

MARIA DO CARMO PINHO FRANCO

**EFEITO DA DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA NA FUNÇÃO
MODULADORA DO ENDOTÉLIO SOBRE A REATIVIDADE
VASCULAR: A IMPORTÂNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO, DO RADICAL
SUPERÓXIDO E DA ANGIOTENSINA II.**

**Tese apresentada para obtenção do Título de
Doutora em Ciências pelo Departamento de
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo.**

Orientadora: Dra. Dorothy Nigro

São Paulo

2004

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

T-ICB
BMF
QV4
F825e
2004

Franco, Maria do Carmo Pinho.

Efeito da desnutrição intra-uterina na função moduladora do endotélio sobre a reatividade vascular: a importância do óxido nítrico, do radical superóxido e da angiotensina II / Maria do Carmo Pinho Franco. -- São Paulo, 2004.

Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Linha de pesquisa: Hipertensão e desnutrição intra-uterina.

Orientador: Nigro, Dorothy.

Versão do título para o inglês: Programming the endothelium dysfunction in utero: role of superoxide anion, nitric oxide and angiotensin II..

Descritores: 1. Desnutrição intra-uterina 2. Hipertensão 3. Disfunção endotelial 4. Óxido nítrico 5. Ânion superóxido 6. Angiotensina II

ICB/SBIB090/2004

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maria do Carmo Pinho Franco.


Tese: Efeito da desnutrição intra-uterina na função moduladora do endotélio sobre a reatividade vascular: A importância do óxido nítrico, do radical superóxido e da angiotensina II.

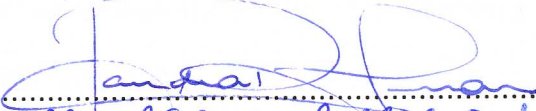
Orientador: Dorothy Nigro.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 18/08/04, considerou

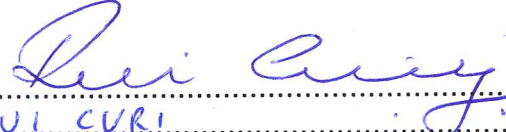
Aprovado(a)


Reprovado(a)

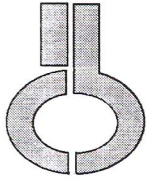
Examinador(a) Assinatura 
Nome FRIDA ZALADEK GIL
Instituição UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Examinador(a) Assinatura 
Nome SANDRA REGINA RODRIGUES LUCAS
Instituição UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

Examinador(a) Assinatura 
Nome JOEL CLAUDIO HEIMANN
Instituição FACULDADE DE MEDICINA - USP

Examinador(a) Assinatura 
Nome RUI CURÍ
Instituição INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - USP

Presidente Assinatura 
Nome DOROTHY NIGRO
Instituição INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS - USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**


Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3813-0900 – telefax : (55) (011) 3818-7438
e-mail: icbsedir@icb.usp.br

CERTIFICADO

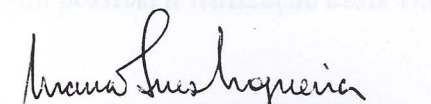
Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 092/2001, sobre o projeto intitulado "*Hipertensão induzida pela desnutrição intra-uterina: o papel do endotélio*", sob a responsabilidade de Dorothy Nigro, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de 13/08/2001.

(We certify that the protocol nº 092/2001 about "*Intrauterine undernutrition- induce hypertension: Role of endothelium*" agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 13/08/2001 meeting.)

São Paulo, 13 de agosto de 2001.



Prof. Dra. Estela Maris A. F. Bevilacqua
Coordenadora da CEEA



Prof. Dra. Maria Inês Nogueira
Secretária da CEEA

AGRADECIMENTOS

Às Dras. Maria Helena C e Rita C.A.Tostes pelo apoio constante e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

Aos Drs. Cristóforo Scavone, Luís Roberto G de Britto e Marcelo N Muscará pela grande amizade e atenção dispensada que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

À Dra. Dulce Elena Casarini (Laboratorio de Rins e Hormônios – UNIFESP – EPM) pela amizade e a valiosa contribuição para elaboração deste trabalho.

Aos amigos do Laboratorio de Rins e Hormônios (UNIFESP – EPM): Giovana, Fabi, Dani, Fernanda, Luciana e Claudina pelos momentos descontraídos e ajuda técnico-científica que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Hipertensão: Manecas, Ritinha, Doralice, Martinha e Bá pela grande amizade durante todos esses anos, por me ajudarem sempre que precisei e por tornar tudo mais alegre.

Às secretárias do Departamento de Farmacologia: Julieta e Selminha pela grande amizade, pelas memoráveis manhãs e também pela ajuda com os assuntos burocráticos.

Aos grandes amigos (INESQUECÍVEIS!!!): Luis (Dindo), Paulinha, Nê, Eli, Cidora, Michele, Robbys, Dani, Tyeko, Grazelela, Stephen, Ana Lúcia, Juliano, Viviane, Maristela, Liliam, Guto, Soraya, Débora, Álvaro e Marcio pela enorme amizade e pelos ótimos momentos de descontração e alegria.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudo.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

CONTEÚDO

Lista das Abreviaturas

Resumo

1.0. INTRODUÇÃO

- | | |
|--|----|
| 1.1. Hipertensão Arterial e o Endotélio | 01 |
| 1.2. Influência da Desnutrição Intra-Uterina na Hipertensão Arterial | 03 |

2.0. OBJETIVOS 12

3.0. MATERIAIS E MÉTODOS

- | | |
|---|----|
| 3.1. Animais | 13 |
| 3.2. Grupos Experimentais | 14 |
| 3.3. Acasalamento e Prenhez | 14 |
| 3.4. Indução da Desnutrição Intra-Uterina | 15 |
| 3.5. Peso Materno na Gestação | 16 |
| 3.6. Peso dos Recém-Nascidos | 16 |
| 3.7. Medida Indireta da Pressão Arterial | 16 |
| 3.8. Indução do Estro | 17 |

3.9. Peso Renal	18
3.10. Técnica Histológica	18
3.11. Determinação do Número de Néfrons	19
3.12. Reatividade Vascular <i>in vitro</i> – Aorta Torácica Isolada	19
3.12.1. Curvas Concentração-Efeito	20
3.13. Drogas e Soluções	21
3.14. Avaliação da Alteração de Sensibilidade	22
3.15. Avaliação da Alteração de Resposta Máxima	22
3.16. Análise Estatística	22

4.0. RESULTADOS

4.1. Peso Materno na Gestação	23
4.2. Peso dos Recém-Nascidos	27
4.3. Medida Indireta da Pressão Arterial	29
4.4. Estudo da Reatividade Vascular em Aorta Torácica Isolada de Animais SHR	33
4.4.1. Curva Concentração-Efeito (CCE) ao Agente Vasodilatador Dependente de Endotélio Acetilcolina (ACh)	33
4.4.2. Curva Concentração-Efeito (CCE) ao Agente Vasodilatador Independente de Endotélio Nitroprussiato De Sódio (NPS)	38
4.4.3. Curva Concentração-Efeito (CCE) ao Agente Vasoconstritor Noradrenalina (NA)	42

4.5. Estudo da Reatividade Vascular em Aorta Torácica	
Isolada de Animais Wistar	47
4.5.1. Curva Concentração-Efeito (CCE) ao Agente Vasodilatador Dependente de Endotélio Acetilcolina (ACh)	47
4.5.2. Curva Concentração-Efeito (CCE) ao Agente Vasodilatador Independente de Endotélio Nitroprussiato De Sódio (NPS)	51
4.5.3. Curva Concentração-Efeito (CCE) ao Agente Vasoconstritor Noradrenalina (NA)	55
4.6. Análise do Peso Renal	60
4.7. Determinação do Número de Néfrons	63
5.0. DISCUSSÃO	71
6.0. CONCLUSÕES	82
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ABSTRACT

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 HIPERTENSÃO ARTERIAL E O ENDOTÉLIO

A hipertensão arterial é uma doença de origem multifatorial e assume maior importância clínica devido a elevada incidência (20% da população mundial é hipertensa) e ao risco cardiovascular que representa. A hipertensão arterial pode ser considerada a principal responsável por doenças coronarianas, cerebrais e vasculares renais, sendo a principal causa de morte entre adultos (PICKERING, 1995).

Esta doença se caracteriza, na sua fase crônica, por débito cardíaco normal e resistência periférica total aumentada. Admite-se que o aumento da resistência periférica total possa ser causada por aumento da contração propriamente dita ou por diminuição do relaxamento, por modificações estruturais na vasculatura ou por ambos. Nestas situações, o endotélio vascular tem participação importante.

A célula endotelial representa mais do que uma simples barreira de difusão entre substâncias do sangue para os tecidos, ela se constitui em verdadeiro órgão endócrino liberando substâncias vasoativas. A descoberta da participação do endotélio na modulação do tono vascular foi feita em aorta por FURCHGOTT & ZAWADZKI (1980) que demonstraram que o relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) era totalmente dependente da presença e integridade da célula endotelial e que esta agia estimulando a síntese de um fator vasodilatador o qual foi

denominado: fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) do inglês, “Endothelium-Derived Relaxing Factor” (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Posteriormente, foi demonstrado que este fator é o óxido nítrico (NO) (PALMER et al., 1987) e que era liberado pela ACh após interação com receptores muscarínicos M_3 da célula endotelial (BRUNING et al., 1994). O NO é sintetizado na célula endotelial a partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima NO sintase endotelial (MONCADA et al., 1991), difunde-se para o músculo liso vascular onde exerce efeito vasodilatador. É liberado em condições basais, após estimulação por agentes químicos e por forças mecânicas como a força de cisalhamento (“shear stress”) e o fluxo sanguíneo.

Outras substâncias vasodilatadoras foram descritas como dependentes do endotélio: ionóforo de cálcio, ADP, ATP, bradicinina, trombina e alguns metabólitos do ácido araquidônico (FURCHGOTT, 1983).

Além do NO, o endotélio produz outro fator relaxante denominado fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF), do inglês “Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor” (FÉLÉTOU & VANHOUTTE, 1988), o qual é liberado pela ligação da ACh aos receptores muscarínicos do tipo M_1 na célula endotelial (TAYLOR et al., 1988). O EDHF causa relaxamento vascular via hiperpolarização da membrana do músculo liso vascular, através da abertura de canais de K^+ . Contrariamente ao EDRF, o EDHF não é liberado em condições basais, mas por estímulos como os induzidos pela acetilcolina, bradicinina, nucleotídeos de adenosina, histamina, trombina e substância P (CHEN et al., 1991).

Além dos fatores relaxantes, o endotélio também sintetiza fatores contráteis, que são denominados EDCF, do inglês “Endothelium-Derived Contracting Factor”, dentre os quais podemos citar: prostaglandinas vasoconstritoras (PGH_2 , $PGF_{2\alpha}$),

tromboxana A_2 (TXA₂), endotelinas e espécies reativas de oxigênio, tal como ânion superóxido (VANHOUTTE, 1997).

Sumarizando, a célula endotelial libera, em resposta a diferentes estímulos físicos e químicos, fatores de relaxamento e de contração que modulam, momento a momento, a reatividade vascular. O perfeito equilíbrio entre estes fatores caracteriza a resposta vascular normal. Por outro lado, em algumas situações patológicas, como na hipertensão arterial, a célula endotelial torna-se não funcional (VANHOUTTE et al., 1995). A disfunção endotelial observada nessa situação pode ser decorrente da redução da liberação de fatores relaxantes e/ou aumento de vasoconstritores pela célula endotelial. Portanto, um desequilíbrio da produção e/ou liberação de EDRF e EDCF pode estar contribuindo para a gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial.

1.2 INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA NA HIPERTENSÃO ARTERIAL

A desnutrição intra-uterina possui causas complexas, onde fatores maternos, fetais e placentários podem estar envolvidos. Dentre os fatores maternos, podemos incluir a desnutrição como sendo o mais comum e o de maior importância. De fato, se considerarmos que o crescimento se inicia na concepção, e não no nascimento, a dieta materna durante a gestação torna-se importante elemento para o perfeito aproveitamento do potencial genético fetal.

As necessidades do embrião são mínimas, mas como essa fase inicial é marcada por intenso crescimento hiperplásico, é imprescindível o fornecimento adequado de nutrientes para que não ocorram danos celulares irreversíveis. Portanto, nessa fase o feto é extremamente vulnerável a qualquer grau de deficiência nutricional. Por outro lado, nos estágios finais de desenvolvimento, quando predomina o crescimento hipertrófico, os danos são menos definitivos e acarretam, principalmente, redução do peso fetal. Assim sendo, os períodos finais da gestação são menos suscetíveis aos efeitos deletérios da desnutrição materna. Isto sugere que a fase da gestação em que ocorre a desnutrição é determinante no aparecimento de alterações irreversíveis nos tecidos e órgãos fetais (CAMPBELL et al., 1996).

O retardamento do crescimento fetal, ocasionado pela desnutrição intra-uterina, é caracterizado por diminuição do peso ao nascer, redução das circunferências craniana e do abdômen e aumento do peso da placenta. Alguns autores tem considerado que esse aumento da placenta ocorra para compensar o fornecimento inadequado de nutrientes durante a gestação, e aumentar, assim, a disponibilidade de nutrientes ao feto (CAMPBELL et al., 1996; BAUER et al., 1998; LUMEY, 1998).

Atualmente, os efeitos deletérios promovidos pela desnutrição intra-uterina tem sido colocados em evidência devido às graves repercussões detectadas nas fases iniciais da vida, e também aos diversos trabalhos na literatura que demonstram que, futuramente, essas crianças passam a desenvolver uma série de enfermidades. A desnutrição intra-uterina tem sido apontada como uma das principais causas de morbidez nas primeiras horas após o nascimento. Além disso, trabalhos clínicos tem

demonstrado que crianças submetidas à desnutrição intra-uterina são mais propensas a desenvolver hipertensão arterial e também apresentam maior mortalidade por doenças cardíacas quando atingem a maturidade (BARKER et al.,1993; LAW et al., 1993; BARKER, 1996).

Embora ainda não sejam conhecidos os mecanismos exatos pelos quais a desnutrição intra-uterina possa levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta, dados na literatura tem sugerido que alterações permanentes do metabolismo, fisiologia e sistema humoral do feto, possam “programar” o desenvolvimento tardio dessas enfermidades. Esse fenômeno pode ser interpretado como a tentativa do feto em se adaptar ao novo ambiente pobre em nutrientes, permitindo sua sobrevivência às custas de modificações permanentes em suas estruturas e órgãos vitais (BARKER et al.,1993; GODFREY & BARKER, 1995; LANGLEY-EVANS et al., 1996; BARKER, 1998; SHERMAN et al., 1999). De fato, determinadas alterações ocorridas durante a vida fetal podem, realmente, exercer ações de “programação”, acarretando modificações que persistem durante toda a vida do indivíduo (GUSTAFSSON et al., 1983; SECKL et al., 1995).

Muitos trabalhos na literatura tem demonstrado que alterações permanentes ocorridas no desenvolvimento renal podem estar contribuindo para o desenvolvimento tardio da hipertensão arterial induzida pela desnutrição intra-uterina. Reduções do peso renal e também do número total de néfrons têm sido observadas tanto em crianças com retardamento de crescimento intra-uterino (KONJE et al., 1996), quanto em ratos que foram expostos à desnutrição fetal (MERLET-BENICHOU et al.,1994). Além disso, LANGLEY-EVANS et al. (1999) observaram que ratos que sofreram desnutrição intra-uterina apresentam

desenvolvimento anormal do rim, caracterizado por nefrogênese irregular que pode prejudicar, a longo prazo, as funções renais. LUCAS et al. (1997) demonstraram que a desnutrição intra-uterina exerce papel importante no desenvolvimento da hipertrofia glomerular, uma vez que a prole que sofreu desnutrição intra-uterina apresentou número reduzido de glomérulos e elevação do diâmetro glomerular, sugerindo que além da presença do estímulo hipertrófico ocorre também a deficiência da glomerulogênese após o nascimento. Em outro estudo, SHERMAN et al. (1999) observaram elevação do nível de prostaglandina E₂ (PGE₂) renal em prole que sofreu desnutrição intra-uterina, acarretando o aumento da resistência renovascular que, a longo prazo, pode elevar os níveis pressóricos desses animais.

Durante a desnutrição intra-uterina as alterações fetais também são acompanhadas por alterações placentárias, acarretando comprometimento da função reguladora da placenta (McCRABB et al., 1991). Tem sido relatado que durante a desnutrição intra-uterina ocorre diminuição da atividade da enzima 11 β -hidroxiesteróide dehidrogenase placentária (11 β HSD₂) (LANGLEY-EVANS et al., 1996; GARDNER et al., 1997), podendo acarretar baixo peso ao nascer e também “programar” doenças cardiovasculares na vida adulta (STEWART et al., 1995).

A 11 β HSD₂ placentária tem como função biológica catalisar a oxidação do cortisol e da corticosterona maternos em compostos inativos (LAKSHMI & MONDER, 1988; LOW et al., 1993; FERRARI et al., 2000). Portanto, essa enzima é responsável pela proteção dos tecidos fetais contra a ação lesiva dos glicocorticóides maternos produzidos durante a gestação (Figura 1), uma vez que o excesso de exposição a glicocorticóides *in utero* pode ser prejudicial para o desenvolvimento e a maturação fetal (MONDER, 1991). Entretanto dados conflitantes foram descritos por STEWART

et al. (1994). Esses autores observaram que vários tecidos fetais também exibem atividade da $11\beta\text{HSD}_2$, sugerindo que o próprio feto pode se proteger do excesso de glicocorticóides maternos, evitando assim as alterações decorrentes deste processo deletério.

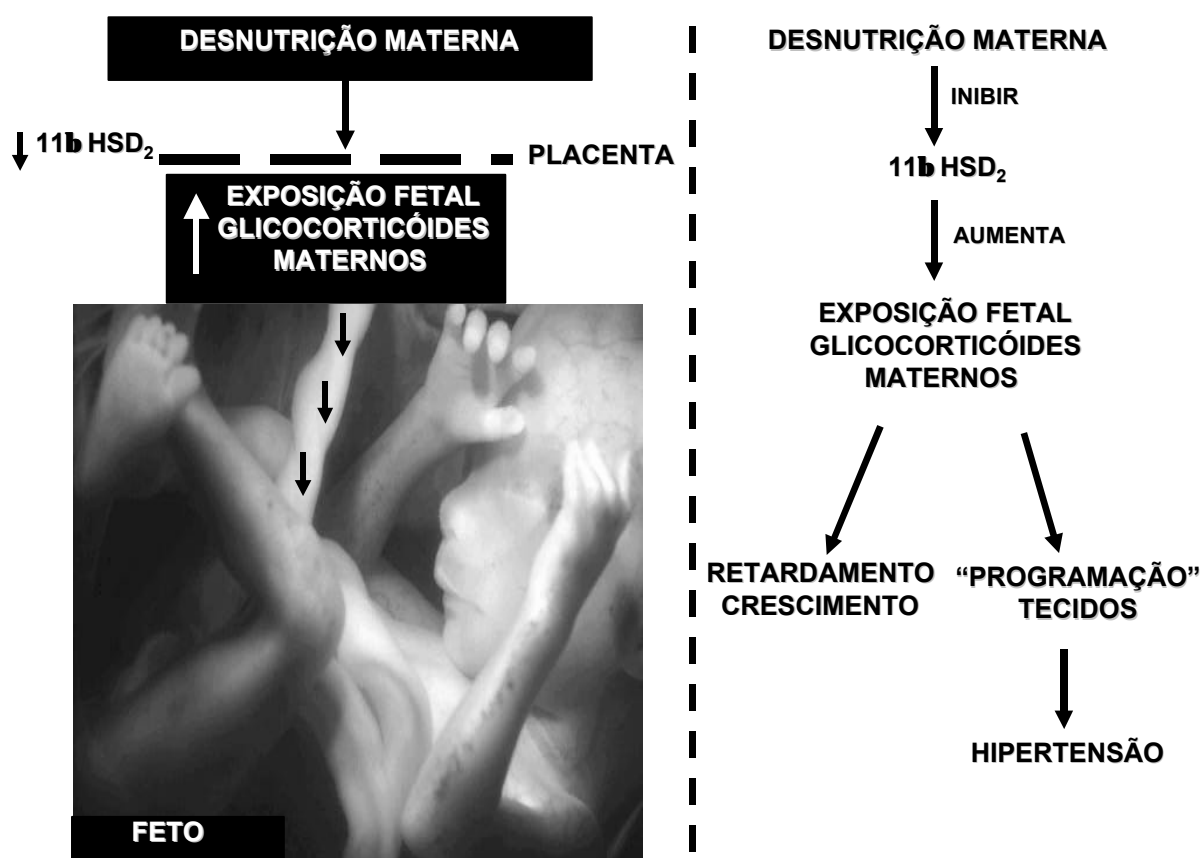


Figura 1: Relação entre a desnutrição materna, a diminuição da $11\beta\text{HSD}_2$ placentária e os efeitos do excesso da exposição a glicocorticóides.

Alguns pesquisadores tem associado o aumento da exposição a glicocorticóides *in utero* aos efeitos deletérios da desnutrição intra-uterina. Tem sido

demonstrado que a inibição farmacológica da $11\beta\text{HSD}_2$ durante a gestação, e consequente aumento da exposição a glicocorticóides, provoca desenvolvimento de hipertensão arterial na prole descendente. LINDSAY et al. (1996) trataram ratas prenhes com carbenoxolone (inibidor da enzima $11\beta\text{HSD}_2$) e observaram, na prole redução do peso ao nascer e elevação da pressão sanguínea na fase adulta. Além disso, o tratamento de ratas prenhes com dexametasona (glicocorticóide sintético) também acarreta redução do peso ao nascer e aumento da pressão arterial muitos meses após a última exposição a glicocorticóides *in utero* (BENEDIKTSSON et al., 1993). Semelhantemente ao observado em animais, estudos em humanos também demonstraram que o tratamento com prednisona (glicocorticóide sintético) durante a gestação, acarreta retardamento de crescimento intra-uterino e afeta o desenvolvimento fetal (REINISCH et al., 1978). Por outro lado, a adrenalectomia materna ou o tratamento com metirapona (inibidor da síntese de corticosterona) durante a gestação de fêmeas submetidas a desnutrição são eficazes na prevenção da elevação dos níveis pressóricos da prole (LINDSAY et al., 1996; LANGLEY-EVANS, 1997; GARDNER et al., 1997). O conjunto destes dados dá suporte à hipótese que o excesso de exposição a glicocorticóides maternos durante a desnutrição intra-uterina é extremamente deletério ao feto, e que a diminuição da atividade da $11\beta\text{HSD}_2$ placentária pode ser o elo entre esse processo de desnutrição e a “programação” da hipertensão arterial.

Alterações metabólicas ocorridas em resposta às adversidades causadas pela desnutrição intra-uterina podem aumentar ainda mais o grau de exposição fetal a glicocorticóides maternos. De fato, a desnutrição materna provoca redução da síntese de andrógenos fetais, e isto também pode estar causando atenuação da

atividade da $11\beta\text{HSD}_2$ acarretando maior exposição do feto a glicocorticóides maternos. Além disso, o stress materno resultante do processo de desnutrição intra-uterina estimula a placenta a secretar o fator liberador de corticotrofina (CRF). Isto provoca aumento desse fator na circulação neonatal, estimulando o eixo pituitária-adrenal do feto a secretar glicocorticóides e amplificando a exposição do feto a esse hormônio (SECKL et al., 1995). Logo, essa cascata de efeitos pode aumentar os níveis de exposição a glicocorticóides no feto submetido a desnutrição intra-uterina.

Alguns mecanismos tem sido propostos para explicar os efeitos da exposição a glicocorticóides *in utero* na elevação da pressão arterial. Está bem estabelecido que a exposição pré-natal a baixas doses de dexametasona acarreta aumento da expressão de receptores adrenérgicos, potencializa a adenilato ciclase, modifica o desenvolvimento das inervações simpáticas de vários tecidos (SECKL et al., 1995), aumenta a sensibilidade dos vasos sanguíneos às ações vasoconstritoras da angiotensina II (ANG-II) (LANGLEY-EVANS et al., 1999) e atenua a síntese de prostaciclina (PGI_2) em células endoteliais de artérias sistêmicas (JUN et al., 1999). Portanto, o excesso de exposição a glicocorticóides *in utero* pode alterar a homeostase cardiovascular, o que explicaria o desenvolvimento de hipertensão arterial na vida adulta. Além destes mecanismos, muitos pesquisadores tem sugerido o envolvimento da exposição a glicocorticóides *in utero* na “programação” da expressão de receptores para esses esteróides em vários tecidos (MEANEY et al., 1989; HENRY et al., 1994; SILVA et al., 1994; LEVITT et al., 1995). LANGLEY-EVANS et al. (1996) observaram que as proles descendentes de ratas submetidas à desnutrição durante a gestação apresentavam níveis plasmáticos normais de corticosterona e aumento da expressão de receptores do tipo II de glicocorticóides

no hipocampo e na aorta torácica. A elevação do número desses receptores para glicocorticóides em aorta pode acarretar elevação do número de receptores para a ANG-II nas células do músculo liso vascular (PROVENCHER et al., 1995). Essa modulação da expressão dos receptores de ANG-II pela ação dos glicocorticóides pode ser o mecanismo primário pelo qual esses esteróides estejam modulando diretamente os níveis de pressão arterial em animais expostos a desnutrição intra-uterina.

Oferecendo suporte a essa hipótese, trabalhos na literatura tem demonstrado a importância do sistema renina-angiotensina (SRA) na hipertensão induzida pela desnutrição intra-uterina. SHERMAN & LANGLEY-EVANS (1998) trataram a prole adulta de ratos expostos a desnutrição intra-uterina com captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) e observaram rápido declínio da pressão arterial. De fato, ratos submetidos a desnutrição *in utero* apresentam elevação da atividade plasmática da enzima conversora de angiotensina (ECA) e, por outro lado níveis plasmáticos reduzidos de renina e de ANG-II, indicando a rapidez de “turnover” desse peptídeo em função da elevação da densidade de receptores. Além disso, GARDNER et al. (1998) observaram que ratos expostos a desnutrição intra-uterina apresentam aumento da resposta pressora à administração intravenosa de baixas doses de ANG-II. Esses trabalhos demonstram a importância da ANG-II e da ECA na manutenção do estado hipertensivo de animais desnutridos *in utero*.

Embora os efeitos promovidos pela desnutrição intra-uterina na pressão arterial tenham sido associados ao aumento da atividade do SRA; alterações do desenvolvimento renal; aumento da expressão de receptores para glicocorticóides e alterações da atividade simpática, pouco se sabe sobre os efeitos da desnutrição

intra-uterina na função da célula endotelial. Considerando que o endotélio é um importante determinante do desenvolvimento e/ou manutenção da pressão arterial, decidimos investigar se alterações da reatividade vascular/função endotelial estariam envolvidas nos efeitos da desnutrição intra-uterina sobre a elevação da pressão arterial.

2.0 OBJETIVOS

Tendo em vista que a desnutrição intra-uterina pode favorecer o desenvolvimento de hipertensão arterial na fase adulta, os objetivos do nosso trabalho são: investigar a influência da desnutrição intra-uterina nos níveis pressóricos e na reatividade vascular de ratos normotensos (Wistar) e de ratos espontaneamente hipertensos (SHR).

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEA) do ICB-USP e estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.1. ANIMAIS

Foram usados ratos SHR e Wistar, de ambos os sexos, 14 - 16 semanas de idade, provenientes do Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) - USP e condicionados no Biotério do Laboratório de Hipertensão do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

3.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados os seguintes grupos experimentais:

- Grupo I – Prole nutrida *in utero* (N)

Machos: **Wistar** (WN) e **SHR** (SN)

Fêmeas: **Wistar** (WN) e **SHR** (SN)

- Grupo II – Prole desnutridas *in utero* (D)

Machos: **Wistar** (WD) e **SHR** (SD)

Fêmeas: **Wistar** (WD) e **SHR** (SD)

3.3. ACASALAMENTO E PRENHEZ

Para o acasalamento, três fêmeas, pesadas e marcadas, foram colocadas com um macho da mesma espécie durante o período de uma noite. Na manhã seguinte foi avaliada a presença de espermatozóide no esfregaço vaginal das ratas para confirmação do cruzamento. A presença desses no lavado vaginal determinou o primeiro dia da gestação.

3.4. INDUÇÃO DA DESNUTRIÇÃO INTRA-UTERINA

A dieta de restrição alimentar foi delineada a partir de protocolo prévio, onde se obteve o consumo médio de ração antes do acasalamento e durante a gestação (Figura 2A). A partir deste dado inicial, a oferta de ração às ratas prenhes durante os 21 dias de gestação foi reduzida em 50% (Figura 2B), retornando a alimentação normal após o nascimento da prole. Esse protocolo foi realizado tanto em fêmeas SHR quanto em Wistar, pois não foram observadas diferenças significativas do consumo de ração entre as duas linhagens. Por outro lado, as fêmeas do grupo nutrido receberam ração *ad libitum*.

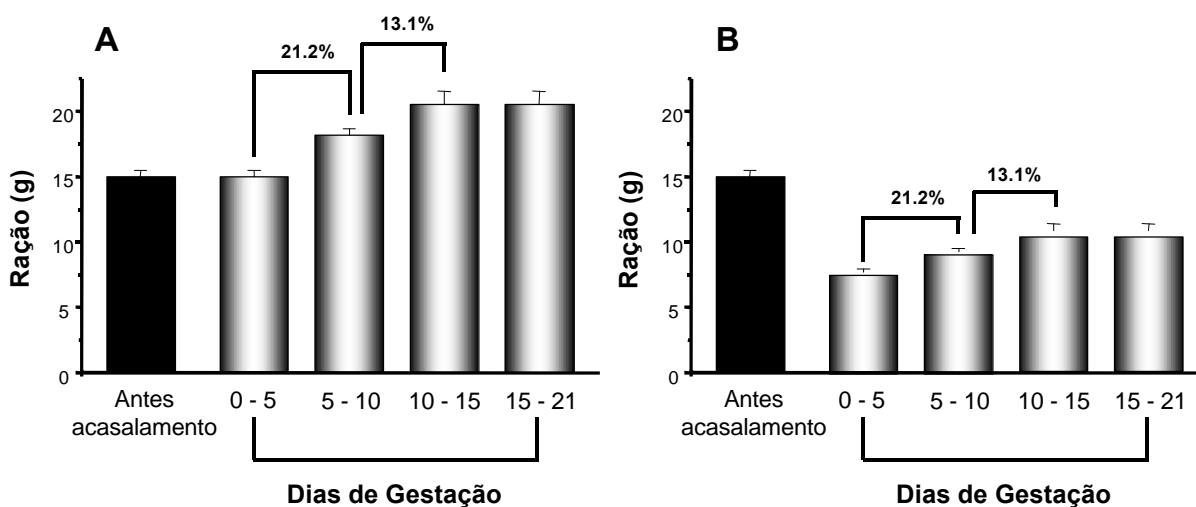


Figura 2: Consumo médio de ração de ratas SHR e Wistar: A – dieta normal (*ad libitum*), B – dieta de restrição alimentar. Os valores em porcentagem representam o aumento do consumo nos períodos estudados.

3.5. PESO MATERNO NA GESTAÇÃO

O peso das ratas prenhes foi obtido em determinados períodos da gestação (5^o, 10^o, 15^o, 22^o dias) através de pesagem simples. O valor foi expresso como média \pm EPM, e este procedimento foi realizado em ambos os grupos experimentais.

3.6. PESO DOS RECÉM-NASCIDOS

O peso dos recém-nascidos foi obtido através de pesagem simples, onde cada um deles foi pesado separadamente e o valor expresso como média \pm EPM. Este procedimento foi realizado em ambos os grupos experimentais.

3.7. MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL

A pressão arterial (PA) caudal de ratos acordados foi determinada por método indireto através de pletismografia de cauda. Um oclusor e um sensor foram ajustados na porção proximal da cauda do rato, acoplados ao esfigmomanômetro elétrico PE-300 conectado a fisiógrafo MKIII (Narco Bio-System). Os animais foram aquecidos por 10 minutos a 40° C e colocados em um cilindro de acrílico com abertura para a cauda e o focinho. O valor final da PA representa a média de, no mínimo, três medidas. Foram considerados hipertensos os animais que apresentaram pressão caudal igual ou maior que 145 mmHg.

A P.A caudal dos animais de todos os grupos experimentais foi registrada a partir da 4^o até a 14^o semana. Portanto, acompanhou-se a evolução da pressão arterial desses animais do desmame até o início do estudo da reatividade vascular em aorta.

3.8. INDUÇÃO DO ESTRO

Para a indução do estro, as fêmeas receberam difosfato tetrasódico de dietilestilbestrol (Honvan ®), 100µg/kg em solução óleo/aquosa via subcutânea, 24 horas antes do experimento.

Para a verificação da eficiência do tratamento estrogênico foi feito exame microscópico do esfregaço vaginal das ratas antes do animal ser usado para o experimento. O estro foi caracterizado pelo grande número de células descamativas, queratinizadas e anucleadas no material vaginal

3.9. PESO RENAL

Na 14^o semana de idade, após o isolamento da aorta torácica para o estudo da reatividade vascular, foram retirados os rins. Em seguida, foram lavados em salina, retirados os tecidos adjacentes e, finalmente secos em papel filtro, para então serem pesados (peso total). Após a pesagem, os rins foram colocados em estufa (30°C) por 24 horas para a obtenção do peso seco. Os resultados foram expressos em gramas de tecido por 100 gramas de peso corporal.

3.10. TÉCNICA HISTOLÓGICA

Os rins foram removidos, dissecados e fixados em solução de Metacan (composição em ml: álcool metílico 60; clorofórmio 30; ácido acético glacial 10) por 3 a 4 horas em temperatura ambiente. Após fixação, os rins foram lavados com álcool absoluto, diafanizadas em xilol e incluídos em paraplast (Oxford, St. Louis, USA), de forma a se obter plano de corte longitudinal. Os rins foram submetidos a cortes de 5µm de espessura em micrótomo automático e aderidos a lâmina histológica com o auxílio de solução de albumina. Em seguida, as lâminas foram coradas pelo método de hematoxilina-eosina (H/E).

3.11. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE NÉFRONS

Segundo a técnica descrita por Langley-Evans et al. (1999) os rins foram submetidos a cortes consecutivos de 5 µm de espessura para a obtenção do número total de secções do rim. A seguir, 4 cortes foram escolhidos aleatoriamente, e submetidos a coloração pelo método de H/E.

Os néfrons foram identificados por seus glomérulos, e a contagem foi feita por toda a região do córtex renal. Foram contados 5 campos, ao acaso, por lâmina e foi

calculada a média das 4 lâminas, esse procedimento foi realizado para cada animal dos respectivos grupos experimentais.

O número total de néfrons (néfrons/rim) foi expresso como média \pm EPM e obtido pelo seguinte cálculo: $\eta = \bar{XG} \times S$, onde: η = o total de néfrons(néfrons/rim); \bar{XG} = a média de glomérulos e S= número total de secções do rim.

3.12. REATIVIDADE VASCULAR *IN VITRO* - AORTA TORÁCICA ISOLADA

Os animais foram anestesiados com solução de hidrato de cloral a 10% (300mg/kg) por via intraperitoneal e após toracotomia, a aorta torácica descendente foi dissecada, removendo-se todo o tecido conectivo e adiposo, evitando-se estiramento excessivo para não haver lesão das células endoteliais e musculares. Foram obtidos dois anéis transversais de aproximadamente 4 mm, em um desses anéis o endotélio foi mantido íntegro enquanto o outro teve seu endotélio removido mecanicamente. Ambos anéis foram suspensos por um par de ganchos de aço inoxidável em transdutores isométricos de tensão (Myograph F-60, Narco Bio-System, Texas, USA) acoplados a fisiógrafo Narco Trace® (Narco Bio-System) em cubas para órgão isolado contendo 15 ml de solução de Krebs-Henseleit modificada (composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄ 1,17; NaHCO₃ 25,0; Glicose 11,0; EDTA 0,026). Essa solução nutriente foi gaseificada (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida aquecida à temperatura de 37,0 \pm 0,5 °C durante todo o protocolo experimental.

As preparações permaneceram por um período de 60 minutos para a estabilização sob tensão de 1,5g, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 20 minutos, até o início do experimento.

3.12.1. CURVAS CONCENTRAÇÃO-EFEITO (CCE):

Foram realizadas CCE pelo método das concentrações cumulativas à Noradrenalina (NA - 10^{-10} a 10^{-4} M), à Acetilcolina (ACh - 10^{-10} a 10^{-4} M) e ao Nitroprussiato de Sódio (NPS - 10^{-10} a 10^{-4} M) em anéis com e sem endotélio. As concentrações aqui mencionadas referem-se à concentração final da droga na cuba. Cada concentração permaneceu em contato com a preparação durante 3 minutos para a estabilização do efeito.

As CCE à ACh e ao NPS foram realizadas em anéis de aorta previamente contraídos com NA 10^{-7} M, concentração que induz tensão equivalente a 60-80% da tensão máxima provocada pela NA. O relaxamento induzido pela ACh e pelo NPS foi expresso em porcentagem de relaxamento em relação à contração obtida com a NA.

As contrações induzidas pela NA foram expressas em gramas de tensão.

3.13. DROGAS E SOLUÇÕES:

- Solução nutriente de Krebs-Henseleit modificada foram utilizados os seguintes sais, diluídos em água destilada: NaCl (113 mM); KCl (4,7 mM); CaCl_2 (2,5 mM); KH_2PO_4 (1,18 mM); MgSO_4 (1,17 mM); NaHCO_3 (25,0 mM); EDTA (0,026 mM) (Merck S/A, Ind. Quím., Rio de Janeiro-RJ, Brasil) e glicose (11 mM) (Ecibra-Equipamentos Científico do Brasil). Para ajustar o pH da solução em 7,4 foram

utilizados HCl e/ou NaOH 0,1N (Merck S/A, Ind. Quím., Rio de Janeiro- RJ, Brasil).

- Solução de hidrato de cloral 10% diluída em salina 0,9% (Merck S/A, Ind. Quím., Rio de Janeiro- RJ, Brasil), para a anestesia.
- Bitartarato de arterenol (NA), cloreto de acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) (Sigma – Chemical Company S/A, St Louis, USA), diluídas em solução de Krebs-Henseleit modificada para a realização das CCE.
- Difosfato tetrasódico de dietilestilbestrol (Honvan ®) (Sigma – Chemical Company S/A, St Louis, USA)
- Álcool metílico, clorofórmio, ácido acético glacial, xilol, hematoxilina, eosina amarela (Cinética S/A, Ind. Quím., São Paulo- SP, Brasil), paraplast (Oxford, St. Louis, USA), para realização da técnica histológica.

3.14. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE SENSIBILIDADE

A sensibilidade das preparações às drogas foi medida pela determinação gráfica da concentração efetiva 50 (EC_{50}), que é a concentração molar que induz 50% do efeito máximo do agonista, em experimentos individuais. A média das EC_{50} foi apresentada como antilogaritmo da média aritmética dos $\log EC_{50}$ de cada experimento, com intervalo de confiança de 95%.

3.15. AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DE RESPOSTA MÁXIMA

A reatividade das preparações foi determinada pelas respostas máximas (RM) aos agentes vasoativos e estão expressas como a média aritmética do efeito máximo, obtido em experimentos individuais, com os seus respectivos erros padrão.

3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística dos resultados obtidos, foram utilizados o teste “t” de Student para amostras independentes ou análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer quando pertinente. Foi adotado nível de significância menor que 5 %.

4.0 RESULTADOS

4.1 PESO MATERNO NA GESTAÇÃO:

O peso de mães submetidas à dieta de restrição alimentar durante o decorrer da gestação (5°, 10°, 15° e 22° dias) foi significativamente menor do que o peso dos respectivos controles submetidos a dieta *ad libitum* tanto em fêmeas SHR (Tabela 1 – Figura 4A) quanto em fêmeas Wistar (Tabela 2 – Figura 4B), demonstrando que a desnutrição durante a gestação promoveu severa redução do peso, em ambas as linhagens estudadas.

Tabela 1 - Efeitos da desnutrição durante a gestação no peso materno (g) de fêmeas SHR.

Dias gestação	SHR nutrida (n)	SHR desnutrida (n)
1º	164,2±5,3(4)	171,4±3,8(6)
5º	182,3±4,3(4)	163,1±2,7*(6)
10º	196,5±6,2(4)	155,3±2,6*(6)
15º	223,5±5,2(4)	166,3±1,9*(6)
22º	248,3±6,6(4)	174,3±7.5*(6)

Resultados estão expressos como média ± EPM.

Teste “t” de Student - não pareado.

* p<0,05 em comparação com SHR nutrida.

(n) número de animais.

Tabela 2 - Efeitos da desnutrição durante a gestação no peso materno (g) de fêmeas Wistar.

Dias gestação	Wistar nutrida (n)	Wistar desnutrida (n)
1º	217,5±3,6(6)	216,0±4,2(7)
5º	239,2±3,8(6)	208,3±4,5*(7)
10º	251,6±4,3(6)	192,6±5,3*(7)
15º	282,3±5,2(6)	206,2±4,1*(7)
22º	306,2±3,2(6)	215,7±5,6*(7)

Resultados estão expressos como média ± EPM.

Teste “t” de Student - não pareado.

* p<0,05 em comparação com Wistar nutrida.

(n) número de animais

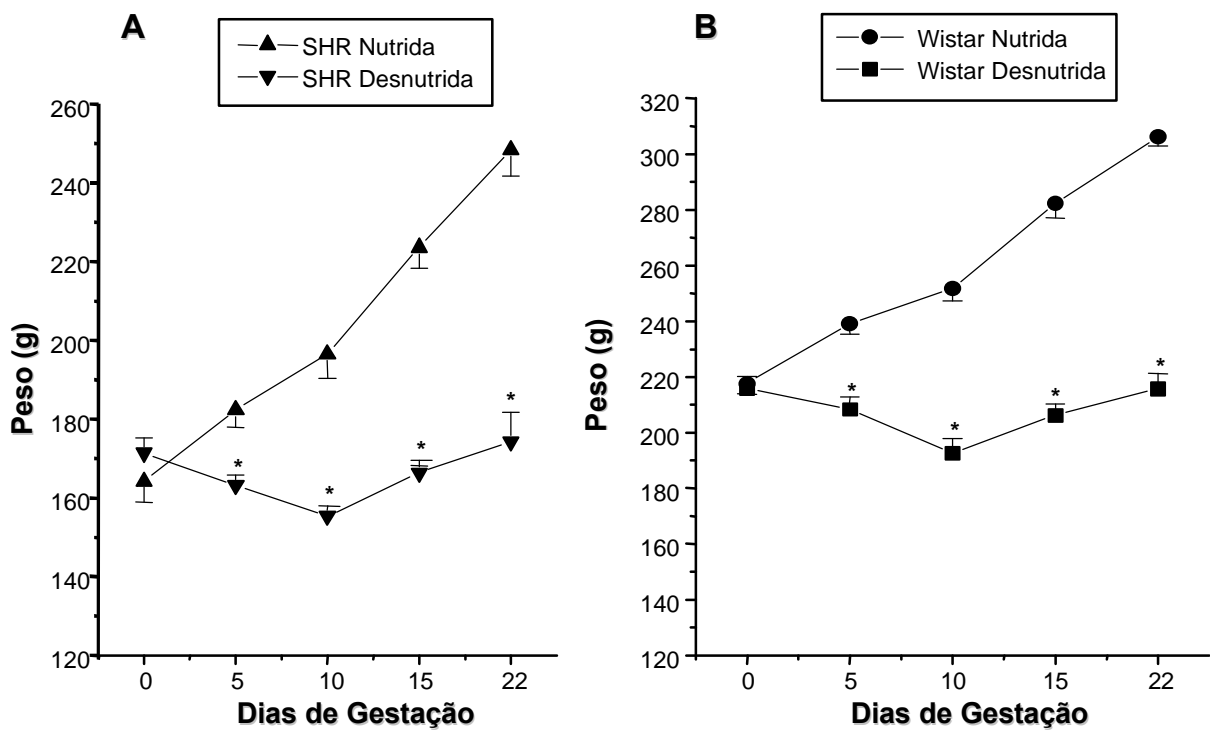


Figura 4 - Peso materno durante a gestação (g): A - Fêmeas SHR, B - Fêmeas Wistar.

Os valores estão expressos em média \pm EPM.

* $p < 0,05$ em comparação com a respectiva fêmea nutrida.

4.2 PESO DOS RECÉM-NASCIDOS:

O peso dos recém-nascidos descendentes de mães desnutridas foi significativamente menor do que o peso dos respectivos controles nutridos, tanto em

animais SHR (Tabela 3 – Figura 5A) quanto em animais Wistar (Tabela 3 – Figura 5B), demonstrando que a desnutrição intra-uterina promoveu baixo peso ao nascer, em ambas as linhagens estudados. Este resultado é indicativo do retardamento do crescimento fetal ocorrido em resposta à desnutrição intra -uterina.

Tabela 3 - Efeitos da desnutrição intra-uterina no peso ao nascer de recém-nascidos SHR e Wistar.

Grupo (n)	Peso dos recém-nascidos (g)
SN (30)	5,8±0,1
SD (30)	3,3±0,1 *
WN (28)	6,0±0,2
WD (28)	3,2±0,1 =

Resultados estão expressos como média ± EPM. SN, prole SHR nutrida *in utero*; SD, prole SHR desnutrida *in utero*; WN, prole Wistar nutrida *in utero*; WD, prole Wistar desnutrida *in utero*.

Teste “t” de Student - não pareado.

* p<0,05 em comparação com SN; = p<0,05 em comparação com WN; (n) número de animais.

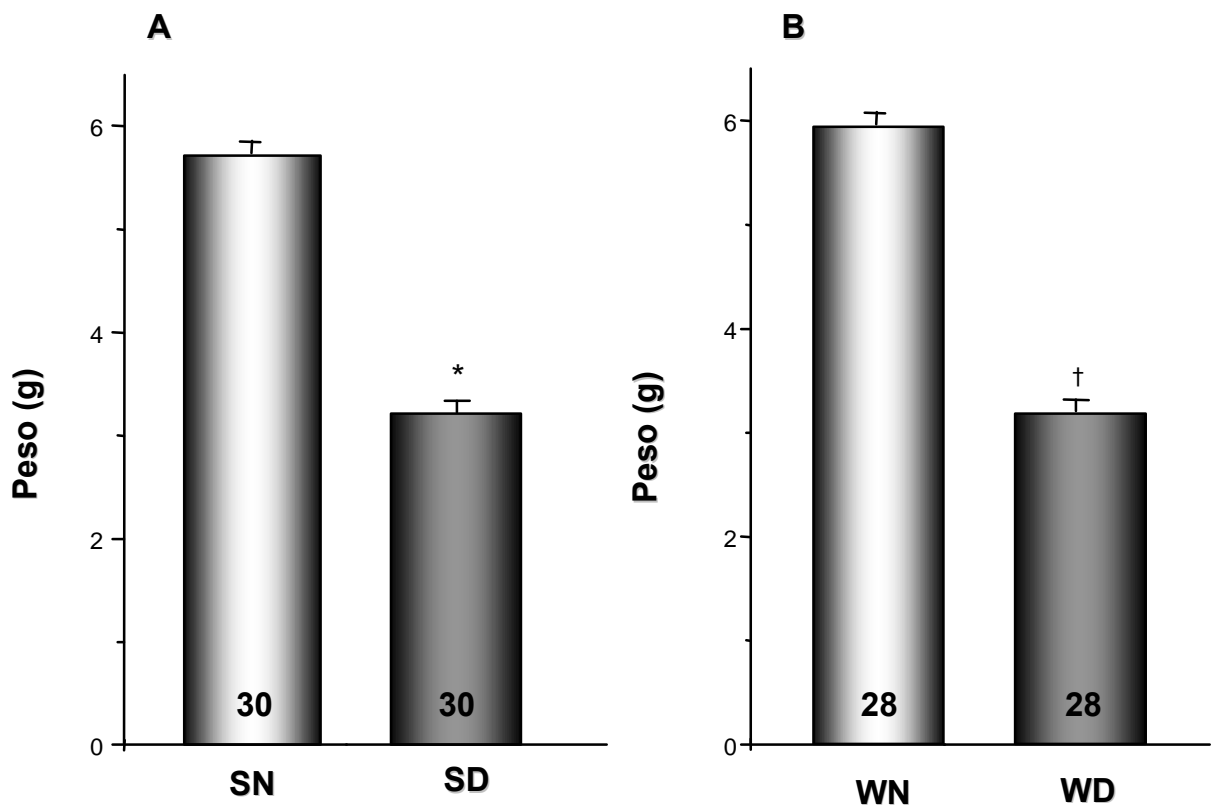


Figura 5 - Peso dos recém-nascidos (g): A - Prole SHR nutrida *in utero* (SN), Prole SHR desnutrida *in utero* (SD); B - Prole Wistar nutrida *in utero* (WN), Prole Wistar desnutrida *in utero* (WD).

Os valores estão expressos em média \pm EPM.

Os números nas barras representam o tamanho da amostra.

* $p < 0,05$ em comparação com SN.

† $p < 0,05$ em comparação com WN.

4.3. MEDIDA INDIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL:

Nos machos SHR desnutridos *in utero* a pressão arterial aumentou significativamente a partir da 6^o semana, apresentando elevação progressiva até a 14^o semana (Tabela 4 - Figura 6A). Esses animais apresentaram, na 14^o semana, elevação dos níveis pressóricos equivalente a 57 mmHg e porcentagem de aumento igual a 23,9%, em relação ao SHR nutrido *in utero*.

Por outro lado, nas fêmeas SHR desnutridas *in utero* a pressão arterial aumentou significativamente a partir da 9^o semana, apresentando elevação progressiva até a 14^o semana (Tabela 4 - Figura 6B). Nesta última aferição foi observada nessas fêmeas elevação dos níveis pressóricos equivalente a 54 mmHg e porcentagem de aumento igual a 25,2%, em relação a SHR nutrida *in utero*.

Os animais Wistar desnutridos *in utero*, tanto machos quanto fêmeas, exibiram elevação significativa dos níveis de pressão arterial a partir da 4^o semana, ocorrendo elevação progressiva de pressão arterial até a 10^o semana, e havendo estabilização dos níveis pressóricos a partir da 11^o semana (Tabela 5 - Figura 6C e 6D, respectivamente). Na 14^o semana de aferição, os machos desnutridos *in utero* apresentaram elevação da pressão arterial equivalente a 35 mmHg e porcentagem de aumento igual a 22,1%, em relação ao Wistar nutrido *in utero*. Por outro lado, as fêmeas Wistar desnutridas *in utero* apresentaram, no mesmo período, elevação da pressão arterial igual a 29 mmHg, e porcentagem de aumento equivalente a 19,9%, em relação a Wistar nutrida *in utero*.

Tabela 4 – Efeito da desnutrição intra-uterina na pressão arterial (mmHg) de SHR macho e fêmea.

Semanas	SN (macho) (n)	SD (macho) (n)	SN (fêmea) (n)	SD (fêmea) (n)
4°	100,3±3,6 (9)	113,0±5,1 (6)	98,8±4,2 (8)	99,3±4,4 (7)
5°	141,6±6,8 (9)	142,0±5,0 (6)	123,6±5,0 (8)	125,0±9,0 (7)
6°	147,2±2,6 (9)	167,2±5,1* (6)	141,6±3,2 (8)	150,2±9,1 (7)
7°	150,0±0,2 (9)	175,0±0,2* (6)	150,0±0,3 (8)	156,2±5,1 (7)
8°	159,4±4,6 (8)	175,0±0,3* (6)	159,4±4,6 (8)	169,3±5,0 (7)
9°	159,4±4,6 (8)	179,0±4,3* (6)	159,4±4,6 (8)	181,0±5,0* (7)
10°	162,5±4,7 (8)	204,2±4,1* (6)	159,4±4,6 (8)	181,0±5,0* (7)
11°	175,0±4,7 (8)	208,2±5,1* (6)	159,4±4,6 (8)	188,2±6,1* (7)
12°	181,3±4,1 (8)	225,4±6,1* (6)	159,4±4,6 (8)	200,0±9,0* (7)
13°	181,3±4,1 (8)	229,0±4,2* (6)	159,4±4,6 (8)	206,1±5,1* (7)
14°	181,3±4,1 (8)	238,2±5,2* (6)	159,4±4,6 (8)	210,7±5,0* (7)

Resultados expressos como média ± EPM. SN, prole SHR nutrida *in utero*; SD, prole SHR desnutrida *in utero*.

Teste “t” de Student – não pareado

*p<0,05 em comparação com respectivo SN.

(n) número de animais.

Tabela 5 – Efeito da desnutrição intra-uterina na pressão arterial (mmHg) de Wistar macho e fêmea.

Semanas	WN (macho) (n)	WD (macho) (n)	WN (fêmea) (n)	WD (fêmea) (n)
4°	75,0±0,1 (7)	93,1±3,1* (17)	75,0±0,1 (7)	91,3±3,1* (17)
5°	89,0±5,0 (7)	112,0±3,0* (17)	89,0±5,0 (7)	106,0±3,0* (17)
6°	93,1±4,1 (7)	118,2±3,1* (17)	93,0±4,2 (7)	110,2±3,1* (17)
7°	100,0±5,0 (7)	131,2±4,1* (17)	96,2±6,1 (7)	119,1±3,1* (17)
8°	107,2±4,1 (7)	144,0±3,0* (17)	104,4±3,2 (7)	134,2±4,1* (17)
9°	107,2±4,1 (7)	150,0±4,0* (17)	107,4±4,1 (7)	143,2±3,1* (17)
10°	107,2±4,1 (7)	154,1±4,1* (17)	107,4±4,1 (7)	147,3±3,1* (17)
11°	111,0±5,2 (7)	156,0±4,0* (17)	107,4±4,1 (7)	147,3±3,1* (17)
12°	114,2±5,1 (7)	156,0±4,0* (17)	114,2±5,0 (7)	147,3±3,1* (17)
13°	121,5±3,0 (7)	156,0±4,0* (17)	114,2±5,0 (7)	147,3±3,1* (17)
14°	121,5±3,0 (7)	156,0±4,0* (17)	118,0±4,0 (7)	147,3±3,1* (17)

Resultados expressos como média ± EPM. WN, prole Wistar nutrida *in utero*; WD, prole Wistar desnutrida *in utero*.

Teste “t” de Student – não pareado.

*p<0,05 em comparação ao respectivo WN.

(n) número de animais.

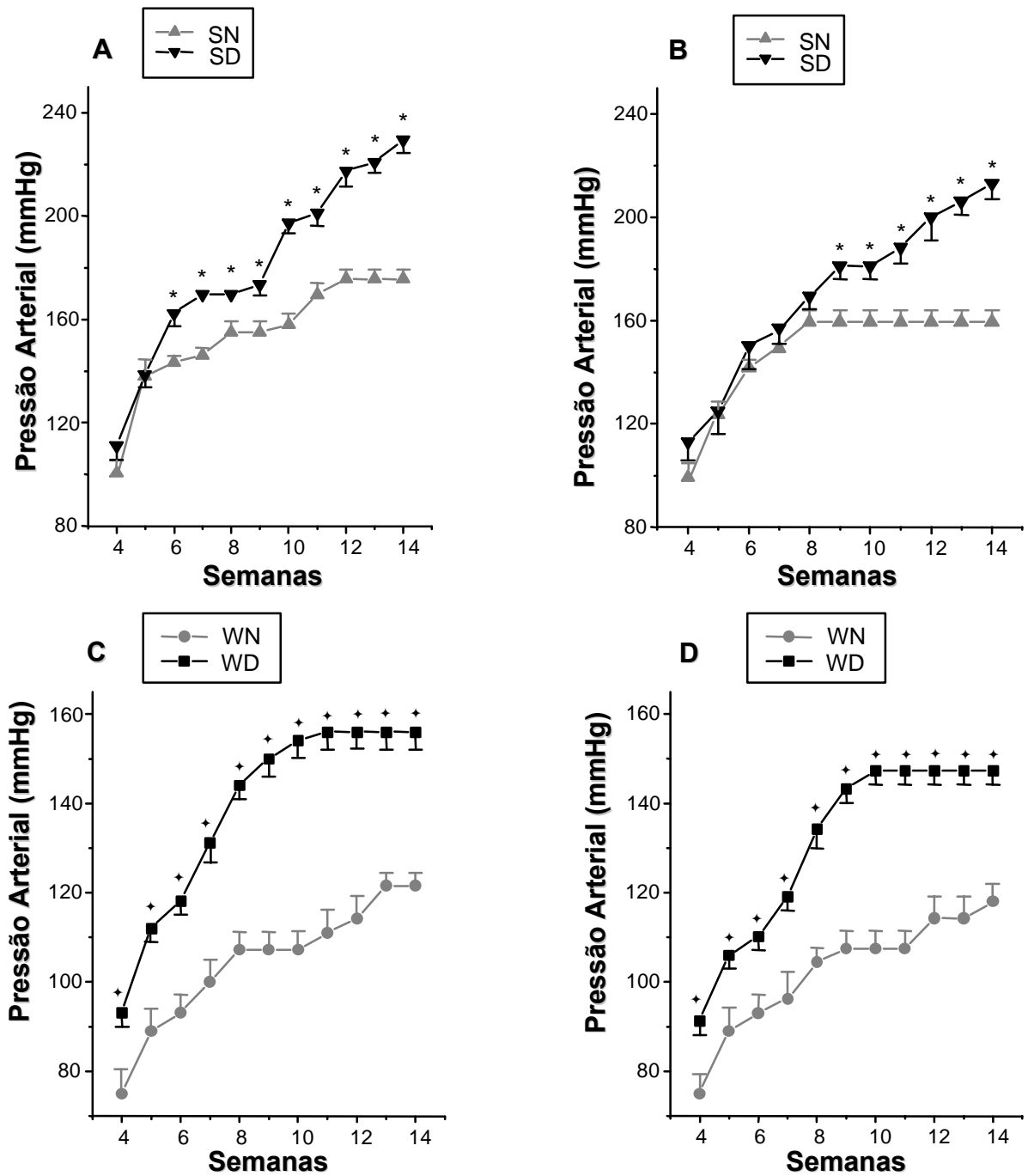


Figura 6 - Pressão arterial (mmHg) de animais nutridos e desnutridos *in utero*: A – SHR machos, B – SHR fêmeas, C – Wistar machos, D – Wistar fêmeas.

* $p < 0,05$ em comparação com o respectivo SN.

$\Phi p < 0,05$ em comparação com o respectivo WN.

4.4 ESTUDO DA REATIVIDADE VASCULAR EM AORTA ISOLADA DE ANIMAIS SHR

4.4.1 CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO À ACETILCOLINA (ACh), AGENTE VASODILATADOR DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO.

Em anéis de aorta de animais SHR nutridos e desnutridos *in utero*, de ambos os sexos, obteve-se a curva bifásica, isto é, relaxamento nas menores concentrações e contração nas maiores concentrações. A fase contrátil da curva bifásica de resposta à ACh de anéis de aorta isolados de animais SHR desnutridos *in utero* foi mais acentuada do que nos respectivos nutridos (Figura 7B e 8B).

Já o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela ACh, em animais nutridos atingiu a resposta máxima na concentração de 10^{-8} M, enquanto que os machos desnutridos *in utero* apresentaram resposta máxima de relaxamento na concentração de 10^{-7} M e as fêmeas desnutridas *in utero* na concentração de 3×10^{-9} M (Figura 7B e 8B). No grupo de machos desnutridos *in utero* não foi observada alteração de relaxamento máximo (Tabela 6 – Figura 7A). Contudo, ocorreu diminuição significativa da sensibilidade à ACh (Tabela 6 - Figura 7B).

Diferentemente dos machos, as fêmeas desnutridas *in utero* apresentaram resposta diminuída à ACh e não foram observadas alterações de sensibilidade a esse agente vasodilatador (Tabela 7- Figura 8A e 8B).

Tabela 6 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e relaxamento máximo (%) à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta com endotélio (E+) isolados de machos SHR.

Grupo (n)	Relaxamento Máximo (%)^a	EC_{50} ($\times 10^{-9}$ M)^b
SN (E+) (11)	70,6 \pm 3,2	2,0(1,4-2,9)
SD (E+) (7)	71,0 \pm 1,0	9,7(5,0-19,1)**

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); SN, SHR nutrido *in utero*; SD, SHR desnutrido *in utero*; Teste “t” de Student; ** $p < 0,01$ em comparação com SN (E+); (n) número de animais.

Tabela 7 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e relaxamento máximo (%) à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta com endotélio (E+) isolados de fêmeas SHR.

Grupo (n)	Relaxamento Máximo (%)^a	EC_{50} ($\times 10^{-10}$ M)^b
SN (E+) (12)	77,3 \pm 2,2	1,7(0,7-3,9)
SD (E+) (8)	59,8 \pm 1,8**	0,9(0,5-1,3)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); SN, SHR nutrida *in utero*; SD, SHR desnutrida *in utero*; Teste “t” de Student; ** $p < 0,01$ em comparação com SN (E+); (n) número de animais.

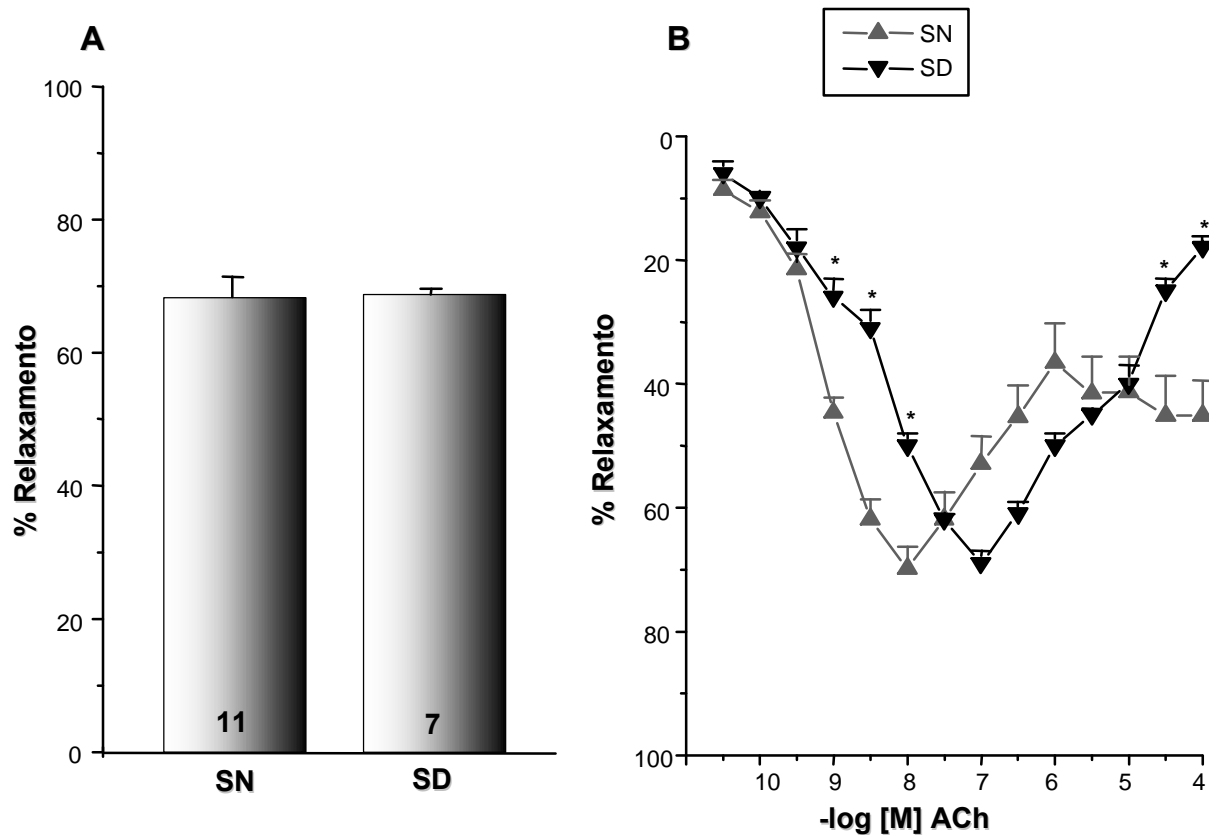


Figura 7 A – Respostas máximas de relaxamento à acetilcolina em anéis de aorta isolados de machos SN e SD. Os números nas barras representam o tamanho da amostra. Os valores estão expressos em média \pm EPM. **B** – Curvas concentração-efeito à acetilcolina obtidas em anéis de aorta isolados de machos SN e SD.

* $p < 0,05$ em comparação ao SN.

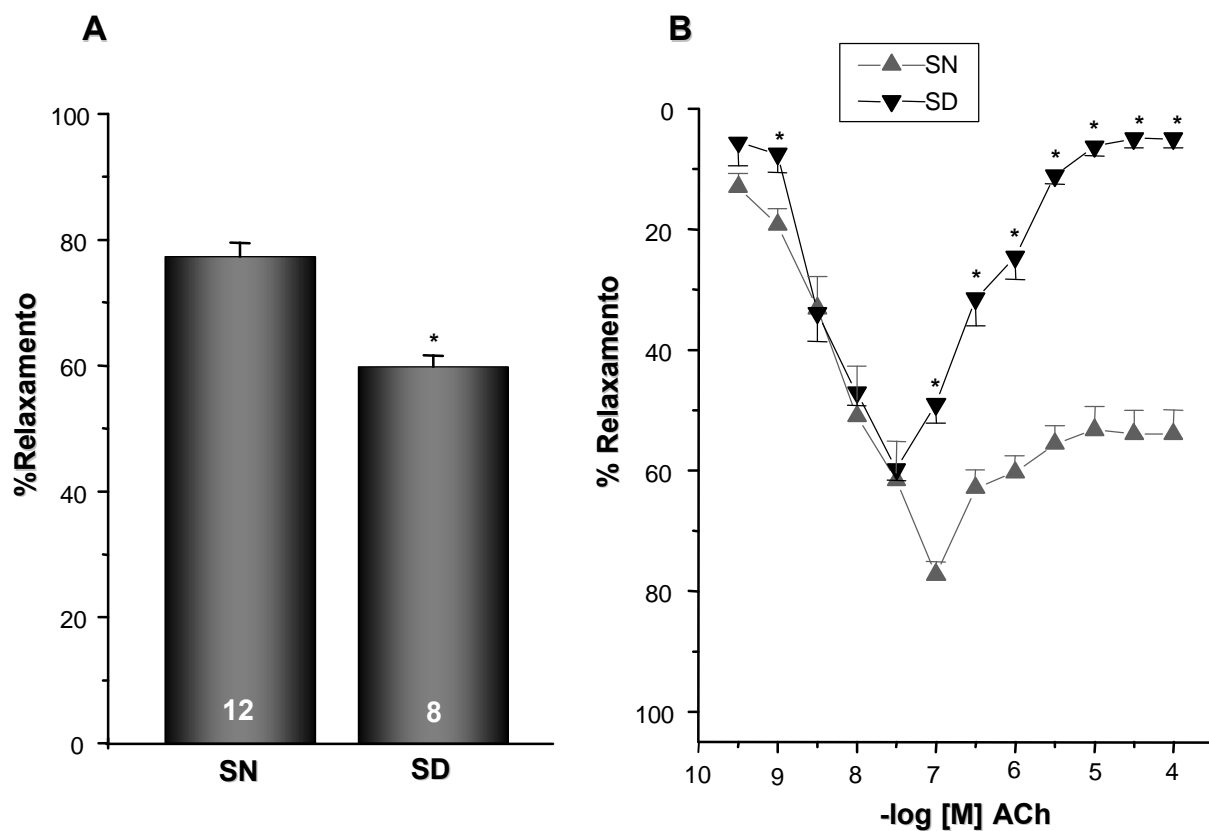


Figura 8 A – Respostas máximas de relaxamento à acetilcolina em anéis de aorta isolados de fêmeas SN e SD. Os números nas barras representam o tamanho da amostra. Os valores estão expressos em média ± EPM. **B** – Curvas concentração-efeito à acetilcolina obtidas em anéis de aorta isolados de fêmeas SN e SD.

*p<0,05 em comparação a SN.

4.4.2 CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (NPS), AGENTE VASODILATADOR INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO.

Em relação ao agente vasodilatador independente de endotélio, nitroprussiato de sódio, não foram observadas alterações de respostas em SHR macho desnutrido *in utero*, tanto em anéis de aorta com endotélio quanto em anéis sem endotélio, quando comparados aos SHR nutridos *in utero* (Tabela 8 - Figura 9).

Nas fêmeas SHR desnutridas *in utero* não foram observadas alterações de relaxamento máximo induzido por esse vasodilatador (Tabela 9 - Figura 10). Contudo, ocorreu aumento significativo da sensibilidade em anéis de aorta sem endotélio isolados de fêmeas SHR desnutridas *in utero* (Tabela 9 - Figura 10).

Tabela 8 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e relaxamento máximo (%) ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de machos SHR.

Grupo (n)	Relaxamento Máximo (%)^a	EC_{50} ($\times 10^{-10}M$)^b
SN (E+) (10)	97,5 \pm 1,0	5,8(3,1-10,1)
SD (E+) (5)	100,0 \pm 0,1	4,5(5,5-7,1)
SN (E-) (10)	98,0 \pm 0,8	2,8(1,3-6,0)
SD (E-) (5)	100,0 \pm 0,1	3,0(2,0-9,0)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); SN, SHR nutrido *in utero*; SD, SHR desnutrido *in utero*; Teste de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer; (n) número de animais.

Tabela 9 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e relaxamento máximo (%) ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de fêmeas SHR.

Grupo (n)	Relaxamento Máximo (%)^a	EC_{50} ($\times 10^{-10}$ M)^b
SN (E+) (8)	98,1 \pm 0,9	4,0(1,5-11,1)
SD (E+) (6)	98,3 \pm 1,3	3,6(0,8-16,4)
SN (E-) (8)	98,8 \pm 0,8	6,2(3,5-11,1)
SD (E-) (6)	100,0 \pm 0,1	1,1(0,5-2,5)*

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); SN, SHR nutrida *in utero*; SD, SHR desnutrida *in utero*; Teste de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ em comparação com SN (E-); (n) número de animais.

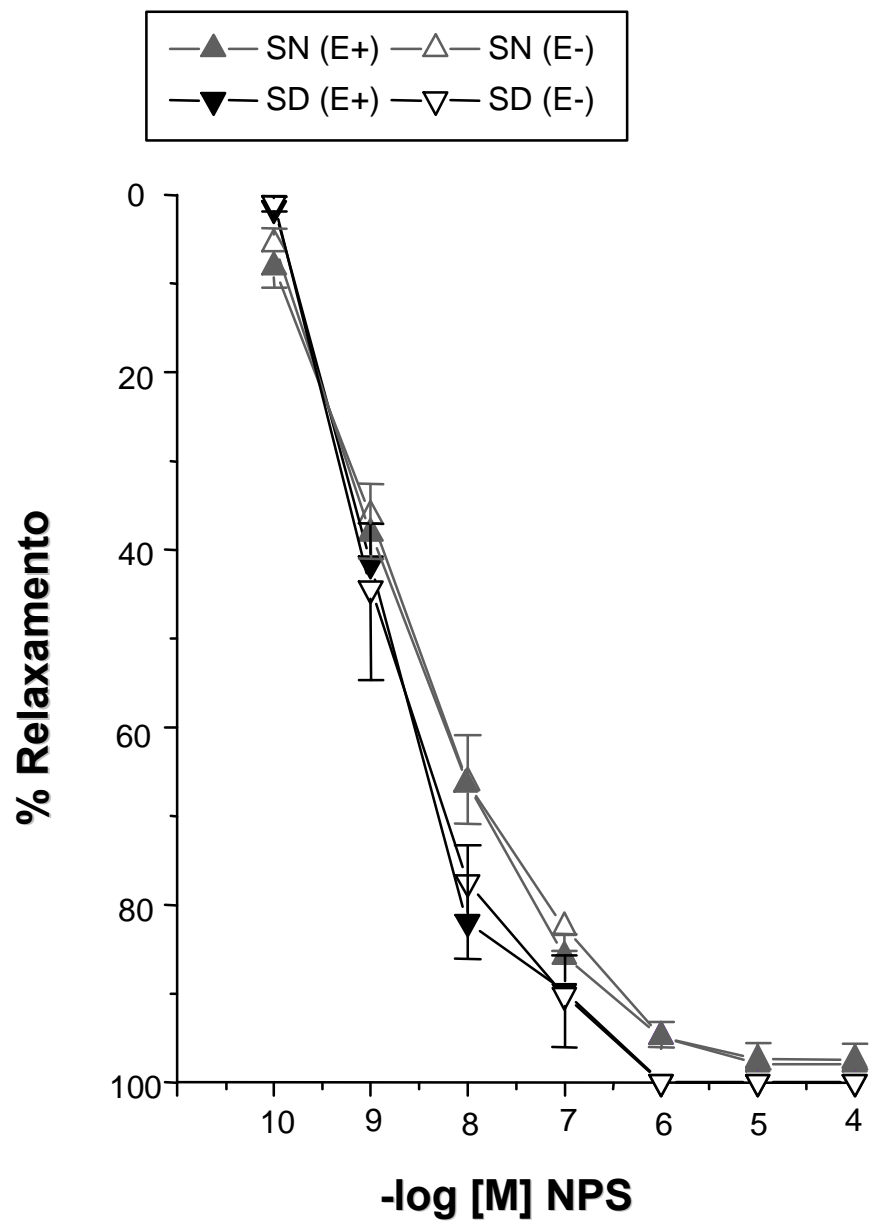


Figura 9 – Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em anéis de aorta isolados de machos SN e SD.

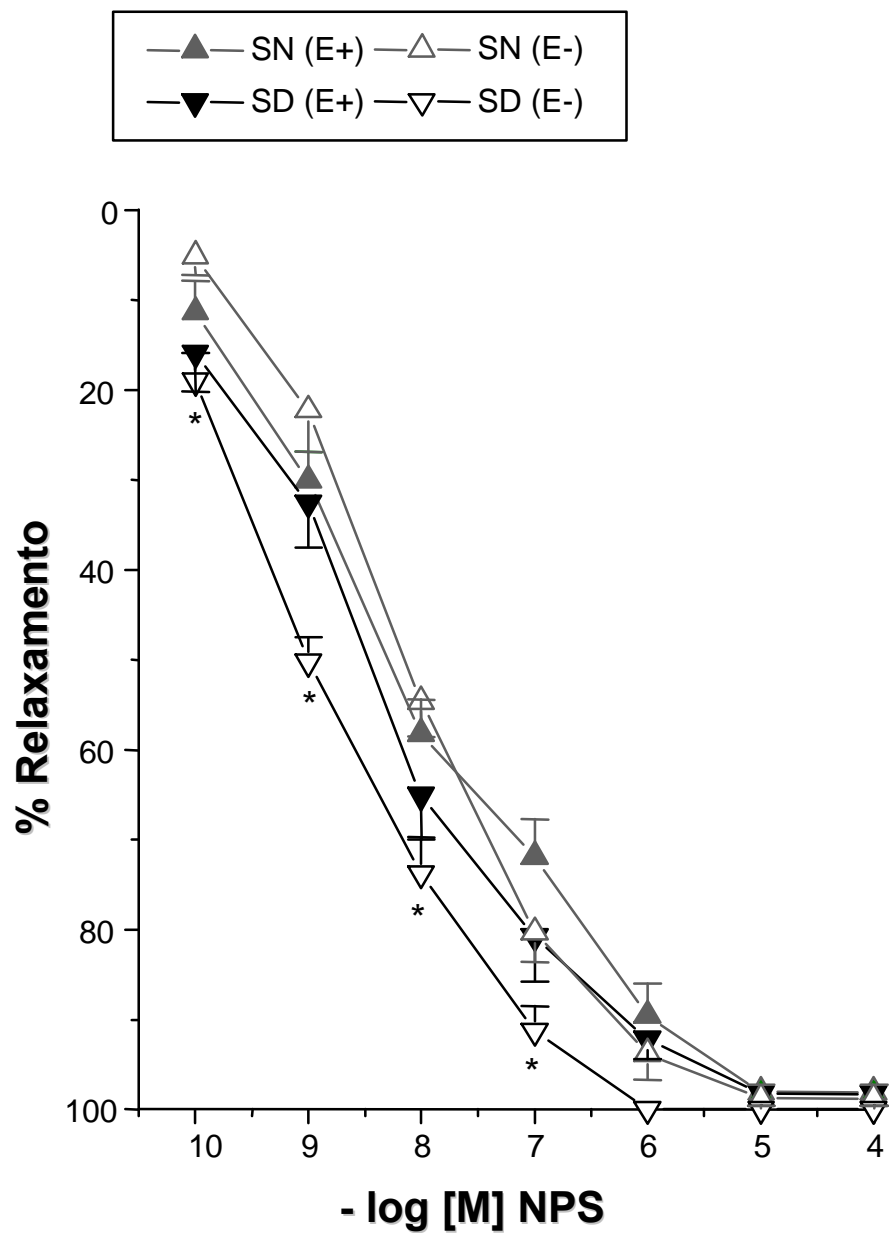


Figura 10 – Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em anéis de aorta isolados de fêmeas SN e SD.

* $p < 0,05$ em comparação a SN (E-).

4.4.3 CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO AO AGENTE VASOCONSTRITOR NORADRENALINA (NA).

Em anéis de aorta isolados de animais SHR nutridos *in utero*, de ambos os sexos, a retirada do endotélio promoveu aumento da resposta vasoconstritora à noradrenalina (Tabela 10 e 11). Por outro lado, em animais SHR desnutridos *in utero*, tanto em machos (Tabela 10 - Figura 11) quanto em fêmeas (Tabela 11 - Figura 12), foi observado aumento significativo da resposta máxima em anéis de aorta com endotélio quando comparados aos respectivos nutridos *in utero*. Entretanto, em animais desnutridos não foi observada alterações de resposta do músculo liso vascular a esse agente vasoconstritor quando comparados aos respectivos nutridos *in utero* (Tabela 10 e 11). Além disso, em anéis de aorta com endotélio isolados de machos SHR desnutridos *in utero* foi observada significativa diminuição de sensibilidade quando comparado aos anéis sem endotélio (Tabela 10).

Tabela 10 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e resposta máxima (RM) à noradrenalina (NA) em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de machos SHR.

Grupo (n)	RM (gramas de tensão) ^a	EC_{50} ($\times 10^{-7}$ M) ^b
SN (E+) (7)	2,5 \pm 0,1	1,1(0,6-2,1)
SD (E+) (6)	3,6 \pm 0,2**	3,5(1,9-6,5)†††
SN (E-) (7)	3,4 \pm 0,2*	0,5(1,8-1,5)
SD (E-) (6)	4,2 \pm 0,3	0,3(0,1-0,6)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); SN, SHR nutrido *in utero*; SD, SHR desnutrido *in utero*; Teste de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ em comparação com SN (E+); ** $p < 0,01$ em comparação com SN (E+); ††† $p < 0,001$ em comparação com SD (E-); (n) número de animais.

Tabela 11 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e resposta máxima (RM) à noradrenalina (NA) em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de fêmeas SHR.

Grupo (n)	RM (gramas de tensão) ^a	EC_{50} ($\times 10^{-7}$ M) ^b
SN (E+) (7)	2,2 \pm 0,1	10,7(6,1-19,1)
SD (E+) (10)	2,8 \pm 0,1**	5,3(2,3-12,0)
SN (E-) (6)	3,5 \pm 0,2***	4,2(3,6-11,0)
SD (E-) (8)	3,1 \pm 0,1	3,8(2,7-5,3)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); SN, SHR nutrida *in utero*; SD, SHR desnutrida *in utero*; Teste de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer; ** $p < 0,01$ em comparação com SN (E+); *** $p < 0,001$ em comparação com SN (E+); (n) número de animais.

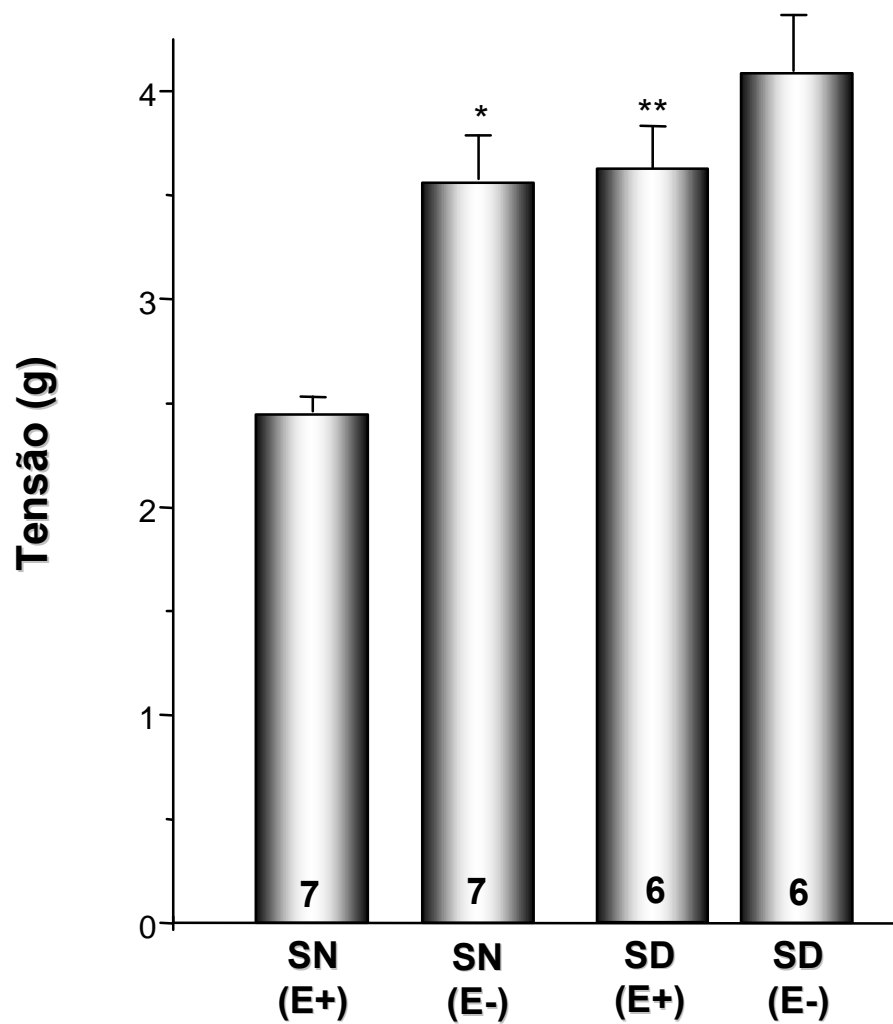


Figura 11 – Respostas máximas (tensão em gramas) ao agente vasoconstritor noradrenalina obtidas em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de machos SN e SD. Os valores estão expressos em média \pm EPM.

Os números nas barras representam o tamanho da amostra. * $p < 0,05$ em comparação SN (E+); ** $p < 0,01$ em comparação SN (E+).

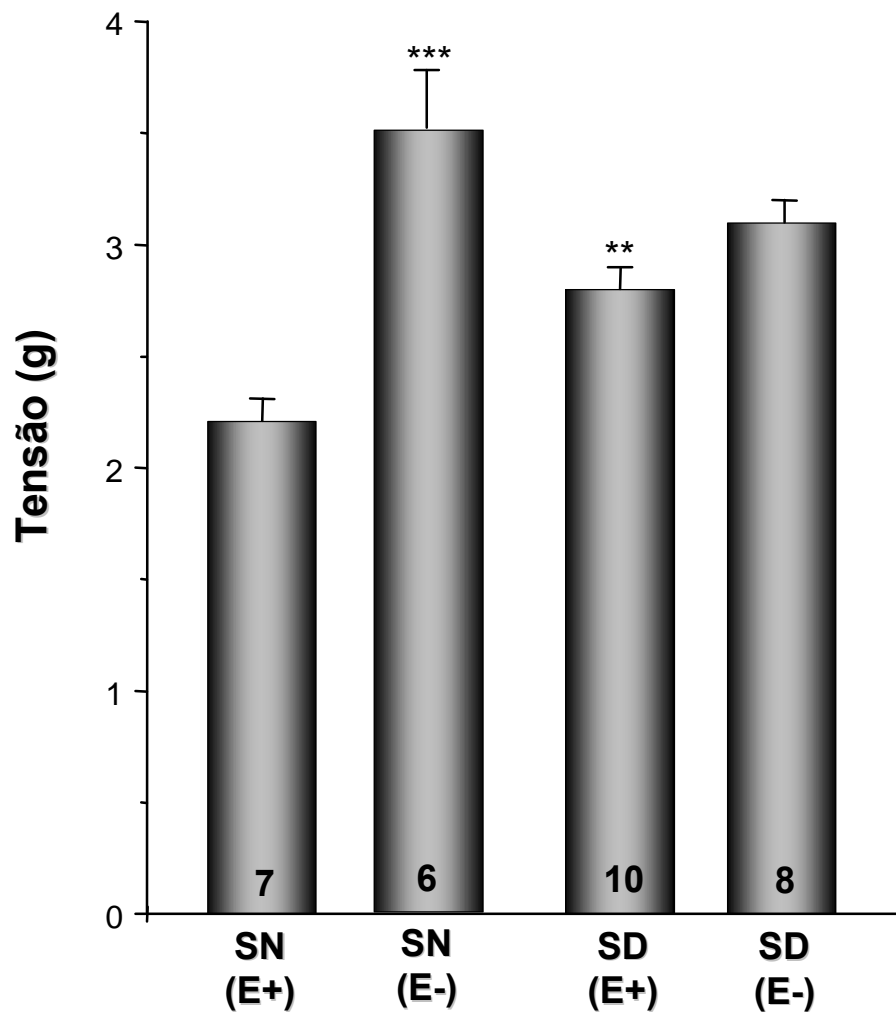


Figura 12 – Respostas máximas (tensão em gramas) ao agente vasoconstritor noradrenalina obtidas em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de fêmeas SN e SD. Os valores estão expressos em média \pm EPM.

Os números nas barras representam o tamanho da amostra. ** $p < 0,01$ em comparação SN (E+); *** $p < 0,001$ em comparação SN (E+).

4.5 ESTUDO DA REATIVIDADE VASCULAR EM AORTA ISOLADA DE ANIMAIS WISTAR.

4.5.1 CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO À ACETILCOLINA (ACh), AGENTE VASODILATADOR DEPENDENTE DE ENDOTÉLIO.

Os Wistar desnutridos *in utero*, tanto machos (Tabela 12 - Figura 13A e 13B) quanto fêmeas (Tabela 13 - Figura 14A e 14B), apresentaram resposta diminuída a esse agente vasodilatador, quando comparados aos respectivos nutridos *in utero*. Quanto à sensibilidade, não foi observada alteração significativa em machos desnutridos *in utero*. Entretanto, as fêmeas desnutridas *in utero* apresentaram diminuição significativa da sensibilidade à ACh (Tabela 13 - Figura 14A e 14B, respectivamente).

Tabela 12 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e relaxamento máximo (%) à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta com endotélio (E+) isolados de machos Wistar.

Grupo (n)	Relaxamento Máximo (%)^a	EC_{50} ($\times 10^{-7}$ M)^b
WN (E+) (11)	98,8 \pm 0,8	1,6(1,1-2,4)
WD (E+) (7)	89,4 \pm 1,9*	1,2(0,9-1,5)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); WN, Wistar nutrido *in utero*; WD, Wistar desnutrido *in utero*; Teste “t” de Student; *p<0,05 em comparação com WN (E+); (n) número de animais.

Tabela 13 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e relaxamento máximo (%) à acetilcolina (ACh) em anéis de aorta com endotélio (E+) isolados de fêmeas Wistar.

Grupo (n)	Relaxamento Máximo (%)^a	EC_{50} ($\times 10^{-7}$ M)^b
WN (E+) (11)	99,1 \pm 0,8	0,7 (0,6-0,9)
WD (E+) (7)	87,7 \pm 2,5*	1,8 (0,9-3,5) ₊₊

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); WN, Wistar nutrida *in utero*; WD, Wistar desnutrida *in utero*; Teste “t” de Student; * $p < 0,05$ em comparação com WN (E+); ++ $p < 0,001$ em comparação com WN (E+); (n) número de animais.

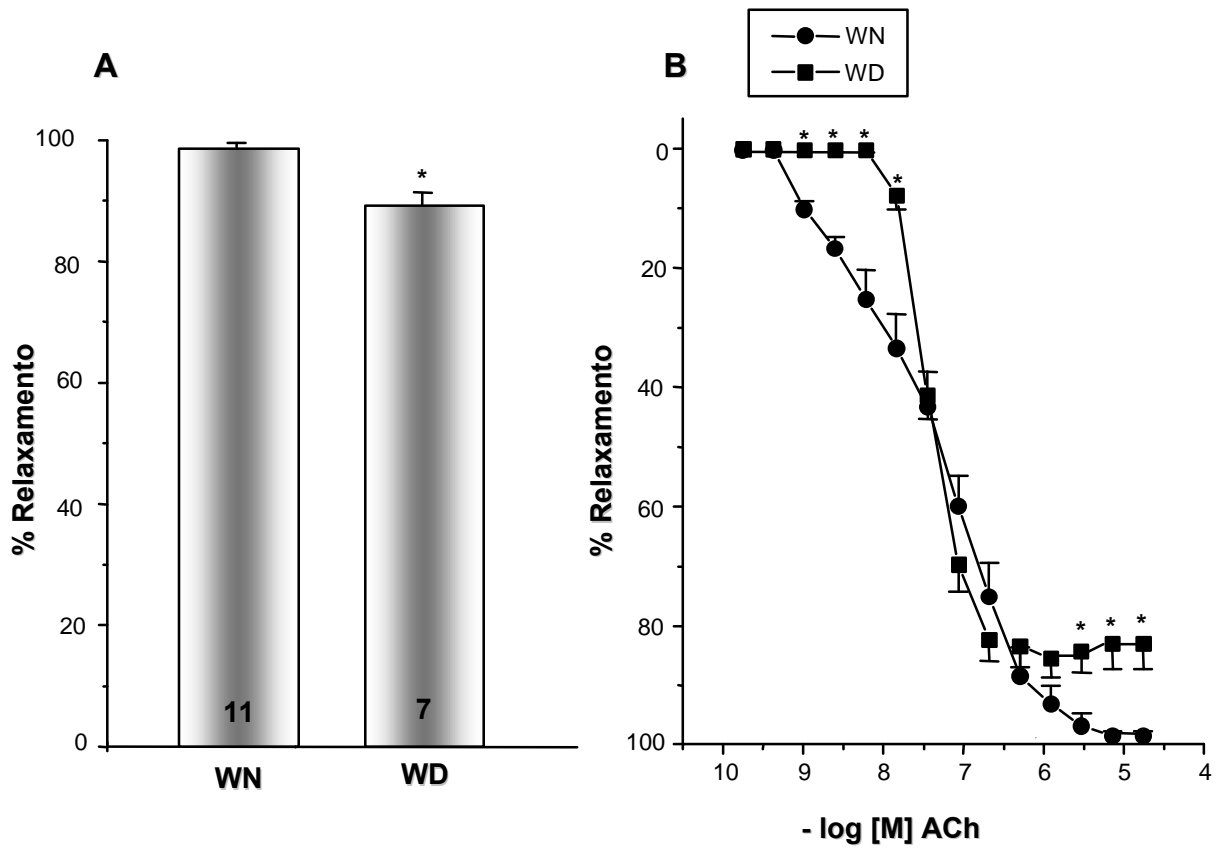


Figura 13 A – Respostas máximas de relaxamento à acetilcolina em anéis de aorta isolados de machos WN e WD. Os números nas barras representam o tamanho da amostra. Os valores estão expressos em média ± EPM. B – Curvas concentração-efeito à acetilcolina obtidas em anéis de aorta isolados de machos WN e WD.

*p<0,05 em comparação ao WN.

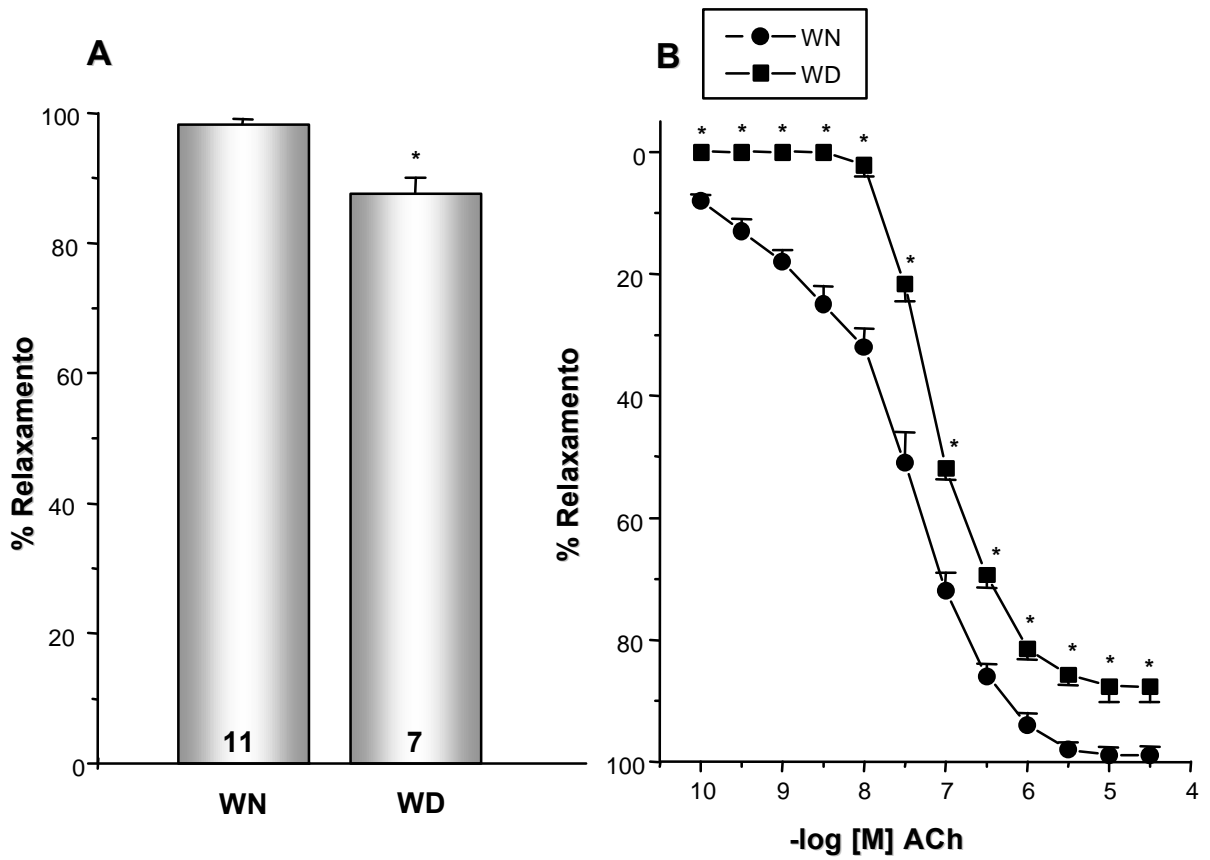


Figura 18 A – Respostas máximas de relaxamento à acetilcolina em anéis de aorta isolados de fêmeas WN e WD. Os números nas barras representam o tamanho da amostra. Os valores estão expressos em média ± EPM. B – Curvas concentração-efeito à acetilcolina obtidas em anéis de aorta isolados de fêmeas WN e WD.

* $p < 0,05$ em comparação a WN.

4.5.1 CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO AO NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (NPS), AGENTE VASODILATADOR INDEPENDENTE DO ENDOTÉLIO.

Não foram observadas em Wistar desnutridos *in utero*, tanto em machos (Tabela 14 - Figura 15) quanto em fêmeas (Tabela 15 - Figura 16), alterações de relaxamento máximo e de sensibilidade quando comparados aos respectivos controles nutridos *in utero*.

Tabela 14 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e relaxamento máximo (%) ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de machos Wistar.

Grupo (n)	Relaxamento Máximo (%) ^a	EC_{50} ($\times 10^{-10}$ M) ^b
WN (E+) (8)	98,3 \pm 1,1	0,6(0,2-2,0)
WD (E+) (5)	99,2 \pm 0,8	0,4(0,3-0,6)
WN (E-) (8)	98,3 \pm 0,9	2,0(0,6-6,6)
WD (E-) (5)	97,5 \pm 1,4	1,5(1,2-1,9)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); WN, Wistar nutrido *in utero*; WD, Wistar desnutrido *in utero*; Teste de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer; (n) número de animais.

Tabela 15 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e relaxamento máximo (%) ao nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de fêmeas Wistar.

Grupo (n)	Relaxamento Máximo (%)^a	EC_{50} ($\times 10^{-10}$ M)^b
WN (E+) (6)	98,3 \pm 0,9	1,9(0,6-6,6)
WD (E+) (5)	99,0 \pm 0,9	1,5(0,9-2,3)
WN (E-) (6)	98,4 \pm 0,7	2,6(1,8-3,8)
WD (E-) (5)	97,8 \pm 1,4	2,1(1,6-2,7)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); WN, Wistar nutrida *in utero*; WD, Wistar desnutrida *in utero*; Teste de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer; (n) número de animais.

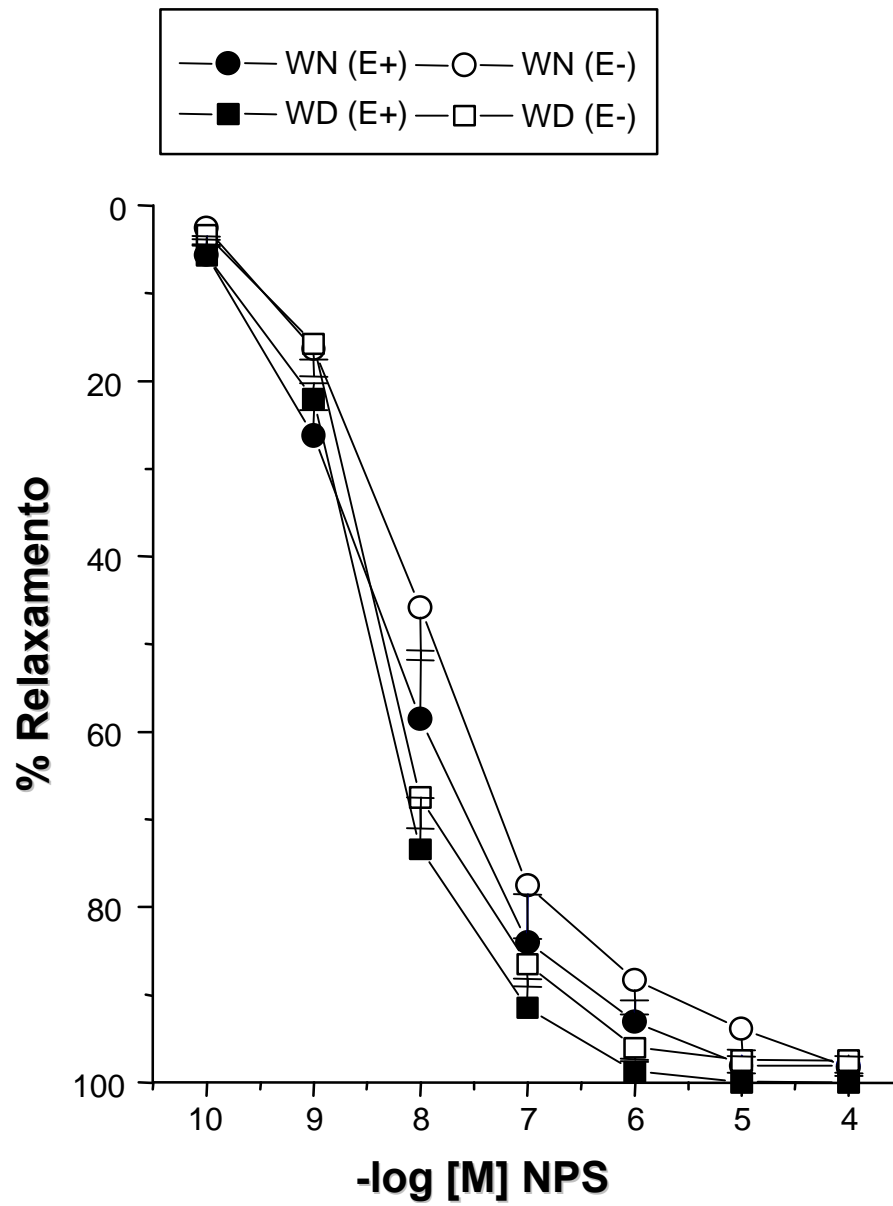


Figura 15 – Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em anéis de aorta isolados de machos WN e WD.

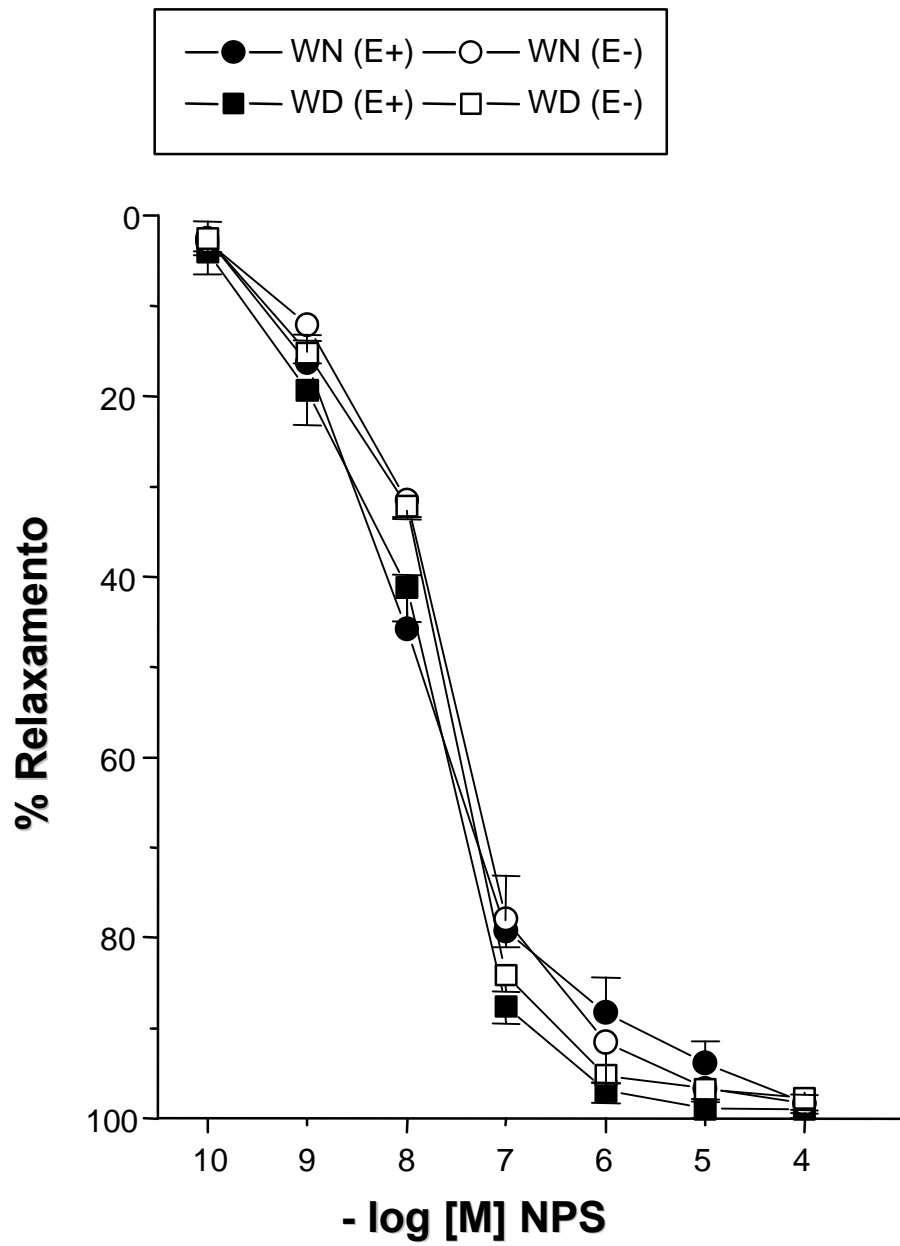


Figura 16 – Curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em anéis de aorta isolados de fêmeas WN e WD.

4.5.3 CURVA CONCENTRAÇÃO-EFEITO AO AGENTE VASOCONSTRITOR NORADRENALINA (NA)

Em anéis de aorta isolados de animais Wistar nutridos *in utero*, de ambos os sexos, a retirada do endotélio promoveu aumento da resposta vasoconstritora à noradrenalina (Tabela 16 e 17).

Foi observado em Wistar desnutridos *in utero*, tanto em machos (Tabela 16 - Figura 17) quanto em fêmeas (Tabela 17 - Figura 18), aumento significativo da resposta máxima em anéis de aorta com endotélio quando comparados aos respectivos nutridos *in utero*. Entretanto, em animais desnutridos não foi observada alterações de resposta do músculo liso vascular a esse agente vasoconstritor quando comparados aos respectivos nutridos *in utero* (Tabela 16 e 17). Por outro lado, ocorreu hipersensibilidade à NA em anéis de aorta com endotélio isolados de machos (Tabela 16) e de fêmeas (Tabela 17) desnutridos *in utero*.

Tabela 16 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e resposta máxima (RM) à noradrenalina (NA) em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de machos Wistar.

Grupo (n)	RM (gramas de tensão) ^a	EC_{50} ($\times 10^{-7}$ M) ^b
WN (E+) (8)	2,6 \pm 0,1	1,9(1,4-2,5)
WD (E+) (11)	3,1 \pm 0,1*	2,5(1,5-4,3) ₊₊₊
WN (E-) (8)	3,4 \pm 0,1***	1,2(0,4-3,1) ₊₊₊
WD (E-) (8)	3,1 \pm 0,2	1,3(0,4-3,2)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); WN, Wistar nutrido *in utero*; WD, Wistar desnutrido *in utero*; Teste de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer; * $p < 0,05$ em comparação com WN (E+); *** $p < 0,001$ em comparação com WN (E+); +++ $p < 0,001$ em comparação com WN (E+); (n) número de animais.

Tabela 17 - Efeitos da desnutrição intra-uterina na sensibilidade (EC_{50}) e resposta máxima (RM) à noradrenalina (NA) em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de fêmeas Wistar.

Grupo (n)	RM (gramas de tensão) ^a	EC_{50} ($\times 10^{-10}$ M) ^b
WN (E+) (7)	2,1 \pm 0,1	13,1(6,4-26,6)
WD (E+) (10)	3,3 \pm 0,2***	1,9(1,1-2,5) †††
WN (E-) (8)	3,7 \pm 0,2***	6,2(3,5-11,3) ††
WD (E-) (8)	3,4 \pm 0,1	6,5(4,4-12,6)

^a Resultados expressos como média \pm EPM; ^b resultados expressos como média e (intervalo de confiança de 95%); WN, Wistar nutrida *in utero*; WD, Wistar desnutrida *in utero*; Teste de variância (ANOVA) seguido de teste de Tukey-Kramer; *** $p < 0,001$ em comparação com WN (E+); †† $p < 0,01$ em comparação com WN (E+); ††† $p < 0,001$ em comparação com WN (E+); (n) número de animais.

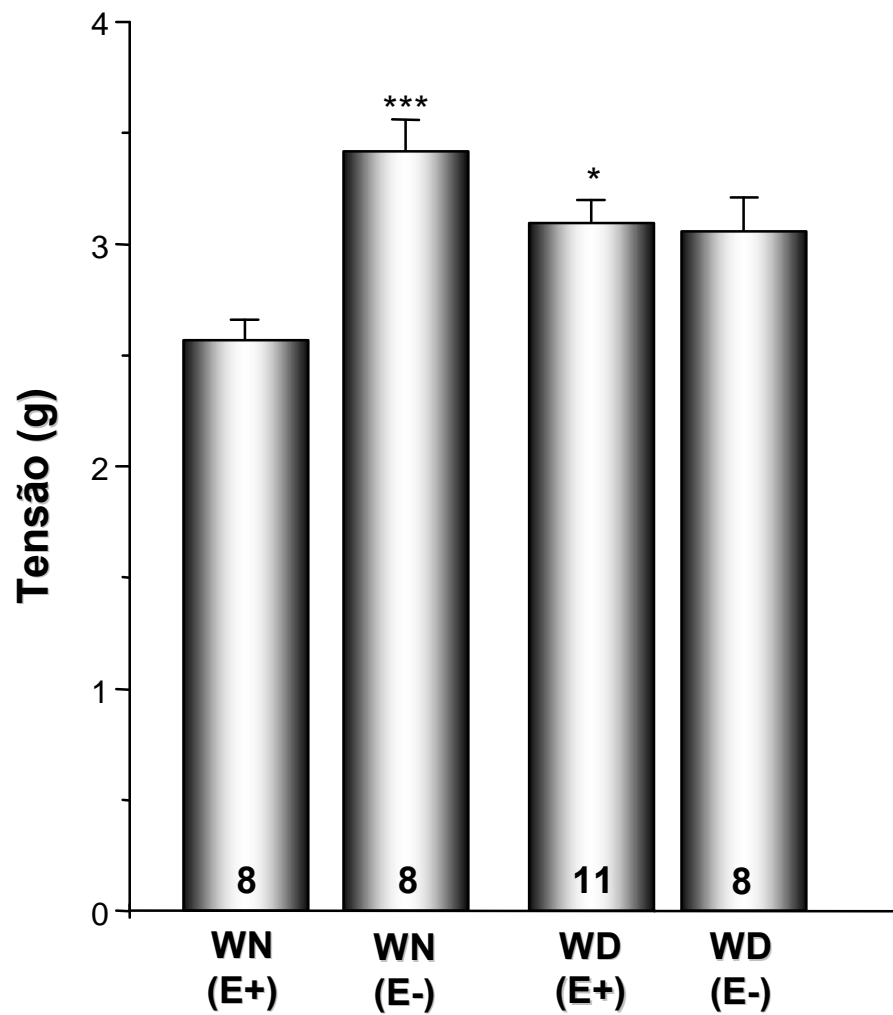


Figura 17 – Respostas máximas (tensão em gramas) ao agente vasoconstritor noradrenalina obtidos em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de machos WN e WD. Os valores estão expressos em média \pm EPM.

Os números nas barras representam o tamanho da amostra. * $p < 0,05$ em comparação WN (E+); *** $p < 0,001$ em comparação WN (E+).

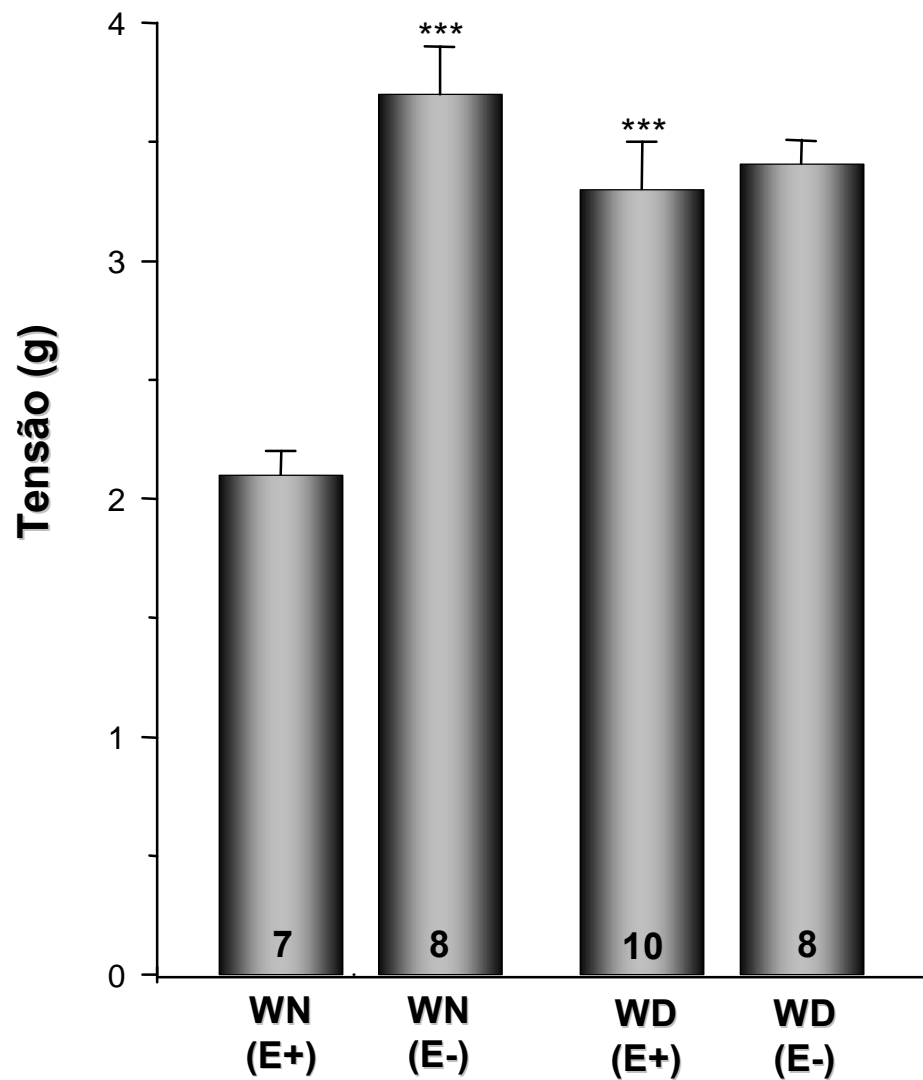


Figura 18 – Respostas máximas (tensão em gramas) ao agente vasoconstritor noradrenalina obtidos em anéis de aorta com endotélio (E+) e sem endotélio (E-) isolados de fêmeas WN e WD. Os valores estão expressos em média \pm EPM.

Os números nas barras representam o tamanho da amostra. *** $p < 0,001$ em comparação WN (E+).

5.0 DISCUSSÃO

Atualmente, acredita-se que qualquer grau de nutrição subótima durante a gestação pode acarretar danos permanentes à fisiologia e ao metabolismo fetal, além de poder contribuir para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares no futuro. De fato, vários estudos demonstraram que recém-nascidos que sofreram desnutrição intra-uterina apresentam maiores chances de desenvolver hipertensão arterial quando adultos e também apresentam elevado risco de mortalidade por isquemia cardíaca (OSMOND et al.,1993). Logo, o estudo do papel da desnutrição intra-uterina no desenvolvimento de doenças cardiovasculares torna-se de extrema importância.

No presente trabalho demonstrou-se que a restrição alimentar durante a gestação resultou em severa diminuição do peso materno e também ocasionou retardamento do crescimento fetal, caracterizado pela redução do peso ao nascer das proles. Além disso, a desnutrição intra-uterina acarretou elevação dos níveis pressóricos de animais Wistar, tornando-os hipertensos e também dos animais SHR agravando a hipertensão já existente. Essas alterações parecem ocorrer: 1) independentemente do sexo dos animais, pois foram observadas em machos e fêmeas de ambas as linhagens estudadas; 2) independentemente da linhagem estudada, pois foram observadas tanto em animais SHR quanto em Wistar.

Dados clínicos e experimentais dão suporte a estas observações. ROSEBOOM et al. (1999) demonstraram, por estudo retrospectivo, que crianças

nascidas na Holanda no período de 1944 à 1945, quando o consumo calórico médio da população era de 600 cal/dia, apresentaram baixo peso ao nascer e na fase adulta exibiram maior mortalidade por hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares. Outros estudos epidemiológicos tem demonstrado que o baixo peso ao nascer em associação com o crescimento desproporcional do feto e também com o aumento do peso da placenta são prenúncio do aparecimento de anomalias no sistema cardiovascular (BARKER et al., 1990; BARKER et al., 1993; LAW et al., 1993; NICOLANTONIO et al., 2000). Também em estudos experimentais, utilizando vários tipos de dietas deficientes e/ou carenciais durante a gestação, observou-se a redução do peso ao nascer, bem como a elevação dos níveis pressóricos da prole adulta (LANGLEY-EVANS 1996; WOODALL et al., 1996; LANGLEY-EVANS 1997). Portanto, nossos dados juntamente com os da literatura sugerem que o risco de desenvolver hipertensão arterial pode ser determinado durante a vida fetal, e que a desnutrição intra-uterina pode ser o fator desencadeante de uma série de eventos que pode levar ao aparecimento de hipertensão arterial na fase adulta.

Muitas hipóteses tem sido propostas na tentativa de esclarecer a elevação da pressão arterial em animais submetidos à desnutrição intra-uterina. Alguns autores tem associado esse aumento de pressão arterial à diminuição da atividade da enzima 11- β HSD₂ placentária e, conseqüente, excesso de exposição do feto aos glicocorticóides de origem materna (VAN UUM et al., 1998). De fato, LINDSAY et al. (1996) demonstraram que a inibição farmacológica dessa enzima durante a gestação produz diminuição do peso ao nascer e elevação dos níveis pressóricos na prole adulta. Dessa forma, pode-se propor que a atividade normal da 11- β HSD₂

placentária é crucial para a prevenção da ação deletéria dos glicocorticóides maternos sobre o desenvolvimento fetal. Além disso, muitos trabalhos tem demonstrado que a exposição a glicocorticóides *in utero* pode promover o desenvolvimento de hipertensão arterial na fase adulta. BENEDIKTSSON et al. (1993) observaram que o tratamento de ratas prenhes com dexametasona (glicocorticóide sintético) acarreta aumento da pressão arterial na prole adulta. Por outro lado, a supressão dos glicocorticóides maternos previne a elevação dos níveis pressóricos induzido pela desnutrição intra-uterina (LINDSAY et al., 1996; GARDNER et al., 1997; LANGLEY-EVANS, 1997).

A exposição a glicocorticóides *in utero* pode promover elevação dos níveis pressóricos por ações diretas e/ou indiretas em leitos vasculares. De fato, a exposição a esses esteróides *in utero* promove alteração da atividade simpática devido ao aumento da expressão de receptores adrenérgicos (SECKL et al., 1995), diminuição da síntese de prostaciclina (PGI₂) (JUN et al., 1999), modificações do sistema renina-angiotênsina (SRA) e hipersensibilidade dos vasos sanguíneos às ações vasoconstritoras da ANG-II (LANGLEY-EVANS et al., 1999). Portanto, o excesso de exposição a glicocorticóides maternos pode desempenhar papel importante na programação da hipertensão arterial.

Para investigar se alterações da reatividade vascular estariam envolvidas nos efeitos da desnutrição intra-uterina sobre a pressão arterial observados em prole de ratos Wistar e SHR, foram utilizados anéis de aorta torácica isoladas de animais nutridos e desnutridos *in utero*, de ambas as linhagens.

Estudando a reatividade vascular à acetilcolina e à noradrenalina, foi possível observar que a desnutrição intra-uterina alterou, de modo significativo, a resposta da

aorta torácica a estes agentes. Preparações isoladas de animais Wistar e SHR desnutridos *in utero* apresentaram resposta diminuída ao agente vasodilatador dependente de endotélio e hiperreatividade àNA. Isto sugere que a desnutrição intra-uterina é capaz de modificar a reatividade de macrovaso isolado de animais Wistar e SHR. Nossos resultados diferem dos de OZAKI et al. (1998). Esses autores observaram em artéria femoral isolada de ratos Wistar desnutridos *in utero* que a resposta vasoconstritora à noradrenalina não estava alterada. Isto pode indicar heterogeneidade anatômica dos efeitos deletérios da desnutrição intra-uterina sobre a reatividade vascular. À semelhança do observado por nós HOLEMANS et al. (1998) observaram diminuição de resposta à acetilcolina utilizando leito mesentérico isolado de machos Wistar desnutridos *in utero*. Isto pode levar à sugestão que a desnutrição intra-uterina altera o relaxamento endotélio-dependente tanto em vaso de condução (aorta) como em vasos de resistência (leito mesentérico) podendo ser um fenômeno mais geral.

Muitos mecanismos poderiam explicar a resposta diminuída à ACh observada nos animais Wistar e SHR desnutridos *in utero*. A nossa primeira hipótese seria que a desnutrição intra-uterina induziu a redução do número de receptores muscarínicos M₃ na célula endotelial da aorta torácica desses animais. Isto porque o possível excesso de exposição a glicocorticóides resultante da desnutrição materna durante a gestação, poderia estar acarretando diminuição da expressão de receptores muscarínicos. Alguns trabalhos tem demonstrado que glicocorticóides modulam a expressão de receptores muscarínicos. EMALA et al. (1997) observaram que os glicocorticóides atenuam a expressão de receptores muscarínicos M₃ do músculo liso das vias aéreas. Por outro lado, EMALA et al. (1995) demonstraram que esse

esteróide adrenal pode aumentar a expressão de receptores muscarínicos M_2 no músculo da traquéia. Contudo, não foram encontrados relatos sobre o controle de expressão desses receptores por glicocorticóides em vasos sanguíneos. Não podemos portanto excluir ou aceitar essa hipótese.

A vasodilatação induzida pela ACh é totalmente dependente do endotélio, logo, ela funciona como marcador da função endotelial. Considerando que o óxido nítrico (NO) é o principal mediador dessa vasodilatação, tanto a hiposensibilidade quanto a diminuição de relaxamento máximo, observados nas proles de ratos Wistar e SHR desnutridos *in utero* podem ser decorrentes de: 1) menor sensibilidade do músculo liso vascular ao NO; 2) menor atividade da óxido nítrico sintase (NOS); 3) aumento da geração de radical superóxido que provocaria aumento da inativação de NO.

Para avaliar a capacidade de resposta do músculo liso vascular ao NO, foram realizadas curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio (doador de NO). Considerando que as preparações isoladas de Wistar desnutridos *in utero*, de ambos os sexos, não apresentaram alteração de resposta a esse agente vasodilatador independente de endotélio, pode-se descartar que a resposta diminuída à ACh seja devida à diminuição de resposta do músculo liso ao NO. O mesmo ocorreu em preparações isoladas de machos SHR desnutridos *in utero*. Contudo, como em fêmeas dessa linhagem a resposta ao NPS em anéis de aorta sem endotélio estava aumentada pode-se sugerir que houve aumento da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO. Essa hipersensibilidade pode ser interpretada como tentativa do músculo liso vascular de compensar a resposta diminuída à ACh promovida pela desnutrição intra-uterina, entretanto sem sucesso, pois no vaso intacto a resposta

está diminuída. Esses dados em conjunto levam à sugestão que a resposta diminuída à ACh observada nos animais desnutridos *in utero*, de ambas as linhagens, não é resultante da diminuição da sensibilidade do músculo liso vascular ao NO.

A desnutrição intra-uterina pode estar promovendo menor atividade da óxido nítrico sintase (NOS) em aorta isolado de animais Wistar e SHR. A NOS é a enzima responsável pela síntese de NO, logo a diminuição de sua atividade acarretaria redução da produção de NO que explicaria o relaxamento diminuído induzido pela acetilcolina. Muitos trabalhos na literatura tem associado alguns modelos de hipertensão, tal como a hipertensão DOCA-sal e a DAHL-sal sensível com a diminuição da atividade da NOS (NAVA et al., 1997). Entretanto, no modelo experimental de hipertensão essencial SHR a atividade das NOS está inalterada ou até mesmo aumentada (LUSCHER & BARTON, 1997; NAVA et al., 1997). Se porém no modelo de hipertensão induzida pela desnutrição intra-uterina há diminuição de atividade de NOS em Wistar e SHR não podemos concluir com os presentes dados.

A resposta diminuída à acetilcolina induzida pela desnutrição intra-uterina observada tanto em animais Wistar quanto em SHR, também pode estar envolvido o aumento da geração de espécies reativas do oxigênio (ERO), tal como o ânion superóxido (O_2^-), acarretando maior inativação de NO pois o ânion superóxido reage rapidamente com o NO formando o radical hidroxila (OH). O aumento da produção de radicais superóxidos está associado ao estado hipertensivo. De fato, vários modelos experimentais, tal como a hipertensão DOCA-sal e a hipertensão essencial SHR apresentam aumento da produção de O_2^- acarretando a inativação de NO (NAVA et al., 1997). Porém, são necessários outros estudos para comprovar se na

hipertensão induzida pela desnutrição intra-uterina também há o aumento de geração de espécies reativas de oxigênio.

Em anéis de aorta isolados de animais SHR, nutrido e desnutridos *in utero*, a ACh induziu resposta bifásica, isto é, relaxamento nas menores e contração nas maiores concentrações. A vasodilatação à ACh é resultante da interação desse vasodilatador com receptores muscarínicos M₃ estimulando a liberação simultânea de EDRFs, tal como o NO, e EDCFs (LUSCHER & VANHOUTTE, 1986; BOULANGER et al., 1994). Tem sido demonstrado que o EDCF envolvido nessa contração dependente do endotélio é metabólito do ácido araquidônico via cicloxigenase, uma vez que a resposta pode ser abolida por indometacina (LUSCHER & VANHOUTTE, 1986). Este fator foi demonstrado posteriormente ser o prostanóide vasoconstritor PGH₂ (KATO et al., 1988). No presente trabalho observamos que a desnutrição intra-uterina foi capaz de promover em animais SHR aumento da fase contrátil da curva bifásica, sugerindo que na resposta diminuída à ACh observada nesses animais pode também estar envolvido o aumento da síntese/liberação de EDCFs. Em animais Wistar nutridos ou desnutridos *in utero*, porém, não foi observada a curva bifásica. Isto pode indicar que na alteração de reatividade à ACh promovida pela desnutrição intra-uterina nesses animais há menor desequilíbrio da síntese de fatores endoteliais, que explicaria a redução de resposta relaxante à ACh, sem entretanto permitir o aparecimento de fase contrátil.

Em resumo, podemos sugerir que a desnutrição intra-uterina promoveu nos animais Wistar e SHR, diminuição de resposta à ACh. Essa alteração de relaxamento parece ocorrer independentemente do sexo dos animais e também da linhagem estudada, uma vez que foi observada tanto em animais SHR quanto em

Wistar, de ambos os sexos. Contudo, não podemos afirmar qual é o mecanismo exato pelo qual a desnutrição intra-uterina induziu essa alteração, podemos sugerir o possível envolvimento de: 1) redução da expressão de receptores muscarínicos M₃; 2) alteração da função moduladora do endotélio sobre a reatividade vascular a esse agente vasodilatador; 3) ambas.

A desnutrição intra-uterina alterou a resposta vasoconstritora à NA apenas em anéis de aorta com endotélio intacto pois a resposta induzida pela NA em anéis de aorta sem endotélio isolados de animais Wistar e SHR desnutridos *in utero* foi semelhante a aquela induzida em anéis de aorta sem endotélio isolados dos respectivos controles nutridos. Isto indica que a capacidade contrátil do músculo liso vascular não foi alterada pela desnutrição intra-uterina, pelo menos no que se refere a esse agente vasoconstritor.

A hiperreatividade à NA observada em anéis de aorta com endotélio isolados de Wistar e SHR desnutridos *in utero* pode ser, em parte, devida ao aumento da expressão de receptores α -adrenérgico na célula endotelial. De fato, alguns autores tem proposto que a exposição a glicocorticóides pode modular expressão de receptores adrenérgicos. Os glicocorticóides aumentam a resposta adrenérgica diretamente através do aumento da expressão de receptores α e β adrenérgicos (SECKL et al., 1995). HUFF et al. (1991) observaram no fígado de ratos expostos a glicocorticóides interconversão de receptores adrenérgicos. Foi demonstrado que os glicocorticóides também aumentam a transcrição de receptores β -adrenérgicos em pulmão de humanos (MAK et al., 1995). Logo, a desnutrição intra-uterina pode levar ao aumento da reatividade à NA através do aumento da expressão de receptores α -adrenérgicos na célula endotelial.

Alterações da produção de fatores vasoativos derivados do endotélio também podem estar envolvidos na hiperreatividade à NA induzida pela desnutrição intra-uterina, uma vez que, a noradrenalina, assim como a acetilcolina, é capaz de liberar simultaneamente EDRFs e EDCFs (NIGRO et al., 1990; ARRIBAS et al., 1994). Além dos prostanóides vasoconstritores, tal como a TXA₂ e PGH₂, outros EDCFs também são liberados via receptor α_2 -adrenérgico, como a ANG-II e a endotelina-1 (ET-1) (LUSCHER & BARTON, 1997; TABERNERO et al., 1999). O aumento da síntese/liberação desses peptídeos vasoativos podem estar contribuindo para a resposta alterada à NA. Trabalhos na literatura tem demonstrado que animais submetidos à desnutrição intra-uterina apresentam aumento do número de receptores para ANG-II (SHERMAN & LANGLEY-EVANS, 1998) e também hipersensibilidade do músculo liso vascular às ações vasoconstritoras desse peptídeo (LANGLEY-EVANS et al., 1999). MORIN et al. (1998) demonstraram que a exposição a glicocorticóides aumenta a transcrição do gene da pré-proendotelina-1 em células do músculo liso vascular de ratos. A síntese da ET-1 é controlada através do nível de transcrição, logo o aumento de RNAm acarreta, paralelamente, aumento da síntese protéica e da ação vasoconstritora desse peptídeo. Além disso, PROVENCHER et al. (1998) observaram que exposição a baixas doses de glicocorticóides acarreta aumento da expressão de pré-proendotelina-1 em aorta torácica de ratos. A desnutrição intra-uterina promovendo o aumento da síntese desses peptídeos vasoativos e/ou diminuição da produção de EDRFs poderia estar contribuindo para a hiperreatividade à NA observada nos animais Wistar e SHR.

Outro dado importante do presente trabalho e que devemos ressaltar é que como não foram observadas alterações de resposta à NA quando comparamos,

entre si, anéis de aorta com endotélio e anéis sem endotélio isolados das respectivas proles desnutridas *in utero*, podemos sugerir que a desnutrição intra-uterina foi capaz de promover acentuada alteração da célula endotelial nessas proles a ponto de anéis de aorta com endotélio responderem como se o endotélio tivesse sido removido.

Resumindo, podemos sugerir que a desnutrição intra-uterina promoveu hiperreatividade à noradrenalina e essa alteração ocorreu independente do sexo e da linhagem estudada. Além disso, podem estar ocorrendo modificações da expressão de receptores α -adrenérgico na célula endotelial e/ou aumento da síntese/liberação de EDCFs.

Para investigar se alterações do desenvolvimento renal também poderiam estar contribuindo para o aparecimento da hipertensão induzida pela desnutrição intra-uterina, foram avaliados o peso renal e o número total de néfrons de animais nutridos e desnutridos *in utero*, de ambas as linhagens. Dados na literatura tem demonstrado diminuição do peso renal (MERLET-BENICHOU et al., 1994), nefrogênese irregular, diminuição da função renal e hipertrofia glomerular em ratos submetidos à desnutrição fetal (LUCAS et al., 1997; LANGLEY -EVANS et al., 1999). Considerando que os néfrons são importantes determinantes da função renal e da pressão sanguínea, a diminuição acentuada do número total de néfrons pode estar prejudicando as funções renais e, a longo prazo, acarretando elevação da pressão arterial. BRENNER et al. (1988) concluíram que o risco de desenvolver hipertensão arterial está inversamente relacionado com o número total de néfrons. Corroborando esta hipótese, foi observada diminuição de 25% do número total de néfrons em ratos espontaneamente hipertensos quando comparados a ratos normotensos

(NYENGAARD & BENDTSEN, 1992; GERBER & STERN, 1999). No presente trabalho não detectamos alterações do peso seco de rins de animais de ambos os grupos experimentais, apenas foi observado aumento do peso total do rim de fêmeas SHR e Wistar desnutridas *in utero*, indicando edemaciamento desse órgão. No entanto, o estudo histológico demonstrou grande redução do número total de néfrons em animais desnutridos em comparação aos nutridos. Como não foram observadas alterações do peso seco dos rins de animais desnutridos podemos sugerir que a desnutrição intra-uterina promoveu hipertrofia glomerular, ou seja, aumento do diâmetro do glomérulo, provavelmente na tentativa de compensar o déficit do número de néfrons. Logo, os eventos ocorridos *in utero* podem modificar e “programar”, permanentemente, as estruturas e funções renais podendo estar também contribuindo para o desenvolvimento da hipertensão induzida pela desnutrição intra-uterina.

Em conjunto, nossos dados permitem sugerir que a desnutrição intra-uterina promove elevação dos níveis pressóricos e que alterações da reatividade vascular, bem como do desenvolvimento renal parecem estar envolvidos na hipertensão induzida pela desnutrição intra-uterina. Além disso, esses efeitos promovidos pela desnutrição intra-uterina ocorrem independentemente do sexo e da linhagem estudada.

6.0. CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados até o momento podemos concluir que:

- A desnutrição intra-uterina promoveu redução acentuada do peso ao nascer de animais Wistar e espontaneamente hipertensos (SHR).
- Os efeitos deletérios da desnutrição intra-uterina foram capazes de transformar animais considerados normotensos em hipertensos, e exacerbar a hipertensão arterial já existente em animais SHR.
- Em animais Wistar a desnutrição intra-uterina comprometeu a função moduladora de endotélio sobre a reatividade vascular, uma vez que foram observadas hiporeatividade à acetilcolina (vasodilatador dependente do endotélio), sem alteração de resposta ao NPS (vasodilatador independente do endotélio), e hiperreatividade à noradrenalina apenas em anéis de aorta com endotélio isolados desses animais.
- A desnutrição intra-uterina exacerbou a disfunção endotelial já existente em animais SHR comprometendo ainda mais a função moduladora do endotélio

sobre a reatividade vascular, pois agravou a resposta diminuída à acetilcolina e acarretou hiperreatividade à noradrenalina.

- A desnutrição intra-uterina promoveu, em ambas as linhagens estudadas, redução acentuada do número total de néfrons.
- A elevação de pressão arterial das proles desnutridas *in utero* pode ser decorrente da alteração da função moduladora do endotélio sobre a reatividade vascular e também de modificações do desenvolvimento renal.
- Os efeitos promovidos pela desnutrição intra-uterina parecem ocorrer independentemente do sexo e da linhagem estudada.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, C.; MARTÍN, M.A; GOYA, L.; BERTIN, E.; PORTHA. B.; PASCUAL-LEONE, A.M. Contrasted impact of maternal rat food restriction on the fetal endocrine pancreas. **Endocrinology.**, 138:2267-73, 1997.

ARRIBAS, S.; MARÍN, J.; PONTE, A.; BALFAGÓN, G.; SALAICES, M. Norepinephrine-induced relaxations in rat aorta mediated by endothelial beta adrenoceptors. Impairment by ageing and hypertension. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**.,270:520-27, 1994.

AUCH-SCHWELK, W. & VANHOUTTE, P.M. Contractions of endothelin in normotensive and spontaneously hypertensive rats:role of endothelium and prostaglandins. **Blood Press.**,1:45-9, 1992.

AUCH-SCHWELK, W.; KATUSIC, Z.S.; VANHOUTTE, P.M. Contractions to oxygen-derived free radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension.**,13:859-64, 1989.

BARKER, D.J.P.; OSMOND, C.; BULL, A.R.; SIMONDS, C. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **B.M.J.**,301:259-62, 1990.

BARKER, D.J.P.; OSMOND, C.; SIMMONDS, S.J.; WIELD, G.A. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. **B.M.J.**,306:422-6, 1993.

BARKER, D.J.P.; GLUCKMAN, P.D.; GODFREY, K.M.; HARDING, J.E.; OWENS, J.A.; ROBINSON, J.S. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet.**,341:939-41,1993.

BELL, D.R. Vascular smooth muscle responses to endothelial autacoids in rats with chronic coarctation hypertension. **J. Hypertens.**,11:65-74, 1993.

BENEDIKTSSON, R.; LINDSAY, R.S.; NOBLE, J.; SECKL, J.R.; EDWARDS, C. Glucocorticoid exposure in utero: a new model for adult hypertension. **Lancet.**,341:339-41, 1993.

BIAN, X.P.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Promotional role for glucocorticoids in the development of intracellular signalling: enhanced cardiac and renal adenylate cyclase reactivity to β -adrenergic and non-adrenergic stimuli after low dose fetal dexametasone exposure. **J. Devel. Physiol.**,17:289-97, 1992.

BIONDI, M.L.; DOUSA, T.; VANHOUTTE, P.M.; ROMERO, J.C. Evidences for the existence of endothelium-derived relaxing factor in the renal medulla. **Am. J. Hypertens...**,3:876-79, 1990.

BOEGEHOLD, M.A. : Enhanced arteriolar vasomotion in rats with chronic salt-induced hypertension. **Microvasc. Res...**,45:83-94,1993.

BONNARDEAUX, A.; NADAUD, S.; CHARRU, A.; JEUNEMAITRE, X.; CORVOL, P.; SOUBRIER, F. Lack of evidence for linkage of the endothelial cell nitric oxide synthase gene to essential hypertension. **Circulation...**,91:96-102, 1995.

BOULANGER, C.M. & LUSCHER, T.F. Release of endothelin from the porcine aorta; inhibition by endothelium -derived nitric oxide. **J. Clin. Invest...**,85:587-90, 1990.

BOULANGER, C.M.; MORRISON, K.J.; VANHOUTTE, P.M. M₃ muscarinic receptors mediate both endothelium-dependent contraction and relaxation to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Br. J. Pharmacol...**,112:519-24, 1994.

BRENNER, B.M; GARCIA, D.L.; ANDERSON, S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? **Am. J. Hypertension**, 1:335-47,1988.

BRUNING, T.A.; HENDRIKS, M.G.C.; CHANG, P.C.; KWYPERS, E.A.P.; VAN ZWIETEN, P.A. In vivo characterization of vasodilating muscarinic-receptor subtypes in humans. **Circ. Res.**,74:912-19, 1994.

CAMPBELL, D.F.M.; HALL, M.H.; BARKER, D.J.P.; CROSS, J.; SHELL, A.W.; GODFREY, K.M. Diet in pregnancy and the offsprings blood pressure 40 years later. **Br. J. Obstet. Gynaecol.**,103:273-80, 1996.

CHEN, G.; YAMAMOTO, Y.; MIWA, K.; SUZUKI, H. Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. **Am. J. Physiol.**,260:1888-92,1991.

DOHI, Y.; CRISCIONE, L.; LUSCHER, T.F. Renovascular hypertension impairs formation of endothelium-derived relaxing factors and sensitivity to endothelin-1 in resistance arteries. **J. Pharmacol.**,104:349-54, 1991.

EDWARDS, C.R.W.; BENETIKTSSON, R.; LINDSAY, R.S.; SECKL, J.R. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension. **Lancet.**,341:355-7,1993.

EMALA, C. W.; ARYANA, A.; LEVINE, R.P ; YASUDA, R.P ; SATKUS, S.A ; WOLFE, B.B ; HIRSHMAN, C.A. Basenji-greyhound dog: increased muscarinic receptor expression in trachealis muscle. **Am. J. Physiol.** 268:L935-40,1995.

EMALA, C. W.; CLANCY, J.; HIRSHMAN, C.A. Glucocorticoid treatment decreased muscarinic receptor expression in canine airway smooth muscle. **Am. J. Physiol.** 272:L745-51,1997.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **Br. J. Pharmacol.**,93:515-24, 1988.

FERRARI, P.; LOVATI, E.; FREY, F.J. The role of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. **J. Hypertension**, 18: 241-8, 2000.

FOLKOW, B. "Structural factor" in primary and secondary hypertension. **Hypertension**.,16:89-101,1990.

FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**.,288:373-76,1980.

FURCHGOTT, R.F. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. **Circ. Res.**.,53:5557-72, 1983.

GARDNER, D.S.; JACKSON, A.A.; LANGLEY-EVANS. S.C. Maintenance of maternal diet-induced hypertension in the rat is dependent on glucocorticoids. **Hypertension**.,30:1525-30, 1997.

GE, T.; HUGHES, H.; JUNQUERO, D.C.; WU, K.K.; VANHOUTTE, P.M.; BOULANGER, C.M. Endothelium-dependent contractions are associated with both augmented expression of prostaglandin H synthase-1 and hypersensitivity to prostaglandin H₂ in the SHR aorta. **Circ. Res.**,76:1003-10, 1995.

GERBER, L.M.& STERN, P.M. Relationship of body size and body mass to blood pressure: sex-specific and developmental influences. **Human Biology.**,71: 505-28, 1999.

GUSTAFSSON, J.A.; MODE, A.; NORSTEDT, G.; SKETT, P. Sex steroid-induced changes in hepatic enzymes. **A.Ver.Physiol.**,45:51-60, 1983.

HATAKEYAMA, H.; INABA, S.; MIYAMORI, I. 11 β -hidroxy steroid dehydrogenase in cultured human vascular cells – possible role in the development of hypertension. **Hypertension.**,33:1179-84, 1999.

HENRY, C.; KABBAJ, M.; SIMON, H.; LEMOAL, M.; MACCARI, S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. **J. Neuroendocr.**,6:341-45,1994.

HOET, J.J. & HANSON, M.A. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. **J. Physiology.**,5143:617-27, 1999.

HOLEMANS, K.; GERBER, R.; MEURRENS, K.; SPITZ, B.; DE CLERCK, F.; POSTON, C.; VAN ASSCHE, F.A. Maternal malnutrition in the rat affects vascular function but does not produce elevated blood pressure. **British. J. Nutr.**.,(in the press).

HUANG, M.; MANNING, R.D.; LEBLANC, M.H.; HESTER, R.L. Overall hemodynamic studies after the chronic inhibition of endothelial-derived nitric oxide in rats. **Am. J. Hypertens.**.,8:358-64, 1995.

HUFF, R.A.; SEIDLER, F.J.; SLOTKIN, T.A. Glucocorticoids regulate the ontogenic transition of adrenergic receptor subtypes in rat liver. **Life Sci.**, 48:1059-65, 1991.

JANSSON, T. & PERSSON, E. Placental transfer of glucose and amino acids in intrauterine growth retardation: studies with substrate analogues in the awake guinea pig. **Pediatr. Res.**.,28:203-8, 1990.

JUN, S.S.; CHEM, Z.; PACE, M.C.; SHOUL, P.W. Glucocorticoids downregulate cyclooxygenase-1 gene expression and prostacyclin synthesis in fetal pulmonary artery endothelium. **Circ. Research.**.,84:193-200, 1999.

KATO, T.; IWANA, Y.; OKUMURA, K.; HASHIMOTO, H.; ITO, T.; SATAKE, T. Prostaglandin H₂ may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta of the rat. **Hypertension.**.,15:475-82, 1990.

KONISHI, M. & SU, C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneous hypertensive rat arteries. **Hypertension**.,5:881-3, 1983.

KONJE, J.C.; BELL, S.C.; MORTON, J.J.; DE CHAZAL, R.; TAYLOR, D.J.; Human fetal kidney morphometry during gestation and relationship between weight kidney morphometry and plasma active renin concentration at birth. **Clin. Sci.**.,91:169-75, 1996.

LAKSMI, V.; MONDER, C. Purification and characterisation of the corticosteroid 11 β -dehydrogenase component of the rat liver 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase complex. **Endocrinology**.,123:2390-8, 1988.

LANGLEY-EVANS, S.C.; GARDNER, D.S.; JACKSON, A.A. maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic- pituitary-adrenal axis. **J.Nutr.**.,126:1578-85, 1996.

LANGLEY-EVANS, S.C. Intrauterine programming of hypertension in the rat: nutrients interactions. **Comp.Biochem.Physiol.**.,114A: 327-33,1996.

LANGLEY-EVANS, S.C.; PHILLIPS, G.J.; BENEDIKTSSON, R.; EDWARDS, C.R.W.; GARDNER, D.S.; JACKSON, A.A.; SECKL, J.R. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. **Placenta**.,17:169-72, 1996.

LANGLEY-EVANS, S.C. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. **Life Science**,60(15):1213-21,1997.

LANGLEY-EVANS, S.C. Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low-protein-diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. **J. Hypertension**,15:537-44,1997.

LANGLEY-EVANS, S.C.; SHERMAN, R.C.; WELHAM, S.J.; NWAGWU, M.O.; GARDNER, D.S.; JACKSON, A.A. Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system. **Biochem. Soc. Trans**.,27:88-93, 1999.

LANGLEY-EVANS, S.C.; WELHAM, S.J.M.; JACKSON, A.A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. **Life Sci**.,64:965-74, 1999.

LAW, C.M.; SWIET, M.; OSMOND, C.; FAYERS, P.M.; BARKER, D.J.P.; CRUDDSON, A.M.; FALL, C.H.D. Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. **B.M.J.**,306:24-7, 1993.

LIN, L.; BALAZY, M.; PAGANO, P.J.; NASJLETTI, A.. Expression of prostaglandin H₂ mediated mechanism of vascular contraction in hypertensive rats: relation to lipoxygenase and prostacyclin synthase activities. **Circ. Res**.,74:197-205, 1994.

LINDSAY, R.S.; EDWARDS, R.W.C.; SECKL, R.J. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats and the programming of blood pressure in the offspring. **Hypertension**.,27:1200-4, 1996.

LUCAS, S.R.; COSTA SILVA, V.L.; MIRAGLIA, S.M.; ZALDEK, G.F. Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. **Pediatr. Nephrol.**,(11)6:719-23, 1997.

LUSCHER, T.F. & VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. **Hypertension**.,8:344-8, 1986.

LUSCHER, T.F.; RAIJ, L.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent vascular responses in normotensive and hypertensive. Dahl-rats. **Hypertension**.,9:157-63, 1987.

LUSCHER, T.F. & BARTON, M. Biology of the endothelium. **Clin. Cardiol.**, 20 (Suppl.II):II3-II10, 1997.

MACKENZIE, H.S. & BRENNER, B.M. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? **Am. J. Kidney Disease**, 26:91-8, 1996.

- MACKENZIE, H.S.; LAWLER, E.V.; BRENNER, B.M. Congenital oligonephropathy: the fetal flaw in essential hypertension? **Kidney International**, S55:S30-4, 1996.
- MAK, J.S.W.; NISHIKAWA, M.; BARNERS, P.J. Glucocorticoids steroids increased β -adrenergic receptor transcription in human lung. **Am. J. Physiol.** 268:L41-6, 1995.
- MAMBOULI, J.V & VANHOUTTE, P.M. Purinergic endothelium-dependent and independent contractions in rat aorta. **Hypertension**.,22:577-83, 1993.
- MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; VIAU, V.; SHARMA, S.; SARRIEAU, A. Neonatal handling alters adrenocortical negative feed-back sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. **Neuroendocrinology**.,126:405-6,1989.
- MERLET-BENICHO, C.; GILBERT, T.; MUFFAT-JOLY, M.; LELIEVRE-PEGORIER, M.; LEROY, B. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. **Pediatr. Nephrol**.,8:175-80, 1994.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev**.,43:109-42, 1991.

MONDER, C. Corticosteroids, receptors and the organ-specific functions of. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. **Faseb.J.**,5:3047-54,1991.

MORIN, C.; ASSELIN, C.; BOUDREAU, F.; PROVENCHER, P.H. Transcriptional regulation of pre-pro-endothelin-1 gene by glucocorticoids in vascular smooth muscle cells. **End.Res.**,28:737-41,1998.

NIGRO, D.; FORTES, Z.B.; SCIVOTETTO, R.; CARVALHO, M.H.C. Simultaneous release of endothelium-derived relaxing and contracting factors induced by noradrenaline in normotensive rats. **Gen. Pharmacol.**,21:443-6. 1990.

NICOLANTONIO, D.R.; KOUTSIS, K.; WLODEK, M.E. Fetal versus maternal determinants of the reduced fetal and placental growth in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertension.**,18: 45-50. 2000.

OSMOND, C.; BARKER, D.J.P.; WINTER, P.; FALL, C.; SIMMONDS, S.J. Early growth and death from cardiovascular disease in women. **Br. Med. J.**,307:1524-7, 1993.

OZAKI, T.; NISHINA, P.; HAWKINS, P.; CROWE, C.; POSTON, L.; HANSON, M.A. Isolated systemic resistance vessel function in hypertensive male rat offspring of mildly nutritionally restricted dams. **J. Phys.**,513:118-9, 1998.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature.**,327:524-6, 1987.

PANZA, J.A.; CASINO, P.R.; KILCOYNE, C.M.; QUYYUMI, A.A. Role of the endothelium derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependente vascular relaxation of patients with essential hypertension. **Circulation.**,87:1468-74, 1993.

PLOTSKY, P.M. & MEANEY, M.J. Early postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in rats. **Molec. Brain. Res.**,18:195-200, 1993.

PICKERING, S.G.. Hypertension: definitions, natural histories and consequences. In: Laragh JH, Brenner BM eds. Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management. **Raven. Press.**,1 New York, 1995.

PROVENCHER, P.H.; VILLENEUVE, A.; MORIN, C. Glucocorticoids increased preproendothelin-1 expression in rat aorta. **Endocr. Research**, 81: 737-71, 1998.

REINISCH, J.M.; SIMON, N.G.; KARWO, W.G.; Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intra-uterine growth. **Science.**,202:436-8, 1978.

REUL, J.M.H.M.; STEC, I.; WIEGERS, G.J.; Prenatal immune challenge alters the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult rats. **J. Clin. Invest.**,93:2600-7, 1994.

RUBANYI, G.M. & VANHOUTTE, P.M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor(s). **Am. J. Physiol.**.,250:H822-7, 1986.

ROSEBOOM, T.J.; VAN DER MEULEN, J.H.P.; RAVELLI, A.C.J.; VAN MONTFRANS, G.A.; OSMOND, C.; BARKER, D.J.P.; BLEKER, O.T. Blood pressure in adults after prenatal exposure to famine. **J. Hypertension.**,17:325-30, 1999.

SECKL, J.R.& BROWN, R.W. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase: on several roads to hypertension. **J. Hypertension.**,12:105-12,1994.

SECKL, J.R.; BENEDIKTSSON, R.; LINDSAY, R.S.; BROWN, R.W. Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the programming of hypertension. **J. Steroid Biochem. Molec. Biol.**.,55:447-55,1995.

STEWART, P.M.; MURRY, B.A.; MASON, J.I. Type 2 11 β hydroxysteroid dehydrogenase in human foetal tissues. **J. Clin. Endocr. Metab.**.,78:1529-32, 1994.

STEWART, P.M.; WHORWOOD, C.B.; MASON, J.I. Type 2 11 β hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. **J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.**,55:465-71, 1995.

STEWART, P.M.; ROGERSON, F.M.; MASON, J.I. Type 2 11 β hydroxysteroid dehydrogenase mRNA and activity in human placenta and foetal membranes: It's relationship to birth weight and putative role and foetal adrenal steroidogenesis. **J. Clin. Endocr. Metab.**,80:885-90, 1995.

STEWART, P.M. Cortisol, hypertension and obesity: the role of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase. **J. R. Coll. Physicians.Lond.**,32(2):154-9, 1998.

TABERNERO, A.; GIRALDO, J.; VILA, E. Modelling the changes due to the endothelium and hypertension in the α -adernoreceptor-mediated responses of the rat aorta. **J. Autonomic.Pharmacol.** 19:219-28, 1999.

TADDEI, S. & VANHOUTTE, P.M. Role of the endothelium in endothelin-evoked contractions in the rat aorta. **Hypertension.**,21:9-15, 1993.

TANGALAKIS, K.; LUMBERS, E.R.; MORITZ, K.M.; TOWSTOLESS, M.K.; WINTOUR, E.M. Effect of cortisol on blood pressure and vascular reactivity in the ovine fetus. **Exp. Physiol.**,77:709-17, 1992.

TAYLOR, S.G.; SOUTHERTON, J.S.; WESTON, A.H.; BARKER, D.J.P. Endothelium dependent effects of acetylcholine in rat aorta: a comparison with sodium nitroprusside and cromakalim. **Br. J. Pharmacol.**,94:853-63, 1988.

TRIPPODO, N.C. & FROLIC, E.D. Similarities of genetic spontaneous hypertension. **Circ. Res.**,48:309-10, 1983.

TUNCER, M. & VANHOUTTE, P.M. Response to endothelium-dependent vasodilator acetylcholine in perfused kidneys of normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Blood Press.**, 2:217-20, 1993.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of endothelium derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. **Lancet.**,1:997-1000, 1989.

VANHOUTTE, P.M.; BOULANGER, C.M.; MOMBOULI, J.V. Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. **Am. J. Cardiol.**,76:3E-12E, 1995.

VANHOUTTE, P.M. Endothelial dysfunction in hypertension. **J. Hypertension.**,14:583- 93, 1997.

VAN UUM, S.H.; HERMUS, A.R.; SMITS, P.; THIEN, T.; LENDERS, J.W. The role of β hydroxysteroid dehydrogenase in the pathogenesis of hypertension. **Cardiovasc. Res.**,38(1):16-24, 1998.

VIDAL, M.J.; ROMERO, J.C.; VANHOUTTE, P.M. Endothelium-derived relaxing factor inhibits renin release. **Eur. J. Pharmacol.**,149:401-2, 1988.

WALKER, B.R. & WILLIAMS, B.C. Corticosteroids and vascular tone: mapping the messenger maze. **Clin. Sci.**,82:597-605, 1992.

WEDER, A.B. & SCHORK, N.J. Adaptation, allometry and hypertension. **Hypertension**, 24:145-56, 1994.

WOODALL, S.M.; BREIER, B.H.; JOHNSTON, B.M.; GLUCKMAN, P.D. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth **J. Endocrinology**.,150:231-42, 1996.

YANAGISAWA, M.; KURIHARA, H.; KIMURA, S.; TOMOBE, Y.; KOBAYASHI, M.M.; YAZAKI, Y.; GOTO, K.; MASAKI, T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**.,332:411-5, 1988.

ABSTRACT

Epidemiological studies suggest that intrauterine undernutrition can play an important role in the development of arterial hypertension in adulthood (FERRARI et al., 2000). Furthermore, maternal malnutrition during organ developmental stage impairs fetal growth and is believed to alter permanently the metabolism and physiology of the developing tissues. The aim of the present study was to examine the effects of intrauterine undernutrition in the arterial blood and vascular reactivity pressure of male and female normotensive (Wistar) and spontaneously hypertensive (SHR) rats offspring. Female pregnant rats (Wistar and SHR) were fed either normal or 50% of the normal intake diets, during the whole gestational period. Arterial blood pressure and the norepinephrine (NE), acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP) dose-response curves in isolated aortic rings of their offspring (male and female – when they reached adulthood) were determined. In Wistar rats, the intrauterine undernutrition induced an increase in the arterial blood pressure, leading to hypertension. Dietary restriction during pregnancy of Wistar rats altered the vascular reactivity to NE and ACh, whereas the response to SNP remained unaltered in the offspring. In the SHR offspring (male and female) the intrauterine undernutrition exacerbates the already existing hypertension and endothelial dysfunction. In summary, this study has shown that intrauterine undernutrition increased the arterial blood pressure and altered the vascular reactivity of male and female normotensive and SHR offspring.

Key Words: intrauterine undernutrition, blood pressure, vascular reactivity, endothelium, hypertension.