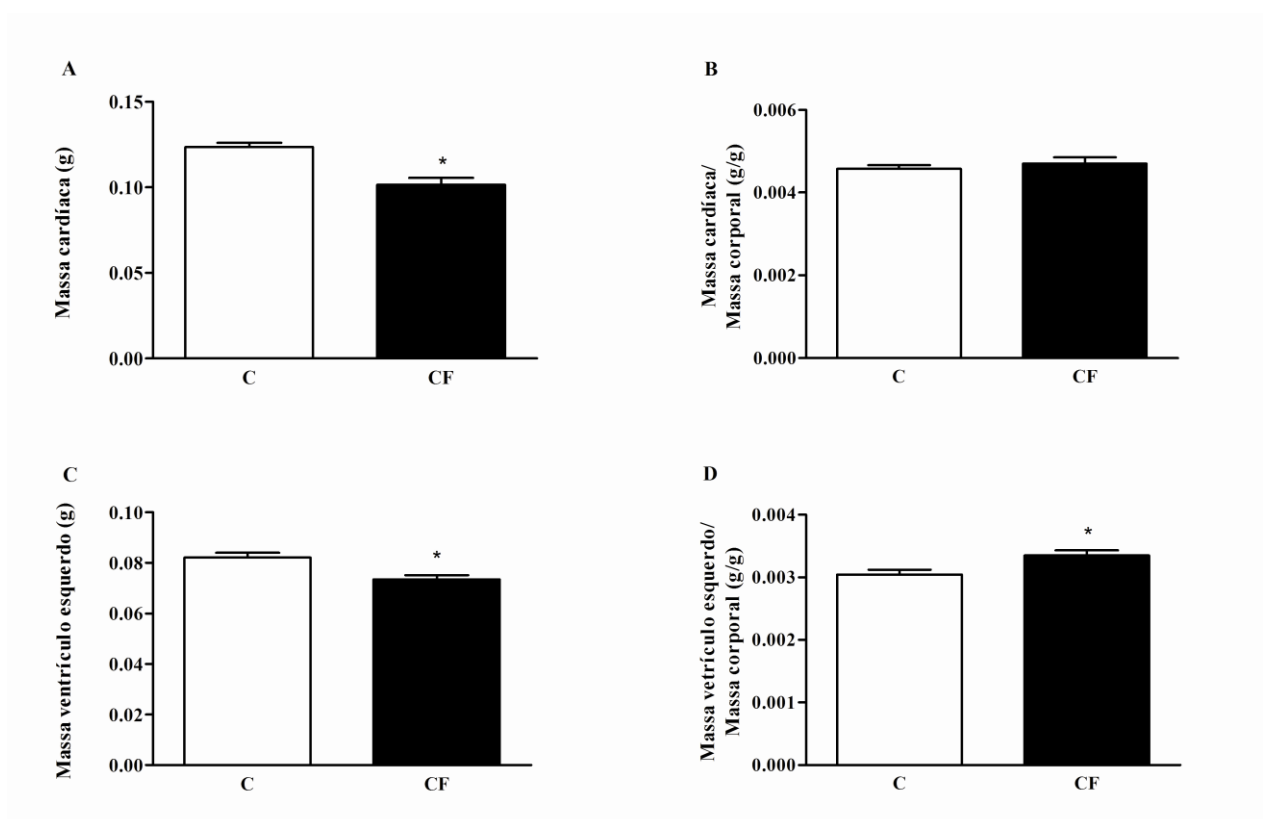


Figura 10. Massas absolutas e relativas do coração (A e B) e do VE (C e D) dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram uma redução da massa absoluta em ambos os tecidos, enquanto que a massa relativa foi maior somente no VE. Dados expressos como média \pm erro padrão de 10 animais por grupo; * $p < 0,05$.

4.6 Avaliação estereológica do ventrículo esquerdo das proles

A principal característica morfológica observada no miocárdio do grupo CF foi o aumento na área dos cardiomiócitos, e redução na densidade de capilares quando comparados ao grupo C. A Figura 11 mostra a morfologia do miocárdio nos grupos do presente estudo, delineando o contorno de um cardiomiócito típico em cada grupo, e as setas indicam os capilares intramiocárdicos.

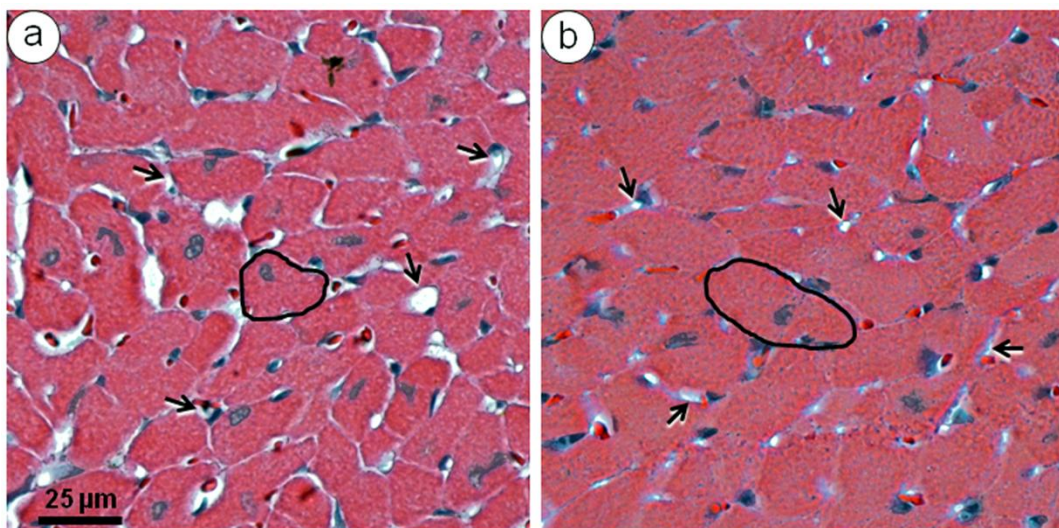


Figura 11. Fotomicrografia do VE dos animais dos grupos controle (a) e cafeína (b) ao final do experimento.

A área dos cardiomiócitos é delimitada pelo pontilhado, enquanto que as setas abertas representam os capilares intramiocárdicos. Coloração H&E com aumento de 60X.

A Figura 12 apresenta o QA, o Vv, a área dos cardiomiócitos e a relação capilar/cardiomiócito ao final do experimento. A A [cmi] foi significativamente maior (40% maior; Figura 12A; $p < 0,05$) nos animais do grupo CF quando comparados aos animais do grupo C, assim como o Vv de cardiomiócitos dos animais do grupo CF apresentaram um aumento significativo (3% maior; Figura 12B; $p < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo C, sugerindo uma hipertrofia dos cardiomiócitos. O QA [cmi] foi significativamente menor (26% menor; Figura 12C; $p < 0,01$) nos animais do grupo CF quando comparados com os animais do grupo controle. A vascularização intramiocárdica do ventrículo esquerdo foi mensurada pela relação vasos intramiocárdicos e cardiomiócitos. O grupo CF apresentou uma redução significativa (25% menor; Figura 12D; $p < 0,05$) quando comparada com a dos animais C.

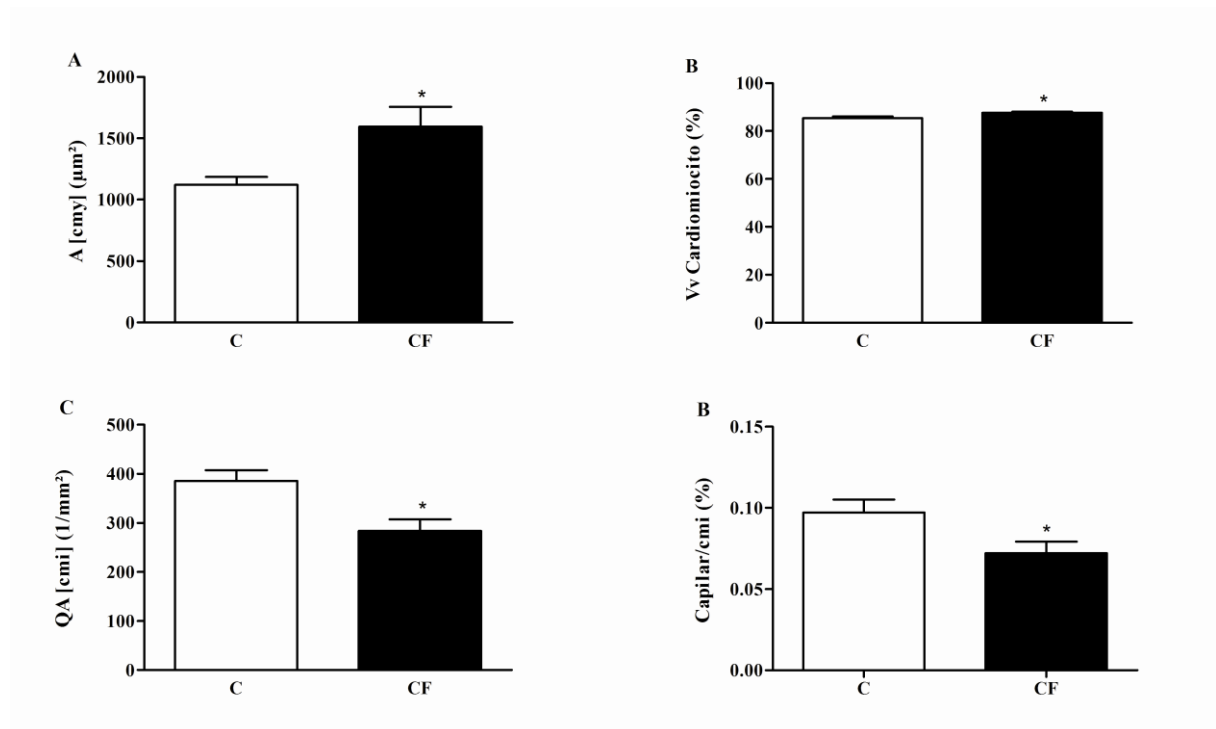


Figura 12. Dados estereológicos do VE.

Área [cmi] (A), Densidade de volume dos cardiomiócitos [Vv] (B), QA [cmi] (C) e Relação de capilares/cardiomiócitos (D) do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento. Os animais do grupo CF apresentaram um aumento da área e Vv, enquanto que o QA e o Capilar/cardiomiócito foram menores quando comparados ao grupo C. Dados expressos como média \pm erro padrão de 5 animais por grupo; * $p < 0,05$.

4.7 Imunohistoquímica de angiotensina II no ventrículo esquerdo das proles

A análise por imunohistoquímica mostrou uma marcação mais evidente para Ang II no grupo CF em relação ao grupo C, conforme mostrado na Figura 13. Observamos o controle negativo do grupo C, a ausência de marcação com o anticorpo secundário.

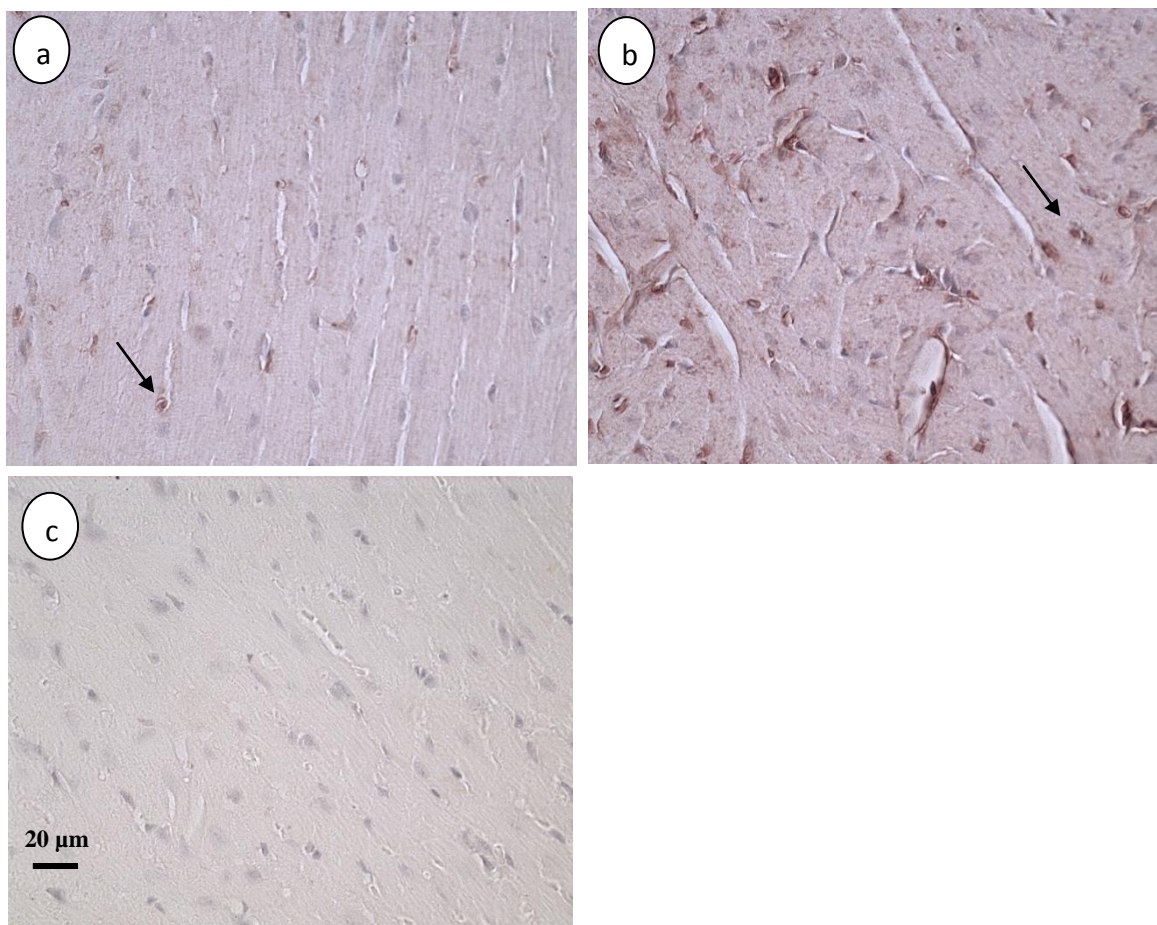


Figura 13. Fotomicrografias representativas da imunohistoquímica para angiotensina II no ventrículo esquerdo dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF).

O grupo cafeína (b) apresentou maior expressão na imunomarcção que o grupo controle (a). Controle negativo (c) com ausência de expressão. As setas indicam imunomarcção para angiotensina II no miocárdio.

4.8 Avaliação da expressão proteica de renina e AT1R no rim das proles

Nas Figuras 14 e 15, podemos observar a expressão proteica da renina e AT1 no rim das proles de mães submetidas à administração de cafeína durante a gestação. Os animais do grupo CF apresentaram um aumento significativo na expressão de renina (128% maior; $p < 0,05$), e de AT1 (88% maior; $p < 0,05$) quando comparados aos animais do grupo C.

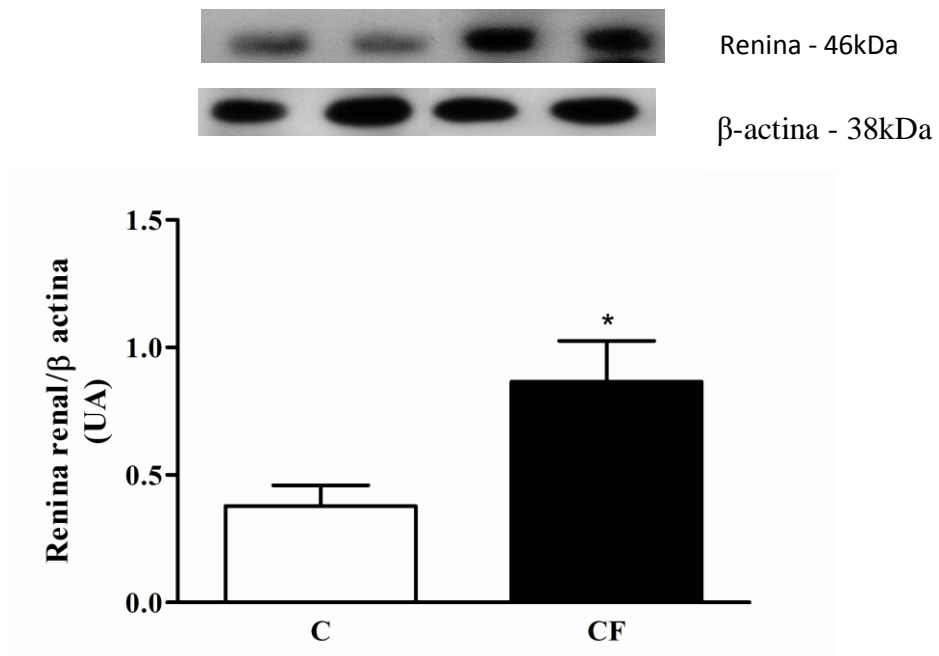


Figura 14. Análise por western blotting da expressão proteica de renina corrigida por beta-actina no rim dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram um aumento significativo na expressão desta proteína. Dados expressos como média \pm erro padrão de 5 animais por grupo; * $p < 0,05$.

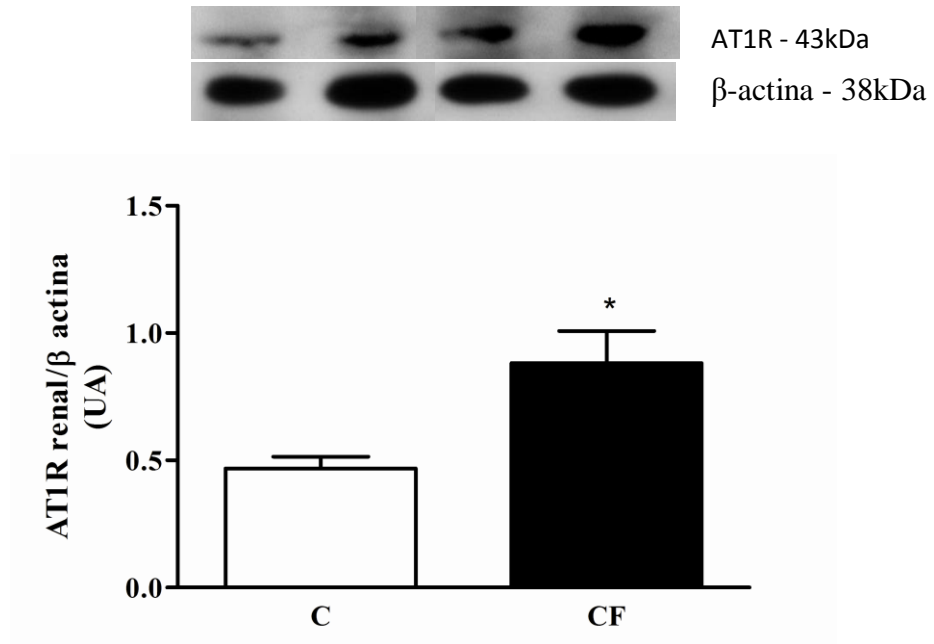


Figura 15. Análise por western blotting da expressão proteica de AT1 corrigida por beta-actina no rim dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram um aumento significativo na expressão desta proteína. Dados expressos como média \pm erro padrão de 5 animais por grupo; * $p < 0,05$.

4.9 Avaliação da expressão proteica de ECA, Ang II, AT1R, AT2R no ventrículo esquerdo das proles

As expressões proteicas de ECA, Ang II, AT1R e AT2R no ventrículo esquerdo foram afetadas pela administração de cafeína durante a gestação. A cafeína levou a um aumento significativo na expressão de ECA (30%; Figura 16; $p<0,05$), Ang II (+60%; Figura 17; $p<0,05$), e AT1R (+77%, Figura 18; $p<0,01$), e uma redução no AT2R (-46%; Figura 19; $p<0,05$).

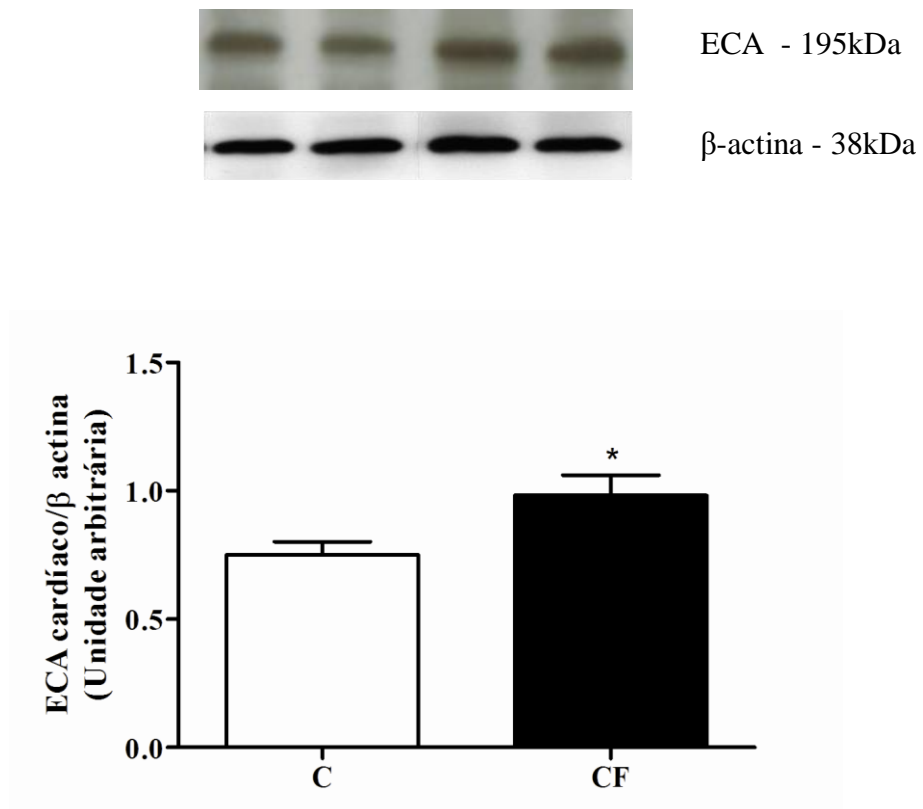


Figura 16. Análise por western blotting da expressão proteica de ECA corrigida por beta-actina no VE dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram um aumento significativo na expressão desta proteína. Dados expressos como média \pm erro padrão de 5 animais por grupo; * $p<0,05$.

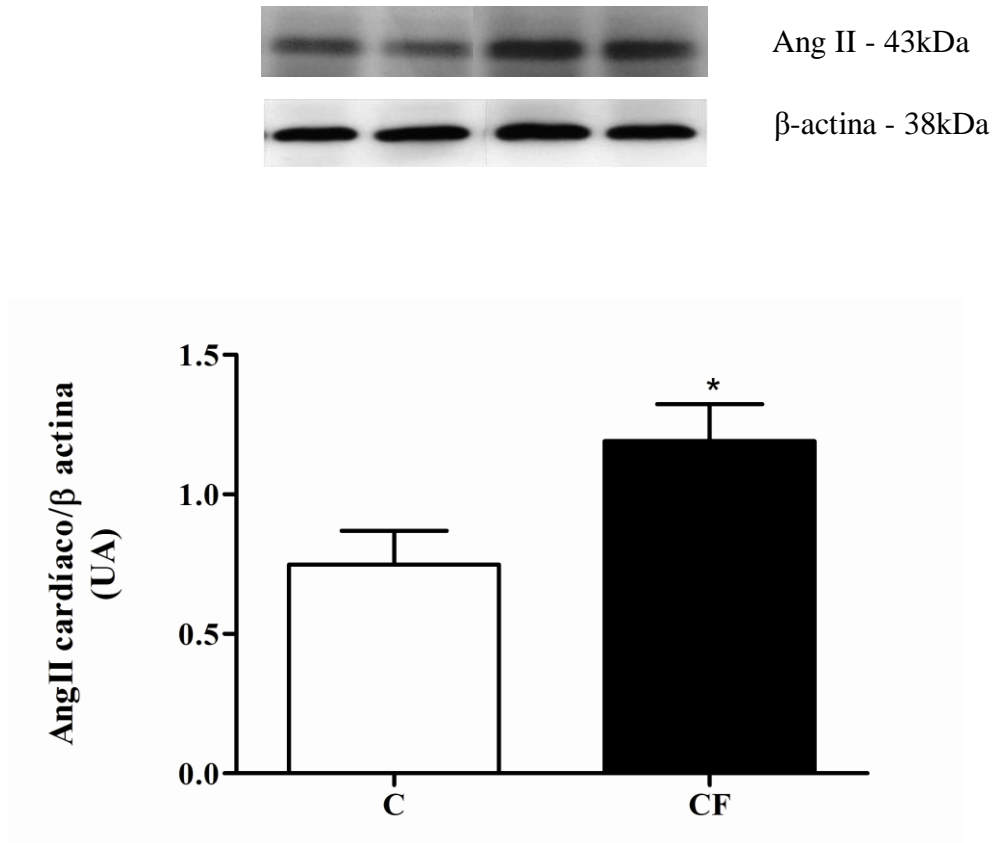


Figura 17. Análise por western blotting da expressão proteica de Angiotensina II corrigida por beta-actina no VE dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram um aumento significativo na expressão desta proteína. Dados expressos como média \pm erro padrão de 5 animais por grupo; * $p < 0,05$.

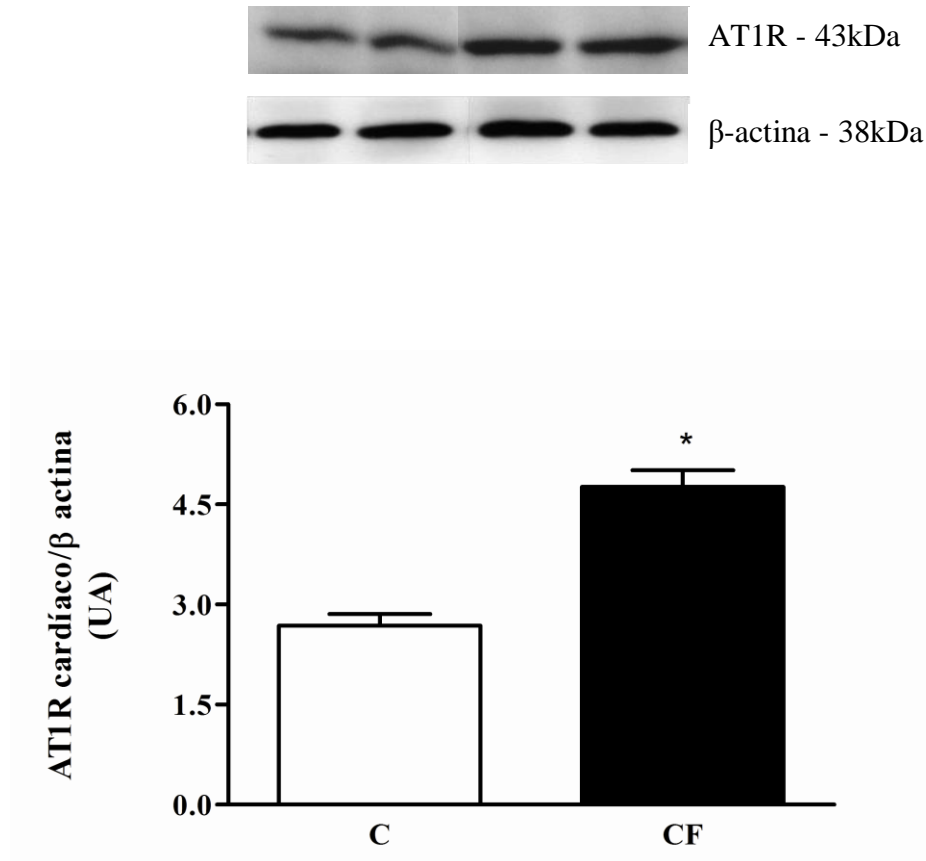


Figura 18. Análise por western blotting da expressão proteica de AT1R corrigida por beta-actina no VE dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram um aumento significativo na expressão desta proteína. Dados expressos como média \pm erro padrão de 5 animais por grupo; * $p < 0,05$.

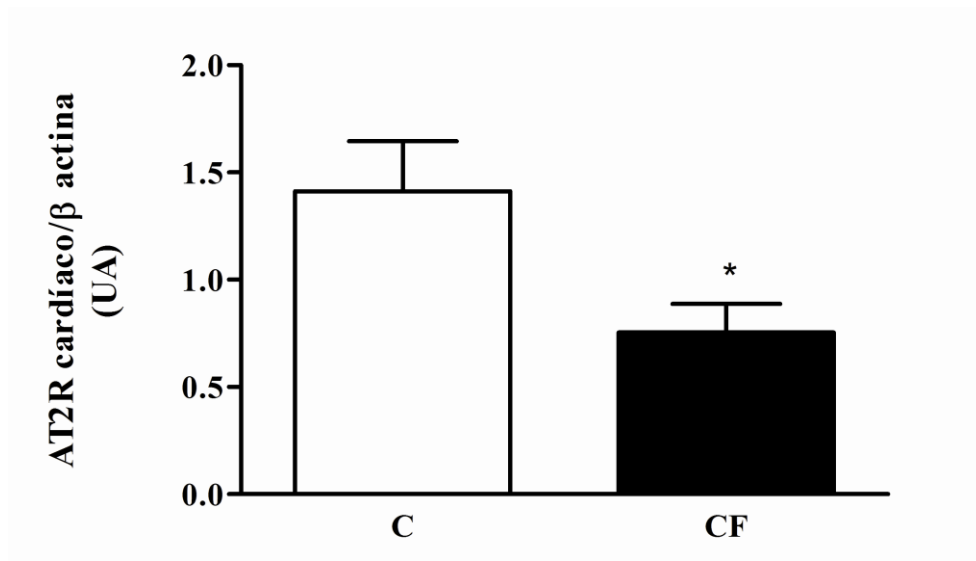
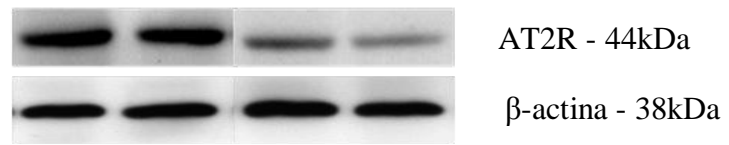


Figura 19. Análise por western blotting da expressão proteica de AT2R corrigida por beta-actina no VE dos animais dos grupos controle (C) e cafeína (CF) ao final do experimento.

Os animais do grupo CF apresentaram uma redução significativa na expressão desta proteína. Dados expressos como média \pm erro padrão de 5 animais por grupo; * $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

A alta frequência do consumo de cafeína pela população mundial, principalmente por mulheres gestantes, despertou o interesse da comunidade científica sobre seus efeitos fisiológicos, relacionando a sua ingestão aos níveis pressóricos ou ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares (Birkett and Logan 1988; Hartley, Lovallo et al. 2001; Winkelmayr, Stampfer et al. 2005; Greenwood, Alwan et al. 2010). Existem duas principais razões para se estudar o efeito da cafeína na gestação, primeiro porque não existe barreira placentária nem hemato-encefálica para a cafeína (Kimmel, Kimmel et al. 1984; Tanaka, Nakazawa et al. 1984), logo o feto absorve a cafeína pela placenta quando a mãe ingere esta substância. Segundo porque a meia vida da cafeína depende da idade, sendo maior no feto que em neonatos (Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009).

A literatura não é consensual no que tange à programação fetal por consumo materno de cafeína. Os mecanismos exatos pelos quais a cafeína pode prejudicar o desenvolvimento fetal permanecem desconhecidos. No presente estudo demonstramos pela primeira vez que a administração crônica de cafeína durante a gestação altera a ingestão alimentar, massa corporal, a taxa metabólica, a pressão arterial, o remodelamento cardiovascular e os componentes do sistema renina-angiotensina no coração e rim da prole adulta.

Trabalho publicado por Iglesias et al. 2006 demonstrou que a ingestão materna de cafeína durante a gestação não altera significativamente a massa corporal das mães até o final do período da gestação (Iglesias, Leon et al. 2006). Nosso estudo corroborou com os achados do autor, onde as mães que foram submetidas à cafeína durante a gestação não apresentaram alterações na massa corporal, assim como no tamanho da ninhada e na ingestão alimentar.

Uma característica marcante de animais que sofreram algum tipo de restrição intraútero, que culmina em programação fetal é o baixo peso ao nascer (Leandro, Furukawa et al. 2008). Alguns autores associam o consumo de cafeína durante a gestação ao baixo peso ao nascimento (Greenwood, Alwan et al. 2010), no entanto este tema é controverso, uma vez que outros autores não encontraram evidências para associar esses dois fatores (Jarosz, Wierzejska et al. 2012). Em nosso estudo não observamos diferenças na massa corporal ao nascimento dos animais expostos à cafeína intraútero, corroborando com outro autor (Jarosz, Wierzejska et al. 2012). Entretanto, na lactação, os animais do grupo cafeína apresentaram um modesto aumento da massa corporal, possivelmente devido ao elevado desempenho lactacional, como

sugerido por Sheffield (1991) que demonstrou que filhotes de mães que consomem cafeína durante a gestação têm um aumento no desempenho lactacional (Sheffield 1991).

O tempo de exposição intraútero à cafeína parece ser fundamental para as respostas apresentadas na vida adulta. Uma única dose de cafeína durante a gestação resultou em aumento da massa corporal da prole adulta (Wendler, Busovsky-McNeal et al. 2009), já uma dose crônica de cafeína na gestação pode resultar em reduzida massa corporal nos animais adultos (Soellner, Grandys et al. 2009). Embora não tenhamos observado significativa diferença na massa corporal dos filhotes ao desmame, a partir da 6ª semana de vida os animais do grupo cafeína apresentaram uma redução significativa na massa corporal assim como reduzida ingestão alimentar, corroborando com os achados de Soellner et al. (2009) (Soellner, Grandys et al. 2009). Podemos sugerir que a reduzida massa corporal seja resultante da menor ingestão alimentar dos animais do grupo cafeína. Trabalhos na Literatura sugerem que a cafeína possua efeitos anorexígenos por indução da saciedade e modulação dos níveis séricos de leptina (Zheng, Sayama et al. 2004; Westerterp-Plantenga, Lejeune et al. 2005; Hussein, Matsuda et al. 2011; Sherman, Gutman et al. 2011). Além disso, podemos correlacionar a redução da massa corporal ao aumento do gasto energético (Hussein, Matsuda et al. 2011; Sherman, Gutman et al. 2011). Para confirmarmos esta hipótese, verificamos o metabolismo basal dos grupos experimentais através da calorimetria indireta.

A calorimetria indireta é o método onde o gasto energético é estimado através da medição das trocas respiratórias, ou seja, do volume de oxigênio consumido (VO₂) e do volume de gás carbônico produzido (VCO₂) (Ferrannini 1988). Padrões de aumento do índice cardíaco, fornecimento e consumo de O₂ foram apontados a caracterizar o aumento das necessidades metabólicas de um indivíduo (Shoemaker, Appel et al. 1991). Nossos dados mostram que os animais do grupo cafeína apresentaram um aumento significativo do VO₂ e do gasto energético. Não está claro o que leva ao aumento destes parâmetros, no entanto, é descrito na literatura que a exposição intraútero a drogas psicoestimulantes, como a cafeína, pode levar a um fenômeno chamado *imprinting neuronal*, pelo qual a droga compromete o feto. Entretanto, estas alterações não se manifestam imediatamente, surgindo somente na vida adulta (Andersen 2005). Adicionalmente, administração crônica de cafeína durante a gestação resultou em baixa regulação (*down regulation*) da proteína Gi no cérebro de ratos (Leon, Albasanz et al. 2005). Nós postulamos que a via estimulatória cerebral (via proteína Gs) esteja em vantagem, principalmente se considerarmos que os animais do grupo cafeína apresentam alta frequência cardíaca em repouso. Elevação da FC em repouso tem sido considerada um reflexo da ativação simpática (Diaz, Bourassa et al. 2005; Arena, Myers et al. 2010). Dessa

forma, os dados apresentados neste estudo sugerem um típico quadro de aumento da taxa metabólica basal dos animais do grupo cafeína.

Em relação ao peso do coração e do VE, observamos que a administração de cafeína materna durante a gestação afeta de maneira diferente as massas absoluta e relativa. A massa absoluta de ambos os tecidos apresentaram-se diminuídas nos grupos cujas mães foram submetidas à cafeína, provavelmente devido a menor massa corporal desses animais. No entanto, a massa relativa do coração não apresentou alterações no grupo cafeína, já o VE demonstrou um aumento de 10 % em sua massa. Este aumento sugere uma resposta adaptativa do VE à elevada pressão arterial observada nestes animais, sendo ainda confirmada pela hipertrofia cardíaca. Esta hipertrofia representa um aumento do peso do miocárdio em resposta à sobrecarga de pressão, muito implicado em aumento do estresse oxidativo e na produção de espécies reativas para oxigênio (Almeida and Mandarim-de-Lacerda 2005).

A lesão do coração manifesta-se fundamentalmente por hipertrofia ventricular esquerda e seu potencial risco de evolução para insuficiência cardíaca e lesão renal (Verma and Solomon 2009). A hipertrofia ventricular esquerda seria um mecanismo adaptativo do VE ao aumento crônico da pós-carga, podendo levar a disfunção diastólica e posteriormente disfunção sistólica (Verma and Solomon 2009). A hipertensão arterial assim provocada, leva ao remodelamento cardíaco que é mediado, em nível molecular, pelo SRA, fator de crescimento de transformação-beta ($TGF-\beta$) e pelo sistema beta-adrenérgico (Campbell and Katwa 1997; Kupfahl, Pink et al. 2000). Nossos dados demonstram que os animais do grupo cafeína apresentam pressão arterial sistólica aumentada e hipertrofia de cardiomiócitos. Recente trabalho realizado por nosso grupo demonstrou uma associação da elevada pressão arterial com aumento de cardiomiócitos em animais cujas mães sofreram uma restrição alimentar na gestação (Gregorio, Souza-Mello et al. 2008). Esses resultados e os resultados apresentados em nosso estudo reforçam a correlação existente entre o aumento do VE e hipertrofia dos cardiomiócitos com a elevada pressão arterial sistólica, que são importantes para o desenvolvimento da hipertensão.

Existem poucos trabalhos na literatura a respeito do impacto da administração materna de cafeína sobre a morfologia cardíaca na prole adulta, portanto, podemos sugerir que as alterações moleculares dos componentes do SRA sejam os responsáveis por tais deficiências. Ao analisarmos a expressão dos componentes do SRA no coração e rim da prole adulta, observamos uma persistente ativação do sistema, que é confirmada pelo aumento da expressão proteica de renina, ECA, AngII e AT1 renal e cardíaco.

A cafeína atua como competidora antagonista pelos receptores de adenosina (Osswald and Schnermann 2011), levando a efeitos na liberação dos canais de cálcio e na inibição das enzimas fosfodiesterases, que hidrolizam o AMPc resultando em seu aumento intracelular (Butcher and Baird 1968; Bolignano, Coppolino et al. 2007). Também são observados efeitos estimulatórios no rim e no sistema nervoso central (Brown, Ollerstam et al. 2001; Bolignano, Coppolino et al. 2007). Trabalhos têm demonstrado que a administração de cafeína em humanos e ratos adultos tem efeitos sobre a liberação e secreção de renina plasmática (Tofovic, Branch et al. 1991; Shinzato, Miwa et al. 1994; Tofovic, Kusaka et al. 1999). Apesar da diferença entre nosso modelo experimental e outros, nossos resultados demonstram uma elevada expressão proteica de renina na prole adulta, corroborando com os achados acima. Um aumento na liberação de renina pela cafeína pode ser crítico porque além do bloqueio dos receptores de adenosina no rim, o fármaco também ativa o eixo simpático-adrenal (Robertson, Frolich et al. 1978; Smits, Pieters et al. 1986; Smits, Aengevaeren et al. 1989; Nussberger, Mooser et al. 1990); e inibi enzimas fosfodiesterases (Wells and Miller 1988), aumentando assim o AMPc (Jackson 1991). Sugerimos que estes efeitos sejam atuantes no feto, já que não existe uma barreira placentária para cafeína (Kimmel, Kimmel et al. 1984; Tanaka, Nakazawa et al. 1984), logo o feto absorve toda a substância ingerida pela mãe sem ser metabolizada. Dessa forma, uma hipótese para esta elevada expressão de renina seja resultante da programação intrauterina por exposição à cafeína.

Outra via de estímulo da secreção de renina ocorre por estimulação simpática (Wollert and Drexler 1999; Dinh, Frauman et al. 2001). Em baixas doses, os efeitos da cafeína são exercidos pelo antagonismo dos receptores de adenosina A1 e A2a que têm um efeito secundário na neurotransmissão dopaminérgica (Fredholm, Battig et al. 1999). Um consenso a respeito da exposição à cafeína em baixas ou moderadas doses intraútero aponta para hiperatividade na adolescência ou vida adulta (Linnet, Dalsgaard et al. 2003).

Outra hipótese para justificar a ativação do SRA pode ser pelo fato do uso crônico de cafeína na gestação conduzir a reduzida função cardíaca do feto (Momoi, Tinney et al. 2008; Buscariollo, Breuer et al. 2011), conseqüentemente, levando a hipotensão e aumento da atividade plasmática de renina (Lumbers and Stevens 1987). Esse fato nos leva a acreditar que uma alterada frequência cardíaca pode ter conseqüências diretas no desenvolvimento do embrião e feto (Dunnigan, Hu et al. 1987; Merchiers, Dhont et al. 1991; Severi, Rizzo et al. 2000), como hiperestimulação de renina intraútero programando definitivamente este órgão a manter os níveis de renina elevados.

O SRA é considerado um sistema endócrino cuja substância ativa, a Ang II, é clivada pela enzima conversora de angiotensina, a partir da Ang I, cuja produção ocorre pela conversão da renina a partir do substrato angiotensinogênio (Giestas, Palma et al. 2010). A Ang II tem como funções contrair o músculo liso da parede vascular, aumentar a força de contração do coração, estimular a secreção de aldosterona e modular a filtração glomerular (Wollert and Drexler 1999; Dinh, Frauman et al. 2001).

Não analisamos a Ang II sérica, entretanto, podemos hipotetizar que seus níveis estejam elevados, uma vez que observamos em nossos resultados o aumento da expressão proteica da renina e da Ang II local. Esta elevada expressão de Ang II no coração pode ser explicada pelo aumento na expressão de renina renal, corroborando com os estudos realizados em humanos (Jeong and Dimsdale 1990; Muller and Luft 2006). Assim como outros componentes do sistema renina-angiotensina, foi detectada a presença da enzima conversora de angiotensina no coração de roedores (Katwa, Campbell et al. 1997). Nosso estudo demonstrou elevada expressão proteica da ECA no coração, que corrobora com nossos resultados referentes ao aumento da expressão proteica de renina e angiotensina II. Não encontramos trabalhos na literatura que tenham avaliado os níveis proteicos de renina, ECA e angiotensina II na prole adulta de mães submetidas à administração crônica de cafeína na gestação. Entretanto, podemos sugerir que a cafeína seja capaz de modular a expressão de ambas as enzimas, regulando a Ang II no coração dos animais do grupo cafeína.

Independente de seus efeitos sobre a pressão arterial, a Ang II, via sua interação com o receptor AT1, contribui para o remodelamento do ventrículo esquerdo, para alterações na morfologia e propriedade mecânica vascular e para o desenvolvimento de disfunção endotelial (Flynn and Tullus 2009). Trabalhos *in vitro* tem demonstrado que a Ang II regula de maneira negativa a expressão do receptor AT1 em células musculares lisas aórticas (Lassegue, Alexander et al. 1995). No entanto, a situação *in vivo* é menos compreendida. Em camundongos adultos, foi demonstrado que uma dieta hiperlipídica eleva no coração a expressão proteica de angiotensina II e dos receptores AT1 (Torres 2012). Não encontramos na literatura trabalhos que tenham avaliado a expressão desse receptor no coração da prole de mães que consumiram cafeína durante a gestação. Ao analisarmos nossos resultados no coração da prole adulta, observamos que a expressão do receptor AT1 foi aumentada, enquanto que a expressão proteica de AT2R apresentou-se reduzida. A partir desses resultados podemos sugerir que em nossos animais cujas mães foram submetidas à administração de cafeína na gestação a expressão de ambos os receptores esteja sendo

regulada pelo próprio hormônio, no entanto os mecanismos exatos desta regulação não são completamente entendidos.

Além da persistente PA elevada, mesmo em condições de elevada renina renal, nosso trabalho demonstrou um aumento nos receptores AT1 renais do grupo cafeína. Em condições normais, observa-se um *feedback* negativo de alça curta para inibição da renina pela AngII (Hackenthal, Paul et al. 1990; Castrop, Hocherl et al. 2010). Ang II sinalizaria às células da mácula densa uma inibição na secreção de renina, por sua regulação através do receptor AT1 renal (Castrop, Hocherl et al. 2010). Sugerimos que o aumento na expressão de AT1R no rim ocorra por uma regulação positiva pela angiotensina II. Podemos supor que a ação inibitória exercida pela Ang II não esteja sendo eficiente em controlar a elevada expressão de renina, uma vez que existem tantos outros mecanismos envolvidos nesta regulação (Castrop, Hocherl et al. 2010). Além disso, a Ang II promove uma redução da sensibilidade dos barorreceptores, reduzindo assim a eficácia no controle da variação da PA (Oparil, Chen et al. 1988). Ou seja, estes barorreceptores possivelmente não estariam percebendo os altos índices da PA, para dessa forma equilibrar o sistema.

Demonstramos neste trabalho que a administração crônica de cafeína na gestação altera os receptores AT1 e AT2 nos órgãos avaliados da prole adulta. Analisando nossos resultados, podemos sugerir que ocorra tanto no coração quanto no rim, uma regulação do tipo positiva do receptor AT1 (*up regulation*) pela angiotensina II, já que a quantidade relativa do receptor está aumentada face à alta expressão proteica da Ang II. Entretanto, o receptor AT2 exerceria uma regulação do tipo negativa (*down regulation*) no coração.

Este estudo avaliou pela primeira vez os efeitos da administração crônica de cafeína nas mães durante a gestação sobre o SRA na prole adulta, e demonstramos uma persistente ativação do SRA, provavelmente devido a diversos fatores diretos ou indiretos da cafeína. Algumas hipóteses podem explicar esta ativação: 1) Uma programação intrauterina da cafeína sobre os mediadores biológicos que regulam a síntese e secreção de renina (Castrop, Hocherl et al. 2010), já que não existe uma barreira placentária para cafeína (Ikeda, Sapienza et al. 1982; Kimmel, Kimmel et al. 1984; Tanaka, Nakazawa et al. 1984); 2) Reduzida frequência cardíaca no feto intraútero, como demonstrado por alguns autores (Momoi, Tinney et al. 2008; Buscariollo, Breuer et al. 2011), levaria a uma redução no débito cardíaco, resultando numa redução da PA. A redução na pressão de perfusão renal através de vários estímulos como hipóxia, hemorragia ou hipotensão, ativaria o SRA fetal (Lumbers and Stevens 1987; Rosnes, Valego et al. 1998). Embora a ativação apropriada do SRA seja vital para a prevenção do colapso circulatório e manutenção do balanço fluido intravascular, a

desregulação e/ou persistente ativação do SRA pode conduzir a uma inapropriada elevação da pressão sanguínea, danos em órgãos alvo e até mesmo reduzir a sobrevivência (Benigni, Corna et al. 2009); 3) Administração crônica de cafeína na gestação inibe o A1AR por uma *down regulation* da proteína Gi no cérebro de ratos (Leon, Albasanz et al. 2005), sugerimos que a via estimulatória esteja mais ativa; e 4) Uma ação indireta da cafeína na gestação poderia ser por restrição de nutrientes, onde o feto seria submetido intraútero por redução do fluxo sanguíneo, e levaria a uma hipertrofia de glomérulos e ativação da renina e angiotensina II interna (Bagby 2007).

Em síntese, esta pesquisa proporcionou uma ideia geral sobre a administração crônica de cafeína durante a gravidez na prole adulta, entretanto outros estudos são requeridos para identificar os mecanismos envolvidos na persistente ativação de SRA.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstram que a administração crônica de cafeína durante a gestação programa a expressão dos componentes do sistema renina-angiotensina, promovendo uma persistente ativação do SRA, levando a um aumento da pressão arterial e um remodelamento cardíaco adverso.

Todas essas descobertas servem para realçar a necessidade de incentivar as mulheres grávidas a evitar o consumo de alimentos ou medicamentos que contenham cafeína. Portanto, nós sugerimos que a ingestão de cafeína durante o desenvolvimento embrionário pode aumentar o risco de doenças crônicas na idade adulta.

REFERÊNCIAS

- Almeida, J. R. and C. A. Mandarim-de-Lacerda. Overweight is gender-dependent in prenatal protein--calorie restricted adult rats acting on the blood pressure and the adverse cardiac remodeling. 2005. *Life Sci* 77(12): 1307-18.
- Andersen, S. L. Stimulants and the developing brain. 2005. *Trends Pharmacol Sci* 26(5): 237-43.
- Arena, R., J. Myers, et al. The prognostic value of the heart rate response during exercise and recovery in patients with heart failure: influence of beta-blockade. 2010. *Int J Cardiol* 138(2): 166-73.
- Armitage, J. A., P. D. Taylor, et al. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. 2005. *J Physiol* 565(Pt 1): 3-8.
- Asadifar, M., M. Yazdani, et al. Combined effects of caffeine and malnutrition on the newborn rat's myocardium. 2005. *Food Chem Toxicol* 43(3): 451-6.
- Bae, S., Y. Xiao, et al. Effect of maternal chronic hypoxic exposure during gestation on apoptosis in fetal rat heart. 2003. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285(3): H983-90.
- Bagby, S. P. Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming. 2007. *J Nutr* 137(4): 1066-72.
- Barker, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. 1990. *BMJ* 301(6761): 1111.
- Barker, D. J. and C. Osmond. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. 1986. *Lancet* 1(8489): 1077-81.
- Benigni, A., D. Corna, et al. Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. 2009. *J Clin Invest* 119(3): 524-30.
- Birkett, N. J. and A. G. Logan. Caffeine-containing beverages and the prevalence of hypertension. 1988. *J Hypertens Suppl* 6(4): S620-2.
- Bjorklund, O., J. Kahlstrom, et al. Perinatal caffeine, acting on maternal adenosine A(1) receptors, causes long-lasting behavioral changes in mouse offspring. 2008. *PLoS One* 3(12): e3977.
- Bolignano, D., G. Coppolino, et al. Caffeine and the kidney: what evidence right now? 2007. *J Ren Nutr* 17(4): 225-34.
- Bono, F., A. Mapelli, et al. The action of synthetic hypertensin on the guinea pig heart under fluothane anesthesia. Experimental study. 1962. *Minerva Anestesiol* 28: 105-10.

- Brown, R., A. Ollerstam, et al. Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice. 2001. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(5): R1362-7.
- Brown, R. D., P. Thoren, et al. Influence of the adenosine A1 receptor on blood pressure regulation and renin release. 2006. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290(5): R1324-9.
- Browne, M. L. Maternal exposure to caffeine and risk of congenital anomalies: a systematic review. 2006. *Epidemiology* 17(3): 324-31.
- Brunner, H. R., H. Gavras, et al. Specific inhibition of the renin-angiotensin system: A key to understanding blood pressure regulation. 1974. *Prog Cardiovasc Dis* 17(2): 87-98.
- Bruns RF, L. H., Pugsley TA. Adenosine Receptor Subtypes: Binding Studies. Topics and Perspectives in Adenosine Research. 1987. B. F. B. Eckehart Gerlach. New York, Springer-Verlag: 59-73.
- Buscariollo, D. L., G. A. Breuer, et al. Caffeine acts via A1 adenosine receptors to disrupt embryonic cardiac function. 2011. *PLoS One* 6(12): e28296.
- Buscemi, S., A. Mattina, et al. Acute effects of coffee on QT interval in healthy subjects. 2011. *Nutr J* 10: 15.
- Butcher, R. W. and C. E. Baird. Effects of prostaglandins on adenosine 3',5'-monophosphate levels in fat and other tissues. 1968. *J Biol Chem* 243(8): 1713-7.
- Campbell, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. 1987. *J Clin Invest* 79(1): 1-6.
- Campbell, S. E. and L. C. Katwa. Angiotensin II stimulated expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts and myofibroblasts. 1997. *J Mol Cell Cardiol* 29(7): 1947-58.
- Castrop, H., K. Hoehlerl, et al. Physiology of kidney renin. 2010. *Physiol Rev* 90(2): 607-73.
- Castrop, H., J. Klar, et al. General inhibition of renocortical cyclooxygenase-2 expression by the renin-angiotensin system. 2003. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(3): F518-24.
- Clausmeyer, S., A. Reinecke, et al. Tissue-specific expression of a rat renin transcript lacking the coding sequence for the prefragment and its stimulation by myocardial infarction. 2000. *Endocrinology* 141(8): 2963-70.
- Clausson, B., F. Granath, et al. Effect of caffeine exposure during pregnancy on birth weight and gestational age. 2002. *Am J Epidemiol* 155(5): 429-36.
- Cnattingius, S., A. Ekblom, et al. Caffeine intake and the risk of spontaneous abortion. 2003. *Food Chem Toxicol* 41(8): 1202; author reply 1203.
- Cody, R. J. The clinical potential of renin inhibitors and angiotensin antagonists. 1994. *Drugs* 47(4): 586-98.

- Danser, A. H. Local renin-angiotensin systems. 1996. *Mol Cell Biochem* 157(1-2): 211-6.
- Danser, A. H. Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. 2003. *Int J Biochem Cell Biol* 35(6): 759-68.
- Danser, A. H., J. J. Saris, et al. "Is there a local renin-angiotensin system in the heart? 1999. *Cardiovasc Res* 44(2): 252-65.
- Dawson, A., J. I. Davies, et al. The role of aldosterone in heart failure and the clinical benefits of aldosterone blockade. 2004. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2(1): 29-36.
- De Mello, W. C. Novel aspects of angiotensin II action in the heart. Implications to myocardial ischemia and heart failure. 2011. *Regul Pept* 166(1-3): 9-14.
- Diaz, A., M. G. Bourassa, et al. Long-term prognostic value of resting heart rate in patients with suspected or proven coronary artery disease. 2005. *Eur Heart J* 26(10): 967-74.
- Dinh, D. T., A. G. Frauman, et al. Angiotensin receptors: distribution, signalling and function. 2001. *Clin Sci (Lond)* 100(5): 481-92.
- Drake, A. J., B. R. Walker, et al. Intergenerational consequences of fetal programming by in utero exposure to glucocorticoids in rats. 2005. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(1): R34-8.
- Dunnigan, A., N. Hu, et al. Effect of heart rate increase on dorsal aortic flow in the stage 24 chick embryo. 1987. *Pediatr Res* 22(4): 442-4.
- Echeverri, D., F. R. Montes, et al. Caffeine's Vascular Mechanisms of Action. 2010. *Int J Vasc Med* 2010: 834060.
- Eskenazi, B. Caffeine--filtering the facts. 1999. *N Engl J Med* 341(22): 1688-9.
- Eskenazi, B., A. L. Stapleton, et al. Associations between maternal decaffeinated and caffeinated coffee consumption and fetal growth and gestational duration. 1999. *Epidemiology* 10(3): 242-9.
- Evereklioglu, C., E. Guldur, et al. Excessive maternal caffeine exposure during pregnancy is cataractogenic for neonatal crystalline lenses in rats: a biomicroscopic and histopathologic study. 2004. *Acta Ophthalmol Scand* 82(5): 552-6.
- Fan, M., W. Qin, et al. Characterization of adenosine receptor(s) involved in adenosine-induced bronchoconstriction in an allergic mouse model. 2003. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(6): L1012-9.
- Faria Tda, S., B. Brasil Fde, et al. Maternal malnutrition during lactation alters the folliculogenesis and gonadotropins and estrogen isoforms ovarian receptors in the offspring at puberty. 2008. *J Endocrinol* 198(3): 625-34.

- Ferrannini, E. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. 1988. *Metabolism* 37(3): 287-301.
- Fischbeck, K. L. and K. M. Rasmussen. Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. 1987. *J Nutr* 117(11): 1967-75.
- Flynn, J. T. and K. Tullus. Severe hypertension in children and adolescents: pathophysiology and treatment. 2009. *Pediatr Nephrol* 24(6): 1101-12.
- Fredholm, B. B. Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. 1995. *Pharmacol Toxicol* 76(2): 93-101.
- Fredholm, B. B., I. J. AP, et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. 2001. *Pharmacol Rev* 53(4): 527-52.
- Fredholm, B. B., K. Battig, et al. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. 1999. *Pharmacol Rev* 51(1): 83-133.
- Ghidini, A. Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach. 1996. *Obstet Gynecol Surv* 51(6): 376-82.
- Giestas, A., I. Palma, et al. Renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and its pharmacologic modulation. 2010. *Acta Med Port* 23(4): 677-88.
- Godfrey, K. M. and D. J. Barker. Fetal nutrition and adult disease. 2000. *Am J Clin Nutr* 71(5 Suppl): 1344S-52S.
- Goldstein, A. and R. Warren. Passage of caffeine into human gonadal and fetal tissue. 1962. *Biochem Pharmacol* 11: 166-8.
- Greenwood, D. C., N. Alwan, et al. Caffeine intake during pregnancy, late miscarriage and stillbirth. 2010. *Eur J Epidemiol* 25(4): 275-80.
- Gregorio, B. M., V. Souza-Mello, et al. Maternal fish oil supplementation benefits programmed offspring from rat dams fed low-protein diet. 2008. *Am J Obstet Gynecol* 199(1): 82 e1-7.
- Grosso, L. M. and M. B. Bracken. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. 2005. *Ann Epidemiol* 15(6): 460-6.
- Guimaraes, S. and A. Albino-Teixeira. Hypertension due to chronic blockade of P1-purinoceptors. 1996. *J Auton Pharmacol* 16(6): 367-70.
- Hackenthal, E., M. Paul, et al. Morphology, physiology, and molecular biology of renin secretion. 1990. *Physiol Rev* 70(4): 1067-116.
- Hales, C. N. and S. E. Ozanne. The dangerous road of catch-up growth. 2003. *J Physiol* 547(Pt 1): 5-10.

- Hartley, T. R., W. R. Lovallo, et al. Caffeine and stress: implications for risk, assessment, and management of hypertension. 2001. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 3(6): 354-61.
- He, Z., W. Y. Ma, et al. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. 2003. *Cancer Res* 63(15): 4396-401.
- Heckman, M. A., J. Weil, et al. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. 2010. *J Food Sci* 75(3): R77-87.
- Hernandez Schulman, I., M. S. Zhou, et al. Cross-talk between angiotensin II receptor types 1 and 2: potential role in vascular remodeling in humans. 2007. *Hypertension* 49(2): 270-1.
- Heyman, S. N., S. Rosen, et al. Hypoxia-inducible factors and the prevention of acute organ injury. 2011. *Crit Care* 15(2): 209.
- Hoehlerl, K., K. Wolf, et al.. Renocortical expression of renin and of cyclooxygenase-2 in response to angiotensin II AT1 receptor blockade is closely coordinated but not causally linked. 2001. *Pflugers Arch* 442(6): 821-7.
- Hussein, G. M., H. Matsuda, et al.. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: involvement of glucagon-like peptide-1. 2011. *Biol Pharm Bull* 34(12): 1849-55.
- Iglesias, I., D. Leon, et al. Chronic intake of caffeine during gestation down regulates metabotropic glutamate receptors in maternal and fetal rat heart. 2006. *Amino Acids* 30(3): 257-66.
- Ikeda, G. J., P. P. Sapienza, et al. Blood levels of caffeine and results of fetal examination after oral administration of caffeine to pregnant rats. 1982. *J Appl Toxicol* 2(6): 307-14.
- Jackson, E. K. Adenosine: a physiological brake on renin release. 1991. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 31: 1-35.
- James, J. E. and M. Richardson. Pressor effects of caffeine and cigarette smoking. 1991. *Br J Clin Psychol* 30 (Pt 3): 276-8.
- Jarosz, M., R. Wierzejska, et al. Maternal caffeine intake and its effect on pregnancy outcomes. 2012. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 160(2): 156-60.
- Jeong, D. U. and J. E. Dimsdale. The effects of caffeine on blood pressure in the work environment. 1990. *Am J Hypertens* 3(10): 749-53.
- Kalow, W. and B. K. Tang. Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. 1991. *Clin Pharmacol Ther* 50(5 Pt 1): 508-19.
- Katwa, L. C., S. E. Campbell, et al.. Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo. 1997. *J Mol Cell Cardiol* 29(5): 1375-86.

- Kennedy, D. O. and E. L. Wightman. Herbal extracts and phytochemicals: plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. 2011. *Adv Nutr (Bethesda)* 2(1): 32-50.
- Kim, S. M., D. Mizel, et al.. Adenosine as a mediator of macula densa-dependent inhibition of renin secretion. 2006. *Am J Physiol Renal Physiol* 290(5): F1016-23.
- Kimmel, C. A., G. L. Kimmel, et al. Blood flow changes and conceptual development in pregnant rats in response to caffeine. 1984. *Fundam Appl Toxicol* 4(2 Pt 1): 240-7.
- Kirkinen, P., P. Jouppila, et al. The effect of caffeine on placental and fetal blood flow in human pregnancy. 1983. *Am J Obstet Gynecol* 147(8): 939-42.
- Kuan, C. J., J. N. Wells, et al. Endogenous adenosine restrains renin release in conscious rats. 1990. *Circ Res* 66(3): 637-46.
- Kumar, R., V. P. Singh, et al. (2008). The intracellular renin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 17(2): 168-73.
- Kupfahl, C., D. Pink, et al. Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. 2000 *Cardiovasc Res* 46(3): 463-75.
- Langley-Evans, S. C. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. 2009. *J Anat* 215(1): 36-51.
- Lassegue, B., R. W. Alexander, et al. Angiotensin II down-regulates the vascular smooth muscle AT1 receptor by transcriptional and post-transcriptional mechanisms: evidence for homologous and heterologous regulation. 1995. *Mol Pharmacol* 48(4): 601-9.
- Leandro, S. M., L. N. Furukawa, et al.. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin-angiotensin system. 2008. *Physiol Behav* 95(1-2): 145-51.
- Lee, M. A., M. Bohm, et al. Tissue renin-angiotensin systems. Their role in cardiovascular disease. 1993. *Circulation* 87(5 Suppl): IV7-13.
- Leon, D., J. L. Albasanz, et al. Adenosine A1 receptor down-regulation in mothers and fetal brain after caffeine and theophylline treatments to pregnant rats. 2002. *J Neurochem* 82(3): 625-34.
- Leon, D., J. L. Albasanz, et al. Chronic caffeine or theophylline intake during pregnancy inhibits A1 receptor function in the rat brain. 2005. *Neuroscience* 131(2): 481-9.
- Li, G., Y. Xiao, et al. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat. 2003. *J Soc Gynecol Investig* 10(5): 265-74.
- Lindpaintner, K., M. W. Jin, et al. Cardiac angiotensinogen and its local activation in the isolated perfused beating heart. 1990. *Circ Res* 67(3): 564-73.

- Linnet, K. M., S. Dalsgaard, et al. Maternal lifestyle factors in pregnancy risk of attention deficit hyperactivity disorder and associated behaviors: review of the current evidence. 2003. *Am J Psychiatry* 160(6): 1028-40.
- Liu, P. S., Y. J. Lin, et al. Effects of caffeine on Ca²⁺ fluxes and secretion in bovine chromaffin cells. 1995. *Eur J Pharmacol* 291(3): 265-72.
- Liu, Y. A., E. Ostlund, et al. Endothelin-induced contractions in human placental blood vessels are enhanced in intrauterine growth retardation, and modulated by agents that regulate levels of intracellular calcium. 1995. *Acta Physiol Scand* 155(4): 405-14.
- Lucas, A. Programming by early nutrition in man. 1991. *Ciba Found Symp* 156: 38-50; discussion 50-5.
- Lucas, A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. 1994. *Arch Dis Child* 71(4): 288-90.
- Lumbers, E. R. and A. D. Stevens. The effects of frusemide, saralasin and hypotension on fetal plasma renin activity and on fetal renal function. 1987. *J Physiol* 393: 479-90.
- Machado, R. D., R. A. Santos, et al. Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. 2000. *Life Sci* 66(1): 67-76.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A.. Stereological tools in biomedical research. 2003. *An Acad Bras Cienc* 75(4): 469-86.
- Martin-Gronert, M. S. and S. E. Ozanne. Mechanisms linking suboptimal early nutrition and increased risk of type 2 diabetes and obesity. 2010. *J Nutr* 140(3): 662-6.
- Mazzolai, L., J. Nussberger, et al. Blood pressure-independent cardiac hypertrophy induced by locally activated renin-angiotensin system. 1998. *Hypertension* 31(6): 1324-30.
- McMillen, I. C. and J. S. Robinson. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. 2005. *Physiol Rev* 85(2): 571-633.
- Mehta, P. K. and K. K. Griendling. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. 2007. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C82-97.
- Merchiers, E. H., M. Dhont, et al. Predictive value of early embryonic cardiac activity for pregnancy outcome. 1991. *Am J Obstet Gynecol* 165(1): 11-4.
- Miller, R. C., W. J. Watson, et al. Acute maternal and fetal cardiovascular effects of caffeine ingestion. 1994. *Am J Perinatol* 11(2): 132-6.
- Ming, Z. and W. W. Lutt. Caffeine-induced natriuresis and diuresis via blockade of hepatic adenosine-mediated sensory nerves and a hepatorenal reflex. 2010. *Can J Physiol Pharmacol* 88(11): 1115-21.

- Momoi, N., J. P. Tinney, et al. Modest maternal caffeine exposure affects developing embryonic cardiovascular function and growth. 2008. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(5): H2248-56.
- Muller, D. N. and F. C. Luft. The renin-angiotensin system in the vessel wall. 1998. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 2: 7-14.
- Muller, D. N. and F. C. Luft. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. 2006. *Clin J Am Soc Nephrol* 1(2): 221-8.
- Nguyen Dinh Cat, A. and R. M. Touyz. A new look at the renin-angiotensin system--focusing on the vascular system. 2011. *Peptides* 32(10): 2141-50.
- Nicholson, S. A. Stimulatory effect of caffeine on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in the rat. 1989. *J Endocrinol* 122(2): 535-43.
- Nurminen, M. L., L. Niittynen, et al. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. 1999. *Eur J Clin Nutr* 53(11): 831-9.
- Nussberger, J., V. Mooser, et al. Caffeine-induced diuresis and atrial natriuretic peptides. 1990. *J Cardiovasc Pharmacol* 15(5): 685-91.
- Nyska, A., E. Murphy, et al. Acute hemorrhagic myocardial necrosis and sudden death of rats exposed to a combination of ephedrine and caffeine. 2005. *Toxicol Sci* 83(2): 388-96.
- Oparil, S., Y. F. Chen, et al. The neural basis of salt sensitivity in the rat: altered hypothalamic function. 1988. *Am J Med Sci* 295(4): 360-9.
- Oparil, S., A. J. Narkates, et al. Altered angiotensin-converting enzyme in lung and extrapulmonary tissues of hypoxia-adapted rats. 1988. *J Appl Physiol* 65(1): 218-27.
- Osswald, H. and J. Schnermann. Methylxanthines and the kidney. 2011. *Handb Exp Pharmacol* (200): 391-412.
- Ozanne, S. E. and C. N. Hales. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. 2004. *Nature* 427(6973): 411-2.
- Patel, K. P. and H. D. Schultz. Angiotensin Peptides and Nitric Oxide in Cardiovascular Disease. 2012. *Antioxid Redox Signal*.
- Paul, M., A. Poyan Mehr, et al. Physiology of local renin-angiotensin systems. 2006. *Physiol Rev* 86(3): 747-803.
- Porter, G. A., Jr. and S. A. Rivkees. Ontogeny of humoral heart rate regulation in the embryonic mouse. 2001. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281(2): R401-7.
- Rasch, R., E. Skriver, et al. The role of the RAS in programming of adult hypertension. 2004. *Acta Physiol Scand* 181(4): 537-42.

- Re, R. N. and J. L. Cook. The basis of an intracrine pharmacology. 2008. *J Clin Pharmacol* 48(3): 344-50.
- Reeves, P. G., F. H. Nielsen, et al. 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. 1993. *J Nutr* 123(11): 1939-51.
- Reudelhuber, T. L. The renin-angiotensin system: peptides and enzymes beyond angiotensin II. 2005. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 14(2): 155-9.
- Riksen, N. P., P. Smits, et al. The cardiovascular effects of methylxanthines. 2011. *Handb Exp Pharmacol* (200): 413-37.
- Rivkees, S. A. and C. C. Wendler. Adverse and protective influences of adenosine on the newborn and embryo: implications for preterm white matter injury and embryo protection. 2011. *Pediatr Res* 69(4): 271-8.
- Robertson, D., J. C. Frolich, et al. Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. 1978. *N Engl J Med* 298(4): 181-6.
- Rosnes, J. S., N. Valego, et al. Active renin, prorenin, and renin gene expression after reduced renal perfusion pressure in term ovine fetuses. 1998. *Am J Physiol* 275(1 Pt 2): R141-7.
- Santos, I. S., C. G. Victora, et al. Caffeine intake and low birth weight: a population-based case-control study. 1998. *Am J Epidemiol* 147(7): 620-7.
- Sato, A., K. Terata, et al. Mechanism of vasodilation to adenosine in coronary arterioles from patients with heart disease. 2005. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(4): H1633-40.
- Sawynok, J. Methylxanthines and pain. 2011. *Handb Exp Pharmacol* 200: 311-29.
- Scherle, W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. 1970. *Mikroskopie* 26(1): 57-60.
- Schunkert, H., V. J. Dzau, et al. Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. Effects on coronary resistance, contractility, and relaxation. 1990. *J Clin Invest* 86(6): 1913-20.
- Seckl, J. R. and M. J. Meaney. Glucocorticoid programming. 2004. *Ann N Y Acad Sci* 1032: 63-84.
- Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. 2007. *Sci STKE* 2007(407): cm8.
- Serneri, G. G., M. Boddi, et al. Cardiac angiotensin II formation in the clinical course of heart failure and its relationship with left ventricular function. 2001. *Circ Res* 88(9): 961-8.
- Severi, F. M., G. Rizzo, et al. Intrauterine growth retardation and fetal cardiac function. 2000. *Fetal Diagn Ther* 15(1): 8-19.

Sheffield, L. G. Caffeine administered during pregnancy augments subsequent lactation in mice. 1991. *J Anim Sci* 69(3): 1128-32.

Sherman, H., R. Gutman, et al. Caffeine alters circadian rhythms and expression of disease and metabolic markers. 2011. *Int J Biochem Cell Biol* 43(5): 829-38.

Shinzato, T., M. Miwa, et al. Role of adenosine in dialysis-induced hypotension. 1994. *J Am Soc Nephrol* 4(12): 1987-94.

Shoemaker, W. C., P. L. Appel, et al. Oxygen transport measurements to evaluate tissue perfusion and titrate therapy: dobutamine and dopamine effects. 1991. *Crit Care Med* 19(5): 672-88.

Signorello, L. B., A. Nordmark, et al. Caffeine metabolism and the risk of spontaneous abortion of normal karyotype fetuses. 2001. *Obstet Gynecol* 98(6): 1059-66.

Simmons, R. A., L. J. Templeton, et al. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. 2001. *Diabetes* 50(10): 2279-86.

Slotkin, T. A. Developmental cholinotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. 1999. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1: 71-80.

Smits, P., W. R. Aengevaeren, et al. Caffeine reduces dipyridamole-induced myocardial ischemia. 1989. *J Nucl Med* 30(10): 1723-6.

Smits, P., G. Pieters, et al. The role of epinephrine in the circulatory effects of coffee. 1986. *Clin Pharmacol Ther* 40(4): 431-7.

Soellner, D. E., T. Grandys, et al. Chronic prenatal caffeine exposure impairs novel object recognition and radial arm maze behaviors in adult rats. 2009. *Behav Brain Res* 205(1): 191-9.

Solinas, M., S. Ferre, et al. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. 2002. *J Neurosci* 22(15): 6321-4.

Soyka, L. F. Effects of methylxanthines on the fetus. 1979. *Clin Perinatol* 6(1): 37-51.

Stanton, A. Therapeutic potential of renin inhibitors in the management of cardiovascular disorders. 2003. *Am J Cardiovasc Drugs* 3(6): 389-94.

Stein, Z. and M. Susser. The Dutch famine, 1944-1945, and the reproductive process. I. Effects on six indices at birth. 1975. *Pediatr Res* 9(2): 70-6.

Stein, Z. and M. Susser. The Dutch famine, 1944-1945, and the reproductive process. II. Interrelations of caloric rations and six indices at birth. 1975. *Pediatr Res* 9(2): 76-83.

Sun, D., L. C. Samuelson, et al. Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. 2001. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9983-8.

- Sun, Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. 2009. *Cardiovasc Res* 81(3): 482-90.
- Tanaka, H., K. Nakazawa, et al. Caffeine and its dimethylxanthines and fetal cerebral development in rat. 1984. *Brain Dev* 6(4): 355-61.
- Tintu, A., E. Rouwet, et al. Hypoxia induces dilated cardiomyopathy in the chick embryo: mechanism, intervention, and long-term consequences. 2009. *PLoS One* 4(4): e5155.
- Tofovic, S. P., K. R. Branch, et al. Caffeine potentiates vasodilator-induced renin release. 1991. *J Pharmacol Exp Ther* 256(3): 850-60.
- Tofovic, S. P., H. Kusaka, et al. Caffeine increases renal renin secretion in a rat model of genetic heart failure. 1999. *J Cardiovasc Pharmacol* 33(3): 440-50.
- Torres, T. d. S. Fenofibrato (agonista do receptor ativador da proliferação peroxissomal) modula o sistema renina-angiotensina no coração de camundongos alimentados com dieta hiperlipídica. 2012. *Anatomia*. Rio de Janeiro, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Doutor: 95.
- Vallon, V., B. Muhlbauer, et al. Adenosine and kidney function. 2006. *Physiol Rev* 86(3): 901-40.
- Van Assche, F. A., K. Holemans, et al. Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy. 2001. *Br Med Bull* 60: 173-82.
- Verma, A. and S. D. Solomon. Diastolic dysfunction as a link between hypertension and heart failure. 2009. *Med Clin North Am* 93(3): 647-64.
- Vik, T., L. S. Bakkeiteig, et al. High caffeine consumption in the third trimester of pregnancy: gender-specific effects on fetal growth. 2003. *Paediatr Perinat Epidemiol* 17(4): 324-31.
- Wardas, J. Neuroprotective role of adenosine in the CNS. 2002. *Pol J Pharmacol* 54(4): 313-26.
- Weibel, E. R. *Stereological Methods. Practical methods for biological morphometry*. 1979. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, Academic Press.
- Wells, J. N. and J. R. Miller. Methylxanthine inhibitors of phosphodiesterases. 1988. *Methods Enzymol* 159: 489-96.
- Wendler, C. C., M. Busovsky-McNeal, et al. Embryonic caffeine exposure induces adverse effects in adulthood. 2009. *FASEB J* 23(4): 1272-8.
- Westerterp-Plantenga, M. S., M. P. Lejeune, et al. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. 2005. *Obes Res* 13(7): 1195-204.
- Wink, C. S., M. J. Rossowska, et al. Effects of caffeine on heart mitochondria in newborn rats. 1999. *Biol Neonate* 76(2): 114-9.

- Winkelmayr, W. C., M. J. Stampfer, et al. Habitual caffeine intake and the risk of hypertension in women. 2005. *JAMA* 294(18): 2330-5.
- Wollert, K. C. and H. Drexler. The renin-angiotensin system and experimental heart failure. 1999. *Cardiovasc Res* 43(4): 838-49.
- Woods, L. L. Fetal origins of adult hypertension: a renal mechanism? 2000. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9(4): 419-25.
- Woods, L. L. Maternal nutrition and predisposition to later kidney disease. 2007. *Curr Drug Targets* 8(8): 906-13.
- Woods, L. L., D. A. Weeks, et al. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. 2004. *Kidney Int* 65(4): 1339-48.
- Xiao, D., C. A. Ducasay, et al. Chronic hypoxia and developmental regulation of cytochrome c expression in rats. 2000. *J Soc Gynecol Investig* 7(5): 279-83.
- Xu, J., O. A. Carretero, et al. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. 2010. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299(5): H1328-38.
- Zhang, L. Prenatal hypoxia and cardiac programming. 2005. *J Soc Gynecol Investig* 12(1): 2-13.
- Zheng, G., K. Sayama, et al. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. 2004. *In Vivo* 18(1): 55-62.

APÊNDICE - Artigo *Maternal caffeine administration leads to adverse effects on adult mice offspring* submetido a *European Journal of Nutrition*

Maternal caffeine administration leads to adverse effects on adult mice offspring

Diana F Serapiao-Moraes;
Vanessa Souza-Mello;
Marcia B Aguila;
Carlos A Mandarin-de-Lacerda¹;
Tatiane S Faria

Laboratory of Morphometry, Metabolism and Cardiovascular Diseases, Biomedical Center, Institute of Biology,
State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Short title: Maternal caffeine affects renin-angiotensin system

¹ Corresponding author: Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doença Cardiovascular, Centro Biomédico, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Av 28 de Setembro, 87 (fds) - 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Phone: [+55.21] 2868-8316; Fax: 2868-8033; E-mail: mandarim@uerj.br, Website: WWW.lmmc.uerj.br

Abstract

Purpose: This study aimed to evaluate the role of caffeine chronic administration during gestation of C57BL/6 mice on cardiac remodeling and the expression of components of the renin-angiotensin system (RAS) in male offspring as adults. *Methods:* Pregnant C57BL/6 female mice were divided into two groups (n=10): Control group (C), dams were injected with the vehicle only (saline 0.9% NaCl). Caffeine group (CF), dams received daily a subcutaneous injection of 20 mg/kg of caffeine/day (1 mg/ml saline). Pups had free access to standard chow since weaning to three months of age, when were killed. *Results:* CF group showed increased energy expenditure (+7%; $P<0.05$) with consequent reduction in body mass (BM) gain (-18%; $P<0.0001$), increased blood pressure (+48%; $P<0.0001$) and higher heart rate (+10%; $P<0.01$) than C group. The ratio between LV mass/BM was greater (+10%; $P<0.01$), with bigger cardiomyocytes (+40%; $P<0.05$), and reduced vascularization (-25%; $P<0.05$) in CF group than in C group. In the LV, the expression of angiotensin-converting enzyme (+30%; $P<0.05$), Angiotensin II (AngII) (+60%; $P<0.01$), AngII receptor (ATR)-1 (+77%; $P<0.01$) were higher, and the expression of ATR-2 was lower (-46%; $P<0.05$) in CF group than in C group. In the kidney, the expressions of renin (+128%; $P<0.05$) and ATR-1 (+88%; $P<0.05$) were higher in CF group than in C group. *Conclusions:* chronic administration of caffeine by mothers led to persistent activation of local RAS in the kidney and heart of the offspring, which, in turn, leads to high BP and adverse cardiac remodeling. These findings highlight the urge to encourage pregnant women to avoid food or medicines containing caffeine.

Key words: caffeine; fetal programming; energy expenditure; cardiac hypertrophy; renin-angiotensin system; hypertension.

Introduction

Caffeine is a chemical compound naturally found in a wide variety of beverages and foods, apart from its use as analgesic adjuvant by pharmacological industry [1]. It is characterized as a methylxanthine, which is capable of stimulating central nervous system, making caffeine the most used psychoactive worldwide [2]. Thus, the high consumption of caffeine encompasses all groups of age, including pregnant women [3]. As a hydrophobic compound, caffeine is easily absorbed by biological membranes and during gestation is able to cross the placenta and reach the fetus [4]. The half-life of caffeine increases from 3-6 h to 10-20 h during gestation, once fetus is incapable of demethylating the caffeine [5]. Thus, a discreet intake of caffeine by the mother may have significant effects upon fetus. These observations give rise to the concept that the intake of caffeine during gestation represents a sort of fetal programming [6].

Literature is not conclusive regarding the pathways underlying fetal programming by maternal caffeine intake. Although the mechanisms remain to be described, caffeine can act directly on fetus by passing through placenta and blocking fetus' adenosine receptors, yielding increased levels of cyclic AMP by phosphodiesterases inhibition, which can interfere with cellular division [7]. Caffeine can also indirectly exert effects upon the mother causing insufficient blood flow to placenta, leading to fetal hypoxia, followed by intrauterine growth retardation or uterine vasoconstriction mediated by catecholamines [8].

Hypertension due to caffeine intake is not well defined. Acute intake of caffeine increases blood pressure (BP), norepinephrine levels, arterial stiffness and reduces endothelium dependent vasodilatation [9]. In addition, renin-angiotensin system (RAS) is critically involved in the control of BP. It is known that local RAS is able to operate independently from systemic RAS [10]. Local RAS in the heart is related to maintenance of appropriate cellular composition through induction and inhibition of cell growth and proliferation as well as mediation of adaptive responses to myocardial stress [11].

The present study aimed to evaluate effects of maternal chronic administration of caffeine on cardiac remodeling and expression of RAS components in the heart of adult offspring.

Materials and Methods

Animals

The study was performed in accordance with the guidelines of the "Care Use of Laboratory Animals" (US National Institutes of Health 85-23, revised 1996). The handling and experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil ("Ethics committee for the care and use of experimental animals", protocol number 029/2012).

Twenty virgin female together with ten male C57BL/6 mice were kept under standard conditions (12 h light/dark cycles, $21\pm 2^{\circ}\text{C}$, humidity $60\pm 10\%$) and had free access to water and standard rodent chow (produced by PragSolucoes, Jau, SP, Brazil, according to AIN-93G recommendations) [12].

Experimental design

a) *Dams*

The females were mated with males inbreeding (ratio of 1:1 male and female). The first day of gestation was considered the day that the vaginal plug was found positive. Then, pregnant females were transferred to individual cages and were randomly divided into two groups (n=10 each group): Control group (C) - mothers received daily subcutaneous saline 0.9% NaCl, and Caffeine group (CF) – mothers received daily 20 mg/kg of caffeine subcutaneously (Sigma ReagentPlus caffeine, 1mg/ml in saline, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). This dose corresponds to two cups of coffee in humans [5]. In both groups, the injections were made from the first day until the end of gestation.

b) *Offspring*

The litter size and weight of pups were recorded on the day of birth. In order to standardize the suckling, only six pups were kept per mother, the offspring from Control mothers were named as control (C), and the offspring from Caffeine mothers were named as caffeine (CF). After weaning, one male per litter was randomly taken to form the groups control and caffeine, based on their mothers. They were housed until adulthood (three months old) with unlimited access to food and water. Each mouse was labeled and weighed weekly during the experimental period (13 weeks). The food intake, determined as the difference between the amount of food supplied and the amount left in the grid, was measured daily.

Blood pressure

Systolic BP was recorded weekly in conscious mice since the seventh week of life until the end of the experiment (tail-cuff plethysmography, Leticia LE5100, Harvard/Panlab, Barcelona, Spain). The animals had a 2-week period of adaptation before the beginning of the official measurement of BP.

Indirect calorimetry

Oxygen (O₂) consumption and carbon dioxide (CO₂) production were measured using an open-circuit respirometry Oxylet system (System, Harvard/Panlab, Barcelona, Spain). The animals were placed individually during 26 h (the animals had a 2 h-period of adaptation, being considered for the analysis of the last 24 h) in an isolated polycarbonate cage. The system allows monitoring of oxygen consumption (O₂) and production of carbon dioxide (CO₂) sequentially for each cage, where the respiratory quotient (RQ) is given by the known equation: $RQ = VCO_2 / VO_2$ and energy expenditure (EE) by the Weir equation: $EE = 1.44 \times VO_2 \times (1.23 + 3.815 \times RQ)$, with the units in Kcal/day/kg^{0.75}. Calibration of O₂ and CO₂ analyzers were undertaken before and after each experiment and it was determined as low O₂= 20,17%, CO₂= 0,20% and high O₂= 48,42%, CO₂ 1,44%.

Euthanasia

The animals were fasted for 6 h, but had free access to water, and then were deeply anesthetized to euthanasia (intraperitoneal sodium pentobarbital, 150 mg/kg). The heart was removed and the left ventricle (LV) was separated from atria and the right ventricle and the LV mass (including the interventricular septum) was measured. Right kidney was also collected for further analyses.

A part of LV and right kidney were kept at -80°C for subsequent measurements of the expressions of renin (kidney), angiotensin-converting enzyme (ACE) (LV), angiotensin II (AngII) (LV), AngII receptor 1 (ATR-1) (LV and kidney), and AngII receptor 2 (ATR-2) (LV) by Western blot. The other part of LV was fixed in freshly prepared fixative for 48 h at room temperature (1.27 mol/L formaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2), embedded in Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), sectioned at 5 μm thick and stained with hematoxylin and eosin.

Left ventricle

Digital images were obtained with Olympus BX51 (TIFF, 36-bit, 1280×1024 pixels) for quantitative analysis. The cardiomyocyte (cmy) volume density ($V_v[\text{cmy}]$) was estimated by point counting as the ratio between the points hitting cmy and the total test-points in the system (P_T): $V_v[\text{structure}] = P_p[\text{structure}]/P_T$. Additionally, the volume densities of intramyocardial arteries and capillaries (vessels) and cardiac interstitium (int) were estimated. The counts were made with the help of the on-line system Stepanizer (www.stepanizer.com) with a test-system consisting of 36 test-points [13]. The amount of intramyocardial vascularization was estimated as the ratio between $V_v[\text{vessels}]/V_v[\text{cmy}]$. The mean cross-sectional area of cardiomyocytes was estimated as $V_v[\text{cmy}]/2 \cdot Q_A[\text{cmy}] \mu\text{m}^2$ (being $Q_A[\text{cmy}] = N[\text{cmy}]/A_T$, with N being the number of cmy profiles counted in the test-frame, A_T , do not hitting the “forbidden line”) [14, 15].

Western blot

LV and kidney were homogenized in lysis buffer (Sodium chloride 150 mM; NP-40 1.0%; Tris 50 mM, pH 8.0; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of protease inhibitor cocktail Sigma-Aldrich, MO, USA). The tissues homogenates were centrifuged twice at 3000×g for 20 min at 4°C , and the supernatants were used for western blotting analysis. Briefly, protein concentrations were determined using the BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific). Ten micrograms of protein extract was loaded onto a 10% polyacrylamide gel (Amersham Bio Science) and separated proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Hybond-P). The membranes were blocked for 1 h 30 min at room temperature with 5% nonfat dry milk in Tris-buffered saline (TBS) (Amersham Bio Science, Braunschweig, Germany) containing 0.05% Tween-20 (Bio Rad). Then, the membranes were incubated overnight at 4°C with anti-renin, anti-angiotensin-converting enzyme, anti-AngII, anti ATR-1 and anti ATR-2 (rabbit, polyclonal, Santa Cruz Biotechnology) at 1:1000 dilution. Anti-beta actin (mouse, monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) at 1:1000 dilution was used as a loading control. After incubation, the membranes were washed with TBS containing 0.05% Tween-20 and then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (at 1:5.000 for renin; at 1:10.000 for ACE, at 1:20.000 for AngII; 1:20.000 for ATR-1; at 1:10.000 for ATR-2; and 1:5000 dilution for beta-actin). Visualization was performed using the enhanced chemiluminescence (ECL) kit according to the manufacturer's protocol (GE Healthcare Bio-Sciences), followed by autoradiography using ECL detection reagents supplied by Amersham (Braunschweig, Germany). Bands were scanned in a computer and their relative intensities determined by densitometry using the Image J software.

Data analysis

The data are shown as mean and standard error of the mean (SEM). The differences between the groups were analyzed with the unpaired Student's *t*-test with Welch's correction as needed. A $P < 0.05$ was considered statistically significant (GraphPad Prism 5.03, GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Results

a) Dams

Food intake and body mass of the progenitors were not statistically different between groups, as well as the size of the litter (data not shown).

b) Offspring

Food intake (Table 1) and body mass (Fig. 1)

The food intake was smaller in CF group than in C group (-13%; $P < 0.05$). Thus, CF group showed reduction in the BM evolution since the sixth week onward in comparison to C group (Fig. 1; $P < 0.05$) with significant reduction in BM gain in comparison to C group (-18%; Table 1; $P < 0.0001$).

Energy expenditure (Table 2)

At 11th week of age, CF group showed greater oxygen consumption (VO₂) (+7%; $P < 0.05$), and energy expenditure (EE) (+7%; $P < 0.05$) than C group. Although the CO₂ production and respiratory quotient were increased, no significant difference was found between the groups.

BP and heart rate

The BP evolution is shown in Fig. 2 and the heart rate in Table 1. The CF group had higher systolic BP values in the last four weeks of experiment (+48%; $P < 0.0001$) and higher heart rate (+10%; $P < 0.01$) than C group.

Left ventricle

a) Structural analysis

The ratio between LV mass/BM was significantly greater in CF offspring than in C offspring (+10%; $P < 0.01$) (Table 1). Moreover, the cardiomyocytes were bigger, and vascularization was fewer in CF group than in C group as showed in Fig. 3. The CF group had greater A[cm²] (+40%; $P < 0.05$) with smaller ratio between vessels/cm² (-25%; $P < 0.05$) than C group (Fig. 4).

b) Protein expressions

The expressions of ACE, and AngII are shown in Fig. 5. The expressions of ATR-1 and ATR-2 are shown in Fig. 6. As illustrated, CF offspring had higher expression of ACE (+30%; $P < 0.05$), Ang II (+60%; $P < 0.01$), and ATR-1 (+77%; $P < 0.01$), with lower expression of ATR-2 (-46%; $P < 0.05$) than C offspring.

Kidney

a) Protein expressions

The expression of renin and ATR-1 proteins in the kidney are shown in Fig. 7. The expressions of renin (+128%; $P < 0.05$) and ATR-1 (+88%; $P < 0.05$) were significantly higher in CF offspring than in C offspring.

Discussion

In the present study, we were concerned with the problem of maternal caffeine administration and the consequences to the offspring. As demonstrated, the administration of caffeine to mothers during gestation has effect upon the adult offspring, compromising BM, basal metabolic rate, BP and cardiac remodeling. In addition, an important modification in the protein expression of RAS components was observed in both heart and kidney.

Data are controversial regarding the low birth weight and maternal caffeine consumption [3, 16]. The present findings did not show differences in BM at birth and during lactation, possibly because of the augmentation of suckling performance [17].

The time of intrauterine exposure to caffeine seems to be fundamental to determine the responses presented in adult life. A single dose of caffeine during gestation results in higher BM in adult offspring [6], while a chronic dose of caffeine during gestation may result in reduced BM in adult offspring [18]. Although we have not observed significant difference of BM between the offspring at weaning, animals from caffeine group showed reduction of both food intake and BM since the 6th week of life. Caffeine has anorectic effects by inducing satiety via modulation of serum leptin levels [19]. This may suggest that chronic intrauterine exposure to caffeine can program fetus to display increased satiety.

The reduced BM can be attributed to augmented energy expenditure [19, 20]. In the present study, in order to confirm this hypothesis, basal metabolism was verified in experimental groups by indirect calorimetry. Patterns of cardiac index, supply and consumption of O₂ were used to characterize increase of metabolic needs of an individual [21]. Present data showed that mice from caffeine group had significant increase of VO₂ and energy expenditure. However, it has been described that intrauterine exposure to psychoactive drug, such as caffeine, yields neuronal imprinting, by which the drug compromises the fetus becoming apparent in adult life [22]. In addition, chronic administration of caffeine during gestation resulted in down regulation of inhibitory G protein (Gi) in fetal brain [23]. We hypothesize that stimulatory cerebral pathway (via Gs protein) might be in advantage, mainly if we consider that caffeine mice showed high cardiac frequency at rest. Elevation of cardiac frequency at rest is considered a reflex of sympathetic activation [24]. Thus, present data suggests a typical situation of increased metabolic rate in mice from caffeine group.

Maternal administration of caffeine leads to cardiac adverse remodeling in the offspring. The greater LV mass/BM observed in CF offspring is probably linked to an adaptive response to elevated BP values observed in these animals. The adaptive cardiac hypertrophy facing chronic increased load might lead to diastolic dysfunction and, afterwards, systolic dysfunction [25]. Moreover, this hypertrophy is accompanied by high oxidative stress and production of reactive oxygen species [26] that are also adverse effects.

Systemic arterial hypertension yields cardiac remodeling, which is mediated at molecular level by RAS, transformation growth factor (TGF)-beta and beta-adrenergic system [27]. Literature lacks information regarding the impact of maternal caffeine administration upon cardiac structure in adult offspring. Therefore, we put forward that molecular alterations of RAS components may be responsible for such impairments. Persistent activation of RAS components was observed in the heart and kidney of adult offspring from mothers having taken caffeine during gestation and lactation.

Caffeine acts as an antagonist competitor to adenosine receptors [28], leading to increased calcium channels release and inhibition of phosphodiesterase enzyme, which hydrolyses c-AMP, resulting in increased intracellular c-AMP levels [29, 30]. Stimulatory effects are also observed in the kidney and central nervous system [30, 31]. Rodents stimulated with caffeine had increased plasma renin [32]. Despite the difference among models, present study has shown that caffeine affects secretion of renin. Thus, greater release of renin by caffeine can be critical because apart from the blockade of adenosine receptor, caffeine also activates sympathetic-adrenal axis [33] and inhibits phosphodiesterases, increasing c-AMP levels [32, 34]. These effects upon fetus are facilitated once the placental barrier is ineffective against caffeine [4] and, therefore, caffeine administered to mother is absorbed by fetus without previous metabolism. As a consequence, elevated expression of renin might be accounted for intrauterine programming by caffeine exposure.

A further hypothesis to justify RAS activation in offspring from maternal caffeine consumption is that the chronic use of caffeine during gestation might trigger reduced cardiac function in the fetus [35, 36], leading to hypotension and high levels of systemic renin during intrauterine life [37]. Considering that altered cardiac frequency can have direct consequences upon embryological and fetal development [38], this overstimulation of intrauterine renin might have programmed the fetus to maintain high levels of this peptide in the extra uterine life.

The high expression of cardiac AngII could be explained by the increased elevation in the expression of renal renin, confirming findings in adult humans [39]. Additionally, caffeine led to an increase in the expression of ACE in the heart, which corroborates present findings of increased renin and AngII expressions. AngII in the adult mice offspring, we would hypothesize that caffeine is able to modulate the expression of both enzymes regulating the AngII in the heart of the animals in the caffeine group.

Apart from its effects on BP, AngII, through its interaction with ATR-1, contributes to LV remodeling, vascular mechanical property and endothelial dysfunction development [40]. Studies *in vitro* [41] and *in vivo* [42] demonstrated that AngII regulates negatively the expression of ATR-1 in aortic smooth muscle cells. The present study describes for the first time the expression of ATR-1 in the heart of offspring from mothers that consumed caffeine throughout gestation. The increased expression of ATR-1 was observed concomitant with decreased expression of ATR-2 in the heart of adult offspring from caffeine group. These data suggest that the expression of both receptors is regulated by the AngII, being ATR-1 up regulated and ATR-2 down regulated by AngII. However, the precise pathways underlying this observation remain to be elucidated.

Although the persistent elevated BP levels, even in the presence of high renin levels, present findings have demonstrated high expression of ATR-1 in the kidney of CF offspring. Under normal conditions, there is a negative feedback in the short loop aiming at inhibition of renin by AngII, which would induce macula dense cells to inhibit renin secretion by its regulation through renal ATR-1[43]. Present findings have demonstrated increased expression of renal ATR-1 in CF mice, suggesting a positive regulation by AngII. It can be

hypothesized that inhibitory action of AngII was not sufficient to reduce renin expression, given the different regulatory mechanisms involved in this action. Moreover, AngII is effective in reducing baroreceptors sensitivity, reducing the efficacy in the control of BP variation [44]. Consequently, baroreceptors could fail to perceive the high BP levels, failing to promote the equilibrium of the system.

The direct action of caffeine could be responsible for the persistent activation of RAS in the adult mice offspring from mothers receiving caffeine during all gestation and lactation periods. This research provided a general idea on the use of caffeine during pregnancy, while further studies are now required to identify the mechanisms involved in the persistent activation of RAS.

In conclusion, the chronic administration of caffeine by mothers apparently alters the expression of the RAS components, leading to persistent activation of local RAS in the kidney and heart, which, in turn, leads to high BP and adverse cardiac remodeling. The fact that pups have been weaned onto a balanced standard chow guarantees that alterations found here should be attributed to maternal caffeine administration, reinforcing the impact of the results. These findings highlight the urge to encourage pregnant women to avoid food or medicines containing caffeine.

Acknowledgments

The authors are grateful to Aline Penna and Thatiany Marinho for their technical assistance. This study was supported by the Brazilian agencies FAPERJ (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, www.faperj.br) grant number (E-26/111.456/2011); and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, www.cnpq.br) grant number (151781/2008 7); and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior).

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Sawynok J (2011) Methylxanthines and pain. *Handb Exp Pharmacol* 200:311-329
2. Heckman MA, Weil J, Gonzalez de Mejia E (2010) Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in foods: a comprehensive review on consumption, functionality, safety, and regulatory matters. *J Food Sci* 75:R77-87
3. Greenwood DC, Alwan N, Boylan S, Cade JE, Charvill J, Chipps KC, Cooke MS, Dolby VA, Hay AW, Kassam S, Kirk SF, Konje JC, Potdar N, Shires S, Simpson N, Taub N, Thomas JD, Walker J, White KL, Wild CP (2010) Caffeine intake during pregnancy, late miscarriage and stillbirth. *Eur J Epidemiol* 25:275-280
4. Kirkinen P, Jouppila P, Koivula A, Vuori J, Puukka M (1983) The effect of caffeine on placental and fetal blood flow in human pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 147:939-942

5. Fredholm BB (1995) Astra Award Lecture. Adenosine, adenosine receptors and the actions of caffeine. *Pharmacol Toxicol* 76:93-101
6. Wendler CC, Busovsky-McNeal M, Ghatpande S, Kalinowski A, Russell KS, Rivkees SA (2009) Embryonic caffeine exposure induces adverse effects in adulthood. *FASEB J* 23:1272-1278
7. Soyka LF (1979) Effects of methylxanthines on the fetus. *Clin Perinatol* 6:37-51
8. Liu YA, Ostlund E, Fried G (1995) Endothelin-induced contractions in human placental blood vessels are enhanced in intrauterine growth retardation, and modulated by agents that regulate levels of intracellular calcium. *Acta Physiol Scand* 155:405-414
9. Riksen NP, Smits P, Rongen GA (2011) The cardiovascular effects of methylxanthines. *Handb Exp Pharmacol*:413-437
10. Danser AH (2003) Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol* 35:759-768
11. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006) Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 86:747-803
12. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. (1993) 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* 123:1939-1951
13. Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER (2011) A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 243:47-59
14. Gundersen HJG (1977) Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary profiles: the edge effect. *J Microsc* 111:219-227
15. Mandarim-de-Lacerda CA (2003) Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 75:469-486
16. Jarosz M, Wierzejska R, Siuba M (2012) Maternal caffeine intake and its effect on pregnancy outcomes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 160:156-160
17. Sheffield LG (1991) Caffeine administered during pregnancy augments subsequent lactation in mice. *J Anim Sci* 69:1128-1132
18. Soellner DE, Grandys T, Nunez JL (2009) Chronic prenatal caffeine exposure impairs novel object recognition and radial arm maze behaviors in adult rats. *Behav Brain Res* 205:191-199
19. Sherman H, Gutman R, Chapnik N, Meylan J, le Coutre J, Froy O (2011) Caffeine alters circadian rhythms and expression of disease and metabolic markers. *Int J Biochem Cell Biol* 43:829-838
20. Hussein GM, Matsuda H, Nakamura S, Hamao M, Akiyama T, Tamura K, Yoshikawa M (2011) Mate tea (*Ilex paraguariensis*) promotes satiety and body weight lowering in mice: involvement of glucagon-like peptide-1. *Biol Pharm Bull* 34:1849-1855
21. Shoemaker WC, Appel PL, Kram HB (1991) Oxygen transport measurements to evaluate tissue perfusion and titrate therapy: dobutamine and dopamine effects. *Crit Care Med* 19:672-688
22. Andersen SL (2005) Stimulants and the developing brain. *Trends Pharmacol Sci* 26:237-243
23. Leon D, Albasanz JL, Ruiz MA, Martin M (2005) Chronic caffeine or theophylline intake during pregnancy inhibits A1 receptor function in the rat brain. *Neuroscience* 131:481-489

24. Arena R, Myers J, Abella J, Peberdy MA, Bensimhon D, Chase P, Guazzi M (2010) The prognostic value of the heart rate response during exercise and recovery in patients with heart failure: influence of beta-blockade. *Int J Cardiol* 138:166-173
25. Verma A, Solomon SD (2009) Diastolic dysfunction as a link between hypertension and heart failure. *Med Clin North Am* 93:647-664
26. Pereira LM, Bezerra DG, Machado DL, Mandarim-de-Lacerda CA (2004) Enalapril attenuates cardiorenal damage in nitric-oxide-deficient spontaneously hypertensive rats. *Clin Sci (Lond)* 106:337-343
27. Kupfahl C, Pink D, Friedrich K, Zurbrugg HR, Neuss M, Warnecke C, Fielitz J, Graf K, Fleck E, Regitz-Zagrosek V (2000) Angiotensin II directly increases transforming growth factor beta1 and osteopontin and indirectly affects collagen mRNA expression in the human heart. *Cardiovasc Res* 46:463-475
28. Osswald H, Schnermann J (2011) Methylxanthines and the kidney. *Handb Exp Pharmacol*:391-412
29. Butcher RW, Sutherland EW (1962) Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. *J Biol Chem* 237:1244-1250
30. Bolignano D, Coppolino G, Barilla A, Campo S, Criseo M, Tripodo D, Buemi M (2007) Caffeine and the kidney: what evidence right now? *J Ren Nutr* 17:225-234
31. Brown R, Ollerstam A, Johansson B, Skott O, Gebre-Medhin S, Fredholm B, Persson AE (2001) Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281:R1362-1367
32. Tofovic SP, Branch KR, Oliver RD, Magee WD, Jackson EK (1991) Caffeine potentiates vasodilator-induced renin release. *J Pharmacol Exp Ther* 256:850-860
33. Robertson D, Frolich JC, Carr RK, Watson JT, Hollifield JW, Shand DG, Oates JA (1978) Effects of caffeine on plasma renin activity, catecholamines and blood pressure. *N Engl J Med* 298:181-186
34. Wells JN, Miller JR (1988) Methylxanthine inhibitors of phosphodiesterases. *Methods Enzymol* 159:489-496
35. Buscariollo DL, Breuer GA, Wendler CC, Rivkees SA (2011) Caffeine acts via A1 adenosine receptors to disrupt embryonic cardiac function. *PLoS One* 6:e28296
36. Momoi N, Tinney JP, Liu LJ, Elshershari H, Hoffmann PJ, Ralphe JC, Keller BB, Tobita K (2008) Modest maternal caffeine exposure affects developing embryonic cardiovascular function and growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2248-2256
37. Lumbers ER, Stevens AD (1987) The effects of frusemide, saralasin and hypotension on fetal plasma renin activity and on fetal renal function. *J Physiol* 393:479-490
38. Severi FM, Rizzo G, Bocchi C, D'Antona D, Verzuri MS, Arduini D (2000) Intrauterine growth retardation and fetal cardiac function. *Fetal Diagn Ther* 15:8-19
39. Muller DN, Luft FC (2006) Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:221-228
40. Flynn JT, Tullus K (2009) Severe hypertension in children and adolescents: pathophysiology and treatment. *Pediatr Nephrol* 24:1101-1112

41. 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
42. Torres ST, Silva GD, Aguila MB, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA (2008) Effects of rosiglitazone (a peroxysome proliferator-activated receptor gamma agonist) on the blood pressure and aortic structure in metabolically programmed (perinatal low protein) rats. *Hypertens Res* 31:965-975
43. Castrop H, Hocherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C (2010) Physiology of kidney renin. *Physiol Rev* 90:607-673
44. Oparil S, Chen YF, Meng QC, Yang RH, Jin HK, Wyss JM (1988) The neural basis of salt sensitivity in the rat: altered hypothalamic function. *Am J Med Sci* 295:360-369

Figure legends

Figure 1. Body mass evolution in both groups of mice (mean and SEM, n=10): control, C, and caffeine, CF.

Arrow indicates the extension in weeks the difference between the groups was significant.

Figure 2. Systolic blood pressure measured in both groups of mice (mean and SEM, n=10): control, C, and

caffeine, CF. Arrow indicates the extension in weeks the difference between the groups was significant.

Figure 3. Photomicrographs at the same magnification showing the myocardium of the left ventricle wall in

adult offspring in both groups of mice: (a) control, C, and (b) caffeine, CF. A representative cardiomyocyte was outlined in each group to compare its differences in size. Arrows show intramyocardial arteries/capillaries. Hematoxylin and eosin stain.

Figure 4. Sectional area of cardiomyocytes, and the ratio between intramyocardial arteries and cardiomyocyte

ratio in both groups of mice (mean and SEM, n=5): control, C, and caffeine, CF.

Figure 5. Western blotting for ACE and AngII in the left ventricle in both groups of mice (mean and SEM, n=5):

control, C, and caffeine, CF; 10 µg of total protein was loaded in each lane. Anti-β-actin was used as a loading control.

Figure 6. Western blotting for ATR-1 and ATR-2 in the left ventricle in both groups of mice (mean and SEM,

n=5): control, C, and caffeine, CF; 10 µg of total protein was loaded in each lane. Anti-β-actin was used as a loading control.

Figure 7. Western blotting for Renin and ATR-1 in the kidney in both groups of mice (mean and SEM, n=5):

control, C, and caffeine, CF; 10 µg of total protein was loaded in each lane. Anti-β-actin was used as a loading control.

Table 1: Biometry and hemodynamic parameters of animals in the control and caffeine groups.

Data	C	CF
Food intake (g)	4.36 ± 0.14	3.79 ± 0.05*
Final body mass (g)	26.97 ± 0.12	22.38 ± 0.42*
Body mass gain (g)	25.73 ± 0.14	21.08 ± 0.41*
LV mass (mg)	82.10 ± 1.90	73.50 ± 1.74*
LV mass/Body mass (mg/g)	3.04 ± 0.08	3.35 ± 0.08*
Heart rate (BPM)	595 ± 12	654 ± 10*

Values are means ± S.E.M., n= 5 per group. Symbol represent a significant difference ($P<0.05$) compared with the control group, as determined using a Student t test. Abbreviations: BPM= blood pressure; C= control group; CF= caffeine group.

Table 2: Indirect calorimetry control and caffeine offspring.

Data	C	CF
VO₂ (ml/min)	27.99 ± 0.38	29.92 ± 0.71*
VCO₂ (ml/min)	17.26 ± 0.39	18.33 ± 0.57
RQ (ml/min)	0.61 ± 0.01	0.61 ± 0.01
EE (Kcal/day)	184.40 ± 2.79	197.00 ± 4.70*

Values are means ± S.E.M., n= 5 per group. Symbol represent a significant difference (P<0.05) compared with the control group, as determined using a Student t test. Abbreviations: C= control group; CF= caffeine group; EE= energy expenditure; Kcal= kilocalorie; ml= milliliter; RQ= respiratory quotient; VCO₂= carbon dioxide production; VO₂= oxygen consumption.

Figure 1

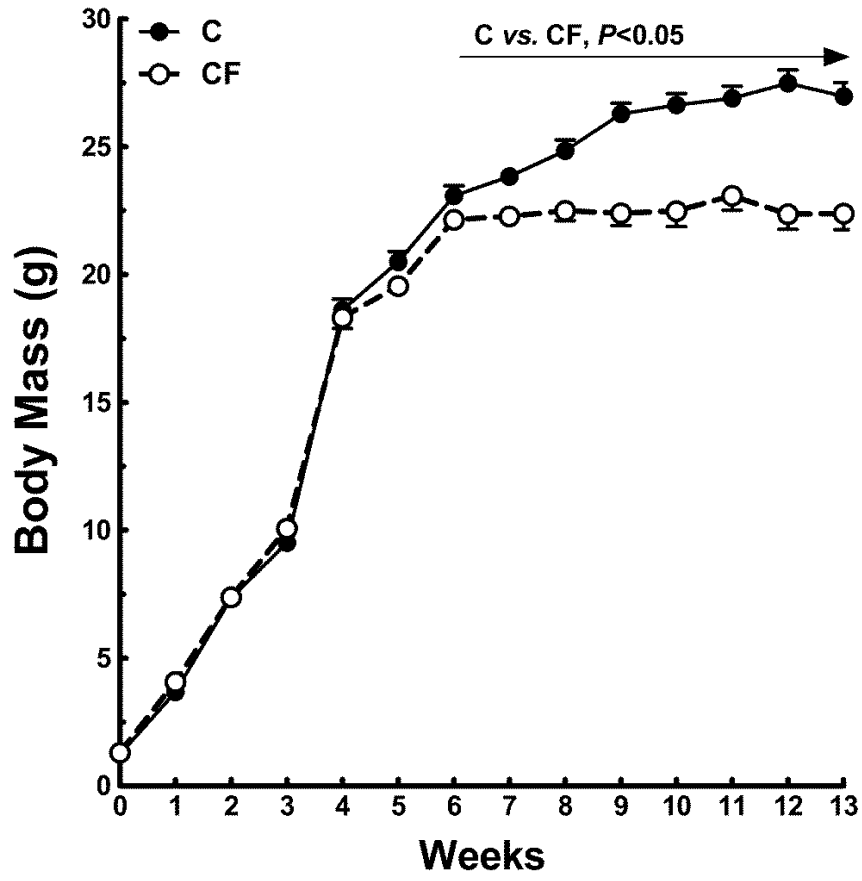


Figure 2

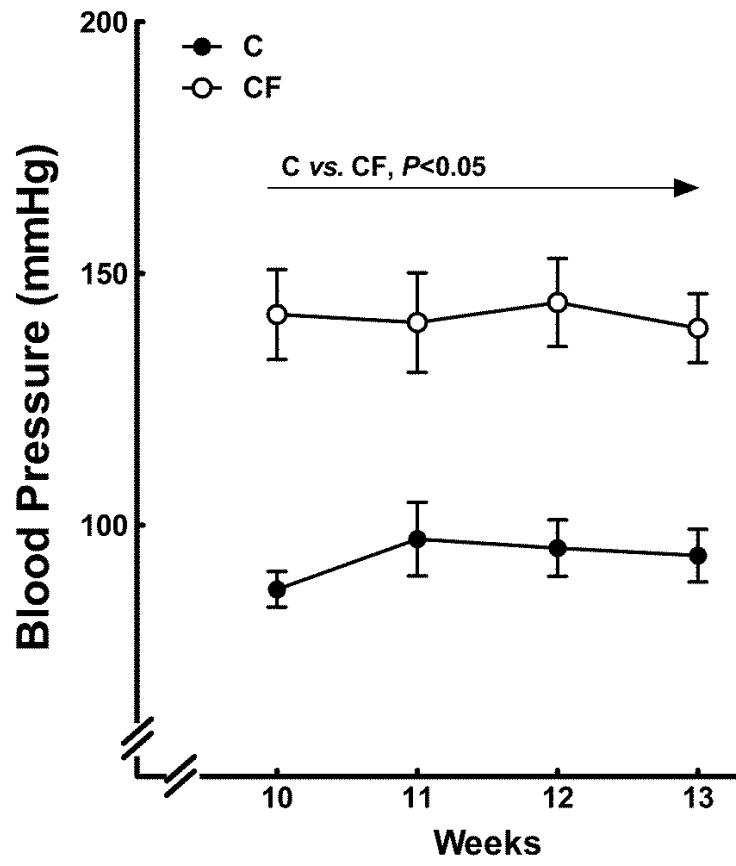


Figure 3

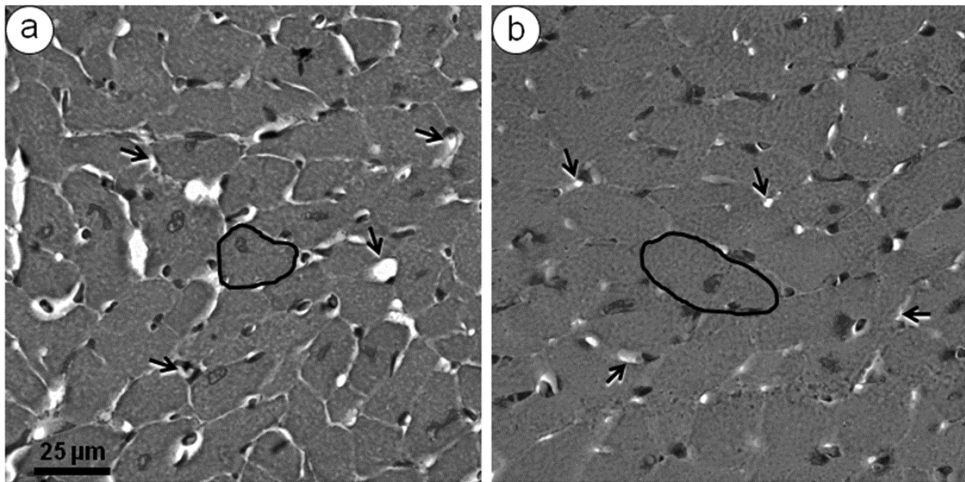


Figure 4

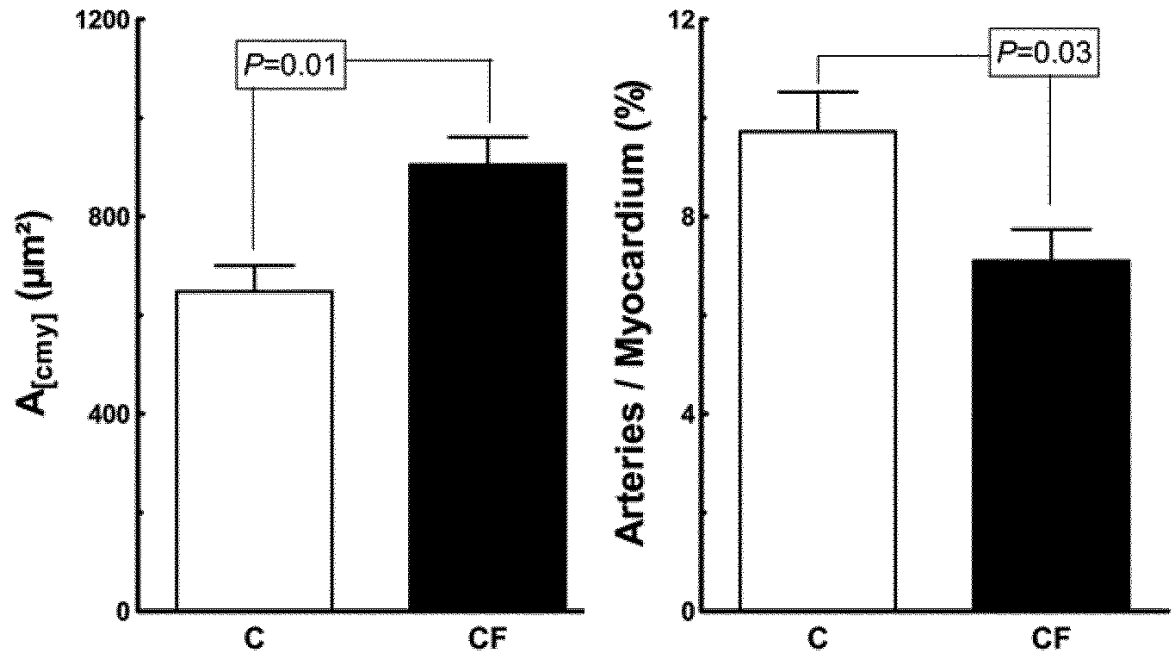


Figure 5

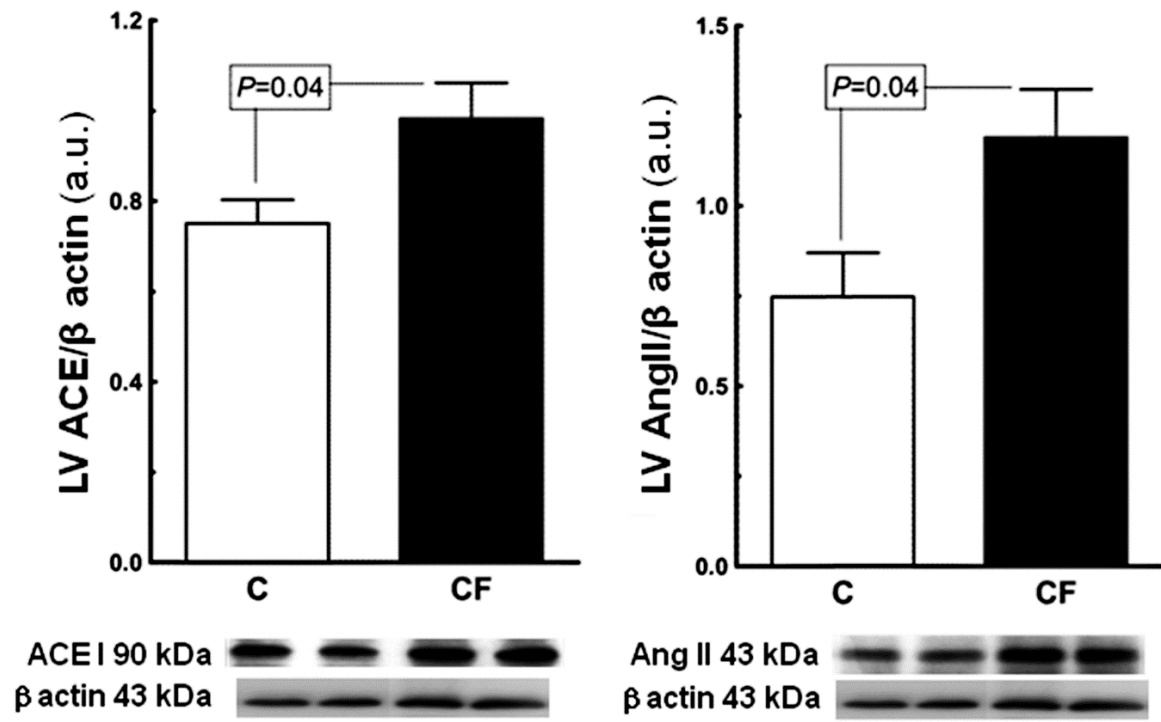


Figure 6

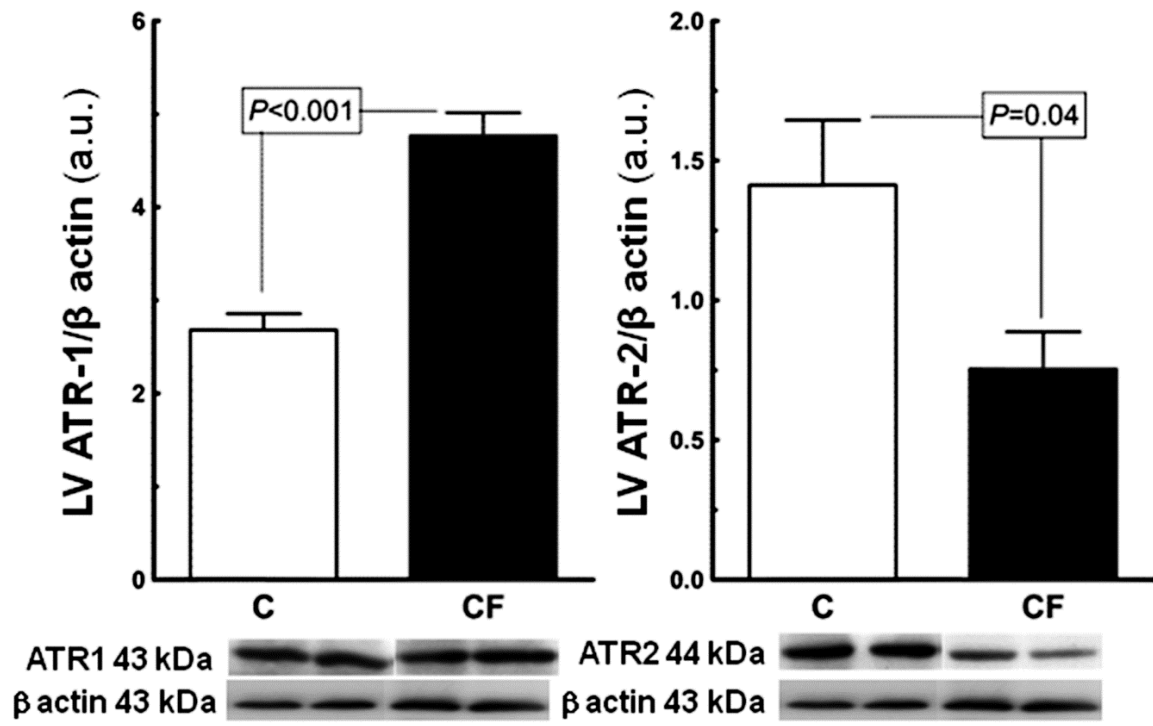
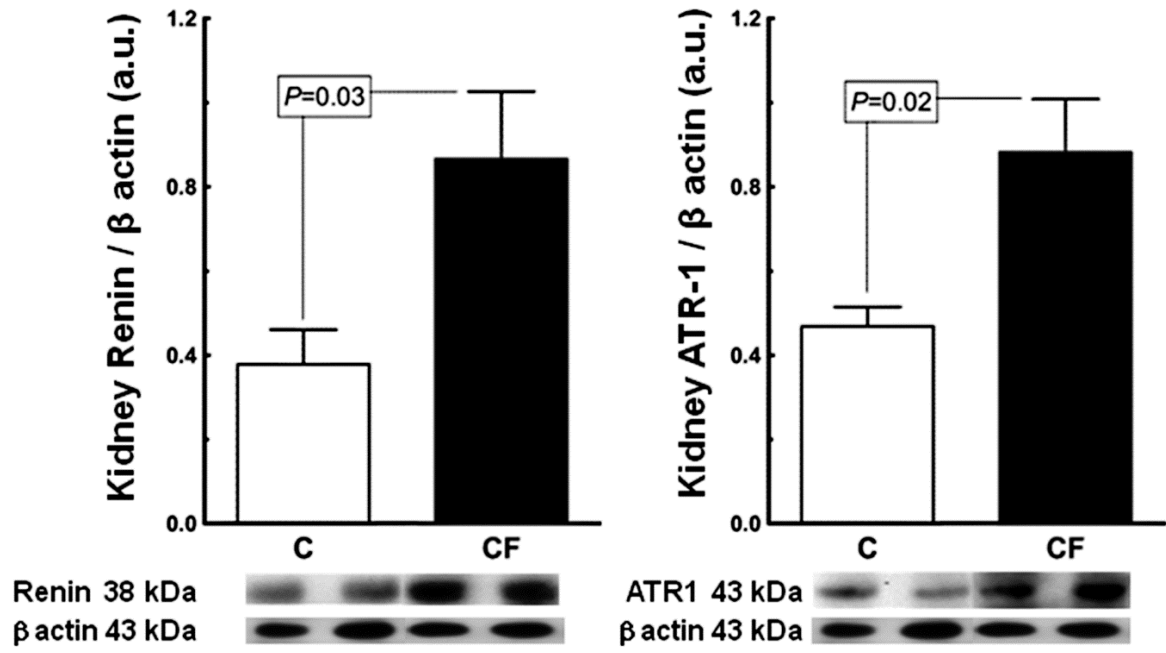


Figure 7



ANEXO - Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/029/2012** sobre “**Dose crônica de cafeína durante a gestação e alterações no sistema renina angiotensina da prole adulta**”, sob a responsabilidade de **Márcia Barbosa Águila**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **24/04/2012**. Este certificado expira em **24/04/2016**.

Rio de Janeiro, 24 de Abril de 2012.



Prof. Patrícia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ



Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Prof. Patrícia Cristina Lisboa da Silva
Sub-Chefe do Deptº de Ciências Fisiológicas
IBRAG/UERJ - Mat. 34765-8

/ ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br