

Mariana Ribeiro Costa

**ADMINISTRAÇÃO PRÉ-NATAL DE EXTRATO DE CASCA DE  
UVA (GSE) IMPEDE LESÃO RENAL PRECOCE INDUZIDA POR  
RESTRIÇÃO PROTÉICA MATERNA**

**UERJ**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura, MD, PhD**

**Rio de Janeiro – RJ – Brasil**

**Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ**

**Setembro de 2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mariana Ribeiro Costa

ADMINISTRAÇÃO PRÉ-NATAL DE EXTRATO DE CASCA DE UVA (GSE)  
IMPEDE LESÃO RENAL PRECOCE INDUZIDA POR RESTRIÇÃO  
PROTÉICA MATERNA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura, MD, PhD

Rio de Janeiro – RJ – Brasil

Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Setembro de 2009

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

C837 Costa, Mariana Ribeiro.  
Administração pré-natal de extrato de casca de uva (GSE) impede a lesão renal precoce induzida por restrição protéica materna / Mariana Ribeiro Costa.- 2009.  
xiii, 98f. : il.

Orientador : Roberto Soares de Moura.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.  
Bibliografia: f. 80-98.

1. Dieta com restrição de proteínas - Teses. 2. Estresse oxidativo - Teses. 3. Rins - Teses. 4. Uva - Uso terapêutico - Teses. I. Moura, Roberto Soares de. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 613.24

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese.

---

Assinatura

---

Data

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação intitulada "ADMINISTRAÇÃO PRÉ-NATAL DE EXTRATO DE CASCA DE UVA (GSE) IMPEDE LESÃO RENAL PRECOCE INDUZIDA POR RESTRIÇÃO PROTÉICA MATERNA", de autoria da mestranda Mariana Ribeiro Costa, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

---

**Anna Tereza Miranda Soares de Moura, M.D., PhD.**

---

**Denise Mafra R.D., PhD.**

---

**Samuel dos Santos Valença, P.T., PhD**

Rio de Janeiro, 29 de setembro de 2009.

"I'm a great believer in luck,  
And I find the harder I work the more I have of it."  
Thomas Jefferson (1743-1826)

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Roberto Soares de Moura pela oportunidade e sua inspirada orientação ao longo deste caminho.

A todos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Plantas Medicinais. Muito obrigada pelo apoio.

A Karla Maria Pires, por sua generosidade, amizade verdadeira e por dividir comigo um pouco do seu vasto conhecimento e espírito científico. Não tenho palavras para expressar minha admiração e gratidão.

Aos meus pais, Julia e João Luiz, e irmãos, Gabriela, Flavia e João Pedro, pelo incentivo, amor e por acreditarem em mim sempre.

À amiga Alessandra Scutellaro, pela amizade fundamental em minha vida e apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu namorado, Leonardo Mendes, pelo companheirismo e incentivo fundamentais nesta reta final.

À minha querida Fátima, que já não está mais entre nós, que com sua luta e coragem me ensinou a jamais desistir e ser digna até o final. Saudades eternas.

## SUMÁRIO

### Capa

Folha de Aprovação.....	iv
Epígrafe .....	v
Agradecimentos.....	vi
Lista de Figuras e Tabelas .....	ix
Lista de Abreviaturas.....	xi
Resumo .....	xii
Abstract .....	xiii
I-Revisão de Literatura .....	14
1. Hipótese da Origem Fetal das Doenças .....	14
1.a. Programação Fetal .....	15
1.b. Má Nutrição Fetal .....	16
1.c. Manipulação da Dieta Materna .....	19
1.c.1. Restrição Calórico-Protéica .....	19
1.c.2. Restrição Protéica .....	20
1.d. Exposição Fetal a Glicocorticóides .....	21
1.e. Fatores Genéticos e Programação Fetal.....	22
2. Programação Fetal das Doenças Cardiovasculares e Renais.....	24
2.a. Programação da Hipertensão Arterial .....	28
2.a.1. Estudos Epidemiológicos: Peso da Placenta .....	28
2.a.2. Estudos Epidemiológicos: Peso ao Nascimento .....	30
2.a.3. Estudos Experimentais: Alterações Cardiovasculares .....	31
2.a.4. Estudos Experimentais: Alterações Renais.....	33
3. Programação fetal e estresse oxidativo.....	39
3.a. Estresse oxidativo.....	39
3.b. Estresse oxidativo e Programação Fetal.....	42
III-Extrato de casca de uva:efeitos protetores.....	45
IV-Hipótese.....	48
V-Objetivos.....	49
VI- Materiais e Métodos.....	50

1. Produção do Extrato hidroalcoólico de casca de uva (GSE).....	50
2. Grupos experimentais.....	50
3. Eutanásia e preparação técnica.....	52
3.a. Ensaio bioquímicos.....	53
3.a.1. Homogeneização do material.....	53
3.a.2. Dosagem de proteínas.....	53
3.a.3. Dano oxidativo: Peroxidação lipídica renal e hepática.....	53
3.a.4. Atividade da Catalase e da Superóxido dismutase hepáticas.....	54
3.a.5. Morfologia Renal.....	54
3.a.6. Microscopia de Luz e Estereologia.....	54
3.a.7. Análise dos dados.....	58
VII-Resultados.....	59
1.Matrizes.....	59
2. Biometria das proles.....	61
3. Dano Oxidativo: Peroxidação lipídica.....	64
4. Atividades da catalase e da superóxido dismutase.....	65
5. Microscopia de luz e Morfometria .....	66
6. Estereologia.....	69
7. Correlações e Comparação das Regressões Lineares.....	73
VIII- Discussão.....	75
IX- Referências.....	80

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Linha de suprimento fetal.....	16
Figura 2. Alterações devidas à desnutrição fetal .....	18
Figura 3. Mortalidade por doenças coronarianas.....	25
Figura 4. Resumo diagramático das alterações durante o processo de nefrogênese que podem resultar em hipertensão no adulto.....	27
Figura 5. Estrutura morfológica do néfron.....	33
Figura 6. Corte longitudinal do rim de camundongo (primeiro dia pós-natal).....	35
Figura 7. Ação das enzimas antioxidantes na detoxificação de radicais livres.....	40
Figura 8. Reação em cadeia do processo de peroxidação lipídica.....	41
Figura 9. Mecanismos descritos e potenciais da participação do estresse oxidativo sobre a hipertensão arterial programada.....	44
Figura 10. Estrutura química dos flavonóides e não-flavonóides.....	46
Figura 11. Princípio de Cavalieri.....	56
Figura 12. Método do <i>Fractionator</i> .....	57
Figura 13. Massa corporal ao nascimento e comprimento naso-anal das proles estudadas.....	62
Figura 14. Relação Massa Renal/Massa Corporal das proles estudadas.....	63
Figura 15. Determinação da peroxidação lipídica no homogeneizado do tecido renal e hepático das proles estudadas.....	64
Figura 16. Atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase hepáticas (U/mg proteína) no homogeneizado do tecido renal e hepático das proles estudadas.....	65
Figura 17. Fotomicrografias do córtex renal das proles ao nascimento.....	67

Figura 18. Número total de glomérulos dos rins das proles ao nascimento (N[glom]) por volume de córtex (CV-mm <sup>3</sup> ) obtido pelo método Fractionator.....	70
Figura 19. Relação entre o número de glomérulos vascularizados por volume de região não-nefrogênica e número de glomérulos não-vascularizados por região nefrogênica (v-N[glom]/a-N[glom]) dos rins das proles ao nascimento.....	71
Figura 20. Volume médio do glomérulo vascularizado (10 <sup>6</sup> µm <sup>3</sup> ).....	72
Figura 21. Correlação entre massa corporal e número de glomérulos de todos os grupos estudados e regressão linear de dados log-transformados, correlacionando a massa corporal (g) com o número de glomérulos dos grupos separadamente.....	74
Tabela 1. Associações entre o peso da placenta e a relação peso da placenta/peso ao nascimento.....	29
Tabela 2. Composição das dietas utilizadas no estudo.....	51
Tabela 3. Massa corporal (g), ingestão de ração (g/dia) e ingestão de proteínas (g/dia) das matrizes dos grupos estudados.....	60
Tabela 4. Medidas morfométricas dos volumes renais dos rins das proles ao nascimento.....	68
Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética	

## LISTA DE ABREVIATURAS

**11-β-HSD I e II:** Enzimas 11-β-hidroxiesteróide desidrogenase I e II  
**a-N[glom]:** Número de glomérulos avascularizados  
**CMV:** Relação córtico-medular  
**CuZnSOD:** Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco  
**CV:** Volume do córtex  
**DCV:** Doença Cardiovascular  
**ECA:** Enzima conversora de angiotensina  
**EHHA:** Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal  
**GPX:** Glutaciona peroxidase  
**GSE:** Extrato da casca de uva  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Peróxido de hidrogênio  
**IGF-1:** Fator de crescimento semelhante à insulina-1  
**IGF-2:** Fator de crescimento semelhante à insulina-2  
**LDL:** Lipoproteína de baixa densidade  
**MDA:** Malondialdeído  
**MnSOD:** Superóxido dismutase dependente de manganês  
**MV:** Volume medular  
**N[glom]:** Número total de glomérulos  
**NADH:** Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina  
**NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P  
**NAL:** Comprimento naso-anal  
**n-NR:** Região não-nefrogência  
**n-NRV:** Volume de região não nefrogência  
**NR:** Região Nefrogência  
**NRV:** Volume de região nefrogênica  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>:** Ânion superóxido  
**OH<sup>-</sup>:** Íon hidroxila  
**ON:** Óxido Nítrico  
**ONOO<sup>-</sup>:** Peroxinitrito  
**PA:** Pressão Arterial  
**RCIU:** Retardo do crescimento intra-uterino  
**RMA:** Eixo maior reduzido  
**ROS:** Espécies reativas de oxigênio  
**RPM:** Restrição protéica materna  
**SRAA:** Sistema renina-angiotensina-aldosterona  
**TBA:** Ácido tiobarbitúrico  
**TBARS:** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico  
**TCD:** Túbulo contorcido distal  
**TCP:** Túbulo contorcido proximal  
**TFG:** Taxa de Filtração Glomerular  
**v-N[glom]:** Número de glomérulos vascularizados

## RESUMO

As alterações renais induzidas pela restrição de proteínas na dieta materna durante a gestação (RPM) podem estar relacionadas ao surgimento de um ambiente oxidativo fetal. OBJETIVO: investigar os efeitos da administração de extrato de cascas de uvas viníferas (GSE) sobre o dano oxidativo e a morfologia renal da prole de fêmeas sob RPM. METODOLOGIA: Foi analisada a ação do GSE sobre os rins de proles de camundongos C57/Bl-6 de 1 dia de vida provenientes de matrizes que receberam dietas isocalóricas contendo 19% (Controle e Controle+GSE-200mg/kg/dia) ou 6% de proteínas (RP e RP+GSE-200mg/kg/dia) durante a gestação. A morfologia renal foi avaliada quanto ao número de glomérulos totais (N[glom]), relação glomérulos vascularizados e glomérulos avascularizados ( $v-N[glom]/a-N[glom]$ ), volumes corticais (CV) e medulares (MV) e volume médio do glomérulo (Vm). As atividades de superóxido dismutase (SOD) catalase (CAT) hepáticas, assim como o dano oxidativo lipídico renal e hepático foram aferidos. ANÁLISE ESTATÍSTICA: teste  $\chi^2$  para análise de freqüências de natimortos e incidência de gênero, ANOVA one-way seguida de Newman-Keuls para dados biométricos. ANOVA Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn para dados estereológicos. Análise de correlação e regressão bivariada: número de glomérulos N[glom] vs. massa corporal. As diferenças entre os coeficientes angulares foram avaliadas Teste-t de *Student* RESULTADOS: Não houve diferença quanto à incidência de nascimentos. A administração GSE impediu a redução na relação glomérulos maduros/imaturos e correlação do N[glom] com a massa corporal ( $r=0,95$ ,  $p<0,001$ ), elevou a atividade de CAT hepática que estava 20% diminuída ( $p<0,05$ ) e protegeu o rim do dano oxidativo lipídico observados no grupo RP. Não houve diferença nos volumes renais, porém o grupo RP teve o VM reduzido em 15% ( $p<0,05$ ) quando comparado ao grupo Controle. A relação ( $v-N[glom]/a-N[glom]$ ) foi menor no grupo RP. A administração de GSE restaurou esse parâmetro. CONCLUSÃO: Todos os resultados observados levam a conclusão de que a administração de GSE foi benéfica para a preservação da morfologia renal na prole de fêmeas que receberam dieta hipoprotéica durante a gestação, possivelmente via sua ação antioxidante e vasodilatadora.

Palavras-chaves: Restrição protéica; estresse oxidativo; morfologia renal; extrato de casca de uva.

## ABSTRACT

Maternal protein restriction (MPR)-induced morphological renal injury might be associated with fetal oxidative stress. **OBJECTIVE:** To investigate the effect of vinifera grape skin extract (GSE) on renal oxidative damage of MPR 1-day-old offspring. **METHODS:** Offspring of C57/Bl-6 were used. Dams were fed either isocaloric diets with 19% protein (Control and Control+GSE-200mg/kg/day) or 6% protein (RP and RP+GSE-200mg/kg/day) throughout gestation. Renal morphology — glomerular number  $N[\text{glom}]$ ; renal maturity — vascular glomeruli and avascular glomeruli ratio ( $v\text{-}N[\text{glom}]/a\text{-}N[\text{glom}]$ ); medullar (MV) and cortical (CV) volumes, as well as glomerular volume ( $V_m$ ) — was analyzed. Hepatic superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities were evaluated as well as hepatic and renal lipid peroxidation levels were measured.

**DATA ANALYSIS:** Frequencies of offspring dead were analyzed using  $\chi^2$  test. One-way ANOVA followed by Newman-Keuls test for analyzing biometrical data; one-way Kruskal-Wallis followed by Dunn test for stereological data. The correlation between the numbers of glomeruli ( $N[\text{glom}]$ ) versus body mass was verified through a bivariate study using an allometric model. The differences among angular coefficients were tested by Student's t-test.

**RESULTS:** No difference was observed on birth frequencies. GSE protected against glomerular loss ( $r=0.95$ ,  $p<0.001$ ) and renal immaturity in the offspring. Hepatic CAT activity was 20% lower and lipid peroxidation levels were higher in RP group ( $p<0.05$ ). GSE treatment restored these parameters. Cortical volumes were similar among groups, however  $V_m$  in RP group was 15% lower in RP group ( $p<0.05$ ) when compared with Control group. Vascular glomeruli/avascular glomeruli ratio was lower in RP group. GSE treatment restored this parameter. **CONCLUSION:** Our results taken together indicate that GSE treatment showed beneficial morphological effects on maternal protein restricted-offspring, probably through its antioxidant and vasodilator effects.

**Key-words:** Protein restriction; oxidative stress; renal morphology; grape skin extract.

## I - REVISÃO DE LITERATURA

### 1- Hipótese da Origem Fetal das Doenças

Muitos estudos epidemiológicos em populações distintas de todo o mundo demonstraram uma associação entre baixo peso ao nascimento e o surgimento de hipertensão, resistência à insulina, diabetes tipo II e doenças cardiovasculares (Barker 1998), mostrando que o ambiente intra-uterino é primordial na formação de um indivíduo saudável (Barker et al. 1990). Esta associação parece ser independente de estilos de vida clássicos como o tabagismo, o peso durante a vida adulta, classe social, álcool, falta de exercícios físicos, mas que, contudo, são fatores agravantes dos sintomas (Barker et al. 1993).

A restrição ou retardo do crescimento intra-uterino (RCIU) está diretamente ligada a alterações na estrutura ambiental intra-útero e descreve uma diminuição na taxa de crescimento fetal que impede a criança de obter seu potencial de crescimento completo (Brodsky and Christou 2004). Dois padrões de retardo do crescimento fetal podem ser observados: RCIU simétrico e RCIU assimétrico. Se o crescimento fetal for prejudicado durante o primeiro ou segundo trimestre de gestação, o feto terá RCIU simétrico. Esta proporção no déficit de crescimento é causada pela redução da proliferação celular de todos os órgãos e ocorre em aproximadamente 20 a 30% das crianças que sofrem RCIU. Caso a criança tenha uma diminuição no tamanho abdominal quando comparado ao tamanho da cabeça, esta apresenta RCIU assimétrico. Este efeito poupador do desenvolvimento da cabeça é a forma mais comum (aproximadamente 70% a 80% dos casos) e é atribuído à habilidade do feto de responder a esses estímulos deletérios redistribuindo o fluxo sanguíneo para as circulações do baço, da glândula supra-renal, coronariana e cerebral (Lin et al. 1991; Robinson et al. 1991; Jackson et al. 1996).

## 1.a. Programação Fetal

A "Programação Fetal" foi proposta como mecanismo provável de resposta fetal que resultaria em RCIU. Esta hipótese propõe que estímulos ou insultos agindo durante períodos críticos ou vulneráveis do crescimento e/ou desenvolvimento, estágios de crescimento rápido, maturação ou proliferação celular, podem alterar permanentemente tanto a estrutura quanto a função dos tecidos. Estas alterações são, contudo, necessárias para a sobrevivência do organismo (Lucas 1991). Algumas mudanças podem, entretanto, comprometer o bem-estar do indivíduo na vida futura.

O processo de "*programação*" é caracterizado por a) alta susceptibilidade a lesões durante períodos ontogênicos do desenvolvimento; b) efeitos persistentes até a vida adulta; c) efeitos que podem ser medidos ou especificados – entretanto podem variar de indivíduo para indivíduo; d) relação dose-resposta ou limiar entre uma exposição específica e efeitos futuros (Lucas 1991). Embora alguns autores utilizem o termo "*imprinting*" ao invés de "*programação*" para as alterações supracitadas (Waterland and Garza 1999), ambos refletem as características apresentadas (Lucas 2000).

Duas maiores hipóteses ambientais foram propostas para explicar os mecanismos que associam o RCIU com doenças no adulto: a má nutrição fetal (Barker et al. 1989) e a exposição fetal excessiva a glicocorticóides (Edwards et al. 1993). Uma terceira hipótese sugere que fatores genéticos poderiam afetar tanto o baixo peso quanto o subsequente risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Dunger et al. 1998).

## 1.b. Má Nutrição Fetal

Originalmente citada por David Barker e colaboradores, a hipótese da origem fetal das doenças na vida adulta descreve que fatores ambientais, principalmente a nutrição, atuam na vida neonatal como agentes de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta resultando em morte prematura (Barker 1994). Através de estudos epidemiológicos anteriores, Barker e colaboradores constataram que havia uma correlação entre baixo peso ao nascimento, oriundo de uma nutrição materna deficiente, e morte por doenças cardiovasculares e acidentes vasculares (Barker et al. 1989), resistência à insulina e diabetes tipo II (Barker 1998).

O suprimento de nutrientes para o feto é o fator de maior importância na regulação de seu crescimento. Este depende da composição e tamanho maternos, seus estoques de nutrientes, o tipo de alimento ingerido durante a gestação e transporte de nutrientes através da placenta. Esta longa e vulnerável série de eventos constitui a linha de suprimento fetal (Harding 2001) (Figura 1).

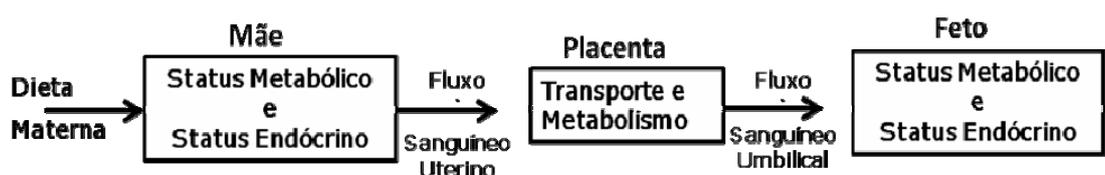


Figura 1. A linha de suprimento fetal. (Harding 2001)

Mudanças relativamente grandes na dieta materna podem ter impacto reduzido sobre a nutrição fetal se a capacidade da linha de suprimento fetal permitir uma margem de segurança para o crescimento fetal (Harding 2001).

A placenta possui vários papéis como um componente importante na linha de suprimento fetal e por esta razão, crítica para a dissociação entre

a nutrição materna e fetal. A evidência mais óbvia da influência placentária sobre a nutrição fetal está na sua capacidade de transportar nutrientes da circulação materna para a fetal, podendo ser afetada pelo ambiente nutricional materno (Erel et al. 2001; Bajoria et al. 2002).

Desta forma, o feto só se torna mal nutrido quando a sua demanda por nutrientes excede o suprimento oferecido. A capacidade que o feto possui para sustentar seu crescimento durante o período de má nutrição depende de sua taxa de crescimento, quanto mais alta a demanda por nutrientes, menos o feto irá suportar os efeitos da má nutrição (Barker 2001).

Como outros seres vivos, o ser humano é capaz de responder à má nutrição. Estas respostas incluem a redistribuição do fluxo sanguíneo, alterações metabólicas e mudanças na produção de hormônios fetais e placentários que controlam o crescimento. As alterações no fluxo sanguíneo têm como principal objetivo proteger o cérebro dos efeitos da má nutrição. No que se refere ao metabolismo, a resposta imediata à desnutrição é o catabolismo de substratos para obtenção de energia (Barker 1998). Após este período inicial, ocorre uma desaceleração do seu crescimento, o que aumenta as chances de sobrevivência do feto, uma vez que ele reduz a sua taxa metabólica e uso de substratos (Fowden 1995). As mudanças endócrinas incluem a redução nas concentrações de insulina e IGF-1, o que contribui para a redução do crescimento fetal. Embora a desnutrição reduza estes hormônios, há o aumento na concentração de cortisol, o qual está ligado à diferenciação celular (Harding and Johnston 1995). Entretanto, apesar desses esforços, ainda há redução do crescimento intra-uterino (Figura 2).

Vários modelos experimentais de má nutrição fetal utilizam manipulação da dieta e limitação do consumo materno de proteínas ou energia. Sendo assim, podem reproduzir muitos dos fenômenos observados em estudos epidemiológicos.

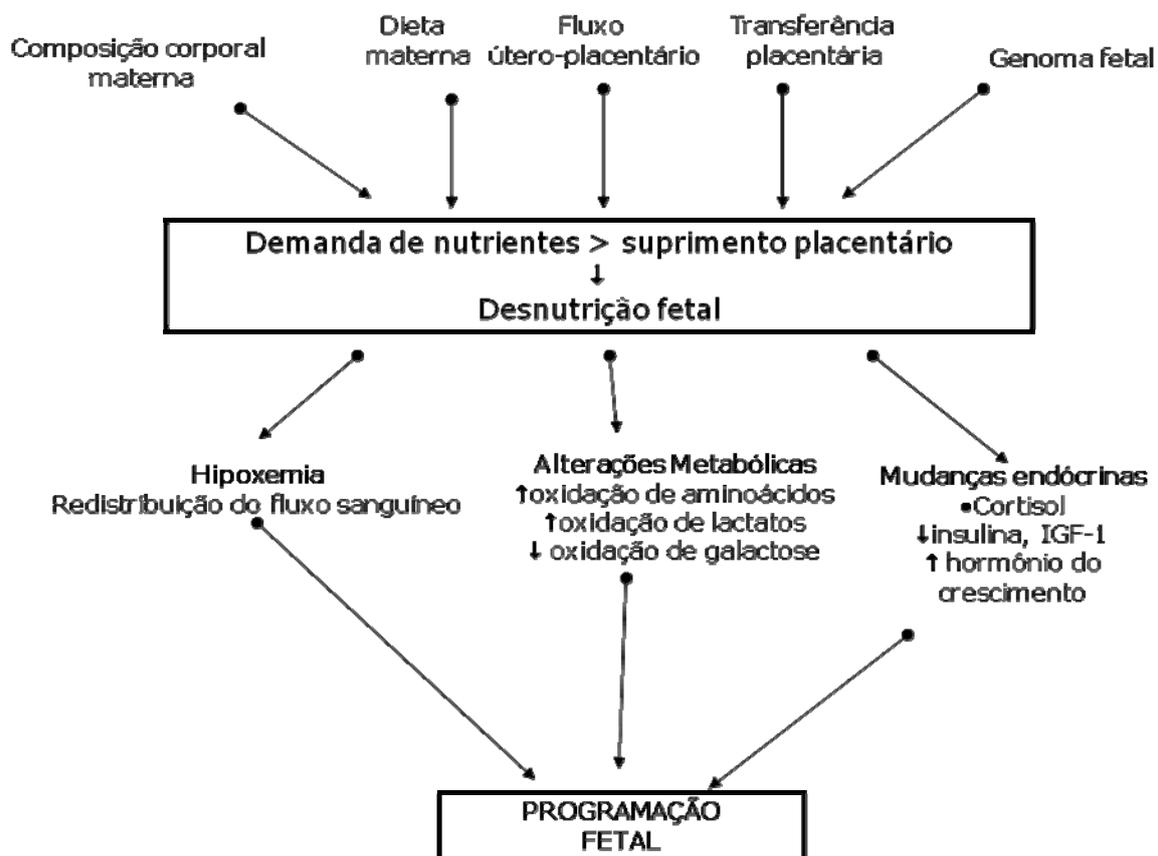


Figura 2. Alterações devidas à desnutrição fetal. IGF-1 = fator de crescimento semelhante à insulina-1 (Barker 1998).

## **1.c. Manipulação da Dieta Materna**

As manipulações dietéticas por restrição de vitamina A, ferro ou suplementação de gordura têm sido o foco de vários trabalhos, tanto em roedores quanto em ovinos. Entre eles, os modelos onde a restrição ocorre durante o período pré-natal se destacam.

A restrição materna de ferro leva à alteração na função hepática com prejuízo ao metabolismo de triglicérides e colesterol (Zhang et al. 2005), hipertensão e diminuição do número de glomérulos (Lisle, Lewis et al. 2003), possivelmente devido à redução da vascularização placentária o que resulta em retardo do crescimento intra-uterino (Lewis et al. 2001). Alterações renais relacionadas à formação renal também foram vistas em modelos onde há deficiência materna de vitamina A (Lelievre-Pegorier et al. 1998). Além disso, a utilização de uma dieta materna rica em gordura é capaz de produzir disfunção vascular na prole (Koukkou et al. 1998).

### **1.c.1 Restrição Calórico-Protéica**

A partir de estudos com indivíduos expostos a "Dutch Hunger Winter", ou "Inverno de Fome Alemão", um grande número de pesquisas sobre a restrição de nutrientes da dieta materna foi desenvolvido para mimetizar a restrição calórica vivida pelas mulheres grávidas naquela época. A grande maioria destes estudos foi realizada em ratos e a intensidade varia de branda (30% de redução da ingestão de calorias), moderada (50% de redução da ingestão de calorias) à intensa (70% de redução da ingestão de calorias).

São descritas alterações cardiovasculares (Ozaki et al. 2001; Almeida and Mandarin-de-Lacerda 2005) e renais (Zeman 1983; Almeida and Mandarin-de-Lacerda 2005) na vida adulta, alterações no desenvolvimento pancreático (Garofano et al. 1997; Garofano et al. 1998; Bertin et al. 2002) e resistência à insulina (Holemans et al. 1996).

### 1.c.2. Restrição Protéica

Vários modelos animais de restrição protéica materna foram descritos para mimetizar a desnutrição sofrida por países em desenvolvimento. Partindo da quantidade total de proteínas na dieta (de 20 a 23%), foram realizadas restrições brandas (de 18% a 15% de proteínas na dieta), moderadas (12% a 8%) e intensas (de 5% a 0%). Foram utilizadas dietas isocalóricas a fim de avaliar o efeito somente da restrição de proteínas sobre o desenvolvimento da prole.

Das alterações encontradas, são destaques a hipertensão arterial (Langley and Jackson 1994; Langley-Evans and Jackson 1996; Kwong et al. 2000) e doenças cardiovasculares, havendo também danos em nível pancreático levando ao diabetes mellitus (Petrik et al. 1999; Merezak et al. 2001).

#### 1.d. Exposição Fetal a Glicocorticóides

Os glicocorticóides têm sido bem caracterizados como agentes programadores do desenvolvimento fetal, podendo refletir uma ação negativa de seu papel natural de promoção da diferenciação e maturação de tecidos (Ballard 1979; Thakore and Dinan 1994).

A exposição aos glicocorticóides sintéticos resulta em RCIU tanto em humanos quanto em animais (Reinisch et al. 1978). Além disso, os glicocorticóides são potentes reguladores negativos da expressão de diversos genes responsáveis pela maturação de vários órgãos como o coração, pulmão e rins. O feto é protegido de tal ação por duas vias: a) A glândula supra-renal se torna ativa somente ao final do período gestacional (Chatelain et al. 1980); b) há a produção placentária da enzima 11- $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase II (11- $\beta$ -HSD II) que inibe a ação dos glicocorticóides endógenos. No rato, a 11- $\beta$ -HSD II metaboliza a corticosterona em 11-dehidrocorticosterona (forma inerte). Gestações com atividade reduzida da 11- $\beta$ -HSD II, o que caracteriza uma reação de estresse materno, levam a super-exposição do feto a glicocorticóides resultando na reestruturação do Eixo-Hipotalâmico-Hipofisário-Adrenal (EHHA). A programação do EHHA pela restrição protéica materna pode levar à hipertensão pelo aumento da sensibilidade dos receptores de esteróides nos vasos da prole restrita, o que resulta num elevado *uptake* de sódio e cálcio pelas células musculares lisas. A angiotensina II é um potente agente pressor e a modulação do número de seus receptores pelos glicocorticóides pode representar o mais importante mecanismo pelo qual os glicocorticóides elevam a pressão arterial (Langley-Evans 1996, Langley-Evans 1997).

### 1.e. Fatores Genéticos e Programação Fetal.

O alelo 825T do gene GNB3 que codifica a subunidade  $\beta 3$  das proteínas ligantes de guanina trifosfato heterotriméricas, ou proteínas G, ganhou destaque nas pesquisas sobre programação fetal. Muitos hormônios e neurotransmissores usam receptores específicos que interagem por ligações não-covalentes com proteínas G em seus processos de sinalização transmembrana (Neer and Clapham 1988). A proteína G contém subunidades de heterodímeros alfa, beta e gama. A subunidade  $\beta 3$  preferencialmente se liga a proteína G inibidora ( $G_i$ ). O fenótipo molecular deste alelo é caracterizado por um aumento do sinal de tradução via proteínas G através da geração de moléculas denominadas  $G\beta 3s$ , variantes obtidas após o *splicing*. O genótipo homocigoto para GNB3 825T tem sido associado com o aumento do índice de massa corporal em diferentes populações, já que sua ativação pode estimular a adipogênese (Moxham et al. 1993; Hegele et al. 1999; Siffert et al. 1999).

Um polimorfismo comum (825 C/T) em 10 éxons do gene GNB3, que codifica a subunidade  $\beta 3$ , foi descoberto recentemente e parece estar associado com o fenótipo hipertensivo dos indivíduos portadores desse polimorfismo (Siffert et al. 1998; Siffert 2000). Além disso, Hocher e colaboradores destacam que mães saudáveis que geraram filhos com baixo peso ao nascimento possuíam o alelo para 825T (Hocher et al. 2000). É sabido que o conceito clássico de programação fetal propõe que a nutrição materna durante a gravidez causa alterações duradouras no feto que resultariam em baixo peso ao nascimento, aumentando o risco de doenças cardiovasculares (Barker 1993).

Siffer, em 2001, propôs outra visão sobre a análise de Hocher, já que o risco de indivíduos com o alelo 825T, provenientes de mães saudáveis, de desenvolver doenças cardiovasculares na vida não resulta da programação fetal, mas da presença do alelo em si, uma vez que aumenta a vasoconstrição das artérias coronárias (Baumgart et al. 1999), a ativação de células imunes (Virchow et al. 1998; Virchow et al. 1999),

agregação plaquetária (Naber, Hermann et al. 2000) e desregulação dos canais de potássio cardíacos (Dobrev et al. 2000). Siffer considera que o alelo da subunidade  $\beta 3$  da proteína G poderia somente ser um risco, e não um fator determinante, para o desenvolvimento de baixo peso ao nascimento (Hochoer et al. 2001).

Recentemente, a redução na expressão e de modificações das histonas H3 e H4 localizadas na região promotora de genes importantes como o IGF-2 (Fator de crescimento semelhante à insulina-2), cuja função principal é induzir o crescimento durante a gestação, foram diretamente associadas à restrição protéica materna em animais com fenótipo de baixo peso ao nascer (Sharif et al. 2007).

Estes estudos destacam que as alterações ambientais podem influenciar a expressão de genes importantes no processo de desenvolvimento fetal, originando uma gama de doenças na vida adulta.

## 2- Programação das Doenças Cardiovasculares e Renais

As doenças cardiovasculares (DCV), nas quais estão incluídas a doença coronariana, derrame e doença vascular periférica, são as maiores causas de morte nos países em desenvolvimento. Contudo, seus índices nos países em desenvolvimento aumentam a cada ano. A teoria da origem fetal das doenças surge como explicação para essa alta incidência.

Em 1987, Barker e colaboradores (Barker et al. 1989; Osmond et al. 1993) relataram que o peso ao nascimento e comprimento aos 12 meses de vida estavam associados com o aumento do risco de morte por doenças cardiovasculares e derrame em homens e mulheres nascidos em Hertfordshire, Inglaterra, nos anos entre 1911 e 1930 (Figura 3). Um outro estudo, realizado com 15.000 homens e mulheres suecos, mostrou que a incidência de doenças isquêmicas cardíacas aumentou em indivíduos que estavam abaixo do peso normal ao nascimento (Leon et al. 2000). O mesmo se repetiu no estudo americano "*Nurses Study*", no qual uma relação negativa foi observada entre peso ao nascer e a presença de DCV e derrames não-fatais (Rich-Edwards et al. 1997). A associação entre o peso ao nascer e doenças cardiovasculares continuou sendo relatada em vários outros estudos (Frankel et al. 1996; Frankel et al. 1996; Martyn et al. 1996; Stein et al. 1996). Tal associação não foi evidenciada em estudo sueco realizado com gêmeos, os quais normalmente apresentam baixo peso ao nascimento por razões que independem das condições sócio-econômicas. O baixo peso apresentado por esta população não constitui um risco para o desenvolvimento de doença cardíaca na vida adulta (Vagero and Leon 1994). Desta forma, os autores sugerem que o surgimento de doenças cardiovasculares na vida adulta tenha mais relação com a nutrição materna e condições sócio-econômicas do que simplesmente com o peso ao nascer.

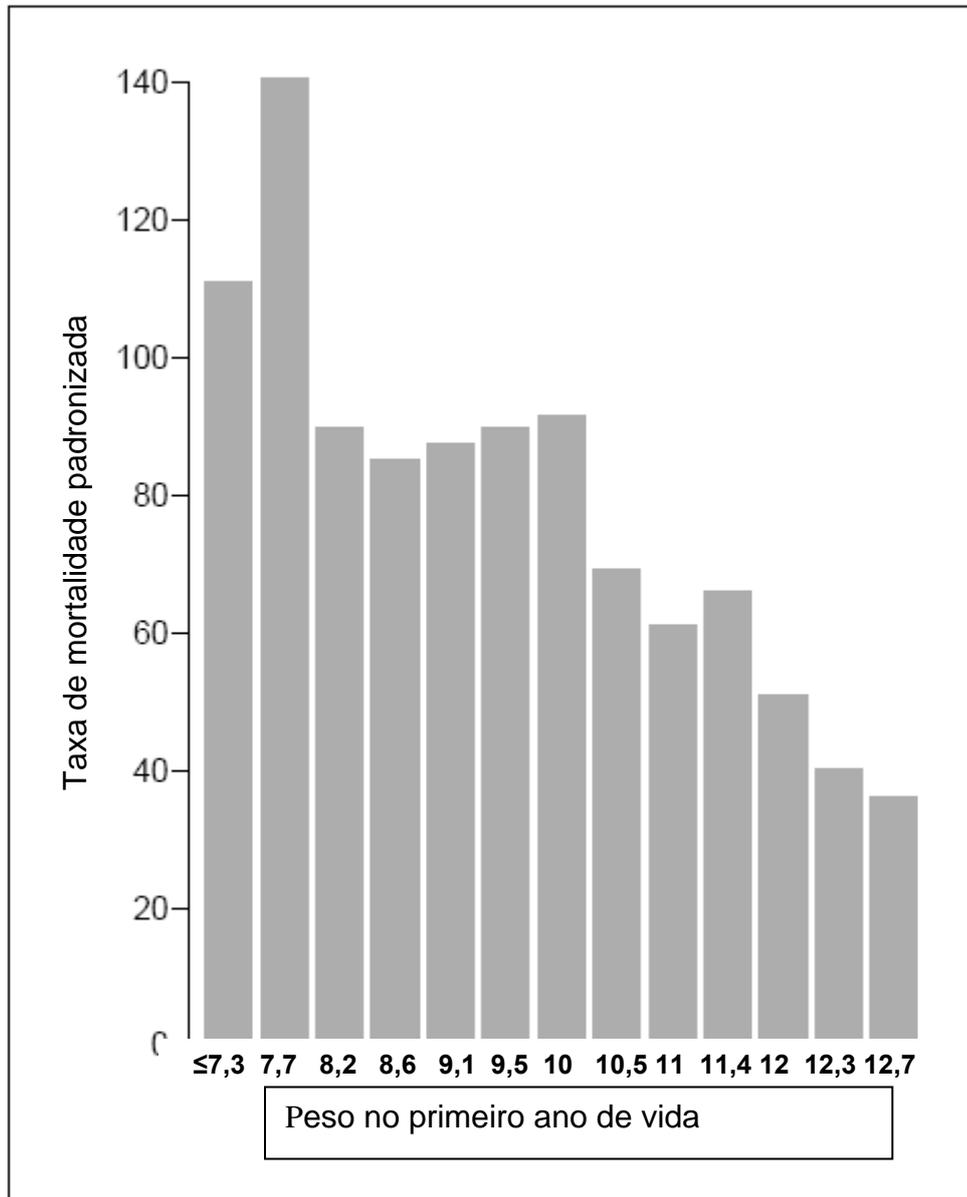


Figura 3. Mortalidade por doenças coronarianas em 8.175 homens nascidos entre 1911 e 1930 de acordo com o peso em 1 ano. Adaptado de (Osmond, Barker et al. 1993).

Brenner e colaboradores originalmente propuseram que a teoria da hipertensão essencial, associada à hipótese do RCIU, é uma consequência da redução do número total de néfrons, levando à retenção de sódio e aumento da taxa de filtração glomerular com glomeruloesclerose (Brenner et al. 1988). O indivíduo entraria num ciclo onde a pressão arterial média continuaria a aumentar para manter a função hemodinâmica e resultaria em dano renal irreversível (Brenner et al. 1982; Mackenzie and Brenner 1995; Mackenzie et al. 1996; Brenner and Mackenzie 1997) (Figura 4). Um estudo recente mostrou que em humanos o número de néfrons varia de 227.327 a 1.825.380 e que há uma correlação forte que prediz um aumento de 257.426 néfrons para cada quilo de peso ganho ao nascer (Hughson, Farris et al. 2003), corroborando a relação negativa entre peso ao nascer e pressão arterial.

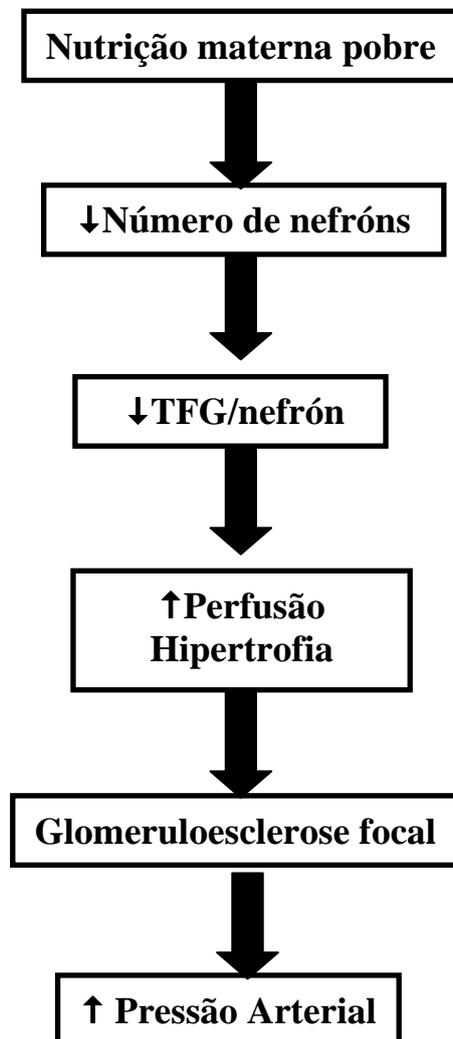


Figura 4. Resumo diagramático de como alterações durante o processo de nefrogênese podem resultar em hipertensão no adulto. TFG – taxa de filtração glomerular.

## **2.a Programação da Hipertensão Arterial**

### **2.a.1 Estudos Epidemiológicos: Peso da Placenta**

A relação entre o baixo peso ao nascimento e o elevado peso da placenta também prediz uma elevação da pressão arterial na vida adulta. Estudos em pacientes australianos (Law et al. 1991) e ingleses (Barker et al. 1992), com idades variando entre 4 e 40 anos de idade mostram que há uma relação inversa entre o peso da placenta e o peso do feto, sendo a associação com a elevação da pressão arterial relativa ao aumento da placenta. Moore e colaboradores destacam que a elevação da pressão arterial já pode ser vista mesmo em indivíduos de 8 anos de idade (Moore et al. 1996). Em contrapartida, existem trabalhos em que essa relação está inversa e o baixo peso placentário leva à elevação da pressão arterial (Martyn et al. 1996; Forsen et al. 1997; Thame et al. 2000). (Tabela 1)

Fenótipo	Alterações cardiovasculares	Referências
<i>Pressão Arterial</i>		
Baixo peso placentário	↑ PA no adulto	(Campbell et al. 1996)
Baixo volume placentário	↑ PA na infância	(Thame et al. 2000)
Alto peso placentário	↑ PA no adulto	(Barker et al. 1990)
Alto peso placentário	↑ PA na infância	(Law et al. 1991)
Alto peso placentário	↑ PA na infância	(Moore et al. 1996)
Razão placentária elevada	↑ PA no adulto	(Barker et al. 1992)
Razão placentária elevada	↑ PA no adulto	(Moore et al. 1999)
<i>Doença coronariana</i>		
Baixo peso da placenta	↑ Doença coronariana em homens	(Forsen et al. 1997)
Razão placentária baixa	↑ Doença coronariana em homens	(Martyn et al. 1996)
Razão placentária elevada	↑ Doença coronariana em mulheres	(Forsen et al. 1999)
<i>Derrame</i>		
Baixo peso placentário	↑ Incidência de derrames	(Martyn et al. 1996)

Tabela 1. Associações entre o peso da placenta e a relação peso da placenta/peso ao nascimento (razão placentária) e alterações cardiovasculares. PA — pressão arterial. (Adaptado de Godfrey 2002).

## 2.a.2 Estudos Epidemiológicos: Peso ao Nascimento

No final dos anos 80, Gennser e colaboradores revelaram que o risco de aumento da pressão diastólica era significativamente alto em um grupo de homens alistados para o exército que tinham sido pequenos ao nascer. Nele, os autores concluíram que ser pequeno para a idade gestacional poderia ser um indicativo para a elevada pressão arterial na vida adulta (Gennser et al. 1988) e, portanto, um agravante para o risco cardiovascular. Essa associação foi observada em estudos posteriores, mais robustos, onde cerca de 66.000 pessoas de todas as idades foram incluídas (Law and Shiell 1996).

Contudo, tem se discutido a noção de que avaliar somente o peso ao nascer seria uma medida grosseira do peso fetal que não distingue um bebê raquítico de um magro, diferenças no tamanho da cabeça, ou variações no balanço entre tamanho fetal e tamanho da placenta. Através das análises dos dados do *Shroe Green Hospital* em Preston, foram definidos dois tipos de bebês que desenvolveram pressão arterial elevada: a) bebês magros, com um índice ponderal baixo (peso ao nascer/comprimento<sup>3</sup>) e com circunferência cranial abaixo da média e b) bebês que apresentaram desproporção entre os tamanhos do tronco e cabeça, caracterizada pela razão circunferência do crânio/comprimento elevada (Barker et al. 1992).

### 2.a.3. Estudos Experimentais: Alterações Cardiovasculares

O melhor e mais bem caracterizado modelo animal para a hipótese de Barker foi aquele que utilizou a administração de dietas maternas contendo baixa quantidade de proteínas durante a gestação. Estes estudos foram baseados nas observações iniciais de Zeman e colaboradores onde uma dieta contendo 40-60 g de proteínas/kg (restrição de 67%-50% de proteínas) resultava em baixo peso ao nascimento (Zeman 1968; Zeman and Stanbrough 1969).

Langley e Jackson descreveram que a administração de uma dieta contendo 60g, 90g ou 120g de proteínas/kg de dieta às ratas gestantes resultaria em proles com pressões arteriais elevadas, apesar das fêmeas terem sido alimentadas com a dieta do grupo controle logo após o nascimento da prole (Langley and Jackson 1994).

Os estudos seguintes concentraram-se nos efeitos a longo prazo da utilização de uma dieta contendo 9g/kg de proteínas na dieta (restrição de 15% de proteínas). As proles apresentaram distúrbios no crescimento fetal (Levy and Jackson 1993; Langley-Evans and Nwagwu 1998), sendo os fetos menores que seus respectivos controles entre os dias 14 e 20 (Langley-Evans et al. 1996). Esse efeito no crescimento é aumentado se a restrição ocorrer no início da gestação, entre o dia 0 e o dia 7 (Langley-Evans and Nwagwu 1998). Por outro lado, o efeito sobre o retardo no crescimento parece ser mais intenso no final da gestação (Lesage et al. 2001) e é acompanhado pela elevação mais significativa da pressão arterial (Langley-Evans et al. 1996).

O fenótipo hipertensivo observado nesta prole pode se manifestar bem precocemente, com apenas quatro semanas de idade, variando entre 7 e 30 mmHg de diferença em relação ao grupo controle (Langley and Jackson 1994; Langley-Evans et al. 1996). Entretanto, as diferenças entre machos e fêmeas foram observadas anos depois, quando uma dieta com 9% de proteínas, que representaria a quantidade de proteínas equivalente

para uma rata não-gestante (Clarke et al. 1977), gera hipertensão somente em machos (Woods et al. 2005), ao passo que uma mais intensa (5%) é capaz de causar esse efeito em ambos o gêneros (Woods et al. 2004). O efeito hipertensivo da má nutrição materna parece não ser dependente da mudança na pressão arterial da gestante, já que esse tipo de alteração não está presente neste modelo (Langley and Jackson 1994).

Um alvo para a programação da função cardíaca é o número final de cardiomiócitos. Enquanto o impacto das perturbações intra-uterinas, incluindo a restrição calórico-protéica e dietas hipoprotéicas, sobre a nefrogênese é bem documentado, existem poucos trabalhos que relatam as associações entre o número ou o tamanho dos cardiomiócitos nos fetos que sofrem restrição do crescimento intra-uterino. Dois trabalhos, contudo, se destacam. Recentemente, Corstius e colaboradores descreveram uma redução significativa de cardiomiócitos ao nascer em ratos com retardo do crescimento intra-uterino (Corstius et al. 2005). Cheema e colaboradores encontraram uma relação entre a dieta materna e a incidência de disfunção cardíaca na vida adulta (Cheema et al. 2005).

#### 2.a.4 Estudos Experimentais: Alterações Renais

O rim, órgão que possui a função de filtração sanguínea, tem como sua unidade funcional o néfron, morfologicamente dividido em corpúsculo renal ou glomérulo (composto pelo tufo capilar coberto pela cápsula de Bowman), e pelo sistema tubular (túbulo contorcido proximal, alça de Henle e túbulo contorcido distal) que se conecta a ducto coletor (Hansen and Koeppen 2003) (Figura 5).

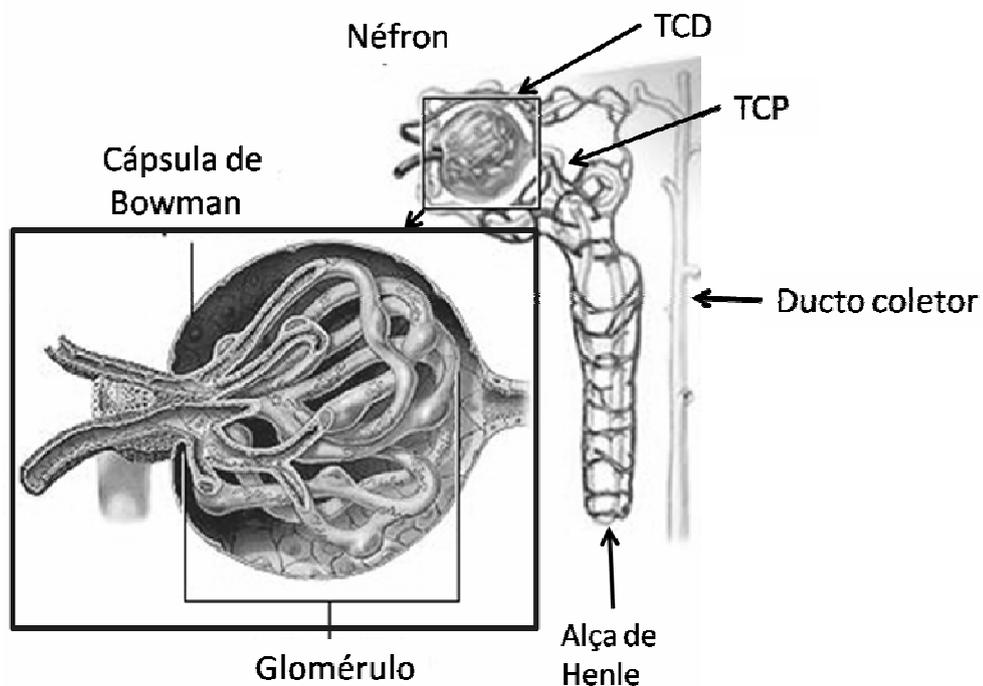


Figura 5. Estrutura morfológica do néfron. TCP: Túbulo contorcido proximal. TCD: Túbulo contorcido distal. Adaptado de (Hansen and Koeppen 2003).

O rim sofre mudanças estruturais durante o desenvolvimento. A primeira fase é denominada nefrogênese, onde os néfrons são originados. A segunda é a de maturação anatômica dos néfrons existentes. Desta forma, há mudanças na histologia glomerular e tubular. Os néfrons passam por quatro etapas de maturação morfológica distintas: a fase vesicular, a fase de "vírgula", a fase em "S" e a fase de tufo glomerular. Estas estruturas, com exceção da fase de tufo glomerular, se encontram na região próxima a cápsula renal. Esta região recebe o nome de Região Nefrogênica. A maturação dos néfrons se dá de forma centrípeta e sempre constante, resultando na presença de néfrons em fases distintas num mesmo momento. A terceira fase é a de crescimento do néfron cuja maturação foi feita corretamente (Hansen and Koeppen 2003) (Figura 6).

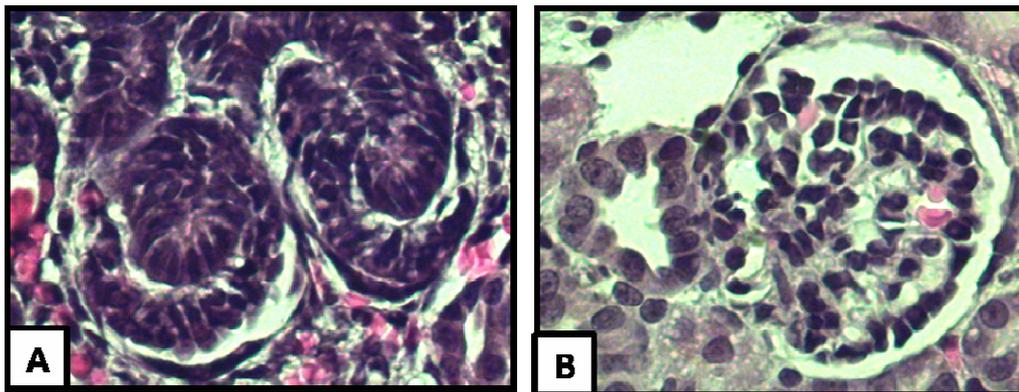
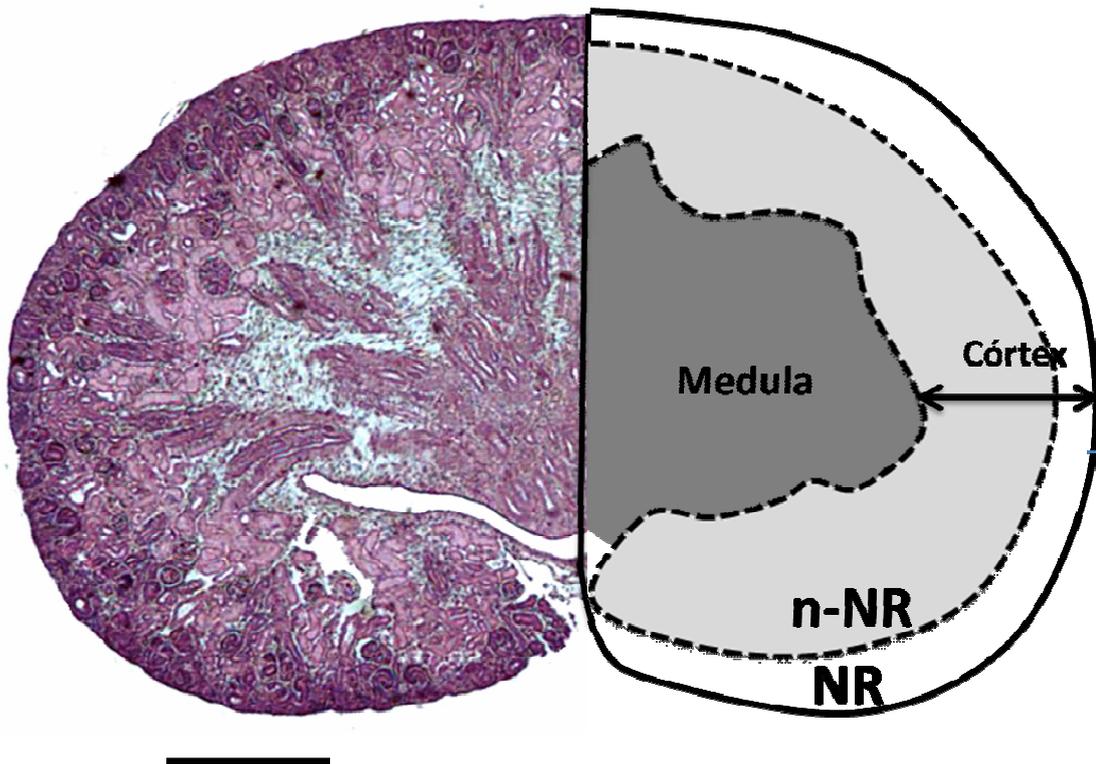


Figura 6. Corte longitudinal do rim de camundongo (primeiro dia pós-natal). Neste estágio a morfologia renal é bastante estratificada. As duas principais regiões são o córtex e a medula. O córtex é subdividido em duas regiões: Região nefrogênica (NR) – onde estão localizados os glomérulos avascularizados (A) — e Região não-nefrogênica (n-NR)-onde estão localizados os glomérulos vascularizados (B). Barra: 1,5 mm. Coloração: Hematoxilina e eosina.

O rim fetal parece ser extremamente vulnerável aos efeitos do retardo do crescimento. Em humanos, a nefrogênese se completa nas 36 semanas de gestação fetal. Desta forma, um recém-nato possui o mesmo número de néfrons que um adulto saudável (Kleinman 1982). No rato, a nefrogênese começa por volta do 12º dia gestacional e não está completa até o 8º dia pós-natal (Larsson et al. 1980; Larsson and Maunsbach 1980). Estudos sobre a insuficiência útero-placentária em ratos, induzida pela ligadura bilateral da artéria uterina no 19º dia de gestação, mostram a redução no número de glomérulos no rim maduro (Pham et al. 2003). Isto se deve ao aumento da expressão do gene para *Bcl-2* e um significativo aumento na expressão do gene para a proteína *Bax* no rim (Pham et al. 2003), levando a um aumento da apoptose em nível metanéfrico (Welham et al. 2002), o que justifica a diminuição no número de glomérulos formados.

Recentemente, Woods e colaboradores estudaram as alterações quanto à função renal de animais com baixo peso espontâneo. Neste trabalho, foi detectada uma freqüência de nascimentos equivalentes a 1 por prole de animais com peso ao nascimento aproximadamente 10% menor que os animais de peso normal. Estes animais apresentavam elevação da pressão arterial ( $\pm 20$  mmHg em machos e  $\pm 10$  mmHg em fêmeas) e proteinúria, apenas vistas em machos com 20 semanas de idade. A elevação da pressão arterial não se devia às lesões renais, e poderia ter relação com alterações funcionais e/ou estruturais imperceptíveis às medições feitas. (Woods and Weeks 2004).

Contudo, o uso de dietas hipoprotéicas ou hipoenergéticas tem impacto forte sobre o desenvolvimento renal. Estudos no final década de sessenta e início da década de oitenta já destacam redução no número de glomérulos (Zeman 1968; Zeman and Stanbrough 1969; Zeman 1983). Trabalhos mais recentes descrevem aumento do diâmetro glomerular, glomeruloesclerose e função renal prejudicada (Regina et al. 2001; Almeida and Mandarim-de-Lacerda 2005).

Uma restrição protéica moderada (9% de proteínas da dieta) gera uma redução no número de néfrons na vida pós-natal precoce e na vida adulta (Langley-Evans et al. 1999; Vehaskari et al. 2001; Woods et al. 2004), diminuição da função renal (taxa de filtração glomerular/peso renal) (Nwagwu et al. 2000; Woods et al. 2001) e aumento das concentrações plasmáticas de sódio (Manning and Vehaskari 2001). Existem evidências de que a restrição protéica materna aumentaria a concentração de receptores para glicocorticóides e também a resposta  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  no rim (Bertram et al. 2001), contribuindo para a retenção de sódio e mediando a programação da hipertensão corticóide-dependente.

A administração de dexametasona durante a gestação resulta em diminuição do número de néfrons, glomeruloesclerose e hipertensão, porém não diretamente associadas, uma vez que o grupo que recebeu a droga durante o 13º e 14º dias de gestação somente apresentou elevação da pressão arterial. (Ortiz et al. 2001; Ortiz et al. 2003).

Foi sugerido que haveria um período crítico para o surgimento de hipertensão e este seria determinado por danos durante a nefrogênese. Em um estudo recente, Pires e colaboradores descreveram que a utilização de uma dieta contendo apenas 5% de proteínas durante a gestação e nos 10 primeiros dias pós-natais, cobrindo assim todo o período de nefrogênese, retarda o desenvolvimento renal da prole (Pires et al, 2006).

Langley-Evans e colaboradores, corroborado por Woods e colaboradores, indicam a perturbação no processo de nefrogênese como sendo parte importante na predisposição do indivíduo a um fenótipo hipertensivo na vida adulta (Langley-Evans et al. 1999; Langley-Evans et al. 1999; Woods et al. 2004). Estudo em prole de camundongos C57/BL6 submetidos à restrição protéica materna moderada (9%) durante a gestação e lactação, evidenciou uma redução no número de néfrons tanto em machos quanto em fêmeas, quando comparados à prole controle que ingeriu ração normoprotéica (20%). O comprometimento da nefrogênese

em resposta à restrição protéica torna estes animais mais suscetíveis ao desenvolvimento de hipertensão arterial na vida adulta e reproduz em camundongos os resultados observados anteriormente apenas em ratos (Hoppe et al. 2007).

Sabe-se que o Sistema-Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA) é primordial para um desenvolvimento renal correto (Chen et al. 2004) e que seus componentes são partes essenciais no controle da pressão arterial.

A má nutrição materna leva à alteração na expressão gênica normal durante nefrogênese, causando uma *down-regulation* da expressão de renina e angiotensina (Rosenberg et al. 1990), níveis reduzidos de angiotensina II no tecido renal (Woods et al. 2001) e alteração em genes-chaves do SRAA como o da enzima conversora de angiotensina (ECA). A resposta a tais alterações é o comprometimento da nefrogênese e uma posterior elevação da sensibilidade vascular à angiotensina II, levando à hipertensão (Langley-Evans et al. 1999).

### 3. Programação fetal e estresse oxidativo

#### 3.a. Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) ânion hidroxila ( $OH^-$ ) e espécies reativas de nitrogênio como o óxido nítrico (ON) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), são produzidas de forma constitutiva em organismos aeróbios e estão envolvidas em inúmeros mecanismos como reações enzimáticas (como a xantina oxidase e a aldeído oxidase) e a auto-oxidação de certos compostos (catecolaminas), além de inúmeras vias da homeostase celular como sinalização, diferenciação e crescimento celular. Altos níveis de ROS comprometem funções biológicas e resultam em dano e morte celular (Droge 2002; Li and Shah 2004).

Os organismos eucarióticos apresentam vários mecanismos de defesa antioxidante contra altas concentrações de ROS. A superóxido dismutase de cobre e zinco (CuZnSOD) está localizada principalmente no citoplasma, enquanto que a SOD de manganês (MnSOD), uma proteína distinta que é codificada por um conjunto de genes diferentes, está localizada primariamente na mitocôndria (Ho, Howard et al. 1991). Ambas as enzimas catalisam a reação:  $O_2^- + O_2^- + 2H^+ = O_2 + H_2O_2$ . O  $H_2O_2$  é convertido em  $H_2O + O_2$  nos peroxissomos pela Catalase, e no citoplasma pela glutathione peroxidase (GPX) (Figura 7).

Quando a produção de oxidantes supera a produção de mecanismos de defesa antioxidante, seja por aumento das concentrações de oxidantes, seja pela diminuição das defesas antioxidantes, há a oxidação de macromoléculas biológicas, como o DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos (Van Remmen and Jones 2009). Este processo recebe o nome de estresse oxidativo.



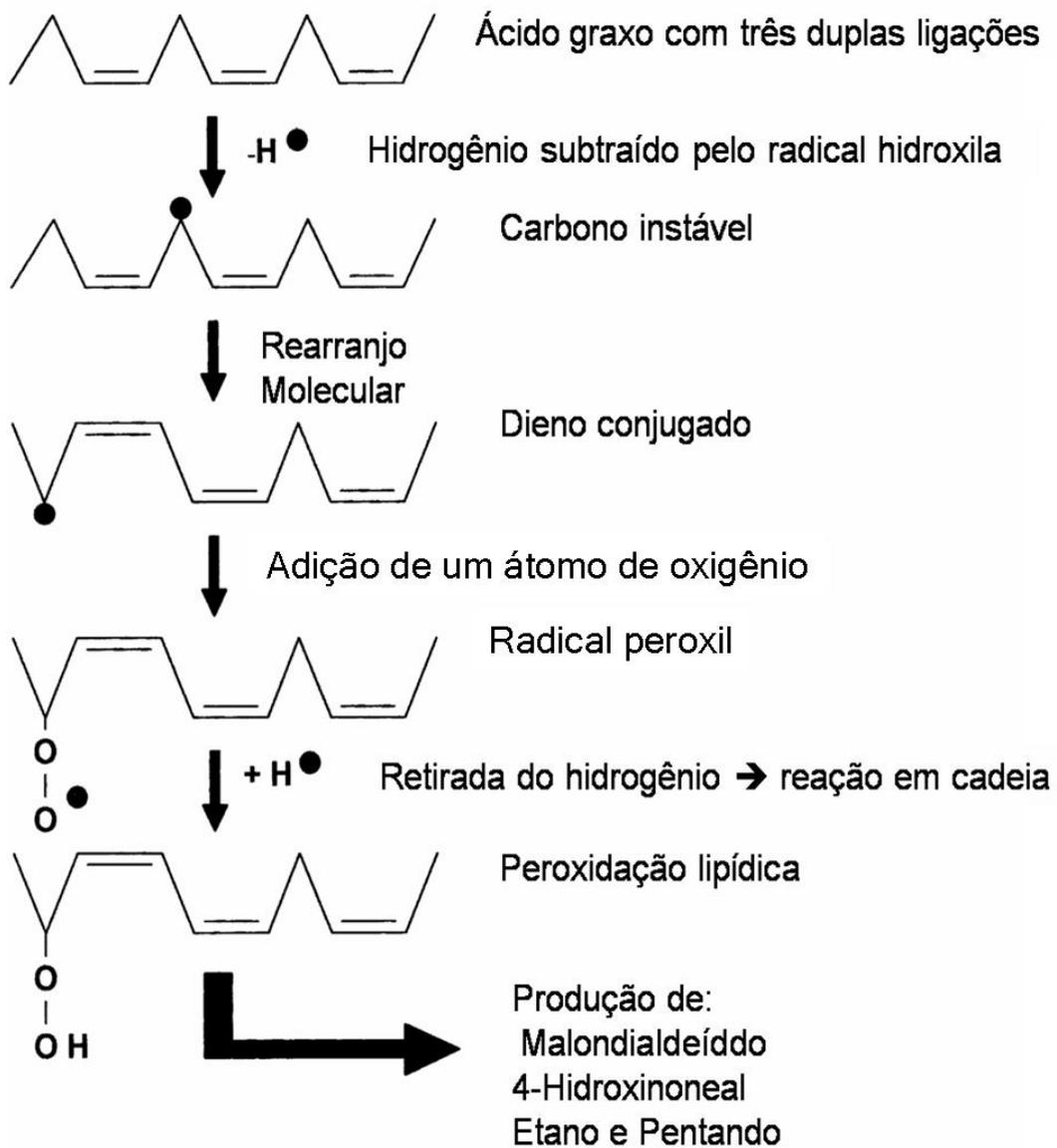


Figura 8. Reação em cadeia do processo de peroxidação lipídica.  
(Adaptado de Halliwell and Gutteridge 1991)

### 3.b. Estresse oxidativo e Programação Fetal

Várias evidências mostram que o estresse oxidativo está presente e, possivelmente, é um dos elementos patogênicos de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose, a disfunção vascular e o remodelamento vascular (Li and Shah 2004). As ROS também são consideradas importantes uma vez que muitas doenças fetais e neonatais estão associadas com o estresse oxidativo ou são de natureza pró-oxidante, como o diabetes gestacional, hipertensão gestacional e pré-eclâmpsia, tabagismo, má-nutrição ou supernutrição e prematuridade (Peuchant et al. 2004; Gupta et al. 2005; Arguelles et al. 2006; Biri et al. 2006; Vincent and Taylor 2006).

Em modelos de programação, a elevação da pressão arterial e a disfunção vascular são caracterizadas pela produção aumentada de superóxido gerado pelos vasos, pelo menos em parte, pela NADPH oxidase (Brawley et al. 2003; Yzydorczyk et al. 2006).

O uso de um mimético da SOD, denominado tempol, normalizou a elevada vasoconstrição à angiotensina II em proles de fêmeas que sofreram restrição protéica, sugerindo que há uma produção vascular de ânion superóxido (Yzydorczyk et al. 2006). A quase completa inibição da produção de superóxido em presença de apocinina, inibidor da NADPH oxidase, indica que esta é a maior fonte de superóxido na aorta da prole, seja na condição basal, seja após a estimulação por angiotensina II. Esses resultados estão em concordância com vários outros trabalhos que relatam que o NADH unido à membrana e as NADPH oxidases são as fontes mais importantes de ROS na parede vascular e que a angiotensina II aumenta a produção de ROS vascular (principalmente o ânion superóxido) através da ativação da NADH e da NADPH oxidases (Touyz 2004; Touyz and Schiffrin 2004).

Estudos recentes relatam diminuições significativas nas atividades de glutathiona, calatase e SOD na prole restrita na gestação (Cambonie et al. 2007; Fetoui et al. 2009). Além disso, a utilização de um inibidor de

peroxidação lipídica denominado "Lazaroid" em fêmeas grávidas e concomitante administração da dieta hipoprotéica, previniu a elevação da pressão arterial e a disfunção vascular da prole.

O tratamento com tempol reduziu a marcação para nitrotirosina nos rins e a elevação da pressão arterial de proles, mesmo quando as matrizes foram alimentadas com dieta hipoprotéica (Stewart et al. 2005). A suplementação de matrizes de ratas espontaneamente hipertensas (SHR) com L-arginina (a qual favorece a produção de óxido nítrico) e vitaminas antioxidantes durante a gestação e o período pós-parto resultou na redução da pressão arterial persistente na prole adulta (Racasan et al. 2005).

Anteriormente foi descrito que o aumento do estresse oxidativo precoce resulta na rarefação de microvasos por necrose das células endoteliais e alteração de fatores angiogênicos específicos o que resulta na rarefação anatômica de capilares e arteríolas (Brault et al. 2003; Don et al. 2003; Pladys et al. 2005).

Embora o papel do estresse oxidativo esteja bem definido nas doenças cardiovasculares, o papel protetor dos mecanismos antioxidantes ainda permanece obscuro. As informações acima levam à formulação de um novo esquema que inclui a participação do estresse oxidativo como parte importante no processo de programação fetal (Figura 9).

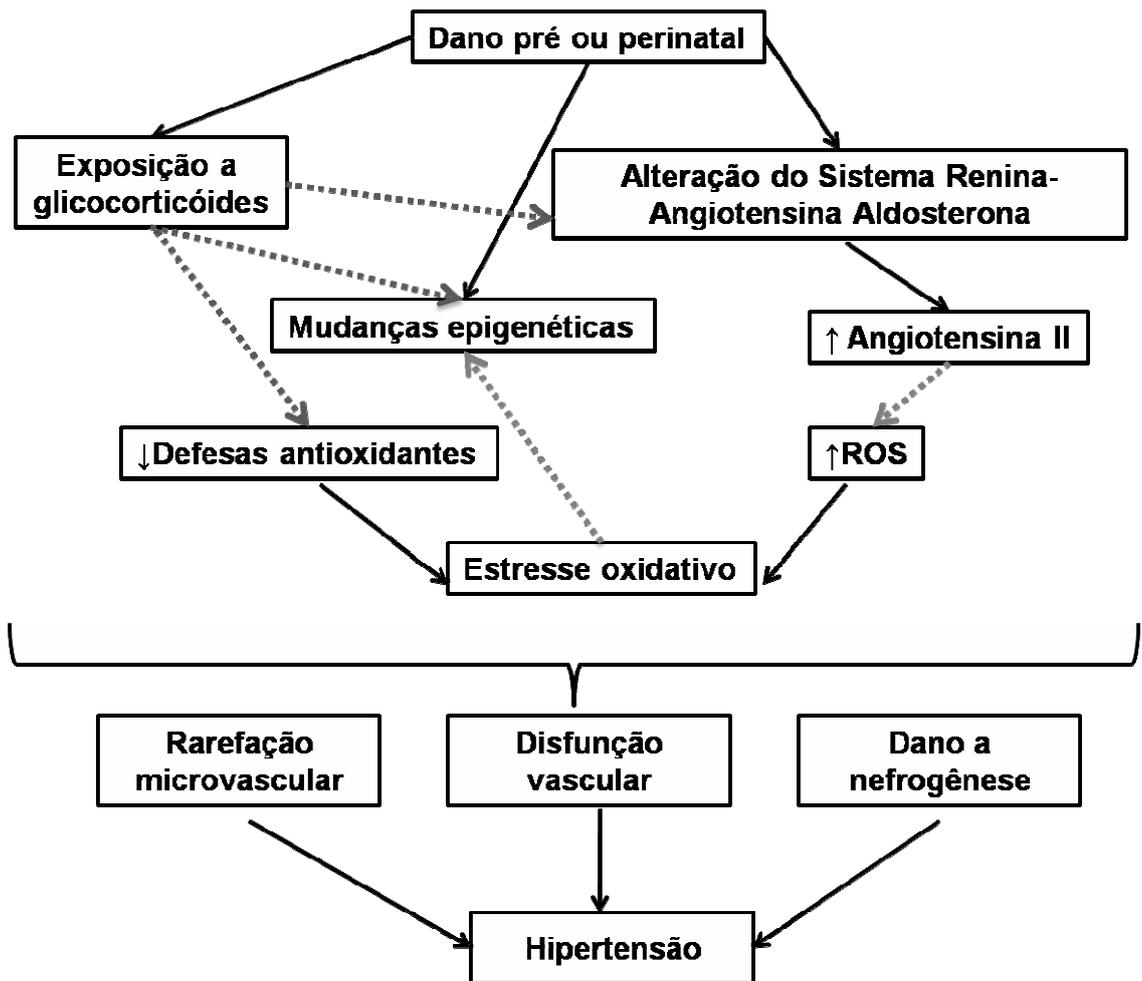


Figura 9. Mecanismos descritos (setas pretas) e potenciais (setas cinza e pontilhadas) da participação do estresse oxidativo sobre a hipertensão arterial programada. (Adaptado de Nuyt 2008).

### III-Extrato de casca de Uva: efeitos protetores

O vinho proveniente da variedade *vinífera*, nativa da Europa e do Oeste da Ásia, foi introduzido no sul do Brasil, no estado do Rio Grande do Sul, em 1839. As uvas (espécies *Vitis vinífera* e *Vitis labrusca*) e outros constituintes derivados delas como o suco de uva e o vinho têm recebido bastante atenção nos últimos anos. O consumo de quantidades adequadas de frutas e vegetais é considerado essencial para que se mantenha uma vida saudável. Uma publicação recente sobre a “nova pirâmide alimentar” recomenda um consumo diário de duas a três porções de frutas. Uma grande ingestão de frutas e vegetais está correlacionada à redução das doenças cardiovasculares e câncer (Yoshida 1992; Da et al. 2002).

O efeito protetor das uvas foi inicialmente descrito em 1979 (St Leger et al. 1979) e depois corroborado em 1992 (Renaud and de Lorgeril 1992) 1998 (Truelsen et al. 1998) e 2001 (Rotondo et al. 2001), quando foi demonstrada uma correlação inversa entre a mortalidade por doenças cardiovasculares e o consumo regular de vinho, mesmo havendo ingestão elevada de alimentos ricos em gorduras saturadas. Tal correlação caracteriza o chamado “Paradoxo Francês”.

O mecanismo pelo qual o vinho exerce seu efeito cardioprotetor ainda não foi completamente estabelecido. As ações inibitórias da agregação plaquetária (Demrow et al. 1995), diminuição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Hertog et al. 1993), inibição da expressão de moléculas pró-trombóticas e pró-escleróticas (Feng and Cheng 1999), redução da síntese de endotelina (Corder et al. 2001) e aumento da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (Wallerath et al. 2003), conferem ao vinho uma característica vasodilatadora significativa.

Primeiramente, os efeitos benéficos do vinho foram atribuídos ao etanol presente em sua composição, uma vez que outras bebidas alcoólicas também mostram benefícios à saúde (Ginter and Simko 2008).

Estudos realizados em nosso laboratório vem demonstrando efeitos anti-hipertensivos do extrato não alcoólico feito a partir da casca da uva

(GSE), provavelmente devido ao efeito vasodilatador dependente de endotélio (de Moura et al. 2002). A atenção também se voltou para os outros componentes do vinho, entre os quais os polifenóis se destacam. Estas estruturas estão presentes na casca, na polpa e nas sementes da uva, e possuem pelo menos um anel aromático no qual um dos hidrogênios é substituído por um grupo hidroxila. Podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal dividindo-se em flavonóides, maioria dos fenóis no vinho e derivados da extração da casca e da polpa da uva durante o processo de fermentação (flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavanóis) e não-flavonóides (como o resveratrol) (Terao 2009) (Figura 10).

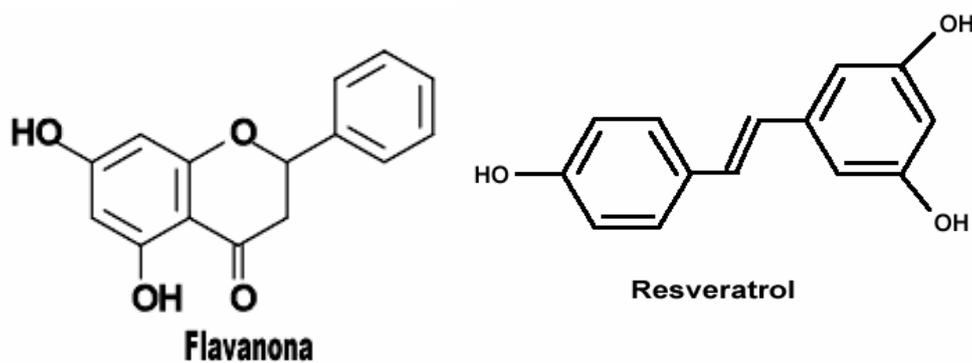


Figura 10. Estrutura química dos flavonóides e não-flavonóides. (Fonte: Shah 2009).

Desta forma, a maioria dos efeitos benéficos do vinho vem sendo atribuída aos seus polifenóis, como o aumento da expressão da óxido nítrico sintase endotelial e os efeitos vasodilatadores (Wallerath et al. 2002; Madeira et al. 2009).

Uma diversidade de estudos tem descrito as diferentes ações benéficas dos polifenóis presentes nas diferentes porções da uva, entre elas se destacam a casca e as sementes, onde foram relatadas ações antioxidantes, antiinflamatórias e antimicrobianas, além das ações cardioprotetoras, hepatoprotetoras e neuroprotetoras (Nassiri-Asl and Hosseinzadeh 2009).

O extrato produzido em nosso laboratório a partir da espécie *Vitis vinifera*, vem se mostrando eficiente em induzir a vasodilatação dependente do endotélio, possuindo ação antioxidante e anti-hipertensiva (de Moura et al. 2002; de Moura et al. 2007).

#### **IV - Hipótese**

A utilização de um extrato à base de casca de uvas (GSE), rico em antioxidantes, durante a gestação, minimizaria os efeitos deletérios renais precoces da prole, oriundos da administração de dieta hipoprotéica materna.

## V- Objetivos

Objetivo geral:

- Investigar os efeitos da administração de um extrato de casca de uvas (GSE) rico em antioxidantes sobre a morfologia renal precoce na prole de fêmeas sob restrição protéica intensa durante a gestação.

Objetivos específicos:

1) Induzir restrição protéica materna intensa através da utilização de uma dieta isocalórica contendo 6% de proteínas.

2) Estudar as alterações oriundas da restrição protéica materna intensa sobre:

- a) Equilíbrio redox tecidual
- b) Dano oxidativo tecidual
- c) A massa corporal nos animais ao nascimento.
- d) A morfologia renal:

(i) Relação massa renal/massa corporal

(ii) Volumes renais:

1. Cortical (Região Nefrogênica e Região não-Nefrogênica)

2. Medular

(iii) Número de glomérulos

1. Vascularizados

2. Avascularizados

3) Investigar se existe correlação entre a massa corporal e o número de glomérulos através de um modelo alométrico log-transformado e análise de regressão linear com comparação de slopes.

## VI - MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Produção do Extrato da casca de uva (GSE)

O extrato foi feito a partir de uvas da espécie *Vitis vinifera*. Estas uvas foram obtidas de vinhedos selecionados localizados no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. A preparação do GSE já foi descrita anteriormente. Resumidamente, as uvas são lavadas em água corrente e as cascas são separadas das polpas. As cascas são fervidas em água destilada e posteriormente, álcool etílico foi adicionado para a decocção. A solução foi mantida sob refrigeração e o álcool foi evaporado numa pressão baixa a 55°C. O extrato foi então liofilizado e congelado a -20°C até o dia do uso. Normalmente, 100g de cascas frescas dão origem a 8,9g de extrato liofilizado (Madeira et al. 2005). A concentração total de polifenóis no GSE foi medida pelo método de Folin-Ciocalteu. A concentração final de polifenóis obtida foi de 55,5 mg/g GSE (de Moura et al. 2002).

### 2. Grupos experimentais

Camundongos da linhagem c57-bl/6 adultas (3 meses de idade), pesando  $19,4 \pm 0,9$ g, obtidas do Núcleo de Animais de laboratório (NAL) da Universidade Federal Fluminense, foram acondicionadas em ambiente de luz com ciclos de 12 horas de claro/escuro e temperatura controlados durante todo o experimento. Os animais foram acasalados e o dia 0 de gestação foi considerado a partir da visualização de um plug vaginal nas fêmeas. Quatro grupos principais foram formados (n=6 cada):

a) Grupo Controle (C) que recebeu dieta AIN 93-G (com 19,3% de proteínas Rhoister, São Paulo, Brasil) *ad libitum* (Reeves et al. 1993). Tabela 2;

b) Grupo Restrição Protéica (RP) que recebeu dieta com 6% de proteínas (Rhoister, São Paulo, Brasil) *ad libitum*. Tabela 2;

c) Grupo Controle tratado com GSE (C+GSE) que recebeu dieta AIN

93-G (com 19,3% de proteínas Rhoster, São Paulo, Brasil) *ad libitum* e 200mg/kg/dia de GSE dissolvidos na água de beber.

d) Grupo Restrição Protéica tratado com GSE (RP+GSE) que recebeu a dieta com 6% de proteínas (Rhoster, São Paulo, Brasil) *ad libitum* e 200mg/kg/dia de GSE dissolvidos na água de beber.

As garrafas eram cobertas da luz e as soluções e os volumes eram calculados previamente para suprir a necessidade diária dos animais.

Composição das dietas isocalóricas		
Nutrientes	Controle	Restrição Protéica
	%	%
Carboidratos	54	67
Proteínas-caseína	19	6
Lipídeos	16	16
Fibras	5	5
Mix de Minerais	1	1
Mix de Vitaminas	5	5

Tabela 2. Composição das dietas utilizadas no estudo. O mix de vitaminas e o mix de minerais foram formulados em concordância com o "American Institute of Nutrition" AIN 93G recommendation for rodent (Reeves et al. 1993).

A determinação do gênero dos filhotes foi feita através da distância ano-genital (Sharp and La Regina 1998) e o número de filhotes nascidos por fêmea, comprimento naso-anal (NAL) (Sharp and La Regina 1998) e massa corporal foram aferidos ao nascimento. Todos os procedimentos estavam de acordo com o Comitê de Ética Animal da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e com o Guia de Experimentação e Uso de Animais (NIH publicação nº 85-23, revisado em 1996). Anexo 1

### **3. Eutanásia e preparação técnica**

Não mais do que dois filhotes machos por matriz foram utilizados. Ao nascimento, os animais foram decapitados e rapidamente os rins e os fígados foram removidos. Os rins foram pesados em balança de precisão. Desta forma, o índice Massa Renal/Massa Corporal pode ser obtido. Os rins direitos e os fígados foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados para as análises bioquímicas. Os rins esquerdos foram imersos em solução fixadora preparada com antecedência com 1,27 mols/l de formaldeído em 0,1 M de solução tampão fosfato, com pH =7.2 por 48 horas em temperatura ambiente. Após este período, os órgãos foram processados em concentrações crescentes de alcoóis e xilol e foram incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, USA), seccionados a 5µm de espessura e corados em Hematoxilina e Eosina.

### **3.a. Ensaio bioquímicos**

#### **3.a.1. Homogeneização do material**

Os rins direitos e fígados foram descongelados e a homogeneização foi realizada em potter-Elvehjem a uma velocidade de 800 rpm, utilizando de tampão PBS (pH 7,0) e 1nM de anticoagulante quelante EDTA. Foram feitos *pools* de órgãos, onde não mais do que 2 filhotes de cada matriz foram utilizados. As amostras foram centrifugadas a 2.000 RPM por 10 minutos e os sobrenadantes foram reservados para as análises futuras.

#### **3.a.2. Dosagem de proteínas**

A dosagem de proteína foi realizada nas amostras pelo Método de Bradford (Bradford 1976). O reagente de Bradford contém como seu principal componente o corante coomasie brilliant blue, que em solução ácida se liga as proteínas da amostra, alterando a absorvância de 465 nm para 595 nm, medida através do leitor de microplacas.

#### **3.a.3. Dano oxidativo: Peroxidação lipídica renal e hepática**

Este método consiste na análise dos produtos finais da peroxidação lipídica (malondialdeídos-MDA) que, ao reagirem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA, Sigma), formam bases de Schiff. Os homogeneizados dos tecidos renais e hepáticos, previamente estocados, foram descongelados até atingir 37°C. As amostras foram misturadas com uma solução de ácido tricloracético a 10% e centrifugadas a 2.000 RPM por 10 minutos. Ao sobrenadante, foi adicionado ácido tiobarbitúrico a 0,86% e aquecido em banho-maria por 60 minutos. Após resfriamento, a absorvância do precipitado foi medida em espectrofotômetro (Spectronic 601-Milto Roy) com comprimento de onda de 532 nm. Uma curva padrão foi realizada, utilizando-se solução estoque de MDA a 10mM, preparada a partir do tetrametoxipropano (Sigma), sendo que as concentrações encontradas nas amostras apresentaram-se dentro desta curva,

mostrando boa linearidade com o padrão. Os dados foram apresentados como MDA/mg de proteína.

#### **3.a.4. Atividade da Catalase e da Superóxido dismutase hepáticas**

Alíquotas de homogeneizados foram utilizadas para dosar a atividade da catalase e da superóxido dismutase (Aebi 1984). A atividade enzimática de catalase foi determinada pelo decaimento de 10nM de peróxido de hidrogênio (Sigma) em solução de PBS (pH 7,0) monitorado a 240 nm. Já a mensuração da atividade de superóxido dismutase foi feita a partir de um ensaio cinético da inibição oxidação de 50nM epinefrina PBS, monitorado a 480 nm (Bannister and Calabrese 1987).

#### **3.a.5. Morfologia Renal**

A morfologia renal é extremamente estratificada um dia após o nascimento em camundongos. Desta forma, por motivos relacionados aos cálculos, considerou-se haver duas regiões principais no rim: O córtex – que se subdivide em região nefrogênica (NR-porção mais externa do córtex) e região não-nefrogênica (n-NR-porção mais interna do córtex) – e medula. Os tufo glomerulares que se localizavam na NR e não estavam completamente desenvolvidos foram considerados como glomérulos avascularizados (a-N[glom]). Os glomérulos restantes, localizados no córtex e que apresentavam uma Cápsula de Bowman bem definida, foram denominados glomérulos vascularizados (v-N[glom]). Foram utilizados 5 animais de cada grupo (todos provenientes de matrizes distintas).

#### **3.a.6. Microscopia de Luz e Estereologia**

Uma a cada 15 imagens completas do rim inteiro foi digitalizada (format TIFF, 36-bit colour, 1280 X 1024 pixels) utilizando-se uma câmera LC Evolution e um microscópio Olympus BX51. Estas imagens foram analisadas através do software IMAGE-PRO PLUS versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver spring, MD, USA).

Os volumes renais (V) foram calculados como já descrito anteriormente (Pires, Aguila et al. 2006), a partir do Método de Cavalieri, segundo a equação (Thame et al. 2000; Mandarin-de-Lacerda 2003)  $Vol = \Sigma \text{Áreas das imagens (mm}^2) \cdot T \text{ (mm)}$  (T equivale à distância entre cada imagem) (Figura 11).

Os seguintes volumes foram estimados:

- a) Volume cortical: CV ( $\text{mm}^3$ )
- b) Volume medular: MV ( $\text{mm}^3$ )
- c) Volume da região Nefrogênica: NRV ( $\text{mm}^3$ )
- d) Volume da Região não-Nefrogênica: n-NRV ( $\text{mm}^3$ )

O número total de glomérulos (N[glom]), definido como a soma do total de glomérulos vascularizados (v-N[glom]) e do total dos glomérulos avascularizados (a-N[glom]), foi estimado usando o método do *Fractionator* (Bertram et al. 1992; Pires et al. 2006) (Figura 12).

O volume médio do v-N[glom] foi definido como a razão entre o volume glomerular total e o número de glomérulos vascularizados (estimado por contagem de pontos, como descrito por anteriormente) (Almeida and Mandarin-de-Lacerda 2002). Utilizando os parâmetros acima, as seguintes relações foram feitas:

- a) Relação Córtico-Medular: CV/MV ( $\text{mm}^3$ )
- b) N[glom]/CV ( $\text{n/mm}^3$ )
- c) NRV/CV ( $\text{mm}^3$ )
- d) N-NRV/CV ( $\text{mm}^3$ )
- e) NRV/n-NRV ( $\text{mm}^3$ )
- f) Razão v-N[glom]/n-NRV / a-N[glom]/NRV (v-N[glom]/a-N[glom])

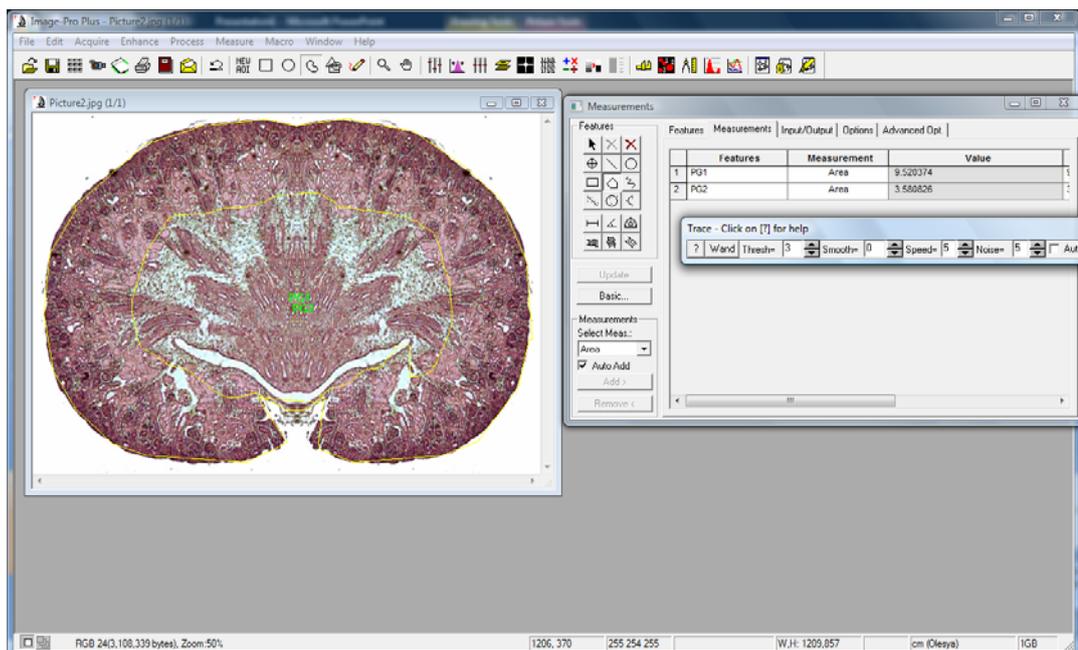
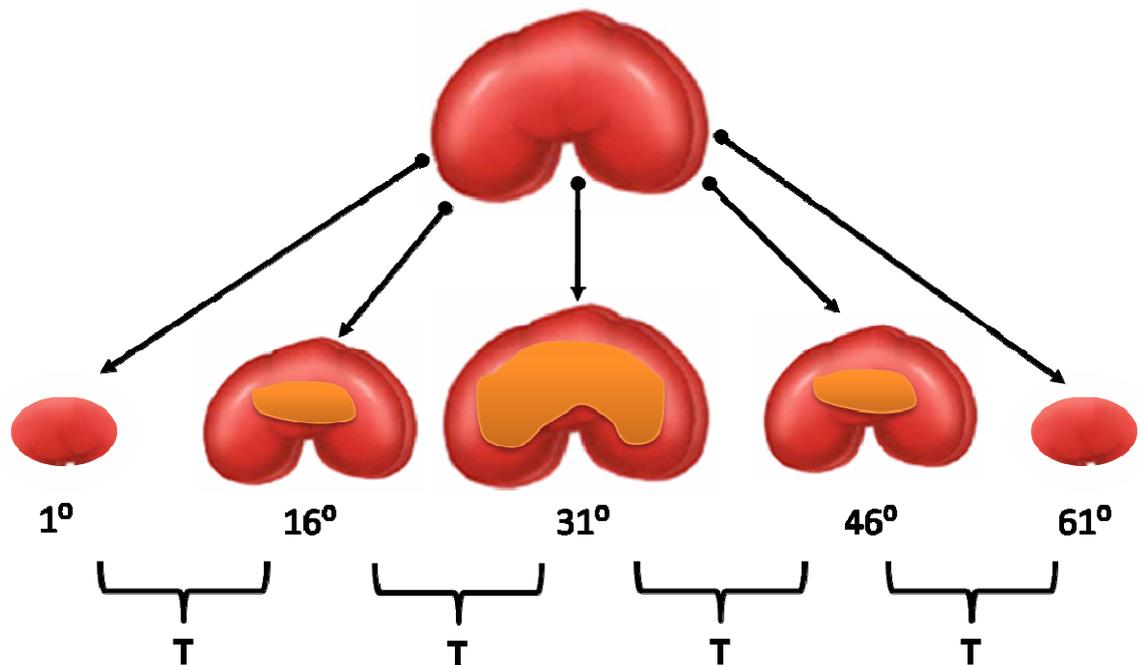


Figura 11. Princípio de Cavalieri. Método de estimativa de volume. Os volumes do córtex – área vermelha – e da medula – área laranja – foram estimados pelo produto somatório de áreas (A) – obtidas por análise das imagens pelo Software Image-Pro Plus, figura inferior – e a distância entre as amostras (T).  $Vol = \sum A \cdot T$ .

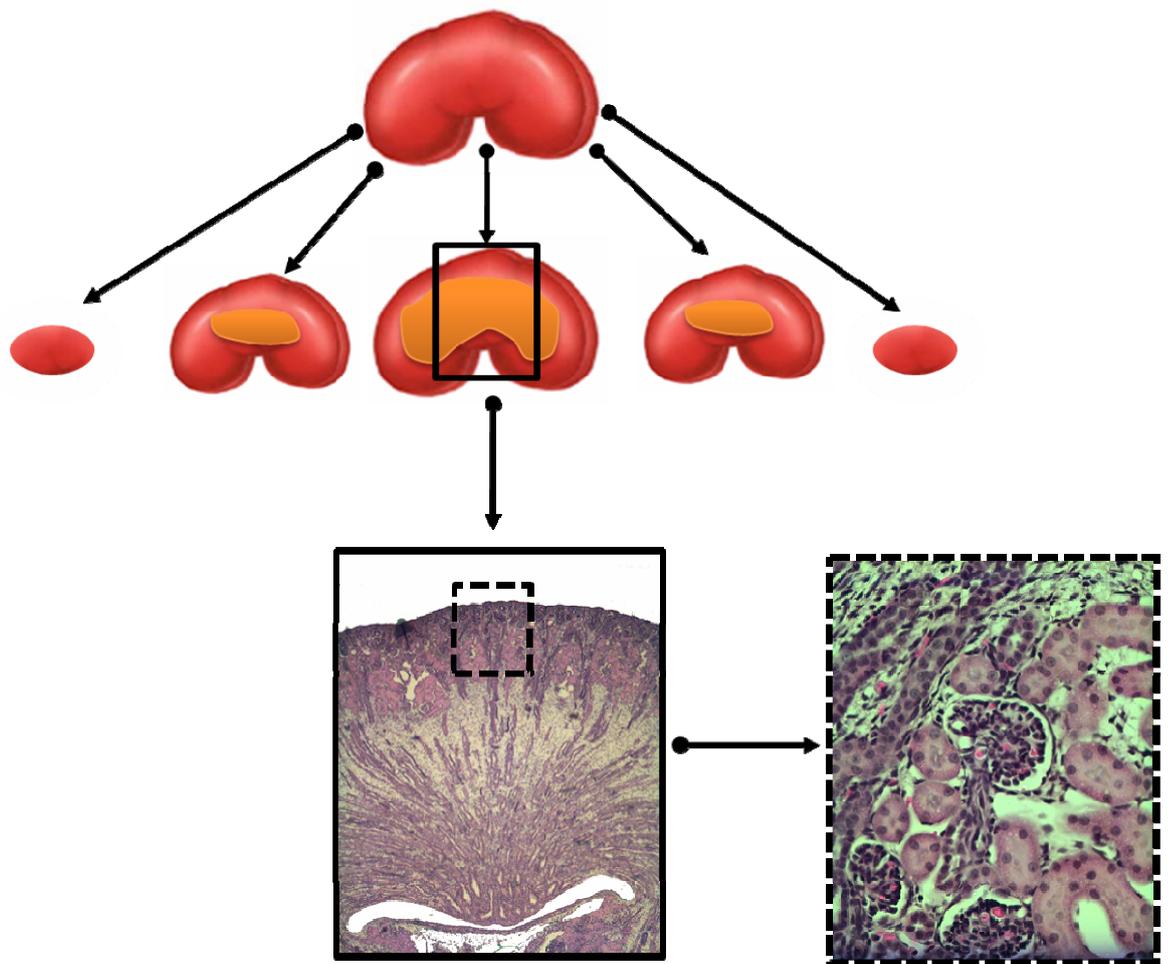


Figura 12. Método do *Fractionator*. O rim foi seccionado em vários segmentos de 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Todos os segmentos foram corados em Hematoxilina e eosina e analisados. A estimativa do número total de glomérulos foi feita contando-se todos os glomérulos observados em cada segmento.

### 3.a.7. Análise dos dados

As frequências de morte perinatal, assim como a comparação do número de filhotes e a incidência de gênero de todas as proles foram analisadas com o teste  $\chi^2$  com um grau de liberdade. Todos os dados foram testados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados paramétricos foram analisados com o teste one-way ANOVA e com o pós-teste de Newman-Keuls. Os dados não-paramétricos foram analisados pelo teste ANOVA Kruskal Wallis e pelo pós-teste de Dunn (Prism version 4.03, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Um estudo bivariado usando dados log-transformados e o modelo alométrico  $\log y = \log a + (b) \log x$  (Jolicoeur and Heusner 1986) foi feito para analisar a correlação entre o N[gl] (*variável dependentes*) vs. Peso ao nascimento (*variável independente*), utilizando-se o menor eixo computado (Sokal and Rohlf 1995; Mandarim-de-Lacerda and Pereira 2001). O coeficiente da correlação do produto do momento de Pearson e regressões lineares foram feitos para cada grupo, e nos casos que foram relevantes, as regressões foram comparadas (comparação de slopes, Teste-t de *Student*). Em todos os casos o nível de significância foi fixado em 0,05 (Primer of Biostatistics, McGraw-Hill Co., New York, version 5.0) (Glantz 2002).

## VII-Resultados

### 1. Matrizes

Os dados de massa corporal, ingestão de ração e ingestão de proteína das matrizes durante a gestação estão apresentados na tabela 3. O ganho de peso das matrizes do grupo RP foi reduzido em 57% ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao do grupo controle. A administração de GSE resultou numa redução dessa perda de peso de 27% ( $p < 0,05$ ) no grupo RP+GSE. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos Controle e Controle+GSE.

A ingestão de ração foi idêntica em todos os grupos estudados. Porém, as matrizes dos grupos RP e RP+ GSE ingeriram 75% menos proteínas que os demais grupos controles durante a gestação ( $p < 0,01$ ). As frequências referentes ao tamanho da prole, à incidência de gênero e à morte perinatal foram similares entre os grupos, sendo assim, nenhuma correção quanto ao número de filhotes por fêmea foi feita.

<b>Dias</b>	<b>Controle</b>	<b>RP</b>	<b>Controle + GSE</b>	<b>RP + GSE</b>
<b>Massa corporal (g)</b>				
<b>1</b>	<b>19,35±0,56</b>	<b>19,44±0,39</b>	<b>19,67±0,33</b>	<b>19,33±0,67</b>
<b>7</b>	<b>20,00±0,63</b>	<b>19,60±0,75</b>	<b>19,0±0,58</b>	<b>19,17±0,60</b>
<b>14</b>	<b>29,20±0,80†</b>	<b>22,80±0,80†,‡</b>	<b>27,33±1,20↯</b>	<b>24,50±0,78↯,‡</b>
<b>21</b>	<b>32,80±0,49†</b>	<b>25,20±0,80†,‡</b>	<b>34,67±0,33↯</b>	<b>29,33±0,33↯,‡</b>
<b>Ganho de peso (g)</b>	<b>13,33±0,95†</b>	<b>5,70±0,90†,‡</b>	<b>15,00±0,45↯</b>	<b>11,00±0,77↯,‡</b>
<b>Ingestão de ração (g/dia)</b>				
<b>7</b>	<b>3,24±0,12</b>	<b>2,71±0,20</b>	<b>3,20±0,30</b>	<b>3,10±0,20</b>
<b>14</b>	<b>2,91±0,10</b>	<b>3,02±0,30</b>	<b>3,00±0,20</b>	<b>3,01±0,30</b>
<b>21</b>	<b>2,92±0,20</b>	<b>2,71±0,20</b>	<b>3,10±0,10</b>	<b>2,91±0,10</b>
<b>Ingestão de proteínas (g/dia)</b>				
<b>7</b>	<b>0,62±0,02†</b>	<b>0,13±0,01†</b>	<b>0,61±0,04↯</b>	<b>0,16±0,01↯</b>
<b>14</b>	<b>0,59±0,03†</b>	<b>0,15±0,02†</b>	<b>0,57±0,02↯</b>	<b>0,15±0,01↯</b>
<b>21</b>	<b>0,63±0,01†</b>	<b>0,13±0,01†</b>	<b>0,59±0,01↯</b>	<b>0,14±0,01↯</b>
<b>Gestação (dias)</b>	<b>21,40±0,24</b>	<b>21,33±0,21</b>	<b>21,25±0,20</b>	<b>21,20±0,18</b>
<b>Filhotes/ Fêmea</b>	<b>34/6</b>	<b>28/6</b>	<b>33/6</b>	<b>24/6</b>
<b>Incidência de Gênero (machos/fêmeas)</b>	<b>28/7</b>	<b>18/10</b>	<b>25/8</b>	<b>18/8</b>
<b>Morte perinatal (mortos/total)</b>	<b>1/34</b>	<b>1/28</b>	<b>2/33</b>	<b>1/24</b>

Tabela 3. Massa corporal (g), ingestão de ração (g/dia) e ingestão de proteínas (g/dia) das matrizes dos grupos estudados. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. GSE representa a administração de 200mg/kg/dia de extrato de casca de uva; Símbolos iguais indicam  $p < 0,05$  entre os grupos. One-way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls foram aplicados para a análise da massa corporal, ingestão de ração e proteínas. O teste  $\chi^2$  foi aplicado para as frequências referentes ao número de filhotes por fêmea, à incidência de gênero e à morte perinatal.  $n=6$  cada.

## 2. Biometria das proles

A restrição protéica materna resultou em uma diminuição de 25% no peso ao nascimento e 16% do NAL ( $p < 0,001$ ) do grupo RP quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,001$ ). Tanto o peso ao nascer quanto o NAL foram maiores cerca de 15% no grupo RP+GSE quando comparado ao grupo RP ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença de peso ao nascer ou no NAL entre o grupo Controle+GSE e o grupo Controle (Figura 13).

A relação Massa Renal/Massa corporal foi reduzida em 14% no grupo RP quando comparado com o grupo Controle ( $p < 0,01$ ). A administração de GSE restaurou parcialmente esse parâmetro no grupo RP+GSE ( $p < 0,05$ ). Além disso, esse parâmetro foi comparável aos valores do grupo Controle+GSE. A administração de GSE não afetou a relação Massa renal/Massa corporal quando os grupos Controle e Controle +GSE foram comparados (Figura 14).

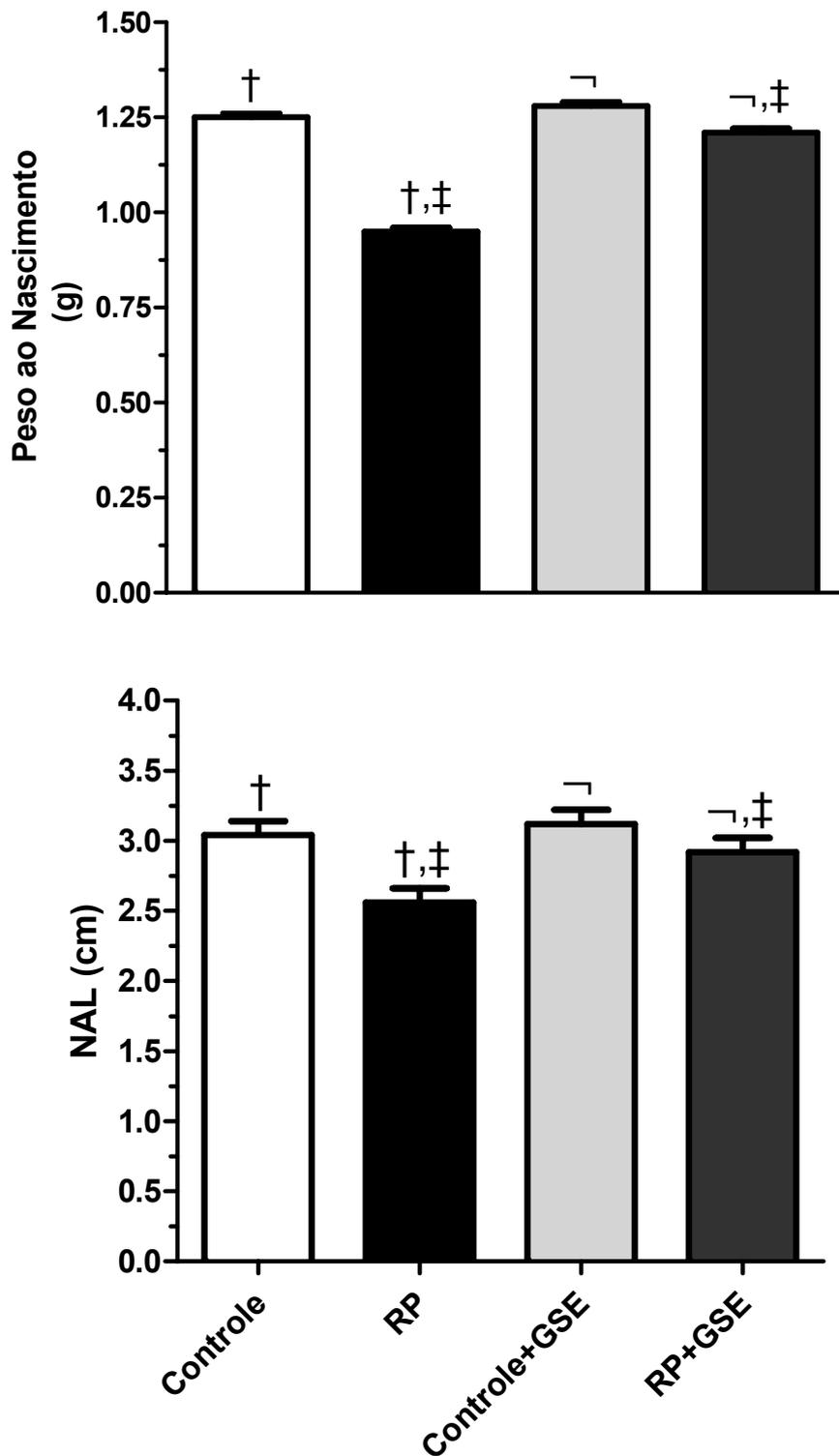


Figura 13. (A) Massa corporal ao nascimento; (B) Comprimento naso-anal das proles estudadas; Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. GSE representa a administração de 200mg/kg/dia de extrato de casca de uva; Símbolos iguais indicam  $p < 0,05$  entre os grupos. Análise estatística: One-way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.  $n=6$  cada.

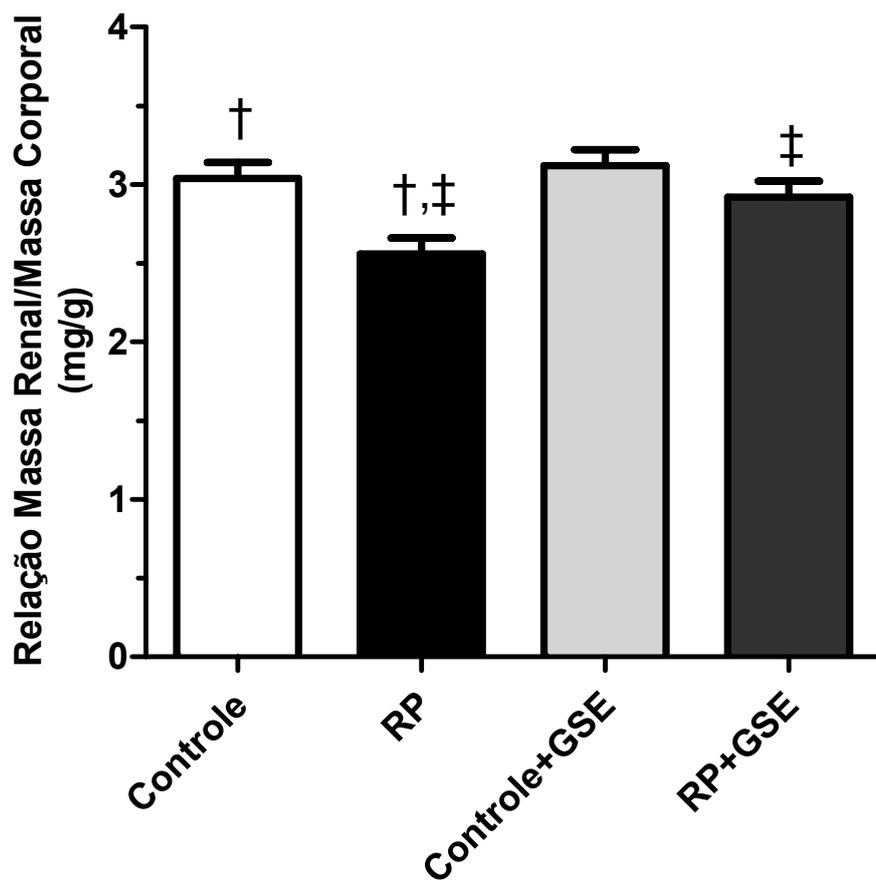


Figura 14. Relação Massa Renal/Massa Corporal das proles estudadas; Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. GSE representa a administração de 200mg/kg/dia de extrato de casca de uva; Símbolos iguais indicam  $p < 0,05$  entre os grupos. Análise estatística: One-way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.  $n=6$  cada.

### 3. Dano Oxidativo: Peroxidação lipídica

A restrição protéica materna resultou num aumento significativo da peroxidação lipídica renal e hepática do grupo RP quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,001$ ). A administração de GSE reduziu significativamente esse parâmetro no grupo RP+GSE, tornando-o equivalente ao Controle+GSE. Não houve diferença quando os grupos Controle e Controle+GSE foram comparados (Figura 15).

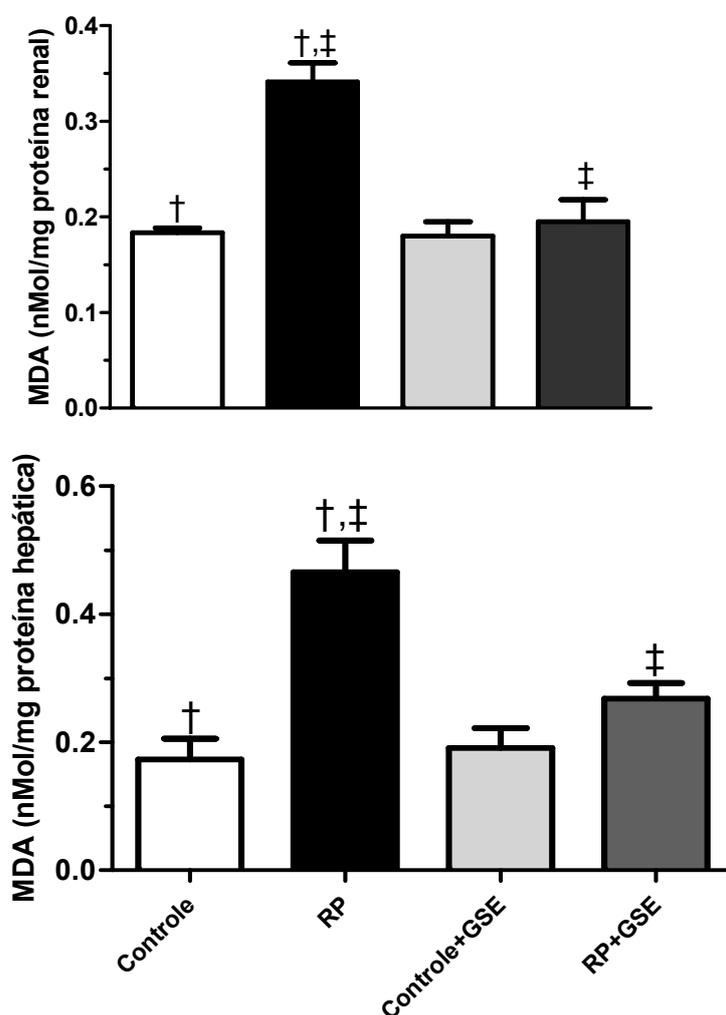


Figura 15. Determinação da peroxidação lipídica no homogenizado do tecido renal e hepático das proles estudadas. Quantidade de malondialdeído (MDA) por miligrama de proteína,  $n=4$  pools por grupo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. GSE representa a administração de 200mg/kg/dia de extrato de casca de uva; Símbolos iguais indicam  $p < 0,05$  entre os grupos. Análise estatística: One-way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.

#### 4. Atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase

Não houve diferença nas atividades de SOD entre os grupos. A atividade da catalase foi reduzida em 30% no grupo RP quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ). A administração de GSE restaurou esse parâmetro no grupo RP+ GSE quando comparado ao grupo RP ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença quando os grupos Controle e Controle+GSE foram comparados (Figura 16).

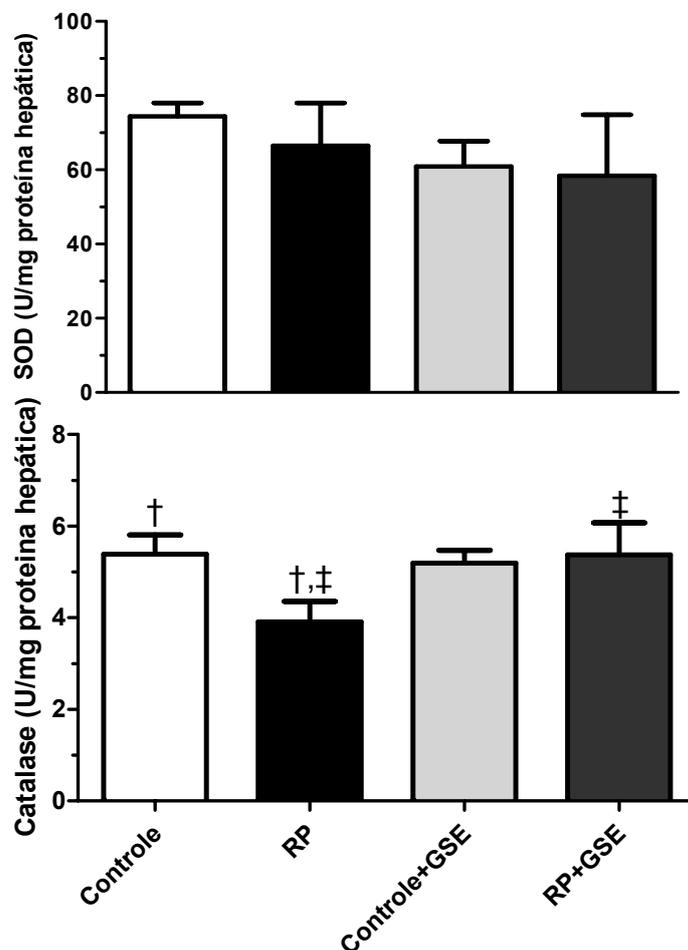


Figura 16. Atividades da superóxido dismutase (SOD) e da catalase hepáticas (U/mg proteína) no homogeneizado do tecido renal e hepático das proles estudadas.  $n=4$  pools por grupo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. GSE representa a administração de 200mg/kg/dia de extrato de casca de uva; Símbolos iguais indicam  $p < 0,05$  entre os grupos. Análise estatística: One-way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls.

## 5. Microscopia de luz e Morfometria

A morfologia renal foi significativamente afetada pela restrição protéica materna durante a gestação. A análise histológica dos rins do grupo RP mostrou uma desorganização tubular intensa e a presença de poucos glomérulos vascularizados no córtex renal. O tratamento com GSE no grupo RP resultou numa estruturação cortical equivalente ao grupo Controle+GSE. (Figura 17).

A relação CV/MV foi comparável em todos os grupos estudados. Embora as relações n-NRV/CV tenham sido as mesmas em todos os grupos, as relações de NRV/CV e NRV/n-NRV foram aumentadas cerca de 20% no grupo RP quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ). A administração de GSE recuperou estes parâmetros no grupo RP+GSE quando comparado ao grupo RP. Não houve diferença quando os grupos Controle e Controle+GSE foram comparados Tabela 4.

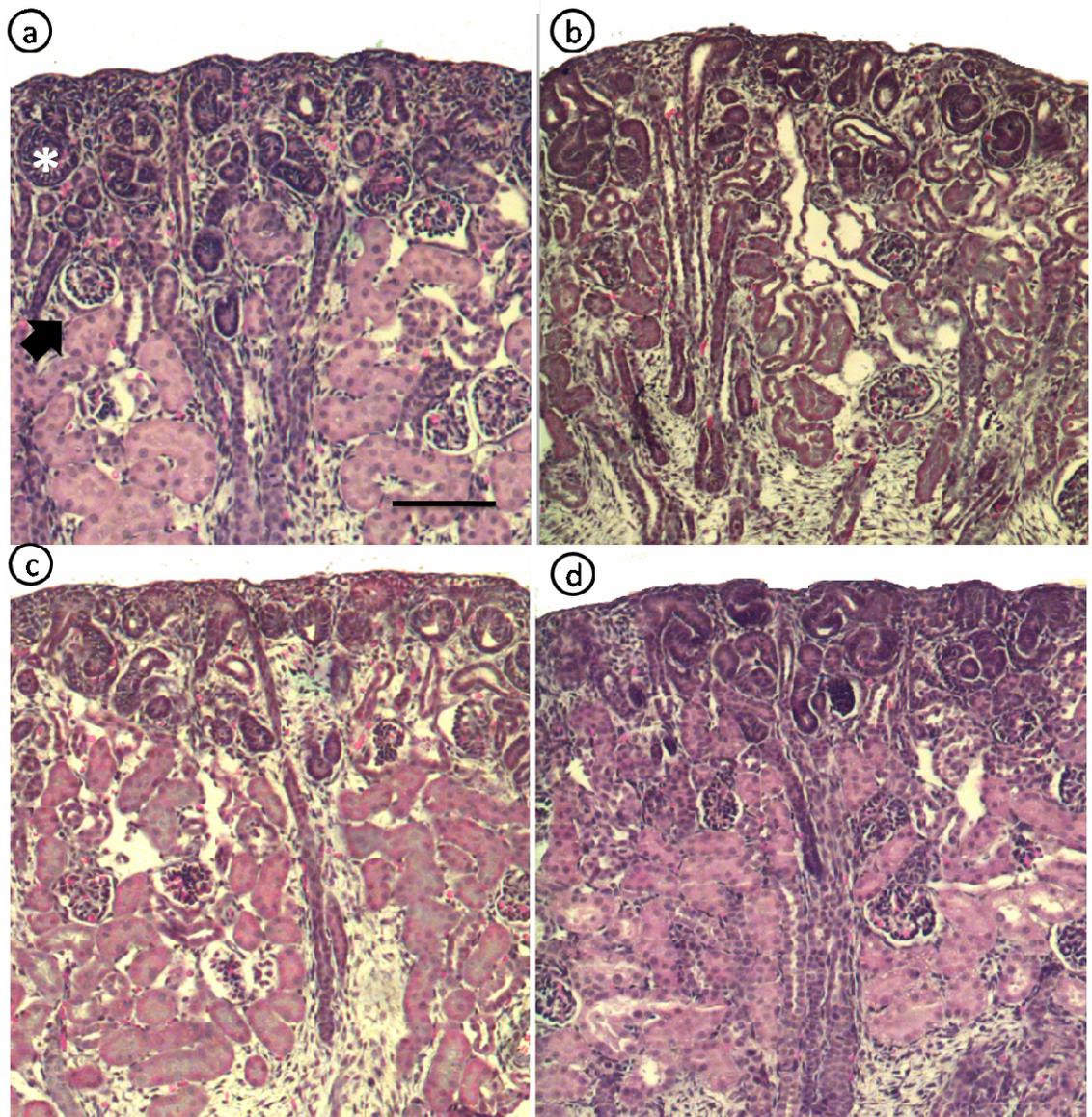


Figura 17. Fotomicrografias representativas do córtex renal das proles ao nascimento (mesma magnificação em todas as imagens – barra=100 $\mu$ m). (a) Grupo Controle; (b) Grupo RP; (c) Grupo Controle+GSE; (d) Grupo RP+GSE. A figura (b), assim como o asterisco branco na figura (a), indicam glomérulos avascularizados localizados na periferia do córtex renal. A figura (d), assim como a seta preta na figura (a), indicam glomérulos vascularizados localizados mais profundamente no córtex renal.

	Relação CV/MV	Relação NRV/CV	Relação n-NRV/CV	Relação NRV/n-NRV
Controle	5,405±0,050	0,229±0,004 †	0,771±0,004	0,299±0,007†
RP	4,886±0,10	0,264±0,006 †,‡	0,776±0,011	0,366±0,011†,‡
Controle+ GSE	5,301±0,085	0,235±0,004	0,746±0,006	0,308±0,012
RP+ GSE	5,104±0,169	0,224±0,011‡	0,736±0,006	0,315±0,023‡

Tabela 4. Medidas morfométricas dos volumes renais dos rins das proles ao nascimento. CV: Volume cortical (mm<sup>3</sup>); MV: Volume medular (mm<sup>3</sup>). NRV: Volume da região nefrogênica (mm<sup>3</sup>); n-NRV: Volume da região nao-nefrogênica (mm<sup>3</sup>); Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média; Símbolos iguais indicam p<0,05 entre os grupos. Análise estatística: One-way ANOVA e pós-teste de Newmann Keuls, n=5 cada.

## 6. Estereologia

O  $N[\text{glom}]/\text{CV}$  foi reduzido em 20% no grupo RP quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,001$ ). A administração de GSE aumentou esse parâmetro tanto no grupo Controle+GSE quanto no grupo RP+GSE (20% no grupo Controle+GSE,  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo Controle; 25% no grupo RP+GSE,  $p < 0,001$  quando comparado ao grupo RP). O  $N[\text{glom}/\text{CV}]$  foi menor 15% no grupo RP+GSE quando comparado ao grupo Controle+GSE ( $p < 0,001$ ) (Figura 18).

A relação  $(v-N[\text{glom}]/a-N[\text{glom}])$  foi 10% menor no grupo RP+GSE quando comparado ao Controle+GSE ( $p < 0,001$ ) e 18% maior quando comparado ao grupo RP ( $p < 0,001$ ) (Figura 19).

O volume médio do glomérulo vascularizado foi menor 13% no grupo RP quando comparado ao grupo Controle ( $p < 0,05$ ). O grupo RP+GSE apresentou uma elevação de 15% nesse parâmetro quando comparado ao grupo RP ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença quando os grupos Controle e Controle+GSE foram comparados (Figura 20).

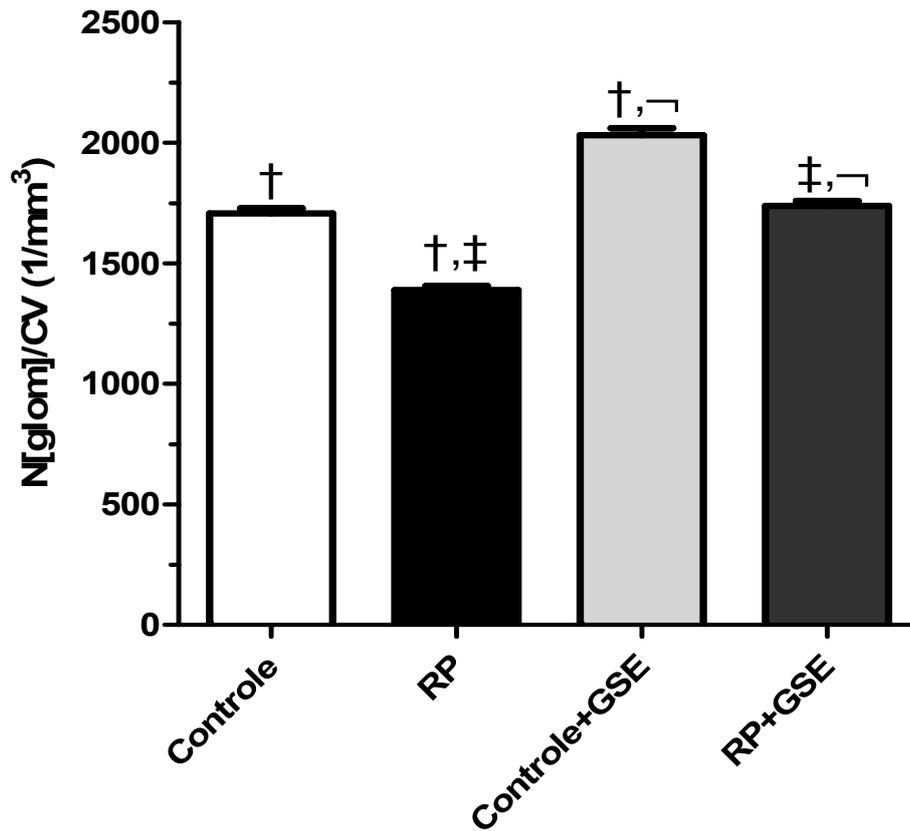


Figura 18. Número total de glomérulos dos rins das proles ao nascimento (N[glom]) por volume de córtex (CV - mm<sup>3</sup>) obtido pelo Método do Fractionator. Os dados estão apresentados como média±erro padrão da média. GSE representa a administração de 200mg/kg/dia de extrato de casca de uva; Símbolos iguais indicam p<0,05 entre os grupos. Análise estatística: One-way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls. n=5 cada.

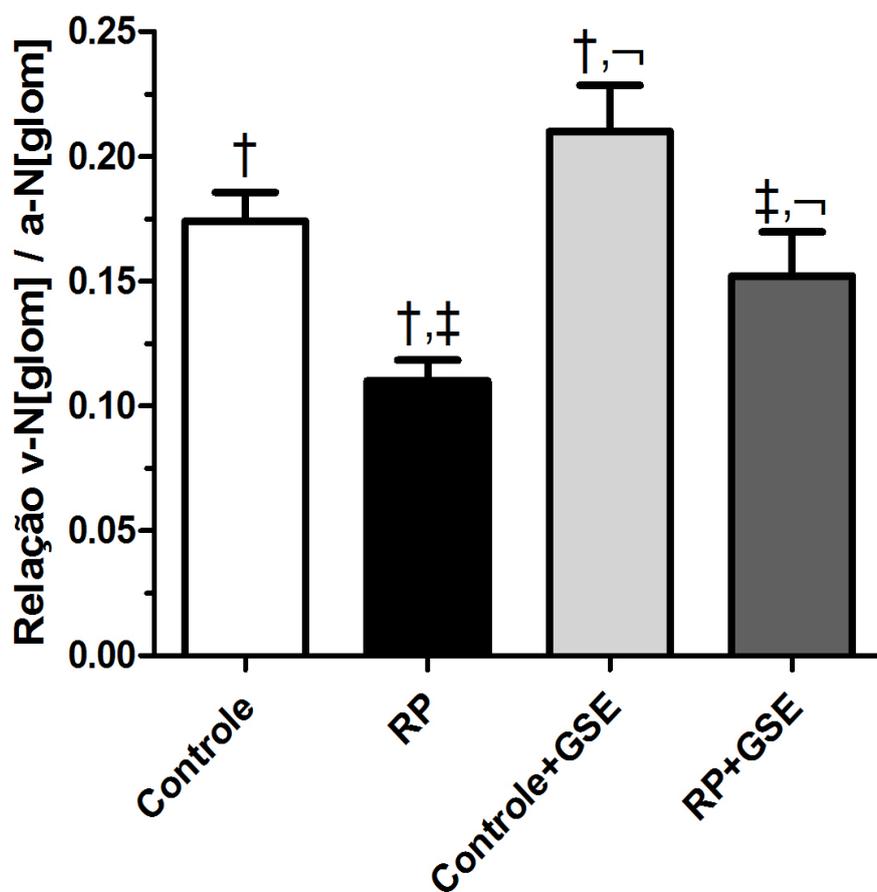


Figura 19. Relação entre (v-N[glom]/a-N[glom]) dos rins das proles ao nascimento. Valores obtidos pelo Método do Fractionator. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. GSE representa a administração de 200mg/kg/dia de extrato de casca de uva; Símbolos iguais indicam  $p < 0,05$  entre os grupos. Análise estatística: Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn.  $n=5$  cada.

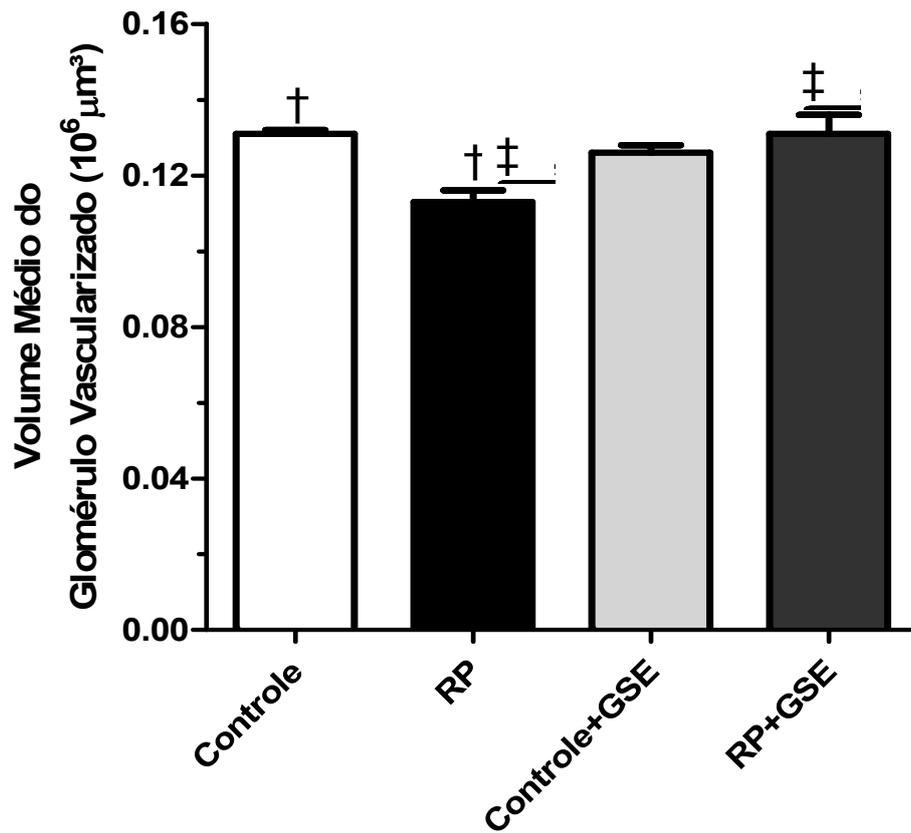


Figura 20. Volume médio do glomérulo vascularizado ( $10^6 \mu\text{m}^3$ ). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. GSE representa a administração de 200mg/kg/dia de extrato de casca de uva; Símbolos iguais indicam  $p < 0,05$  entre os grupos. Análise estatística: Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn.  $n=5$  cada.

## 7. Correlações e Comparação das Regressões Lineares

O N[glom] foi positivamente correlacionado com o peso ao nascimento em todos os grupos (Controle:  $r=0,99$ ;  $p<0,001$ ; RP:  $r=0,97$   $p<0,001$ ; Controle+GSE:  $0,99$ ;  $p<0,001$ ; RP+GSE:  $0,96$ .  $p<0,001$ ). Quando os slopes de dados log-transformados e corrigidos quanto ao RMA (eixo maior reduzido), foram comparados, observou-se que o slope do grupo RP foi 45% menor do que o do grupo Controle ( $0,805\pm 0,133$  e  $1,453\pm 0,307$ , respectivamente.  $p<0,001$ ). Ambos os grupos que receberam GSE tiveram os slopes maiores do que seus respectivos controles que não receberam GSE (Controle+GSE:  $2,713\pm 0,342$ ; RP+GSE:  $2,712\pm 0,411$ ;  $p<0,001$ ). Não houve diferença quando estes grupos foram comparados (Figura 21).

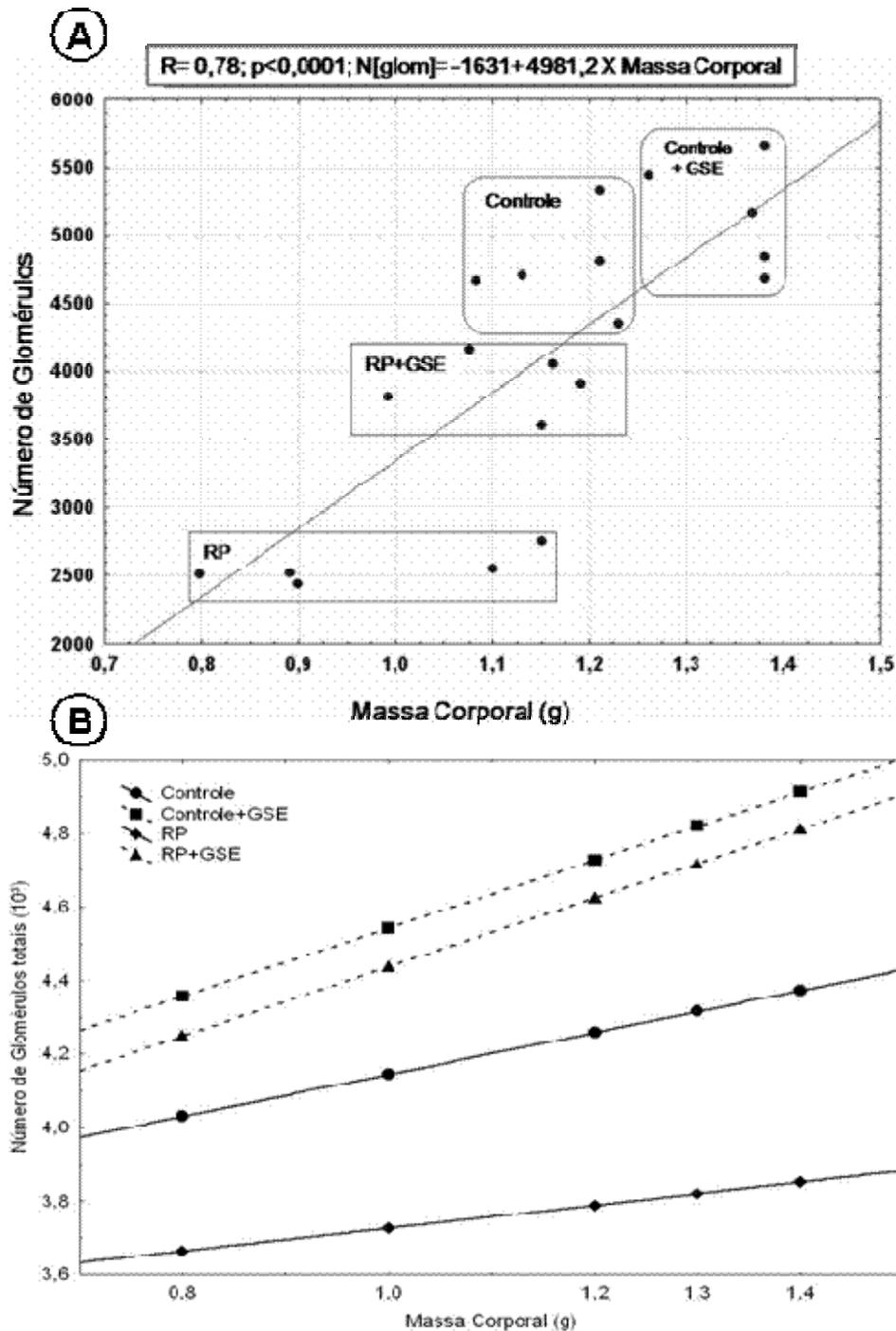


Figura 21. A) Correlação entre massa corporal (g) e número de glomérulos de todos os grupos estudados. B) Regressão linear, de dados log-transformados, correlacionando a massa corporal (g) com o número de glomérulos dos grupos separadamente. (Controle:  $r=0,99$ ,  $\text{slope}=1,453 \pm 0,307$   $p < 0,001$ ; RP:  $r=0,97$ ,  $\text{slope}=0,805 \pm 0,133$ ,  $p < 0,001$ ; Controle+GSE:  $r=0,99$ ;  $\text{slope}=2,713 \pm 0,342$ ,  $p < 0,001$ ; RP+GSE:  $r=0,96$ ,  $\text{slope}=2,712 \pm 0,411$ ,  $p < 0,001$ ).  $n=5$  cada.

## VIII- Discussão

Este trabalho visou estudar os efeitos benéficos da administração pré-natal do extrato hidroalcoólico de casca de uva (GSE) sobre as alterações renais precoces da prole de matrizes que receberam dieta hipoprotéica durante a gestação. Foi observado que a administração de GSE foi capaz de afetar positivamente o peso ao nascimento da prole, evitar o dano oxidativo renal e minimizar os efeitos deletérios sobre a morfologia renal.

Vários estudos vêm demonstrando que a administração de uma dieta hipoprotéica durante a gestação é capaz de gerar um baixo peso ao nascimento na prole correlacionado ao aparecimento de um fenótipo hipertensivo na vida adulta, sendo esta relacionada a alterações cardiovasculares e renais (Woods et al. 2001; Langley-Evans et al. 2003; Corstius et al. 2005; Welham et al. 2005; Lim et al. 2006; Pires et al. 2006; Hoppe et al. 2007; Woods 2007; Ream et al. 2008; Chan et al. 2009; Harrison and Langley-Evans 2009). Recentemente, a participação do estresse e posterior dano oxidativo foi cogitada como ponto de grande importância na definição do fenótipo hipertensivo (Biri et al. 2007; Saker et al. 2008; Fetoui, Garoui et al. 2009; Theys et al. 2009).

Até a presente data, poucos estudos verificaram o efeito da dieta hipoprotéica materna sobre a prole de murinos (C57 bl-6) (Hoppe et al. 2007; Bol et al. 2009). Infelizmente, esses estudos, como a maioria dos estudos feitos em ratos das linhagens Wistar e Sprague-Dawley (Langley-Evans, Langley-Evans et al. 2003; McMullen et al. 2004; Woods and Weeks 2004; Woods et al. 2004; McMullen and Langley-Evans 2005; Woods et al. 2005; Woods and Weeks 2005; Harrison and Langley-Evans 2009), porcos (Foxcroft et al. 2006; Tatara et al. 2007) e ovelhas (Osgerby et al. 2002; Williams et al. 2007; Sharkey et al. 2009) se detêm apenas a relatar as alterações observadas na prole. O estudo mais recente feito em ratos da linhagem Wistar não relata diferenças na massa corporal

das matrizes (Alwasel and Ashton 2009). No presente estudo, utilizamos um extrato rico em polifenóis naturais que atuou de forma importante na proteção da prole contra os efeitos deletérios da restrição protéica materna. Observamos um efeito protetor da administração de GSE sobre a prole do grupo RP+GSE, refletido no ganho de peso diferenciado das matrizes deste grupo.

A absorção dos flavonóides é um grande problema não resolvido, tendo em vista seus diversos efeitos sobre a saúde. Os flavonóides presentes nos alimentos são considerados não-absorvíveis uma vez que se encontram ligados a moléculas de açúcar. Somente os flavonóides livres, denominados agliconas, são descritos por conseguirem passar através do epitélio gástrico (Hollman and Katan 1997). Neste trabalho, o processo de extração do extrato da casca de uvas viníferas com etanol possivelmente retira quaisquer resíduos de lipídeos e açúcares das mesmas. Contudo, não foi possível identificar a quantidade de flavonóides absorvida pela fêmea, nem mesmo o quanto que foi absorvido pelos fetos. Somente pudemos identificar os efeitos indiretos da absorção dos flavonóides pelas alterações observadas nas proles.

Os dois maiores sítios de metabolismo de flavonóides são o fígado e a flora bacteriana intestinal (Hollman and Katan 1997). Neste trabalho, apesar de não haver diferença na atividade da SOD entre os grupos, a atividade de catalase hepática estava reduzida de forma significativa no grupo RP. Além disso, as peroxidações lipídicas renais e hepáticas foram significativamente altas no grupo RP. Estes dados sugerem um desequilíbrio redox importante nos animais do grupo RP, culminando num dano oxidativo significativo. Esse ambiente mais oxidado nos animais que sofreram restrição protéica materna já foi sugerido anteriormente (Cambonie et al. 2007; Fetoui et al. 2009), contudo, esse é o primeiro estudo onde o dano oxidativo foi observado e reduzido, em nível renal, pelo uso de um extrato rico em polifenóis. Desta forma, este estudo corrobora a participação do desequilíbrio redox na lesão renal observada em modelos de restrição protéica materna. Atualmente, a participação do

estresse oxidativo sobre o mecanismo da hipertensão programada vem sendo bastante discutida. Foi observado que o baixo peso ao nascer e a prematuridade estão relacionados à redução da produção de enzimas antioxidantes, expondo o feto a altos níveis de oxidantes (Georgeson et al. 2002; Cambonie et al. 2007; Fetoui et al. 2009).

Cambonie e colaboradores sugerem que o estresse oxidativo pré-natal oriundo de uma restrição protéica materna (9% de proteínas) é moderado, e o dano é impedido pelas enzimas antioxidantes presentes. Neste trabalho, a restrição protéica materna é considerada intensa (6% proteína) e os efeitos observados foram mais significativos. O tratamento com GSE afetou o desequilíbrio redox na prole de fêmeas restritas evitando a oxidação de lipídios tanto no fígado como no rim, impedindo assim o dano oxidativo no grupo RP.

Os efeitos deletérios sobre a morfologia renal tanto precocemente (Woods et al. 2004; Pires et al. 2006) quanto tardiamente (Langley-Evans et al. 1999; Langley-Evans et al. 2003; Woods 2007) na prole de fêmeas sob efeito de dieta hipoprotéica durante a gestação têm sido descritos em diversos trabalhos. Estes estudos mostram um comprometimento renal que já começa ao nascimento (Woods et al. 2004; Pires et al. 2006) e se agrava na vida adulta, com o aparecimento de glomeruloesclerose (Nwagwu et al. 2000) uma vez que não há produção de néfrons além do período de nefrogênese. A escolha de se estudar a prole no momento do nascimento teve como objetivo principal observar o efeito precoce da administração de GSE sobre a prole de fêmeas restritas em proteínas durante a gestação. Essa escolha teve suas limitações, uma vez que não houve a possibilidade de observar os efeitos sobre o fenótipo hipertensivo dos animais. Entretanto, nos estudos em que a prole foi acompanhada até a vida adulta, o número de néfrons totais está diretamente relacionado ao aparecimento de um fenótipo hipertensivo (Woods et al. 2004; Woods 2007). Da mesma forma, observa-se que diferentes formas de tratamento, seja inibindo componentes do SRAA, ou impedindo o estresse oxidativo, resultam na proteção da estrutura renal e reduzem a pressão

arterial na vida adulta (Sherman and Langley-Evans 2000; Stewart et al. 2005).

No presente estudo, a restrição protéica materna afetou de forma significativa o amadurecimento renal indicado pela redução da relação entre o número de glomérulos vascularizados por volume de região não-nefrogênica e número de glomérulos não-vascularizados por região nefrogênica. Esse retardo no crescimento foi observado anteriormente (Pires et al. 2006), porém somente no presente estudo foi possível identificar o grau de imaturidade dos rins da prole do grupo RP, que foi refletido num retardo na formação dos glomérulos maduros, e não só em redução no quantitativo de glomérulos maduros. O tratamento com GSE reverteu esse quadro de forma significativa quando comparado ao grupo restrito que não recebeu tratamento, porém, não igualou esses valores quando comparado ao grupo Controle+GSE. Mostrando que o desequilíbrio redox não representa a totalidade dos efeitos causados pela restrição protéica materna.

Um efeito interessante da administração de GSE foi visto no grupo que recebeu dieta controle. Observou-se um aumento significativo tanto no  $N[\text{glom}]/\text{CV}$  como relação  $v\text{-}N[\text{glom}]/a\text{-}N[\text{glom}]$  no grupo Controle+GSE quando comparado ao grupo Controle. Além disso, o grupo RP+GSE se diferenciou significativamente do grupo RP quando o número de glomérulos foi correlacionado ao peso ao nascimento. Ainda, slope obtido a partir dessa correlação indica um crescimento significativamente menor no grupo RP e maior nos grupos tratados com GSE. Sugerimos que o efeito sobre o crescimento observado nos grupos tratados com GSE se deve aos efeitos vasodilatadores do extrato (Madeira et al. 2005; de Moura et al. 2007). Possivelmente, a administração de GSE atuou na vasodilatação placentária, que já foi descrita como ponto importante para o baixo peso observado na prole do grupo RP (Jansson and Powell 2007), promovendo um maior aporte de nutrientes para os grupos tratados, o que resultou num desenvolvimento renal diferenciado nestes grupos. Esse efeito na proliferação de glomérulos também foi observado em grupo pré-

natalmente restrito de vitamina D (Maka et al. 2008). Neste estudo, o grupo sugere um efeito regulador negativo da 1,25-dihidroxitamina D3 sobre a expressão do gene de renina. A deficiência de tal nutriente levaria ao aumento no número de néfrons, uma vez que a angiotensina II está relacionada ao desenvolvimento renal. Num outro estudo do mesmo grupo, administração de ácido retinóico, uma molécula antioxidante e estimuladora de ramificação mesodérmica renal via ativação do receptor de tirosina kinase c-ret (Moreau et al. 1998), os efeitos sobre a morfologia renal das proles restritas durante a gestação foram semelhantes aos nossos resultados (Makrakis et al. 2007). Se essas alterações confeririam uma vantagem na função renal, ainda é um fato desconhecido. Desta forma, outros estudos são necessários para identificar os mecanismos desse processo.

Todos os resultados observados levam a conclusão de que a administração de GSE foi benéfica para a preservação da morfologia renal na prole de fêmeas que receberam dieta hipoprotéica durante a gestação, possivelmente via sua ação antioxidante e vasodilatadora.

## IX- Referências

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, **105**, 121-6.
- Almeida, J. R. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2002. Quantitative study of the comma-shaped body, S-shaped body and vascularized glomerulus in the second and third human gestational trimesters. *Early Hum Dev*, **69**, 1-13.
- Almeida, J. R. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2005a. Maternal gestational protein-calorie restriction decreases the number of glomeruli and causes glomerular hypertrophy in adult hypertensive rats. *Am J Obstet Gynecol*, **192**, 945-51.
- Almeida, J. R. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2005b. Overweight is gender-dependent in prenatal protein--calorie restricted adult rats acting on the blood pressure and the adverse cardiac remodeling. *Life Sci*, **77**, 1307-18.
- Alwasel, S. H. & Ashton, N. 2009. Prenatal programming of renal sodium handling in the rat. *Clin Sci (Lond)*, **117**, 75-84.
- Arguelles, S., Machado, M. J., Ayala, A., Machado, A. & Hervias, B. 2006. Correlation between circulating biomarkers of oxidative stress of maternal and umbilical cord blood at birth. *Free Radic Res*, **40**, 565-70.
- Bajoria, R., Sooranna, S. R., Ward, S. & Hancock, M. 2002. Placenta as a link between amino acids, insulin-IGF axis, and low birth weight: evidence from twin studies. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 308-15.
- Ballard, P. L. 1979. Glucocorticoids and differentiation. *Monogr Endocrinol*, **12**, 493-515.
- Bannister, J. V. & Calabrese, L. 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*, **32**, 279-312.

- Barker, D. J. 1993. The intrauterine origins of cardiovascular disease. *Acta Paediatr Suppl*, **82 Suppl 391**, 93-9; discussion 100.
- Barker, D. J. 1994. *Mother, Babies, and Disease in Later Life*, London, British Medical Journal Publishing.
- Barker, D. J. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, **95**, 115-28.
- Barker, D. J. 2001. The malnourished baby and infant. *Br Med Bull*, **60**, 69-88.
- Barker, D. J., Bull, A. R., Osmond, C. & Simmonds, S. J. 1990. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*, **301**, 259-62.
- Barker, D. J., Gluckman, P. D., Godfrey, K. M., Harding, J. E., Owens, J. A. & Robinson, J. S. 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, **341**, 938-41.
- Barker, D. J., Godfrey, K. M., Osmond, C. & Bull, A. 1992. The relation of fetal length, ponderal index and head circumference to blood pressure and the risk of hypertension in adult life. *Paediatr Perinat Epidemiol*, **6**, 35-44.
- Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D. & Wadsworth, M. E. 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*, **298**, 564-7.
- Baumgart, D., Naber, C., Haude, M., Oldenburg, O., Erbel, R., Heusch, G., *et al.* 1999. G protein beta3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on alpha(2)-adrenoceptor activation. *Circ Res*, **85**, 965-9.
- Bertin, E., Gangnerau, M. N., Bellon, G., Bailbe, D., Arbelot De Vacqueur, A. & Portha, B. 2002. Development of beta-cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in

last trimester of pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **283**, R623-30.

Bertram, C., Trowern, A. R., Copin, N., Jackson, A. A. & Whorwood, C. B. 2001. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology*, **142**, 2841-53.

Bertram, J. F., Soosaipillai, M. C., Ricardo, S. D. & Ryan, G. B. 1992. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. *Cell Tissue Res*, **270**, 37-45.

Biri, A., Bozkurt, N., Turp, A., Kavutcu, M., Himmetoglu, O. & Durak, I. 2007. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest*, **64**, 187-92.

Biri, A., Onan, A., Devrim, E., Babacan, F., Kavutcu, M. & Durak, I. 2006. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta*, **27**, 327-32.

Bol, V. V., Delattre, A. I., Reusens, B., Raes, M. & Remacle, C. 2009. Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **297**, R291-9.

Bonnes-Taourel, D., Guerin, M. C. & Torreilles, J. 1992. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? *Biochem Pharmacol*, **44**, 985-8.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.

Brault, S., Martinez-Bermudez, A. K., Marrache, A. M., Gobeil, F., Jr., Hou, X., Beauchamp, M., *et al.* 2003. Selective

neuromicrovascular endothelial cell death by 8-Iso-prostaglandin F<sub>2</sub>α: possible role in ischemic brain injury. *Stroke*, **34**, 776-82.

- Brawley, L., Poston, L. & Hanson, M. A. 2003. Mechanisms underlying the programming of small artery dysfunction: review of the model using low protein diet in pregnancy in the rat. *Arch Physiol Biochem*, **111**, 23-35.
- Brenner, B. M., Garcia, D. L. & Anderson, S. 1988. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*, **1**, 335-47.
- Brenner, B. M. & Mackenzie, H. S. 1997. Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int Suppl*, **63**, S124-7.
- Brenner, B. M., Meyer, T. W. & Hostetter, T. H. 1982. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med*, **307**, 652-9.
- Brodsky, D. & Christou, H. 2004. Current concepts in intrauterine growth restriction. *J Intensive Care Med*, **19**, 307-19.
- Cambonie, G., Comte, B., Zydorczyk, C., Ntimbane, T., Germain, N., Le, N. L., *et al.* 2007. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292**, R1236-45.
- Campbell, D. M., Hall, M. H., Barker, D. J., Cross, J., Shiell, A. W. & Godfrey, K. M. 1996. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol*, **103**, 273-80.

- Chan, L. L., Sebert, S. P., Hyatt, M. A., Stephenson, T., Budge, H., Symonds, M. E., *et al.* 2009. Effect of maternal nutrient restriction from early to midgestation on cardiac function and metabolism after adolescent-onset obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **296**, R1455-63.
- Chatelain, A., Dupouy, J. P. & Allaume, P. 1980. Fetal-maternal adrenocorticotropin and corticosterone relationships in the rat: effects of maternal adrenalectomy. *Endocrinology*, **106**, 1297-303.
- Cheema, K. K., Dent, M. R., Saini, H. K., Aroutiounova, N. & Tappia, P. S. 2005. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. *Br J Nutr*, **93**, 471-7.
- Chen, Y., Lasaitiene, D. & Friberg, P. 2004. The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta Physiol Scand*, **181**, 529-35.
- Clarke, H. & Coates, M. 1977. *Dietary standards for laboratory animals: respor of the laboratory Animals Center Diets Advisory Commitee.*
- Corder, R., Douthwaite, J. A., Lees, D. M., Khan, N. Q., Viseu Dos Santos, A. C., Wood, E. G., *et al.* 2001. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*, **414**, 863-4.
- Corstius, H. B., Zimanyi, M. A., Maka, N., Herath, T., Thomas, W., van der Laarse, A., *et al.* 2005. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res*, **57**, 796-800.
- Da, R. R., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., De, O. R., Magnoli, C. E., *et al.* 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Addit Contam*, **19**, 408-14.

- de Moura, R. S., Resende, A. C., Moura, A. S. & Maradei, M. F. 2007. Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinifera grape skin on experimental preeclampsia in rats. *Hypertens Pregnancy*, **26**, 89-100.
- Demrow, H. S., Slane, P. R. & Folts, J. D. 1995. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*, **91**, 1182-8.
- Dobrev, D., Wettwer, E., Himmel, H. M., Kortner, A., Kuhlisch, E., Schuler, S., *et al.* 2000. G-Protein beta(3)-subunit 825T allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents. *Circulation*, **102**, 692-7.
- Don, A. S., Kisker, O., Dilda, P., Donoghue, N., Zhao, X., Decollogne, S., *et al.* 2003. A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial function in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell*, **3**, 497-509.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **82**, 47-95.
- Dunger, D. B., Ong, K. K., Huxtable, S. J., Sherriff, A., Woods, K. A., Ahmed, M. L., *et al.* 1998. Association of the INS VNTR with size at birth. ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *Nat Genet*, **19**, 98-100.
- Edwards, C. R., Benediktsson, R., Lindsay, R. S. & Seckl, J. R. 1993. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet*, **341**, 355-7.
- Erel, C. T., Dane, B., Calay, Z., Kaleli, S. & Aydinli, K. 2001. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynaecol Obstet*, **73**, 229-35.

- Feng, Z. H. & Cheng, S. 1999. [Relationship between oxysterols and atherosclerosis]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **30**, 23-8.
- Fetoui, H., Garoui, M. & Zeghal, N. 2009. Protein restriction in pregnant- and lactating rats-induced oxidative stress and hypohomocysteinaemia in their offspring. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, **93**, 263-70.
- Forsen, T., Eriksson, J. G., Tuomilehto, J., Osmond, C. & Barker, D. J. 1999. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ*, **319**, 1403-7.
- Forsen, T., Eriksson, J. G., Tuomilehto, J., Teramo, K., Osmond, C. & Barker, D. J. 1997. Mother's weight in pregnancy and coronary heart disease in a cohort of Finnish men: follow up study. *BMJ*, **315**, 837-40.
- Fowden, A. L. 1995. Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev*, **7**, 351-63.
- Foxcroft, G. R., Dixon, W. T., Novak, S., Putman, C. T., Town, S. C. & Vinsky, M. D. 2006. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. *J Anim Sci*, **84 Suppl**, E105-12.
- Frankel, S., Elwood, P., Sweetnam, P., Yarnell, J. & Smith, G. D. 1996a. Birthweight, adult risk factors and incident coronary heart disease: the Caerphilly Study. *Public Health*, **110**, 139-43.
- Frankel, S., Elwood, P., Sweetnam, P., Yarnell, J. & Smith, G. D. 1996b. Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease. *Lancet*, **348**, 1478-80.
- Garofano, A., Czernichow, P. & Breant, B. 1997. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia*, **40**, 1231-4.

- Garofano, A., Czernichow, P. & Breant, B. 1998. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia*, **41**, 1114-20.
- Gennser, G., Rymark, P. & Isberg, P. E. 1988. Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br Med J (Clin Res Ed)*, **296**, 1498-500.
- Georgeson, G. D., Szony, B. J., Streitman, K., Varga, I. S., Kovacs, A., Kovacs, L., *et al.* 2002. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **103**, 136-9.
- Ginter, E. & Simko, V. 2008. Ethanol and cardiovascular diseases: epidemiological, biochemical and clinical aspects. *Bratisl Lek Listy*, **109**, 590-4.
- Glantz, S. A. 2002. *Primer of biostatistics.*, New York, Medical Publishing Division.
- Godfrey, K. M. 2002. The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta*, **23 Suppl A**, S20-7.
- Gupta, S., Agarwal, A. & Sharma, R. K. 2005. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*, **60**, 807-16.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 1991. *Free Radicals in Biology and Medicine*, New York Clarendon Press.
- Hansen, J. T. & Koepfen, B. M. 2003. *Atlas de Fisiologia Humana de Netter*, Artmed.
- Harding, J. E. 2001. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol*, **30**, 15-23.
- Harding, J. E. & Johnston, B. M. 1995. Nutrition and fetal growth. *Reprod Fertil Dev*, **7**, 539-47.
- Harrison, M. & Langley-Evans, S. C. 2009. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in

- rats following maternal protein restriction during pregnancy. *Br J Nutr*, **101**, 1020-30.
- Hegele, R. A., Anderson, C., Young, T. K. & Connelly, P. W. 1999. G-protein beta3 subunit gene splice variant and body fat distribution in Nunavut Inuit. *Genome Res*, **9**, 972-7.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, **342**, 1007-11.
- Ho, Y. S., Howard, A. J. & Crapo, J. D. 1991. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **4**, 278-86.
- Hoher, B., Slowinski, T., Bauer, C. & Halle, H. 2001. The advanced fetal programming hypothesis. *Nephrol Dial Transplant*, **16**, 1298-9.
- Hoher, B., Slowinski, T., Stolze, T., Pleschka, A., Neumayer, H. H. & Halle, H. 2000. Association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with low birthweight. *Lancet*, **355**, 1241-2.
- Holemans, K., Verhaeghe, J., Dequeker, J. & Van Assche, F. A. 1996. Insulin sensitivity in adult female rats subjected to malnutrition during the perinatal period. *J Soc Gynecol Investig*, **3**, 71-7.
- Hollman, P. C. & Katan, M. B. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, **51**, 305-10.
- Hoppe, C. C., Evans, R. G., Bertram, J. F. & Moritz, K. M. 2007. Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292**, R1768-74.

- Hughson, M., Farris, A. B., 3rd, Douglas-Denton, R., Hoy, W. E. & Bertram, J. F. 2003. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int*, **63**, 2113-22.
- Jackson, A. A., Langlely-Evans, S. C. & McCarthy, H. D. 1996. Nutritional influences in early life upon obesity and body proportions. *Ciba Found Symp*, **201**, 118-29; discussion 129-37, 188-93.
- Jansson, T. & Powell, T. L. 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)*, **113**, 1-13.
- Jialal, I. & Grundy, S. M. 1992. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, **669**, 237-47; discussion 247-8.
- Jolicoeur, P. & Heusner, A. A. 1986. Log-normal variation belts for growth curves. *Biometrics*, **42**, 785-94.
- Kleinman, L. I. 1982. Developmental renal physiology. *Physiologist*, **25**, 104-10.
- Koukkou, E., Ghosh, P., Lowy, C. & Poston, L. 1998. Offspring of normal and diabetic rats fed saturated fat in pregnancy demonstrate vascular dysfunction. *Circulation*, **98**, 2899-904.
- Kwong, W. Y., Wild, A. E., Roberts, P., Willis, A. C. & Fleming, T. P. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, **127**, 4195-202.
- Langlely-Evans, S. & Jackson, A. 1996. Intrauterine programming of hypertension: nutrient-hormone interactions. *Nutr Rev*, **54**, 163-9.

- Langley-Evans, S. C., Clamp, A. G., Grimble, R. F. & Jackson, A. A. 1996a. Influence of dietary fats upon systolic blood pressure in the rat. *Int J Food Sci Nutr*, **47**, 417-25.
- Langley-Evans, S. C., Gardner, D. S. & Jackson, A. A. 1996b. Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J Reprod Fertil*, **106**, 307-12.
- Langley-Evans, S. C., Gardner, D. S. & Jackson, A. A. 1996c. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr*, **126**, 1578-85.
- Langley-Evans, S. C., Langley-Evans, A. J. & Marchand, M. C. 2003. Nutritional programming of blood pressure and renal morphology. *Arch Physiol Biochem*, **111**, 8-16.
- Langley-Evans, S. C. & Nwagwu, M. 1998. Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life Sci*, **63**, 605-15.
- Langley-Evans, S. C., Sherman, R. C., Welham, S. J., Nwagwu, M. O., Gardner, D. S. & Jackson, A. A. 1999a. Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system. *Biochem Soc Trans*, **27**, 88-93.
- Langley-Evans, S. C., Welham, S. J. & Jackson, A. A. 1999b. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci*, **64**, 965-74.
- Langley-Evans, S. C., Welham, S. J., Sherman, R. C. & Jackson, A. A. 1996d. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)*, **91**, 607-15.

- Langley, S. C. & Jackson, A. A. 1994. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)*, **86**, 217-22; discussion 121.
- Law, C. M., Barker, D. J., Bull, A. R. & Osmond, C. 1991. Maternal and fetal influences on blood pressure. *Arch Dis Child*, **66**, 1291-5.
- McMullen, S., Gardner, D. S. & Langley-Evans, S. C. 2004. Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. *Br J Nutr*, **91**, 133-40.
- Merezak, S., Hardikar, A. A., Yajnik, C. S., Remacle, C. & Reusens, B. 2001. Intrauterine low protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective role of taurine. *J Endocrinol*, **171**, 299-308.
- Moore, V. M., Miller, A. G., Boulton, T. J., Cockington, R. A., Craig, I. H., Magarey, A. M., *et al.* 1996. Placental weight, birth measurements, and blood pressure at age 8 years. *Arch Dis Child*, **74**, 538-41.
- Moreau, E., Vilar, J., Lelievre-Pegorier, M., Merlet-Benichou, C. & Gilbert, T. 1998. Regulation of c-ret expression by retinoic acid in rat metanephros: implication in nephron mass control. *Am J Physiol*, **275**, F938-45.
- Moxham, C. M., Hod, Y. & Malbon, C. C. 1993. Induction of G alpha i2-specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth. *Science*, **260**, 991-5.
- Musgrave, S. 2002. Life and death issues. Interview by Alison Moore. *Nurs Stand*, **17**, 83.
- Naber, C., Hermann, B. L., Vietzke, D., Altmann, C., Haude, M., Mann, K., *et al.* 2000. Enhanced epinephrine-induced platelet aggregation in individuals carrying the G protein beta3 subunit 825T allele. *FEBS Lett*, **484**, 199-201.

- Nassiri-Asl, M. & Hosseinzadeh, H. 2009. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytother Res*, **23**, 1197-204.
- Neer, E. J. & Clapham, D. E. 1988. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*, **333**, 129-34.
- Nuyt, A. M. 2008. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)*, **114**, 1-17.
- Nwagwu, M. O., Cook, A. & Langley-Evans, S. C. 2000. Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. *Br J Nutr*, **83**, 79-85.
- Ortiz, L. A., Quan, A., Weinberg, A. & Baum, M. 2001. Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development. *Kidney Int*, **59**, 1663-9.
- Ortiz, L. A., Quan, A., Zarzar, F., Weinberg, A. & Baum, M. 2003. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension*, **41**, 328-34.
- Osgerby, J. C., Wathes, D. C., Howard, D. & Gadd, T. S. 2002. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J Endocrinol*, **173**, 131-41.
- Osmond, C., Barker, D. J., Winter, P. D., Fall, C. H. & Simmonds, S. J. 1993. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ*, **307**, 1519-24.
- Ozaki, T., Nishina, H., Hanson, M. A. & Poston, L. 2001. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol*, **530**, 141-52.
- Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J. J., *et al.* 1999. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat

- and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology*, **140**, 4861-73.
- Peuchant, E., Brun, J. L., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M. J., Daniel, J. Y., *et al.* 2004. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem*, **37**, 293-8.
- Pham, T. D., MacLennan, N. K., Chiu, C. T., Laksana, G. S., Hsu, J. L. & Lane, R. H. 2003. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**, R962-70.
- Pires, K. M., Aguila, M. B. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2006. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. *Life Sci*, **79**, 2128-34.
- Pladys, P., Sennlaub, F., Brault, S., Checchin, D., Lahaie, I., Le, N. L., *et al.* 2005. Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet in utero. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R1580-8.
- Racasan, S., Braam, B., Koomans, H. A. & Joles, J. A. 2005. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am J Physiol Renal Physiol*, **288**, F626-36.
- Ream, M., Ray, A. M., Chandra, R. & Chikaraishi, D. M. 2008. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**, R583-95.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C., Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on

- the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-51.
- Regina, S., Lucas, R., Miraglia, S. M., Zaladek Gil, F. & Machado Coimbra, T. 2001. Intrauterine food restriction as a determinant of nephrosclerosis. *Am J Kidney Dis*, **37**, 467-76.
- Reinisch, J. M., Simon, N. G., Karow, W. G. & Gandelman, R. 1978. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science*, **202**, 436-8.
- Renaud, S. & de Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**, 1523-6.
- Rich-Edwards, J. W., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A., *et al.* 1997. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ*, **315**, 396-400.
- Robinson, S. M., Wheeler, T., Hayes, M. C., Barker, D. J. & Osmond, C. 1991. Fetal heart rate and intrauterine growth. *Br J Obstet Gynaecol*, **98**, 1223-7.
- Rosenberg, M. E., Chmielewski, D. & Hostetter, T. H. 1990. Effect of dietary protein on rat renin and angiotensinogen gene expression. *J Clin Invest*, **85**, 1144-9.
- Rotondo, S., Di Castelnuovo, A. & de Gaetano, G. 2001. The relationship between wine consumption and cardiovascular risk: from epidemiological evidence to biological plausibility. *Ital Heart J*, **2**, 1-8.
- Saker, M., Soulimane Mokhtari, N., Merzouk, S. A., Merzouk, H., Belarbi, B. & Narce, M. 2008. Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **141**, 95-9.
- Shah, A. R. 2009. Red Wine, The Secret Antidote of Youth?).

- Sharif, J., Nakamura, M., Ito, T., Kimura, Y., Nagamune, T., Mitsuya, K., *et al.* 2007. Food restriction in pregnant mice can induce changes in histone modifications and suppress gene expression in fetus. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 125-6.
- Sharkey, D., Gardner, D. S., Fainberg, H. P., Sebert, S., Bos, P., Wilson, V., *et al.* 2009. Maternal nutrient restriction during pregnancy differentially alters the unfolded protein response in adipose and renal tissue of obese juvenile offspring. *FASEB J*, **23**, 1314-24.
- Sharp, P. E. & La Regina, M. C. 1998. *The Laboratory Rat*, Boca Raton, CRC Press.
- Sherman, R. C. & Langley-Evans, S. C. 2000. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci (Lond)*, **98**, 269-75.
- Siffert, W. 2000. G protein beta 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, **15**, 1298-306.
- Siffert, W., Forster, P., Jockel, K. H., Mvere, D. A., Brinkmann, B., Naber, C., *et al.* 1999. Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Soc Nephrol*, **10**, 1921-30.
- Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., *et al.* 1998. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet*, **18**, 45-8.
- Soares De Moura, R., Costa Viana, F. S., Souza, M. A., Kovary, K., Guedes, D. C., Oliveira, E. P., *et al.* 2002. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol*, **54**, 1515-20.

- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.*, New York, Freeman.
- St Leger, A. S., Cochrane, A. L. & Moore, F. 1979. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*, **1**, 1017-20.
- Stein, C. E., Fall, C. H., Kumaran, K., Osmond, C., Cox, V. & Barker, D. J. 1996. Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet*, **348**, 1269-73.
- Stewart, T., Jung, F. F., Manning, J. & Vehaskari, V. M. 2005. Kidney immune cell infiltration and oxidative stress contribute to prenatally programmed hypertension. *Kidney Int*, **68**, 2180-8.
- Tatara, M. R., Sliwa, E. & Krupski, W. 2007. Prenatal programming of skeletal development in the offspring: effects of maternal treatment with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on femur properties in pigs at slaughter age. *Bone*, **40**, 1615-22.
- Terao, J. 2009. Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum Nutr*, **61**, 87-94.
- Thakore, J. H. & Dinan, T. G. 1994. Growth hormone secretion: the role of glucocorticoids. *Life Sci*, **55**, 1083-99.
- Thame, M., Osmond, C., Wilks, R. J., Bennett, F. I., McFarlane-Anderson, N. & Forrester, T. E. 2000. Blood pressure is related to placental volume and birth weight. *Hypertension*, **35**, 662-7.
- Theys, N., Clippe, A., Bouckenoghe, T., Reusens, B. & Remacle, C. 2009. Early low protein diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet dysfunction. *PLoS One*, **4**, e6110.

- Touyz, R. M. 2004. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*, **37**, 1263-73.
- Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. 2004. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*, **122**, 339-52.
- Truelsen, T., Gronbaek, M., Schnohr, P. & Boysen, G. 1998. Intake of beer, wine, and spirits and risk of stroke : the copenhagen city heart study. *Stroke*, **29**, 2467-72.
- Vagero, D. & Leon, D. 1994. Ischaemic heart disease and low birth weight: a test of the fetal-origins hypothesis from the Swedish Twin Registry. *Lancet*, **343**, 260-3.
- Van Remmen, H. & Jones, D. P. 2009. Current thoughts on the role of mitochondria and free radicals in the biology of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **64**, 171-4.
- Virchow, S., Ansorge, N., Roskopf, D., Rubben, H. & Siffert, W. 1999. The G protein beta3 subunit splice variant Gbeta3-s causes enhanced chemotaxis of human neutrophils in response to interleukin-8. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **360**, 27-32.
- Virchow, S., Ansorge, N., Rubben, H., Siffert, G. & Siffert, W. 1998. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein beta3 subunit 825 T-allele. *FEBS Lett*, **436**, 155-8.
- Wallerath, T., Poleo, D., Li, H. & Forstermann, U. 2003. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol*, **41**, 471-8.
- Waterland, R. A. & Garza, C. 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*, **69**, 179-97.

- Welham, S. J., Riley, P. R., Wade, A., Hubank, M. & Woolf, A. S. 2005. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. *Physiol Genomics*, **22**, 48-56.
- Welham, S. J., Wade, A. & Woolf, A. S. 2002. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int*, **61**, 1231-42.
- Williams, P. J., Kurlak, L. O., Perkins, A. C., Budge, H., Stephenson, T., Keisler, D., *et al.* 2007. Hypertension and impaired renal function accompany juvenile obesity: the effect of prenatal diet. *Kidney Int*, **72**, 279-89.
- Woods, L. L. 2007. Maternal nutrition and predisposition to later kidney disease. *Curr Drug Targets*, **8**, 906-13.
- Woods, L. L., Ingelfinger, J. R., Nyengaard, J. R. & Rasch, R. 2001. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res*, **49**, 460-7.
- Woods, L. L., Ingelfinger, J. R. & Rasch, R. 2005. Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R1131-6.
- Woods, L. L. & Weeks, D. A. 2004. Naturally occurring intrauterine growth retardation and adult blood pressure in rats. *Pediatr Res*, **56**, 763-7.
- Woods, L. L. & Weeks, D. A. 2005. Prenatal programming of adult blood pressure: role of maternal corticosteroids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R955-62.
- Woods, L. L., Weeks, D. A. & Rasch, R. 2004. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int*, **65**, 1339-48.

- Yoshida, A. 1992. Starting from grape cultivation. *Integration*, 2-11.
- Zydziorczyk, C., Gobeil, F., Jr., Cambonie, G., Lahaie, I., Le, N. L., Samarani, S., *et al.* 2006. Exaggerated vasomotor response to ANG II in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet during gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **291**, R1060-8.
- Zeman, F. J. 1968. Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats. *J Nutr*, **94**, 111-6.
- Zeman, F. J. 1983. The effect of prenatal protein-calorie malnutrition on kidney development in the rat. *Prog Clin Biol Res*, **140**, 309-38.
- Zeman, F. J. & Stanbrough, E. C. 1969. Effect of maternal protein deficiency on cellular development in the fetal rat. *J Nutr*, **99**, 274-82.
- Zhang, J., Lewis, R. M., Wang, C., Hales, N. & Byrne, C. D. 2005. Maternal dietary iron restriction modulates hepatic lipid metabolism in the fetuses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **288**, R104-11.

## ANEXO 1

## IX- Referências

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*, **105**, 121-6.
- Almeida, J. R. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2002. Quantitative study of the comma-shaped body, S-shaped body and vascularized glomerulus in the second and third human gestational trimesters. *Early Hum Dev*, **69**, 1-13.
- Almeida, J. R. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2005a. Maternal gestational protein-calorie restriction decreases the number of glomeruli and causes glomerular hypertrophy in adult hypertensive rats. *Am J Obstet Gynecol*, **192**, 945-51.
- Almeida, J. R. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2005b. Overweight is gender-dependent in prenatal protein--calorie restricted adult rats acting on the blood pressure and the adverse cardiac remodeling. *Life Sci*, **77**, 1307-18.
- Alwasel, S. H. & Ashton, N. 2009. Prenatal programming of renal sodium handling in the rat. *Clin Sci (Lond)*, **117**, 75-84.
- Arguelles, S., Machado, M. J., Ayala, A., Machado, A. & Hervias, B. 2006. Correlation between circulating biomarkers of oxidative stress of maternal and umbilical cord blood at birth. *Free Radic Res*, **40**, 565-70.
- Bajoria, R., Sooranna, S. R., Ward, S. & Hancock, M. 2002. Placenta as a link between amino acids, insulin-IGF axis, and low birth weight: evidence from twin studies. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 308-15.
- Ballard, P. L. 1979. Glucocorticoids and differentiation. *Monogr Endocrinol*, **12**, 493-515.
- Bannister, J. V. & Calabrese, L. 1987. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*, **32**, 279-312.
- Barker, D. J. 1993. The intrauterine origins of cardiovascular disease. *Acta Paediatr Suppl*, **82 Suppl 391**, 93-9; discussion 100.
- Barker, D. J. 1994. *Mother, Babies, and Disease in Later Life*, London, British Medical Journal Publishing.

- Barker, D. J. 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, **95**, 115-28.
- Barker, D. J. 2001. The malnourished baby and infant. *Br Med Bull*, **60**, 69-88.
- Barker, D. J., Bull, A. R., Osmond, C. & Simmonds, S. J. 1990. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*, **301**, 259-62.
- Barker, D. J., Gluckman, P. D., Godfrey, K. M., Harding, J. E., Owens, J. A. & Robinson, J. S. 1993. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, **341**, 938-41.
- Barker, D. J., Godfrey, K. M., Osmond, C. & Bull, A. 1992. The relation of fetal length, ponderal index and head circumference to blood pressure and the risk of hypertension in adult life. *Paediatr Perinat Epidemiol*, **6**, 35-44.
- Barker, D. J., Osmond, C., Golding, J., Kuh, D. & Wadsworth, M. E. 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*, **298**, 564-7.
- Baumgart, D., Naber, C., Haude, M., Oldenburg, O., Erbel, R., Heusch, G., *et al.* 1999. G protein beta3 subunit 825T allele and enhanced coronary vasoconstriction on alpha(2)-adrenoceptor activation. *Circ Res*, **85**, 965-9.
- Bertin, E., Gangnerau, M. N., Bellon, G., Bailbe, D., Arbelot De Vacqueur, A. & Portha, B. 2002. Development of beta-cell mass in fetuses of rats deprived of protein and/or energy in last trimester of pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **283**, R623-30.
- Bertram, C., Trowern, A. R., Copin, N., Jackson, A. A. & Whorwood, C. B. 2001. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular

- mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology*, **142**, 2841-53.
- Bertram, J. F., Soosaipillai, M. C., Ricardo, S. D. & Ryan, G. B. 1992. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. *Cell Tissue Res*, **270**, 37-45.
- Biri, A., Bozkurt, N., Turp, A., Kavutcu, M., Himmetoglu, O. & Durak, I. 2007. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest*, **64**, 187-92.
- Biri, A., Onan, A., Devrim, E., Babacan, F., Kavutcu, M. & Durak, I. 2006. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta*, **27**, 327-32.
- Bol, V. V., Delattre, A. I., Reusens, B., Raes, M. & Remacle, C. 2009. Forced catch-up growth after fetal protein restriction alters the adipose tissue gene expression program leading to obesity in adult mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **297**, R291-9.
- Bonnes-Taourel, D., Guerin, M. C. & Torreilles, J. 1992. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? *Biochem Pharmacol*, **44**, 985-8.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Brault, S., Martinez-Bermudez, A. K., Marrache, A. M., Gobeil, F., Jr., Hou, X., Beauchamp, M., *et al.* 2003. Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-Iso-prostaglandin F2alpha: possible role in ischemic brain injury. *Stroke*, **34**, 776-82.
- Brawley, L., Poston, L. & Hanson, M. A. 2003. Mechanisms underlying the programming of small artery dysfunction: review of the model using low protein diet in pregnancy in the rat. *Arch Physiol Biochem*, **111**, 23-35.

- Brenner, B. M., Garcia, D. L. & Anderson, S. 1988. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*, **1**, 335-47.
- Brenner, B. M. & Mackenzie, H. S. 1997. Nephron mass as a risk factor for progression of renal disease. *Kidney Int Suppl*, **63**, S124-7.
- Brenner, B. M., Meyer, T. W. & Hostetter, T. H. 1982. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *N Engl J Med*, **307**, 652-9.
- Brodsky, D. & Christou, H. 2004. Current concepts in intrauterine growth restriction. *J Intensive Care Med*, **19**, 307-19.
- Cambonie, G., Comte, B., Zydorczyk, C., Ntimbane, T., Germain, N., Le, N. L., *et al.* 2007. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292**, R1236-45.
- Campbell, D. M., Hall, M. H., Barker, D. J., Cross, J., Shiell, A. W. & Godfrey, K. M. 1996. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. *Br J Obstet Gynaecol*, **103**, 273-80.
- Chan, L. L., Sebert, S. P., Hyatt, M. A., Stephenson, T., Budge, H., Symonds, M. E., *et al.* 2009. Effect of maternal nutrient restriction from early to midgestation on cardiac function and metabolism after adolescent-onset obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **296**, R1455-63.
- Chatelain, A., Dupouy, J. P. & Allaume, P. 1980. Fetal-maternal adrenocorticotropin and corticosterone relationships in the rat: effects of maternal adrenalectomy. *Endocrinology*, **106**, 1297-303.

- Cheema, K. K., Dent, M. R., Saini, H. K., Aroutiounova, N. & Tappia, P. S. 2005. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. *Br J Nutr*, **93**, 471-7.
- Chen, Y., Lasaitiene, D. & Friberg, P. 2004. The renin-angiotensin system in kidney development. *Acta Physiol Scand*, **181**, 529-35.
- Clarke, H. & Coates, M. 1977. *Dietary standards for laboratory animals: respor of the laboratory Animals Center Diets Advisory Commitee*.
- Corder, R., Douthwaite, J. A., Lees, D. M., Khan, N. Q., Viseu Dos Santos, A. C., Wood, E. G., *et al.* 2001. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*, **414**, 863-4.
- Corstius, H. B., Zimanyi, M. A., Maka, N., Herath, T., Thomas, W., van der Laarse, A., *et al.* 2005. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res*, **57**, 796-800.
- Da, R. R., Palacios, V., Combina, M., Fraga, M. E., De, O. R., Magnoli, C. E., *et al.* 2002. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. *Food Addit Contam*, **19**, 408-14.
- de Moura, R. S., Resende, A. C., Moura, A. S. & Maradei, M. F. 2007. Protective action of a hydroalcoholic extract of a vinifera grape skin on experimental preeclampsia in rats. *Hypertens Pregnancy*, **26**, 89-100.
- Demrow, H. S., Slane, P. R. & Folts, J. D. 1995. Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation*, **91**, 1182-8.
- Dobrev, D., Wettwer, E., Himmel, H. M., Kortner, A., Kuhlisch, E., Schuler, S., *et al.* 2000. G-Protein beta(3)-subunit 825T allele is associated with enhanced human atrial inward rectifier potassium currents. *Circulation*, **102**, 692-7.

- Don, A. S., Kisker, O., Dilda, P., Donoghue, N., Zhao, X., Decollogne, S., *et al.* 2003. A peptide trivalent arsenical inhibits tumor angiogenesis by perturbing mitochondrial function in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell*, **3**, 497-509.
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, **82**, 47-95.
- Dunger, D. B., Ong, K. K., Huxtable, S. J., Sherriff, A., Woods, K. A., Ahmed, M. L., *et al.* 1998. Association of the INS VNTR with size at birth. ALSPAC Study Team. Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. *Nat Genet*, **19**, 98-100.
- Edwards, C. R., Benediktsson, R., Lindsay, R. S. & Seckl, J. R. 1993. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet*, **341**, 355-7.
- Erel, C. T., Dane, B., Calay, Z., Kaleli, S. & Aydinli, K. 2001. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR. *Int J Gynaecol Obstet*, **73**, 229-35.
- Feng, Z. H. & Cheng, S. 1999. [Relationship between oxysterols and atherosclerosis]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **30**, 23-8.
- Fetoui, H., Garoui, M. & Zeghal, N. 2009. Protein restriction in pregnant- and lactating rats-induced oxidative stress and hypohomocysteinaemia in their offspring. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, **93**, 263-70.
- Forsen, T., Eriksson, J. G., Tuomilehto, J., Osmond, C. & Barker, D. J. 1999. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ*, **319**, 1403-7.
- Forsen, T., Eriksson, J. G., Tuomilehto, J., Teramo, K., Osmond, C. & Barker, D. J. 1997. Mother's weight in pregnancy and coronary heart disease in a cohort of Finnish men: follow up study. *BMJ*, **315**, 837-40.
- Fowden, A. L. 1995. Endocrine regulation of fetal growth. *Reprod Fertil Dev*, **7**, 351-63.

- Foxcroft, G. R., Dixon, W. T., Novak, S., Putman, C. T., Town, S. C. & Vinsky, M. D. 2006. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. *J Anim Sci*, **84 Suppl**, E105-12.
- Frankel, S., Elwood, P., Sweetnam, P., Yarnell, J. & Smith, G. D. 1996a. Birthweight, adult risk factors and incident coronary heart disease: the Caerphilly Study. *Public Health*, **110**, 139-43.
- Frankel, S., Elwood, P., Sweetnam, P., Yarnell, J. & Smith, G. D. 1996b. Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease. *Lancet*, **348**, 1478-80.
- Garofano, A., Czernichow, P. & Breant, B. 1997. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia*, **40**, 1231-4.
- Garofano, A., Czernichow, P. & Breant, B. 1998. Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. *Diabetologia*, **41**, 1114-20.
- Gennser, G., Rymark, P. & Isberg, P. E. 1988. Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. *Br Med J (Clin Res Ed)*, **296**, 1498-500.
- Georgeson, G. D., Szony, B. J., Streitman, K., Varga, I. S., Kovacs, A., Kovacs, L., *et al.* 2002. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **103**, 136-9.
- Ginter, E. & Simko, V. 2008. Ethanol and cardiovascular diseases: epidemiological, biochemical and clinical aspects. *Bratisl Lek Listy*, **109**, 590-4.
- Glantz, S. A. 2002. *Primer of biostatistics.*, New York, Medical Publishing Division.
- Godfrey, K. M. 2002. The role of the placenta in fetal programming-a review. *Placenta*, **23 Suppl A**, S20-7.

- Gupta, S., Agarwal, A. & Sharma, R. K. 2005. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv*, **60**, 807-16.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. 1991. *Free Radicals in Biology and Medicine*, New York Clarendon Press.
- Hansen, J. T. & Koepfen, B. M. 2003. *Atlas de Fisiologia Humana de Netter*, Artmed.
- Harding, J. E. 2001. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol*, **30**, 15-23.
- Harding, J. E. & Johnston, B. M. 1995. Nutrition and fetal growth. *Reprod Fertil Dev*, **7**, 539-47.
- Harrison, M. & Langley-Evans, S. C. 2009. Intergenerational programming of impaired nephrogenesis and hypertension in rats following maternal protein restriction during pregnancy. *Br J Nutr*, **101**, 1020-30.
- Hegele, R. A., Anderson, C., Young, T. K. & Connelly, P. W. 1999. G-protein beta3 subunit gene splice variant and body fat distribution in Nunavut Inuit. *Genome Res*, **9**, 972-7.
- Hertog, M. G., Feskens, E. J., Hollman, P. C., Katan, M. B. & Kromhout, D. 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, **342**, 1007-11.
- Ho, Y. S., Howard, A. J. & Crapo, J. D. 1991. Molecular structure of a functional rat gene for manganese-containing superoxide dismutase. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **4**, 278-86.
- Hoher, B., Slowinski, T., Bauer, C. & Halle, H. 2001. The advanced fetal programming hypothesis. *Nephrol Dial Transplant*, **16**, 1298-9.
- Hoher, B., Slowinski, T., Stolze, T., Pleschka, A., Neumayer, H. H. & Halle, H. 2000. Association of maternal G protein beta3 subunit 825T allele with low birthweight. *Lancet*, **355**, 1241-2.

- Holemans, K., Verhaeghe, J., Dequeker, J. & Van Assche, F. A. 1996. Insulin sensitivity in adult female rats subjected to malnutrition during the perinatal period. *J Soc Gynecol Investig*, **3**, 71-7.
- Hollman, P. C. & Katan, M. B. 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, **51**, 305-10.
- Hoppe, C. C., Evans, R. G., Bertram, J. F. & Moritz, K. M. 2007. Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **292**, R1768-74.
- Hughson, M., Farris, A. B., 3rd, Douglas-Denton, R., Hoy, W. E. & Bertram, J. F. 2003. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. *Kidney Int*, **63**, 2113-22.
- Jackson, A. A., Langley-Evans, S. C. & McCarthy, H. D. 1996. Nutritional influences in early life upon obesity and body proportions. *Ciba Found Symp*, **201**, 118-29; discussion 129-37, 188-93.
- Jansson, T. & Powell, T. L. 2007. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clin Sci (Lond)*, **113**, 1-13.
- Jialal, I. & Grundy, S. M. 1992. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. *Ann N Y Acad Sci*, **669**, 237-47; discussion 247-8.
- Jolicoeur, P. & Heusner, A. A. 1986. Log-normal variation belts for growth curves. *Biometrics*, **42**, 785-94.
- Kleinman, L. I. 1982. Developmental renal physiology. *Physiologist*, **25**, 104-10.
- Koukkou, E., Ghosh, P., Lowy, C. & Poston, L. 1998. Offspring of normal and diabetic rats fed saturated fat in pregnancy demonstrate vascular dysfunction. *Circulation*, **98**, 2899-904.

- Kwong, W. Y., Wild, A. E., Roberts, P., Willis, A. C. & Fleming, T. P. 2000. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*, **127**, 4195-202.
- Langley-Evans, S. & Jackson, A. 1996. Intrauterine programming of hypertension: nutrient-hormone interactions. *Nutr Rev*, **54**, 163-9.
- Langley-Evans, S. C., Clamp, A. G., Grimble, R. F. & Jackson, A. A. 1996a. Influence of dietary fats upon systolic blood pressure in the rat. *Int J Food Sci Nutr*, **47**, 417-25.
- Langley-Evans, S. C., Gardner, D. S. & Jackson, A. A. 1996b. Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J Reprod Fertil*, **106**, 307-12.
- Langley-Evans, S. C., Gardner, D. S. & Jackson, A. A. 1996c. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr*, **126**, 1578-85.
- Langley-Evans, S. C., Langley-Evans, A. J. & Marchand, M. C. 2003. Nutritional programming of blood pressure and renal morphology. *Arch Physiol Biochem*, **111**, 8-16.
- Langley-Evans, S. C. & Nwagwu, M. 1998. Impaired growth and increased glucocorticoid-sensitive enzyme activities in tissues of rat fetuses exposed to maternal low protein diets. *Life Sci*, **63**, 605-15.
- Langley-Evans, S. C., Sherman, R. C., Welham, S. J., Nwagwu, M. O., Gardner, D. S. & Jackson, A. A. 1999a. Intrauterine programming of hypertension: the role of the renin-angiotensin system. *Biochem Soc Trans*, **27**, 88-93.
- Langley-Evans, S. C., Welham, S. J. & Jackson, A. A. 1999b. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci*, **64**, 965-74.

- Langley-Evans, S. C., Welham, S. J., Sherman, R. C. & Jackson, A. A. 1996d. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond)*, **91**, 607-15.
- Langley, S. C. & Jackson, A. A. 1994. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)*, **86**, 217-22; discussion 121.
- Law, C. M., Barker, D. J., Bull, A. R. & Osmond, C. 1991. Maternal and fetal influences on blood pressure. *Arch Dis Child*, **66**, 1291-5.
- McMullen, S., Gardner, D. S. & Langley-Evans, S. C. 2004. Prenatal programming of angiotensin II type 2 receptor expression in the rat. *Br J Nutr*, **91**, 133-40.
- Merezak, S., Hardikar, A. A., Yajnik, C. S., Remacle, C. & Reusens, B. 2001. Intrauterine low protein diet increases fetal beta-cell sensitivity to NO and IL-1 beta: the protective role of taurine. *J Endocrinol*, **171**, 299-308.
- Moore, V. M., Miller, A. G., Boulton, T. J., Cockington, R. A., Craig, I. H., Magarey, A. M., *et al.* 1996. Placental weight, birth measurements, and blood pressure at age 8 years. *Arch Dis Child*, **74**, 538-41.
- Moreau, E., Vilar, J., Lelievre-Pegorier, M., Merlet-Benichou, C. & Gilbert, T. 1998. Regulation of c-ret expression by retinoic acid in rat metanephros: implication in nephron mass control. *Am J Physiol*, **275**, F938-45.
- Moxham, C. M., Hod, Y. & Malbon, C. C. 1993. Induction of G alpha i2-specific antisense RNA in vivo inhibits neonatal growth. *Science*, **260**, 991-5.
- Musgrave, S. 2002. Life and death issues. Interview by Alison Moore. *Nurs Stand*, **17**, 83.
- Naber, C., Hermann, B. L., Vietzke, D., Altmann, C., Haude, M., Mann, K., *et al.* 2000. Enhanced epinephrine-induced platelet

- aggregation in individuals carrying the G protein beta3 subunit 825T allele. *FEBS Lett*, **484**, 199-201.
- Nassiri-Asl, M. & Hosseinzadeh, H. 2009. Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (Grape) and its bioactive compounds. *Phytother Res*, **23**, 1197-204.
- Neer, E. J. & Clapham, D. E. 1988. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature*, **333**, 129-34.
- Nuyt, A. M. 2008. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)*, **114**, 1-17.
- Nwagwu, M. O., Cook, A. & Langley-Evans, S. C. 2000. Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. *Br J Nutr*, **83**, 79-85.
- Ortiz, L. A., Quan, A., Weinberg, A. & Baum, M. 2001. Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development. *Kidney Int*, **59**, 1663-9.
- Ortiz, L. A., Quan, A., Zarzar, F., Weinberg, A. & Baum, M. 2003. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension*, **41**, 328-34.
- Osgerby, J. C., Wathes, D. C., Howard, D. & Gadd, T. S. 2002. The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J Endocrinol*, **173**, 131-41.
- Osmond, C., Barker, D. J., Winter, P. D., Fall, C. H. & Simmonds, S. J. 1993. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ*, **307**, 1519-24.
- Ozaki, T., Nishina, H., Hanson, M. A. & Poston, L. 2001. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol*, **530**, 141-52.
- Petrik, J., Reusens, B., Arany, E., Remacle, C., Coelho, C., Hoet, J. J., *et al.* 1999. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat and is

- associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor-II. *Endocrinology*, **140**, 4861-73.
- Peuchant, E., Brun, J. L., Rigalleau, V., Dubourg, L., Thomas, M. J., Daniel, J. Y., *et al.* 2004. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem*, **37**, 293-8.
- Pham, T. D., MacLennan, N. K., Chiu, C. T., Laksana, G. S., Hsu, J. L. & Lane, R. H. 2003. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **285**, R962-70.
- Pires, K. M., Aguila, M. B. & Mandarim-de-Lacerda, C. A. 2006. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. *Life Sci*, **79**, 2128-34.
- Pladys, P., Sennlaub, F., Brault, S., Checchin, D., Lahaie, I., Le, N. L., *et al.* 2005. Microvascular rarefaction and decreased angiogenesis in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet in utero. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R1580-8.
- Racasan, S., Braam, B., Koomans, H. A. & Joles, J. A. 2005. Programming blood pressure in adult SHR by shifting perinatal balance of NO and reactive oxygen species toward NO: the inverted Barker phenomenon. *Am J Physiol Renal Physiol*, **288**, F626-36.
- Ream, M., Ray, A. M., Chandra, R. & Chikaraishi, D. M. 2008. Early fetal hypoxia leads to growth restriction and myocardial thinning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **295**, R583-95.
- Reeves, P. G., Nielsen, F. H. & Fahey, G. C., Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-51.

- Regina, S., Lucas, R., Miraglia, S. M., Zaladek Gil, F. & Machado Coimbra, T. 2001. Intrauterine food restriction as a determinant of nephrosclerosis. *Am J Kidney Dis*, **37**, 467-76.
- Reinisch, J. M., Simon, N. G., Karow, W. G. & Gandelman, R. 1978. Prenatal exposure to prednisone in humans and animals retards intrauterine growth. *Science*, **202**, 436-8.
- Renaud, S. & de Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, **339**, 1523-6.
- Rich-Edwards, J. W., Stampfer, M. J., Manson, J. E., Rosner, B., Hankinson, S. E., Colditz, G. A., *et al.* 1997. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ*, **315**, 396-400.
- Robinson, S. M., Wheeler, T., Hayes, M. C., Barker, D. J. & Osmond, C. 1991. Fetal heart rate and intrauterine growth. *Br J Obstet Gynaecol*, **98**, 1223-7.
- Rosenberg, M. E., Chmielewski, D. & Hostetter, T. H. 1990. Effect of dietary protein on rat renin and angiotensinogen gene expression. *J Clin Invest*, **85**, 1144-9.
- Rotondo, S., Di Castelnuovo, A. & de Gaetano, G. 2001. The relationship between wine consumption and cardiovascular risk: from epidemiological evidence to biological plausibility. *Ital Heart J*, **2**, 1-8.
- Saker, M., Soulimane Mokhtari, N., Merzouk, S. A., Merzouk, H., Belarbi, B. & Narce, M. 2008. Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **141**, 95-9.
- Shah, A. R. 2009. Red Wine, The Secret Antidote of Youth?).
- Sharif, J., Nakamura, M., Ito, T., Kimura, Y., Nagamune, T., Mitsuya, K., *et al.* 2007. Food restriction in pregnant mice can induce changes in histone modifications and suppress gene expression in fetus. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 125-6.

- Sharkey, D., Gardner, D. S., Fainberg, H. P., Sebert, S., Bos, P., Wilson, V., *et al.* 2009. Maternal nutrient restriction during pregnancy differentially alters the unfolded protein response in adipose and renal tissue of obese juvenile offspring. *FASEB J*, **23**, 1314-24.
- Sharp, P. E. & La Regina, M. C. 1998. *The Laboratory Rat*, Boca Raton, CRC Press.
- Sherman, R. C. & Langley-Evans, S. C. 2000. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci (Lond)*, **98**, 269-75.
- Siffert, W. 2000. G protein beta 3 subunit 825T allele, hypertension, obesity, and diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, **15**, 1298-306.
- Siffert, W., Forster, P., Jockel, K. H., Mvere, D. A., Brinkmann, B., Naber, C., *et al.* 1999. Worldwide ethnic distribution of the G protein beta3 subunit 825T allele and its association with obesity in Caucasian, Chinese, and Black African individuals. *J Am Soc Nephrol*, **10**, 1921-30.
- Siffert, W., Roskopf, D., Siffert, G., Busch, S., Moritz, A., Erbel, R., *et al.* 1998. Association of a human G-protein beta3 subunit variant with hypertension. *Nat Genet*, **18**, 45-8.
- Soares De Moura, R., Costa Viana, F. S., Souza, M. A., Kovary, K., Guedes, D. C., Oliveira, E. P., *et al.* 2002. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol*, **54**, 1515-20.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research.*, New York, Freeman.
- St Leger, A. S., Cochrane, A. L. & Moore, F. 1979. Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*, **1**, 1017-20.

- Stein, C. E., Fall, C. H., Kumaran, K., Osmond, C., Cox, V. & Barker, D. J. 1996. Fetal growth and coronary heart disease in south India. *Lancet*, **348**, 1269-73.
- Stewart, T., Jung, F. F., Manning, J. & Vehaskari, V. M. 2005. Kidney immune cell infiltration and oxidative stress contribute to prenatally programmed hypertension. *Kidney Int*, **68**, 2180-8.
- Tatara, M. R., Sliwa, E. & Krupski, W. 2007. Prenatal programming of skeletal development in the offspring: effects of maternal treatment with beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on femur properties in pigs at slaughter age. *Bone*, **40**, 1615-22.
- Terao, J. 2009. Dietary flavonoids as antioxidants. *Forum Nutr*, **61**, 87-94.
- Thakore, J. H. & Dinan, T. G. 1994. Growth hormone secretion: the role of glucocorticoids. *Life Sci*, **55**, 1083-99.
- Thame, M., Osmond, C., Wilks, R. J., Bennett, F. I., McFarlane-Anderson, N. & Forrester, T. E. 2000. Blood pressure is related to placental volume and birth weight. *Hypertension*, **35**, 662-7.
- Theys, N., Clippe, A., Bouckenoghe, T., Reusens, B. & Remacle, C. 2009. Early low protein diet aggravates unbalance between antioxidant enzymes leading to islet dysfunction. *PLoS One*, **4**, e6110.
- Touyz, R. M. 2004. Reactive oxygen species and angiotensin II signaling in vascular cells -- implications in cardiovascular disease. *Braz J Med Biol Res*, **37**, 1263-73.
- Touyz, R. M. & Schiffrin, E. L. 2004. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension. *Histochem Cell Biol*, **122**, 339-52.
- Truelsen, T., Gronbaek, M., Schnohr, P. & Boysen, G. 1998. Intake of beer, wine, and spirits and risk of stroke : the copenhagen city heart study. *Stroke*, **29**, 2467-72.

- Vagero, D. & Leon, D. 1994. Ischaemic heart disease and low birth weight: a test of the fetal-origins hypothesis from the Swedish Twin Registry. *Lancet*, **343**, 260-3.
- Van Remmen, H. & Jones, D. P. 2009. Current thoughts on the role of mitochondria and free radicals in the biology of aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **64**, 171-4.
- Virchow, S., Ansorge, N., Roskopf, D., Rubben, H. & Siffert, W. 1999. The G protein beta3 subunit splice variant Gbeta3-s causes enhanced chemotaxis of human neutrophils in response to interleukin-8. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **360**, 27-32.
- Virchow, S., Ansorge, N., Rubben, H., Siffert, G. & Siffert, W. 1998. Enhanced fMLP-stimulated chemotaxis in human neutrophils from individuals carrying the G protein beta3 subunit 825 T-allele. *FEBS Lett*, **436**, 155-8.
- Wallerath, T., Poleo, D., Li, H. & Forstermann, U. 2003. Red wine increases the expression of human endothelial nitric oxide synthase: a mechanism that may contribute to its beneficial cardiovascular effects. *J Am Coll Cardiol*, **41**, 471-8.
- Waterland, R. A. & Garza, C. 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*, **69**, 179-97.
- Welham, S. J., Riley, P. R., Wade, A., Hubank, M. & Woolf, A. S. 2005. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. *Physiol Genomics*, **22**, 48-56.
- Welham, S. J., Wade, A. & Woolf, A. S. 2002. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int*, **61**, 1231-42.
- Williams, P. J., Kurlak, L. O., Perkins, A. C., Budge, H., Stephenson, T., Keisler, D., *et al.* 2007. Hypertension and impaired renal

- function accompany juvenile obesity: the effect of prenatal diet. *Kidney Int*, **72**, 279-89.
- Woods, L. L. 2007. Maternal nutrition and predisposition to later kidney disease. *Curr Drug Targets*, **8**, 906-13.
- Woods, L. L., Ingelfinger, J. R., Nyengaard, J. R. & Rasch, R. 2001. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res*, **49**, 460-7.
- Woods, L. L., Ingelfinger, J. R. & Rasch, R. 2005. Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R1131-6.
- Woods, L. L. & Weeks, D. A. 2004. Naturally occurring intrauterine growth retardation and adult blood pressure in rats. *Pediatr Res*, **56**, 763-7.
- Woods, L. L. & Weeks, D. A. 2005. Prenatal programming of adult blood pressure: role of maternal corticosteroids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **289**, R955-62.
- Woods, L. L., Weeks, D. A. & Rasch, R. 2004. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int*, **65**, 1339-48.
- Yoshida, A. 1992. Starting from grape cultivation. *Integration*, 2-11.
- Zydzorczyk, C., Gobeil, F., Jr., Cambonie, G., Lahaie, I., Le, N. L., Samarani, S., *et al.* 2006. Exaggerated vasomotor response to ANG II in rats with fetal programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet during gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **291**, R1060-8.
- Zeman, F. J. 1968. Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young of rats. *J Nutr*, **94**, 111-6.
- Zeman, F. J. 1983. The effect of prenatal protein-calorie malnutrition on kidney development in the rat. *Prog Clin Biol Res*, **140**, 309-38.

- Zeman, F. J. & Stanbrough, E. C. 1969. Effect of maternal protein deficiency on cellular development in the fetal rat. *J Nutr*, **99**, 274-82.
- Zhang, J., Lewis, R. M., Wang, C., Hales, N. & Byrne, C. D. 2005. Maternal dietary iron restriction modulates hepatic lipid metabolism in the fetuses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **288**, R104-11.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)