KAREN LUCASECHI LOPES

**Avaliação do sistema renina -
angiotensina tecidual e circulante em
prole de ratas que receberam
sobrecarga ou restrição de sal na dieta
durante a gestação e amamentação**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2006

KAREN LUCASECHI LOPES

**Avaliação do sistema renina -
angiotensina tecidual e circulante em
prole de ratas que receberam
sobrecarga ou restrição de sal na dieta
durante a gestação e amamentação**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Nefrologia
Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

**SÃO PAULO
2006**

DEDICATÓRIA

A **Adalberto Lopes**, meu querido e amado pai, um grande exemplo de honestidade e dono de uma inteligência brilhante, que sempre me incentivou a ter tudo que eu almejo na vida.

A **Hidely** minha adorada mãe pelo constante amor e por fazer tudo para que eu me desenvolvesse bem cercada de conforto e saúde.

A minha amada **Vó Marina** (*in memoriam*) uma pessoa que foi muito importante na minha vida me ensinou muitas coisas e que me cercou de carinho e amor.

Ao meu irmão **Álvaro** que sempre esteve ao meu lado.

Ao amor da minha vida, **Peter Jang**, um grande companheiro que sempre cuida de mim e me cerca de amor e carinho e sempre me apoia em tudo que faço.

*Um pai sábio deixa que os filhos cometam erros. É bom
que, de quando em quando, queimem os dedos. (Ghandi)*

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Joel Claudio Heimann, por ter me aceito como aluna, pela oportunidade de desenvolver este projeto de doutorado no seu laboratório, por sua paciência e tolerância e por me transmitir seus preciosos ensinamentos.

Doutora Miriam Sterman Dolnikoff, pela amizade e ensinamentos e por ser minha mãe científica.

Doutor Fábio Bessa Lima, por seu ensinamento na área de tecido atiposo.

Doutora Luzia Naôko Shinohara Furukawa, por transmitir as competentes técnicas laboratoriais e pela constante dedicação e amizade, sem a qual, não seria possível a realização deste trabalho.

Mestra Ivone Braga de Oliveira, pela inestimável ajuda no fim deste projeto e por sua amizade e dedicação e por sempre colaborar em todos os projetos do nosso laboratório.

Professor Doutor Rui Toledo Barros, por ter me aceito e confiado em mim como pós-graduanda da disciplina de Nefrologia.

A amiga Daniela Araújo Mirandola, que sempre me ajudou a corrigir meus relatórios e por sempre estar pronta para me ajudar quando necessário.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Danielle Nunes Ferreira, Doutora Michella Soraes Coelho Araújo, Sandra Márcia Leandro, Débora Rothstein Ramos e Nauilo Lima Costa, pela amizade e pelo constante apoio durante a realização desta tese.

A Doutora Luciene Machado e Fabiana Graciolli pela amizade e pelo empréstimo de equipamentos e reagentes.

As Doutoradas Vanda Geogetti e Irene de Lourdes Noronha, por disponibilizarem seus laboratórios e equipamentos para realização de alguns experimentos desta tese.

Aos colegas Humberto Delle e Wagner Dominguez pela paciência e amizade por me ensinar à técnica de western blotting

Aos colegas que passaram pelo Laboratório de Hipertensão Experimental, durante o meu período de pós-graduação, com sua ajuda nos momentos difíceis.

Aos amigos Walter Campestre e Janice da Graça Pião da Silva pela dedicação e apoio no cuidado dos animais e materiais utilizados neste trabalho.

As secretárias Denise Cristina Duarte e Marineide Ribeiro pela disponibilidade e grande ajuda em todos os momentos.

A todos os colegas do Lim 16 .

À FAPESP pela concessão de bolsa de estudos durante todo o período de pós-graduação, o que facilitou minha dedicação à tese.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	5
3. MÉTODOS.	6
3.1. Animais	6
3.1.1. Protocolo experimental	9
3.1.2. Bloqueio da enzima de conversão da angiotensina I com Captopril e do receptor AT ₁ da angiotensina II com Losartan	9
3.1.3. Suplementação de angiotensina II via mini-bomba osmótica	9
3.1.4. Nascimento e desmame da prole	10
3.2. Medida da massa do tecido adiposo	10
3.2.1. Índice de adiposidade	10
3.3. Isolamento do tecido adiposo e determinação da quantidade e do o volume dos adipócitos.	10
3.4. Determinação da pressão intra-arterial	11
3.5. Determinação da atividade da renina plasmática	11
3.6. Dosagem da atividade da ECA	12
3.7. Western blotting	13
3.7.1. Anticorpos para western blot	14
3.8. Análise estatística	15
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	79
6. CONCLUSÃO	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE SIGLAS

AII - Angiotensina II

ANG – Angiotensinogênio

cAMP - 3'-5' monofosfato de adenosina cíclico

ECA - Enzima de conversão de angiotensina I

FAS - Ácido graxo sintase

FFA - Ácidos graxos livres

G3PDH - Glicerol 3 fosfatase desidrogenase

HO - Dieta hipossódica

HR - Dieta hipersódica

NR - Dieta normossódica

PA - Pressão arterial

SRA - Sistema renina angiotensina

UCP₁ - Proteína desacopladora mitocondrial 1

LISTA DE FIGURAS

Protocolo experimental materno	8
Protocolo experimental do grupo prole	9
Figura 1 - Peso corpóreo (g) de mães que receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON) durante a gestação e amamentação	18
Figura 2 - Peso corpóreo (g) de mães que receberam dieta normossódica (NR CON), hipossódica (HO CON) ou hipersódica (HR CON), captopril (NR CAP), (HO CAP) – 100 mg /L na água de beber, losartan (NR LOS), (HO LOS) - 200 mg /L na água de beber, ou angiotensina II (NR AII), (HR AII) 150 ng .kg ⁻¹ .min . Todas as drogas foram dadas no dia seguinte à fecundação	19
Figura 3 - Dosagem da atividade (nmol His-Leu/min/mg) da enzima de conversora de AI (ECA) no soro, após a gestação, em mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON)	20
Figura 4 - Dosagem da atividade (nmol His-Leu/min/mg) da enzima conversora de AI (ECA) no soro de mães, após a amamentação, que receberam dieta normossódica (NR CON), captopril 100 mg /L na água de beber (NR CAP), losartan - 200 mg /L na água de beber (NR LOS), ou angiotensina II - 150 ng.kg ⁻¹ .min.(NR AII)	21
Figura 5 - Dosagem da atividade (nmol His-Leu/min/mg) da enzima conversora de AI (ECA) no soro de mães, após a amamentação que receberam dieta hipossódica (HO CON) ou captopril 100 mg /L na água de beber (HO CAP)	21
Figura 6 - Dosagem da atividade (nmol His-Leu/min/mg) da enzima conversora de AI (ECA) no soro de mães, após a amamentação que receberam dieta hipersódica (HR CON) ou angiotensina II -150 ng.kg ⁻¹ .min .(HR AII)	22
Figura 7 - Massa de tecido adiposo marrom interescapular da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON)	36

Figura 8 - Massa de tecido adiposo marrom interescapular da prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON) 36

Figura 9 - Tecido adiposo marrom interescapular da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), normossódica com captopril 100 mg /L (NR CAP), normossódica com losartan 200 mg /L (NR LOS) ou normossódica com angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII) 37

Figura 10 - Tecido adiposo marrom interescapular da prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), normossódica com captopril 100 mg /L (NR CAP), normossódica com losartan 200 mg /L (NR LOS) ou normossódica com angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII) 37

Figura 11 Tecido adiposo marrom interescapular da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica com captopril 100mg/L (HO CAP) 38

Figura 12 - Tecido adiposo marrom interescapular da prole de machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica com captopril 100mg/L (HO CAP) 38

Figura. 13 -Tecido adiposo marrom interescapular da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica (HR CON) ou normossódica com angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII) 39

Figura 14- Tecido adiposo marrom interescapular da prole de machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HR CON) ou normossódica com angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII) 39

Figura 15 - Índice de adiposidade (%) da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON) 52

Figura 16 - Índice de adiposidade (%) da prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON) 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pressão arterial (mmHg), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de mães que receberam dieta hipo, normo e hipersódica	16
Tabela 2 - Pressão arterial (mmHg), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de mães receberam dieta normossódica	17
Tabela 3 - Pressão arterial (mmHg), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de mães receberam dieta hipossódica	17
Tabela 4 - Pressão arterial (mmHg), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de mães receberam dieta hipersódica	17
Tabela 5 - Peso ao nascimento (g) (PN), glicemia neonatal (mg/dl) (GN) e peso com 12 semanas de idade (g) (P12) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica	24
Tabela 6 - Peso ao nascimento (g) (PN), glicemia neonatal (mg/dl) (GN) e peso com 12 semanas de idade (g) (P12) de proles cujas mães receberam dieta normossódica	25
Tabela 7 - Peso ao nascimento (g) (PN), glicemia neonatal (mg/dl) (GN) e peso com 12 semanas de idade (g) (P12) de proles cujas mães receberam dieta hipossódica.	26
Tabela 8 - Peso ao nascimento (g) (PN), glicemia neonatal (mg/dl) (GN) e peso com 12 semanas de idade (g) (P12) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica	27
Tabela 9 - Pressão arterial (mmHg) sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica	28
Tabela 10 - Pressão arterial (mmHg) sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média(PAM), de proles cujas mães receberam dieta normossódica	29
Tabela 11 - Pressão arterial (mmHg) sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), de proles cujas mães receberam dieta hipossódica	30
Tabela 12 - Pressão arterial (mmHg) sistólica(PAS), diastólica (PAD) e média(PAM), de proles cujas mães receberam dieta hipersódica	30
Tabela 13 - Massa de tecido adiposo branco (g/100g) retroperitoneal (RET), gonadal (GON), mesentérico (MES) e inguinal (ING) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica	33

Tabela 14 – Massa de tecido adiposo branco (g/100g) retroperitoneal (RET), gonadal (GON), mesentérico (MES) e inguinal (ING) de proles cujas mães receberam dieta normossódica	34
Tabela 15 – Massa de tecido adiposo branco (g/100g) retroperitoneal (RET), gonadal (GON), mesentérico (MES) e inguinal (ING) de proles cujas mães receberam dieta hipossódica	35
Tabela 16 - Massa de tecido adiposo branco (g /100g) retroperitoneal (RET), gonadal (GON), mesentérico (MES) e inguinal (ING) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica	35
Tabela 17 - Massa cardíaca e renal (g /100g) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica	41
Tabela 18 - Massa cardíaca e renal (g /100g) de proles cujas mães receberam dieta normossódica	42
Tabela 19 - Massa cardíaca e renal (g /100g) de proles cujas mães receberam dieta hipossódica	43
Tabela 20 - Massa cardíaca e renal (g /100g) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica	43
Tabela 21 - Volume celular (μm^3) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica	46
Tabela 22 - Número de adipócitos (adipócitos / μg) dos tecidos adiposos, retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica	47
Tabela 23 - Volume celular (μm^3) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta normossódica	48
Tabela 24 - Número de adipócitos (adipócitos / μg) dos tecidos adiposos, retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta normossódica	49
Tabela 25 - Volume celular (μm^3) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta Hipossódica	50

Tabela 26 - Número de adipócitos (adipócitos / μg) dos tecidos adiposos, retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta hipossódica 50

Tabela 27 - Volume celular (μm^3) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica 51

Tabela 28 - Número de adipócitos (adipócitos / μg) dos tecidos adiposos, retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica 51

Tabela 29- Índice de adiposidade (%) das proles cujas mães receberam dieta normossódica, hipossódica e hipersódica 53

Tabela 30 - Atividade da renina plasmática (ARP) ($\text{ng. mL}^{-1}.\text{hr}^{-1}$) e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) no soro ($\text{nmol His-Leu/min/ml}$), coração ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) e rim ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica 56

Tabela 31 - Atividade da renina plasmática (ARP) ($\text{ng. mL}^{-1}.\text{hr}^{-1}$) e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) no soro ($\text{nmol His-Leu/min/ml}$), coração ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) e rim ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) de proles cujas mães receberam dieta normossódica 57

Tabela 32 - Atividade da renina plasmática (ARP) ($\text{ng. mL}^{-1}.\text{hr}^{-1}$) e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) no soro ($\text{nmol His-Leu/min/ml}$), coração ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) e rim ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) de proles cujas mães receberam dieta hipossódica 58

Tabela 33 - Atividade da renina plasmática (ARP) ($\text{ng. mL}^{-1}.\text{hr}^{-1}$) e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) no soro ($\text{nmol His-Leu/min/ml}$), coração ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) e rim ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica 58

Tabela 34 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT_1 e AT_2 no rim de proles cujas mães receberam dieta, hipo, normo ou hipersódica 68

Tabela 35 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no rim de proles cujas mães receberam dieta normossódica 69

Tabela 36 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no rim de proles cujas mães receberam dieta hipossódica 70

Tabela 37 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no rim de proles cujas mães receberam dieta hipersódica 70

Tabela 38 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no coração de proles cujas mães receberam dieta, hipo, normo ou hipersódica 71

Tabela 39 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no coração de proles cujas mães receberam dieta normossódica 72

Tabela 40 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no coração de proles cujas mães receberam dieta hipossódica 73

Tabela 41 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no coração de proles cujas mães receberam dieta hipersódica 73

Tabela 42 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no

tecido adiposo marrom de proles cujas mães receberam dieta, hipo, normo ou hipersódica 74

Tabela 43 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo marrom de proles cujas mães receberam dieta normossódica 75

Tabela 44 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo marrom de proles cujas mães receberam dieta hipossódica 76

Tabela 45 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo branco retroperitoneal de proles cujas mães receberam dieta, hipo, normo ou hipersódica 77

Tabela 46 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo branco inguinal de proles cujas mães receberam dieta, hipo, normo ou hipersódica 78

RESUMO

Lopes KL. Avaliação do sistema renina-angiotensina tecidual e circulante em prole de ratas que receberam sobrecarga ou restrição de sal na dieta durante a gestação e amamentação [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 88 p.

Muitos estudos epidemiológicos existentes na literatura revelaram que insultos que ocorrem durante a vida intra-uterina estão associados com diversas anormalidades, tanto funcionais quanto estruturais na vida adulta. Estes estudos revelaram uma associação entre baixo peso fetal e subsequente diabetes tipo 2, hipertensão e obesidade[1]. Mães que tiveram uma dieta restrita em nutrientes durante a gestação geraram proles com baixo peso ao nascimento e obesidade na vida adulta. Há ainda um aumento na expressão de genes que estão relacionados ao metabolismo lipídico, além disso há menor expressão gênica da aminopetidase leucil específica, uma enzima que inativa a AII. AII é capaz de regular e estimular diversos fatores que podem modificar o metabolismo do tecido adiposo marrom e do tecido adiposo branco, como as prostaglandinas, enzimas lipogênicas (GPDH e a FAS), 3'-5' monofosfato de adenosina cíclico, catecolaminas, proteína desacopladora mitocondrial (UCP1), prolactina.

É conhecido que na vigência de restrição de sal há ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) circulante. Desta forma, dieta hipossódica durante a gestação pode alterar o desenvolvimento fetal através de um efeito da angiotensina II. O objetivo do presente estudo foi avaliar a função do sistema renina-angiotensina circulante e no tecido adiposo, renal e cardíaco em prole adulta cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta. Para tanto, ratas Wistar foram alimentadas a partir do segundo mês de vida com dieta hipo, normo ou hipersódica. Subgrupos de ratas em cada uma das dietas foram tratados com bloqueadores do SRA ou com angiotensina II. A prole teve seu peso acompanhado desde o nascimento até a 12^a semana de idade, quando foi sacrificada por decapitação para coleta de sangue e retirada dos tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal, marrom, rins e coração que foram armazenados para determinação das atividades de renina plasmática, ECA sérica, ECA renal, ECA cardíaca e Western blot dos componentes do SRA. Restrição de sal no período perinatal induz baixo peso ao nascimento. Maior índice de adiposidade, maior expressão protéica da enzima conversora da angiotensina I na gordura inguinal e menor expressão protéica do receptor AT2 na gordura marrom foram verificados na prole de fêmeas adultas de mães submetidas à restrição de sal durante a gestação e amamentação. A atividade de renina plasmática foi maior na prole de machos adultos cujas mães foram alimentadas com dieta hipossódica durante o período perinatal. Sobrecarga de sal na dieta durante o período perinatal também induziu baixo peso ao nascimento, somente na prole de fêmeas que na idade adulta tem maior massa de tecido adiposo inguinal. Concluindo, sobrecarga e restrição de sal durante o período perinatal induzem alterações no tecido adiposo e no sistema renina - angiotensina na prole adulta de fêmeas, mas não de machos.

Descritores: Dieta hipossódica, prenhez, cloreto de sódio, tecido adiposo, sistema renina angiotensina, ratos Wistar.

SUMARY

Lopes KL. Evaluation of the tissue and circulating renin-angiotensin system in offspring of dams that received salt overload or restriction during pregnancy and lactation [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 88p

Epidemiologic studies reported that insults during the intrauterine life have been associated with many abnormalities such as low birth weight, type 2 diabetes, hypertension and obesity in adulthood.[1] Low birth weight and obesity in adulthood were observed in offspring of undernourished dams. In addition, a high expression of genes related with lipid metabolism, and a low expression of the leucyl-specific aminopeptidase gene, an enzyme that inactivates angiotensin II (AII) was also observed in offspring of undernourished dams. AII is capable to regulate and stimulate many factors that can change the brown (BAT) and white adipose tissue (WAT) metabolism, like a prostaglandin, lipogenic enzymes (GPDH and FAS), cAMP, catecholamines, mitochondrial uncoupling protein one (UCP1) and prolactin (PRL). It is well established that low sodium diet stimulates the RAS. Therefore, low sodium diet during pregnancy may alter fetus development due to an effect of AII. The objective of this study was to evaluate the function of the circulating and adipose tissue, kidney and heart RAS in the adult offspring of dams that received different contents of salt during the pregnancy and lactation. Wistar rats were fed a low (LSD), normal (NSD) or high (HSD) salt diet since 8 weeks of age. Subgroups that received RAS blockers or AII were also studied. BW was measured since birth until adulthood. At 12 weeks of age, the mesenteric (MES), gonadal (GON), and retroperitoneal (RET) white adipose tissue (WAT), brown adipose tissue, heart and kidney were excised and stored. Low birth weight was observed in offspring of dams on salt restriction during pregnancy and lactation. Higher adiposity index, higher protein expression of the angiotensin I converting enzyme in inguinal fat tissue, and lower protein expression of the AT2 receptor in brown adipose tissue were observed in adult female offspring of salt restricted dams during the perinatal period. Plasma renin activity was higher in adult male offspring of salt restricted dams. Dietary salt overload during the perinatal period also induced lower birth weight but only in female offspring in which higher inguinal adipose tissue mass was observed in adulthood. In conclusion, changes in adipose tissue and renin-angiotensin system occur in female but not in male adult offspring in response to salt overload and restriction during pregnancy and lactation.

Key words: Sodium-restricted diet, animal pregnancy, dietary sodium chloride, adipose tissue, renin angiotensin system, Wistar rats.

1. INTRODUÇÃO

Muitos estudos epidemiológicos existentes na literatura revelaram que insultos que ocorrem durante a vida intra-uterina estão associados com diversas anormalidades, tanto funcionais quanto estruturais na vida adulta. Estes estudos revelaram uma associação entre baixo peso fetal e subsequente diabetes tipo 2, hipertensão e obesidade [1].

Um dos primeiros estudos publicados nesta linha foi o de Barker et al. Estes autores analisaram registros de homens nascidos em Hartfordshire (UK), no período de 1911 a 1930 e verificaram uma associação entre o baixo peso ao nascimento e alto risco de morte por doenças cardiovasculares [2]. Mais tarde, em 1992, estes mesmos autores hipotetizaram um mecanismo chamado “thrifty phenotype”. Eles postularam que o desenvolvimento fetal é sensível ao ambiente nutricional, ou seja, quando o ambiente é pobre em nutrientes, ocorre uma resposta adaptativa que se inicia para otimizar o crescimento de órgãos vitais (cérebro, por exemplo), aumentando as chances de sobrevivência do feto [3].

Ozanne et al. avaliaram os efeitos na prole de mães que receberam uma nutrição pobre durante a gestação e observaram baixo peso ao nascimento e desenvolvimento de obesidade [4].

Guan et al., observaram um aumento da expressão de genes que estão relacionados ao metabolismo lipídico em proles cujas mães foram submetidas à restrição protéica durante a gestação [1]. Entre estes genes estão os ácidos graxos sintase (FAS), glicerol 3 fosfatase desidrogenase (G3PDH) e da acetil coenzima A. Outro achado observado por estes pesquisadores foi o aumento da expressão gênica

da enzima quinase 1, que está envolvida na conversão da angiotensina I (AI) para angiotensina II (AII) e também a diminuição da expressão gênica da aminopetidase leucil específica, uma enzima que inativa a AII [1].

A AII é o principal peptídeo do sistema renina-angiotensina (SRA) e possui diversos efeitos incluindo a regulação da pressão arterial, homeostase hídrica e eletrolítica, além da regulação do crescimento celular [5]. Além das funções citadas, a AII é capaz de regular e estimular diversos fatores que podem modificar o metabolismo do tecido adiposo marrom (TAM) e do tecido adiposo branco (TAB), como as prostaglandinas, enzimas lipogênicas (G3PDH e a FAS), 3'-5' monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), catecolaminas, proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP₁), prolactina (PRL), entre outros.

A ação provocada pela angiotensina II depende do tipo de receptor ao qual ela vai se ligar. Existem quatro subtipos de receptores de AII descritos, AT₁, AT₂, AT₃ e AT₄ [6], sendo que esta liga-se preferencialmente ao AT₁ e AT₂. [7]. O receptor AT₁ é expresso em adipócitos e o receptor AT₂ é expresso em pré-adipócitos. [8].

A AII também é responsável por uma redução do fluxo sanguíneo no tecido adiposo, sendo este efeito ativado via receptor AT₁ localizado na parede vascular. Quando este fluxo é reduzido pode haver acúmulo de ácidos graxos livres (FFA) e diminuição do pH intracelular, devido ao aumento da concentração de lactato que é responsável por inibição da lipólise. Com a inibição da lipólise e o acúmulo de FFA pode ocorrer um aumento do estoque de gorduras nos adipócitos [8].

O peptídeo AII estimula a geração de prostaglandina I₂ (PGI₂), um metabólito do ácido aracdônico em ratos e humanos, considerado um potente e específico estimulador autócrino da diferenciação adipogênica, cujo receptor está expresso

exclusivamente em pré-adipócitos [16]. A AII induz diferenciação dos pré-adipócitos por meio da geração de prostaciclina (PGI_2) dependente do estímulo do receptor AT_2 [7, 9]. Este receptor está presente nos pré-adipócitos da linhagem *ob 1771*. Foi observado que a prostaciclina, *in vitro*, pode promover a formação de novas células de pré-adipócitos *ob 1771* [10].

O cAMP é outro fator que interfere na formação e na diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos via AII, além disso, possui efeitos adipogênicos e ativa a proteína kinase A [11]. Foi observado também, que o cAMP aumenta a expressão e secreção de angiotensinogênio (AGT) nos adipócitos. Além da AII, outro fator que estimula o aumento do cAMP são as catecolaminas por meio da adenilciclase, via receptores β adrenérgicos.

Serazin et al. demonstraram que administração de isoprotelenol, um agonista β adrenérgico, aumenta a expressão e a secreção de AGT nos adipócitos, sugerindo que o sistema nervoso simpático (SNS) tem um papel importante na função regulatória e na ativação dos componentes do SRA local [11].

É conhecido que na vigência de restrição de sal há estímulo do SRA. Utilizando-se a dieta hipossódica durante a gestação pode-se supor a existência de um efeito da AII materna sobre o feto.

Em nosso laboratório, Silva et al. demonstraram que sobrecarga de sal na dieta materna produz aumento da pressão arterial na prole na idade adulta [12]. Neste estudo foram utilizados ratos Wistar fêmeas que receberam dieta hipersódica (HR- 8% NaCl), hipossódica (HO- 0, 15% NaCl) ou normossódica (NR -1, 3 % NaCl) desde a 3ª semana de vida até o desmame da sua prole. Foi verificado que o sal não influenciou o peso e o tamanho da prole ao nascimento. No entanto, a prole adulta de

mães submetidas à sobrecarga de sal na dieta apresentou menor peso corpóreo e maior pressão arterial quando comparada às proles de mães que receberam dieta normossódica e hipossódica.

Outro achado de Silva et al. foi o aumento do conteúdo de angiotensina II nos glomérulos da prole adulta de mães submetidas a sobrecarga de sal na dieta e uma ausência de modulação da atividade de renina plasmática em resposta à variação no consumo de sal na dieta [12].

Visto inúmeros eventos iniciados pela angiotensina II, pode-se supor que os diferentes conteúdos de sal na dieta e os tratamentos com inibidores do SRA como losartan e captopril e a própria AII, administrados nas mães, podem influenciar o sistema renina angiotensina e desenvolvimento da massa de tecido adiposo prole.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente projeto de estudo foi avaliar o papel do sistema renina angiotensina nas alterações de massa do tecido adiposo, rim e coração da prole cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta.

3. MÉTODOS

O estudo foi previamente analisado e aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 Animais

Ratas Wistar com 3 semanas de idade (recém desmamados), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram alimentados com dieta normossódica (Nuvilab CR1-Colombo, PR-Brasil) até completarem 8 semanas de idade. Com essa idade, as ratas foram divididas em três grupos de acordo com a dieta (Rhoister, Brasil) que passaram a receber até o período de desmame da sua prole:

Dieta hipossódica (HO): 0,15% de NaCl + 25% de proteínas

Dieta normossódica (NR): 1,3% de NaCl + 25% de proteínas

Dieta hipersódica (HR): 8% de NaCl + 25% de proteínas

As ratas foram acondicionadas em gaiolas de plástico (4 a 5 animais por gaiola) em ambiente mantido a 25° C, com ciclos claro-escuro fixos (12/12 horas) e dieta e água *ad libitum*.

Cada grupo de dieta foi dividido em subgrupos:

- Hipersódica controle (HR)
- Hipersódica + angiotensina II (HR AII): que recebeu uma suplementação de angiotensina II (AII), por meio de mini-bombas osmóticas.
- Normossódica controle (NR)

- Normossódica + captopril (NR CAP): que recebeu o bloqueador da enzima de conversão da angiotensina I (ECA) na água de beber.
- Normossódica + Losartan (NR LOS): que recebeu o bloqueador de receptores AT₁ da angiotensina II na água de beber.
- Normossódica + AII (NR AII) que recebeu uma suplementação de AII, por meio de mini-bombas osmóticas.
- Hipossódica controle (HO)
- Hipossódica + Captopril (HO CAP): que recebeu o bloqueador da ECA na água de beber.

3.1.1 Protocolo experimental

Ao completarem 8 semanas de idade as ratas passaram a receber uma das dietas com os diferentes conteúdos de sal. Quando completaram 12 semanas de idade foram acasaladas com ratos Wistar machos que receberam dieta normossódica desde o desmame.

Para o acasalamento, 4 fêmeas e um macho permaneceram por 3 dias em gaiolas de plástico. Após o nascimento, apenas 8 recém nascidos (4 machos e 4 fêmeas) permaneceram com suas mães.

As dietas com diferentes conteúdos de sal foram oferecidas para as mães até o desmame da prole. As mães foram pesadas semanalmente desde o seu desmame até o desmame da prole.

A prole teve seu peso acompanhado desde o nascimento até a 12^a semana de idade. No final do experimento, a prole foi sacrificada por decapitação para coleta

de sangue e retirada dos tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular, que foram armazenados para futuras determinações.

Protocolo experimental (grupo materno)

Protocolo experimental (prole)

3.1.2 Bloqueio da enzima de conversão da angiotensina I com Captopril e do receptor AT₁ da angiotensina II com Losartan

O Losartan foi ministrado na dose de 200mg/L e o Captopril na dose de 100mg/L diluídos na água de beber.

O tratamento dos animais com estas drogas se iniciou um dia antes do acasalamento.

3.1.3 Suplementação de angiotensina II via mini-bomba osmótica

Ratas alimentadas com dieta hipersódica ou normossódica receberam uma infusão de angiotensina II ($150 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) [13] ou de veículo (salina), por meio de mini-bombas osmóticas implantadas no tecido subcutâneo na região dorsal.

As mini-bombas foram implantadas nas ratas um dia antes do acasalamento.

3.1.4 Nascimento e desmame da prole

No dia do nascimento, o tamanho da prole, o peso dos recém-nascidos e o número de natimortos foram avaliados. Apenas 8 recém-nascidos (4 machos e 4 fêmeas) permaneceram com suas mães e foram acompanhados durante o estudo.

Depois do desmame, a prole de todos os grupos experimentais recebeu dieta normossódica até os animais completarem 12 semanas de idade, quando foram sacrificados para coletas dos tecidos.

3.2 Medida da massa do tecido adiposo

Os animais foram sacrificados em cuba de vidro contendo éter. Em seguida, os tecidos adiposos foram dissecados, colocados em placas de Petri secas e pesados em balança analítica.

3.2.1 Índice de adiposidade

O índice de adiposidade foi calculado com a seguinte fórmula: Índice % = (soma da massa dos tecidos adiposos / massa corpórea) X 100.

Os tecidos adiposos brancos utilizados no cálculo foram o retroperitoneal, mesentérico, gonadal e inguinal.

3.3 Isolamento do tecido adiposo e determinação da quantidade e do o volume dos adipócitos

Imediatamente após o sacrifício dos animais, os tecidos adiposos retroperitoneal, mesentérico gonadal, inguinal e marrom interescapular (TAM) foram

dissecados e pesados. Apenas os tecidos adiposos retroperitoneal e TAM tiveram os adipócitos isolados para determinação da quantidade e do volume. Para tal procedimento usamos o método descrito por Di Girolamo et al. [14] e por Lima et al. [15].

3.4 Determinação da pressão intra-arterial

Para avaliação da PA carotídea, os animais com 12 semanas de idade foram submetidos à cirurgia para a implantação de um cateter de polietileno (PE 50) na artéria carótida. Para tanto, os animais foram anestesiados com 0,2 mL/100 g de peso corpóreo da mistura Rompum (20 mg/mL- 4 mL) + Ketamina (50 mg/mL – 10 mL), posicionados em decúbito dorsal numa mesa cirúrgica aquecida e submetidos à tricotomia na região cervical anterior. Foi feita uma incisão longitudinal na altura da traquéia, sendo a carótida esquerda isolada dos músculos e tecidos adjacentes para implantação do cateter. Este foi preenchido com uma solução de heparina 500 U.I./mL e exteriorizado na região interescapular.

Após 3 dias de recuperação pós-cirúrgica, o cateter foi conectado a um transdutor (Argon, Athens, TX, USA) ligado a um amplificador (Stemtech, INC, GPA-4 modelo 2, Wiscousin, USA) que por sua vez estava ligado ao computador. O animal permanecia um certo tempo em sua gaiola para acomodação e ambientação, somente quando se mostrava quieto e tranqüilo o registro da PA era feito durante 5-10 minutos. No caso de movimentação do animal, o registro era interrompido e recomeçado somente quando condições ideais eram novamente atingidas. O valor médio da PA após o registro foi calculado utilizando-se um programa específico para

este tipo de análise (CODAS – Data Q instruments, Akron, Ohio, USA). A frequência cardíaca foi obtida da mesma maneira que a PA.

3.5 Determinação da atividade da renina plasmática

Amostras de 1,0 mL de sangue foram coletadas por decapitação em tubos plásticos preenchidos com 16µL de EDTA 3,8%, que foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 3.000 rpm, foi armazenado a – 20°C. O plasma obtido foi utilizado para dosagem da atividade de renina plasmática através de “kit” de radioimunoensaio (CIS Bio International, França).

3.6 Dosagem da atividade da ECA

Os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue foi coletado em tubos de ensaio sem anticoagulante, mantidos em gelo e rapidamente centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm a 4°C. O soro foi armazenado a -80°C até as amostras serem processadas.

O tecido renal foi coletado e homogeneizado em tampão borato com sacarose na proporção de 1 g de tecido para 10 mL de tampão. Após as amostras terem sido homogeneizadas, foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 min, a 4°C e os sobrenadantes separados e armazenados a -80°C até o seu processamento.

A atividade da enzima foi determinada em 10µL de soro ou 20µL do sobrenadante dos homogenatos de tecidos que foram incubados com 490µL ou 480µL, respectivamente, do substrato da ECA, Hippuril Histidil-Leucina (Hip His-

Leu 5 mM), a 37°C durante 15 ou 30 minutos. Essa reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de solução de NaOH (0,34 N). A seguir, acrescentou-se 100 µL da solução de *o*-ftaldialdeído (2%), protegido da luz e em temperatura ambiente. Esta substância liga-se ao produto da reação, His-Leu, e permite a sua leitura fluorimetricamente. Após 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 200 µL de HCl (3 N), sempre sob agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi então submetido à leitura da intensidade de fluorescência em espectrofluorímetro (Shimadzu, RF-1501, Kyoto, JP), usando um comprimento de onda de 365nm para excitação e de 495nm para emissão.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, sendo que a fluorescência intrínseca das amostras foi corrigida através de controles onde o material enzimático foi adicionado logo após a reação ser paralisada com NaOH 0,34 M, mantendo as demais etapas do ensaio inalteradas.

Para cada ensaio foi determinado uma curva padrão, relacionando-se a intensidade da fluorescência com quantidades conhecidas do produto formado (His-Leu). A atividade específica da ECA foi expressa em nMoles His-Leu/min/ml no soro e nMoles His-Leu/min/mg de proteína nos tecidos.

A dosagem da proteína foi realizada nas amostras de tecidos onde foi medida a atividade da ECA, pelo método micrométrico de Bradford [16].

3.7 Western blotting

Amostras de tecidos foram pesadas e depois homogeneizadas em tampão de extração protéica (100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10%

glicerol, 1 mM DTT, 10% SDS, 0,1 ml inibidor de proteinase (SIGMA). A concentração de proteínas foi determinada usando o método de Bradford [16]. Quantidades iguais de proteína para todas as amostras (100µg) foram misturadas a um tampão para SDS e colocadas nos *slots* do gel SDS – PAGE (sódio dodecilsulfato poliacrilamida) 12% e submetidas à eletroforese. Após este processo, as amostras contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose.

As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% misturados a TBST por 30 minutos. Anticorpos primários policlonais foram adicionados na solução, seguido das devidas encubações. A seguir os *blots* foram lavados e incubados com anticorpos secundários ligados a peroxidase (HRP). O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado com o substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences, UK).

A seguir os *blots* foram expostos aos filmes de raios-X (Agfa, Argentina) ou (Amersham Biosciences, UK Ltd). As quantificações das bandas foram feitas através do programa Scion image for Windows (Scion Corporation, USA).

3.7.1 Anticorpos para western blot

Foram utilizados:

Primários

Angiotensinogênio - RDI - (código - rtangenabm) - diluição - 1:500 - 1 hora de incubação.

Enzima conversora de angiotensina I (ECA) - Santa Cruz Biotechnology - código (H-170) sc - 20791, Diluição 1:250. - 1 hora de incubação.

Receptor AT₁ - Santa Cruz Biotechnology código - (N-10)- sc - 1173 - diluição - 1:200 incubação 'overnight'.

Receptor AT₂ - Santa Cruz Biotechnology código - sc - 7420 diluição - 1:200- 1 hora de incubação.

Renina - RDI - código (rtreninbm), diluição 1:200 - 1 hora de incubação.

Secundários

Anti - camundongo – Dakopatts – código P-0260 –diluição - 1:5000 - 1 hora de incubação.

Anti - coelho – Amersham - código NA934V- diluição - 1:5000 - 1 hora de incubação.

Anti - cabra - Sigma – código A5420-diluição – 1:20000 - 1 hora de incubação.

3.8 Análise estatística

Foi utilizada análise de variância de um ou dois fatores (One-way ou two-way ANOVA), quando pertinente, seguido do teste ad - hoc de Tukey.

O nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Mães

Pressão arterial

Após a amamentação, as mães foram submetidas à implantação de cateteres na carótida para medida da pressão arterial. A pressão arterial média (PAM) e a pressão arterial sistólica (PAS) foram maiores nas mães que receberam dieta hipersódica (tabela 1), já a pressão arterial diastólica não foi diferente entre os grupos experimentais. Não foram observadas diferenças na pressão média, pressão sistólica e pressão diastólica em nenhum grupo de mães que foram submetidas a diversas drogas, captopril, losartan e angiotensina II. (tabelas 2 a 4).

Tabela 1 - Pressão arterial (mmHg), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de mães que receberam dieta hipo, normo e hipersódica.

	HO CON	NR CON	HR CON
PAS	121±8,7 (5)	128±2,8 (4)	145±9,5 (6)*
PAD	100±6,7 (5)	108±4,2 (4)	123±4,1 (6)
PAM	117±7,5 (5)	119±2,4 (5)	137±4,9 (8)*

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Pressão arterial de mães com 16 semanas de idade (após desmame da prole), que receberam durante a gestação e amamentação, dieta normossódica (NR CON), hipossódica (HO CON) ou hipersódica (HR CON) *p < 0,05 comparado com NR.

Tabela 2- Pressão arterial (mmHg), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de mães receberam dieta normossódica.

	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
PAS	128±2,8 (4)	129±7,8 (4)	116±20,2 (3)	
PAD	108±4,2 (4)	94±5,9 (4)	86±22,1 (3)	
PAM	119±2,4 (5)	111±6,6 (4)	104±16 (4)	123±9,1 (3)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Pressão arterial de mães com 16 semanas de idade (após desmame da prole), que receberam durante a gestação e amamentação apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII).

Tabela 3- Pressão arterial (mmHg), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de mães receberam dieta hipossódica.

	HO CON	HO CAP
PAS	121±8,7 (5)	132±2,7 (3)
PAD	100±6,7 (5)	102±9,8 (3)
PAM	117±7,5 (5)	113±6,4 (4)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Pressão arterial de mães com 16 semanas de idade (após desmame da prole), que receberam durante a gestação e amamentação, apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP).

Tabela 4- Pressão arterial (mmHg), sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) de mães receberam dieta hipersódica.

	HR CON	HR AII
PAS	145±9,5 (6)	139±8,8 (3)
PAD	123±4,1 (6)	122±9,0 (3)
PAM	137±4,9 (8)	128±7,4 (4)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Pressão arterial de mães com 16 semanas de idade (após desmame da prole), que receberam durante a gestação e amamentação, apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII).

Peso corpóreo

Não houve efeito do conteúdo de sal na dieta sobre o peso corpóreo durante a gestação, exceto na semana seguinte ao parto, quando foi observado menor peso corpóreo nas mães que receberam dieta hipersódica em relação às mães que receberam dieta normossódica ($p<0,001$) e hipossódica ($p<0,05$) (figura 1).

O peso corpóreo não sofreu influência dos bloqueadores do SRA, nem da angiotensina II nos diferentes grupos de dietas (figura 2).

Figura. 1 -Peso corpóreo de mães que receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON) durante a gestação e amamentação.

Dieta normossódica **Dieta hipossódica** **Dieta hipersódica**

Figura. 2 - Peso corpóreo de mães que receberam dieta normossódica (NR CON), hipossódica (HO CON) ou hipersódica (HR CON), captopril (NR CAP), (HO CAP) – 100 mg /L na água de beber, losartan (NR LOS), (HO LOS) - 200 mg /L na água de beber, ou angiotensina II (NR AII), (HR AII) 150ng.kg-1.min-1.

Atividade da enzima conversora de AI (ECA)

Soro

A atividade da ECA no soro foi menor ($p<0,05$) em mães que receberam dieta hipersódica em relação a mães que receberam dieta hipossódica (figura 3), não havendo diferença em relação às mães que receberam dieta normossódica.

Mães que receberam dieta normossódica e hipossódica associada ao captopril apresentaram maior atividade da ECA no soro ($p<0,05$) em relação ao grupo no qual as mães receberam apenas a dieta NR ou HO (figuras 4 e 5). O grupo que recebeu dieta hipersódica com suplementação de AII também apresentou maior atividade de ECA no soro ($p<0,05$) em relação às mães que receberam apenas a dieta (figura 6).

Figura. 3- Dosagem da atividade da enzima de conversora de AI no soro, após a amamentação, em mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON).

Figura. 4 - Dosagem da atividade da enzima conversora de AI no soro de mães, após a amamentação, que receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100 mg /L (NR CAP) ou normossódica e losartan 200 mg /L (NR LOS).

Figura 5 - Dosagem da atividade da enzima conversora de AI no soro de mães, após a amamentação, que receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e captopril 100 mg /L (HO CAP).

Figura 6 - Dosagem da atividade da enzima conversora de AI no soro de mães, após a amamentação, que receberam apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII).

Prole

Peso ao nascimento

O peso ao nascimento das proles machos e fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica foi menor ($p<0,001$) em relação às proles cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 5). O peso ao nascimento da prole feminina cujas mães receberam dieta hipersódica também foi menor ($p<0,05$) em relação à prole cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 5).

O peso ao nascimento da prole masculina de mães alimentadas com dieta normossódica e que receberam losartan ou angiotensina II foi menor ($p<0,001$) do que a prole masculina de mães que receberam somente a dieta (tabela 6). A prole feminina apresentou a mesma diferença no peso ao nascimento encontrado na prole masculina quando comparado ao grupo NR CON (tabela 6).

Menor peso ao nascimento foi encontrado nas proles de machos e fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica associado ao losartan ou captopril em relação ao grupo controle (tabela 7) Não foram verificadas diferenças no peso ao nascimento nas proles cujas mães receberam dieta hipersódica (tabela 8).

Glicemia neonatal

Não foram verificadas diferenças entre as glicemias neonatais das proles avaliadas neste estudo.(tabelas 5 a 8).

Peso corpóreo com 12 semanas

Não houve diferença no peso corpóreo entre as proles de mães que receberam dietas hipo, normo ou hipersódica (tabela 5). O peso das proles de machos cujas mães receberam dieta normossódica associada a angiotensina II foi menor ($p<0,05$), em relação às proles que receberam apenas a dieta (tabela 6). As proles de fêmeas de mães que receberam dieta normossódica e angiotensinaII não apresentaram diferença no peso corpóreo na idade adulta em relação às proles cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 6).

Prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica e captopril apresentaram menor ($p<0,05$) peso do que as proles que receberam apenas a dieta (tabela 7). O mesmo não foi observado nos machos das mesmas proles (tabela 7).

A prole masculina de mães que receberam dieta HR associada a AII apresentou menor ($p<0,05$) peso do que o grupo controle (tabela 8). Na prole feminina destas mesmas mães não houve qualquer alteração na mesma variável.

Tabela. 5- Peso ao nascimento (g) (PN), glicemia neonatal (mg/dl) (GN) e peso com 12 semanas de idade (g) (P12) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica.

	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
PN	5,8±0,13 (45)* [#]	6,3±0,10 (46) [#]	5,9±0,08 (62)* [#]	5,6±0,13 (39)*	6,6±0,08 (59)	6,3±0,08 (73)
GN	74,2±4,5 (5)	66,0±2,6 (4)	78,3±4,8 (3)	71,5±3,6 (6)	62,1±3,7 (8)	79,1±10,8 (8)
P12	231±3,3 (16)? [#]	223±2,4 (12) [#]	217±4,6 (19) [#]	358±5,3 (16)	376±10 (16)	366±12 (16)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. * $p < 0,05$ comparado com NR, ? $p < 0,05$ vs. HR e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela. 6- Peso ao nascimento (g)(PN), glicemia neonatal (mg/dl)(GN) e peso com 12 semanas de idade (g) (P12) de proles cujas mães receberam dieta normossódica.

	Fêmeas				Machos			
	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
PN	6,3±0,10 (46) [#]	5,8±0,08 (36)* [#]	5,9±0,10 (54)* [#]	5,7±0,07 (38)* [#]	6,6±0,08 (59)	6,1±0,06 (46)*	6,4±0,10 (60)*	6,0±0,08 (43)*
GN	66,0±2,6 (4)	72,8±1,8 (4)	72,8±1,6 (3)	61,5±4,4 (8)	62,1±3,7 (8)	71,5±2,5 (2)	72,3±0,3 (2)	65,8±7,3 (9)
P12	223±2,4 (12) [#]	233±6,0 (11) [#]	231±3,9 (18) [#]	211,7±4,4 (7) [#]	376±10 (16)	345±3,9 (12)	348±12 (17)	326±12 (7)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Peso ao nascimento, glicemia neonatal e peso com 12 semanas de idade das proles cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII) *p < 0,05 comparado com NR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela. 7- Peso ao nascimento (g)(PN), glicemia neonatal (mg/dl)(GN) e peso com 12 semanas de idade (g) (P12) de proles cujas mães receberam dieta hipossódica.

	Fêmeas			Machos		
	HO CON	HO CAP	HO LOS	HO CON	HO CAP	HO LOS
PN	5,8±0,13 (45) [#]	4,9±0,1 (56)* [#]	3,9±0,1 (16)* [#]	5,6±0,13 (39)	5,1±0,1 (57)*	4,4±0,1 (12)*
GN	74,2±4,5 (5)	63,8±6,1 (9)		71,5±3,6 (6)	67,3±2,9 (6)	
P12	231±3,3 (16) [#]	216±6,2 (11)* [#]		358±5,3 (16)	352±17 (9)	

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Peso ao nascimento, glicemia neonatal e peso com 12 semanas de idade das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON), hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP) ou hipossódica e losartan 200mg/ml (HO LOS) *p < 0,05 comparado com HO CON e # p<0,05 comparado com machos.

Tabela. 8- Peso ao nascimento (g)(PN), glicemia neonatal (mg/dl)(GN) e peso com 12 semanas de idade (g) (P12) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica.

	Fêmeas		Machos	
	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
PN	5,9±0,08 (62) [#]	6,0±0,1 (36) [#]	6,3±0,08 (73)	6,5±0,16 (36)
GN	78,3±4,8 (3)	70,4±4,2 (5)	79,1±10,8 (8)	69,3±4,2 (6)
P12	217±4,6 (19) [#]	227±9,7 (11) [#]	366±12 (16)	326±10,2 (16)*

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Peso ao nascimento, glicemia neonatal e peso com 12 semanas de idade das proles cujas mães receberam apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII) *p < 0,05 comparado com HR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Pressão arterial média

Não foram verificadas diferenças na pressão arterial média dos grupos experimentais avaliados (tabela 9 a 12).

Tabela. 9- Pressão arterial (mmHg) sistólica(PAS), diastólica (PAD) e média(PAM), de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica.

	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
PAS	133±4,5 (9)	124±7,9 (7)	120±2,3 (3)	147±9,5 (9)	133±6,8 (10)	127±7,3 (11)
PAD	108±3,4 (9)#	100±8,6 (7)	100±6,3 (3)	123±6,4 (8)	109±6,8 (10)	105±7,3 (11)
PAM	124,5±4,8 (10)	113±6,9 (8)	114±5,1 (5)	128±8,3 (11)	122±6,7 (10)	120±6,6 (13)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. # p<0,05 comparado com machos.

Tabela. 10- Pressão arterial (mmHg) sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), de proles cujas mães receberam dieta normossódica.

	Fêmeas				Machos			
	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
PAS	124±7,9 (7)	142,2±11 (5)	138±8,7 (6)	120±6,8 (7)#	133±6,8 (10)	128±7,5 (6)	133±9,0 (5)	105±4,9 (8)*
PAD	100±8,6 (7)	114±9,1 (5)	105±7,4 (6)	96±5,9 (7)	109±6,8 (10)	91±6,6 (6)	107±4,7 (5)	106±5,4 (9)
PAM	113±6,9 (8)	129±9,3 (5)	121±7,8 (6)	109±7,1 (7)	122±6,7 (10)	109±6,3 (6)	120±14 (5)	117±5,5 (9)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Pressão arterial de proles com 13 semanas de idade cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII) * p < 0,05 comparado com NR CON e # p < 0,05 comparado com machos.

Tabela. 11- Pressão arterial (mmHg) sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), de proles cujas mães receberam dieta hipossódica.

	Fêmeas		Machos	
	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
PAS	133±4,5 (9)	136±8,2 (4)	147±9,5 (9)	142±12 (6)
PAD	108±3,4 (9)#	109±3,5 (4)	123±6,4 (8)	135±8,2 (6)
PAM	124,5±4,8 (10)	123±4,1 (5)	128±8,3 (11)	126±12 (7)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Pressão arterial de proles com 13 semanas de idade cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HOCON) ou hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP) #p<0,05 comparado com machos.

Tabela. 12- Pressão arterial (mmHg) sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM), de proles cujas mães receberam dieta hipersódica.

	Fêmeas		Machos	
	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
PAS	120±2,3 (3)	130±4,3 (7)	127±7,3 (11)	140±8,9 (6)
PAD	100±6,3 (3)	108±5,9 (7)	105±7,3 (11)	116±8,8 (6)
PAM	114±5,1 (5)	118±4,4 (10)	120±6,6 (13)	128±8,7 (6)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Pressão arterial de proles com 13 semanas de idade cujas mães receberam apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII).

Massa do tecido adiposo

A prole feminina cujas mães receberam dieta hipossódica apresentou maior massa de gordura retroperitoneal e tecido adiposo marrom (figura 7) (p< 0,05) em relação às proles cujas mães receberam dieta normossódica e hipersódica. Verificamos que a prole masculina cujas mães receberam dieta hipossódica

apresentou menor massa de tecido adiposo inguinal ($p < 0,05$) comparado com a prole cujas mães receberam dieta hipersódica (tabela 13)

As massas de tecido adiposo branco gonadal, retroperitoneal e mesentérico da prole feminina de mães alimentadas com dieta normossódica e que receberam losartan foram maiores ($p < 0,05$) do que a prole feminina de mães que receberam somente a dieta (tabela 14). Na prole feminina cujas mães receberam dieta normossódica e captopril foi observada menor massa de tecido adiposo inguinal ($p < 0,05$) em relação à prole cujas mães apenas receberam dieta normossódica. A prole feminina cujas mães receberam dieta normossódica e angiotensina II apresentou maior massa de tecido adiposo marrom ($p < 0,05$) em relação à prole feminina cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (figura 9).

Não foram verificadas diferenças na massa de tecido adiposo nas proles masculinas destes mesmos grupos experimentais (tabela 14 e figura 8).

A prole feminina cujas mães receberam dieta hipossódica e captopril apresentou menor massa de gordura retroperitoneal e tecido adiposo marrom ($p < 0,05$) (tabela 15 e figura 10) comparado com as proles femininas cujas mães receberam apenas a dieta hipossódica. Não foram verificadas diferenças na massa das gorduras gonadal, mesentérica e inguinal nas proles femininas de mães que receberam dieta hipossódica (tabela 15). No entanto, a prole masculina cujas mães foram alimentadas com dieta hipossódica e receberam captopril (HO CAP), apresentou maior massa de tecido adiposo inguinal ($p < 0,05$) em relação ao grupo cujas mães receberam apenas a dieta hipossódica (tabela 15).

A massa de tecido adiposo inguinal da prole feminina cujas mães receberam dieta hipersódica e AII foi menor ($p < 0,05$) em relação à prole cujas mães receberam

---

apenas a dieta, já a prole masculina apresentou maior ($p<0,05$) massa adiposa gonadal em relação à prole HR CON (tabela 16).

Tabela 13- Massa de tecido adiposo branco (g/100g) retroperitoneal (RET), gonadal (GON), mesentérico (MES) e inguinal (ING) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica.

	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
RET	1,6±0,1 (1) ^{#*}	1,0±0,1 (16)	1,1±0,1 (10)	1,11±0,1 (13)	0,91±0,1 (14)	0,98±0,1(14)
GON	2,95±0,4 (12) [#]	2,23±0,2 (16) [#]	1,97±0,2 (12) [#]	1,35±0,1 (14)	1,39±0,1 (14)	1,37±0,1(14)
MES	1,0±0,1 (11) [#]	0,85±0,1 (16)	0,9±0,1 (10)	0,73±0,1 (14)	0,84±0,1 (14)	0,78±0,1(14)
ING	1,64±0,17 (8) [#]	1,67±0,17 (6)	1,74±0,15 (6) ^{#*}	1,26±0,11 (7) [*]	1,46±0,17(6)	1,78±0,10(10)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. ^{*}p < 0,05 comparado com NR e [#]p<0,05 comparado com machos.

Tabela 14- Massa de tecido adiposo branco (g/100g) retroperitoneal (RET), gonadal (GON), mesentérico (MES), inguinal (ING) das proles cujas mães receberam dieta normossódica.

	Fêmeas				Machos			
	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
RET	0,95±0,06 (16)	0,75±0,06 (13)	1,14±0,06 (6) #*	1,03±0,14 (6)	0,91±0,08 (14)	0,76±0,09 (6)	0,76±0,09 (9)	0,85±0,06 (7)
GON	2,17±0,24 (12)#	1,81±0,13 (12)#	3,8±0,31 (6)#*	2,3±0,2 (6)#	1,40±0,09 (14)	1,40±0,07 (16)	1,16±0,13 (9)	1,31±0,08 (7)
MES	0,85±0,04 (16)	0,86±0,24 (12)	1,14±0,06 (6)#	0,78±0,06 (6)	0,84±0,09 (14)	0,73±0,07 (13)	0,67±0,07 (9)	0,73±0,06 (7)
ING	1,67±0,17 (6)	1,11±0,03 (5)#*	1,5±0,10 (6)	1,3±0,13 (6)	1,15±0,17 (6)	1,60±0,16 (6)	1,40±0,15 (9)	1,14±0,1 (7)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Massa corrigida por 100g de peso corpóreo das proles cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII). *p < 0,05 comparado com NR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela 15- Massa de tecido adiposo branco (g/100g) retroperitoneal (RET), gonadal (GON), mesentérico (MES) e inguinal (ING) das proles cujas mães receberam dieta hipossódica.

	Fêmeas		Machos	
	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
RET	1,6±0,1 (11) [#]	1,1±0,09 (10)*	1,1±0,1 (13)	0,9±0,18 (7)
GON	3,0±0,4 (12) [#]	2,6±0,45 (10) [#]	1,4±0,1 (14)	1,4±0,12 (7)
MES	1,0±0,1 (11) [#]	1,0±0,05 (10)	0,7±0,1 (14)	0,8±0,05 (7)
ING	1,6±0,17 (8) [#]	1,6±0,17 (8)	1,3±0,11 (7)	1,8±0,13 (6)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Massa corrigida por 100g de peso corpóreo das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP). * $p < 0,05$ comparado com HO CON e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela. 16- Massa de tecido adiposo branco (g/100g) retroperitoneal (RET), gonadal (GON), mesentérico (MES) e inguinal (ING) das proles cujas mães receberam dieta hipersódica.

	Fêmeas		Machos	
	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
RET	1,3±0,32 (6)	1,1±0,1 (10)	0,9±0,06 (9)	1,0±0,08 (14)
GON	2,7±0,2 (6) [#]	2,0±0,2 (12) [#]	1,4±0,05 (9)	1,4±0,1 (14)
MES	0,9±0,06 (6)	0,9±0,03 (10)	0,8±0,06 (9)	0,8±0,1 (14)
ING	1,5±0,08 (6)	1,7±0,15 (6) [#]	1,5±0,05 (8)	1,8±0,10 (10)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Massa corrigida por 100g de peso das proles cujas mães receberam apenas dieta hipersódica controle (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng. $\text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (HR AII). * $p < 0,05$ comparado com HR CON e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Figura. 7- Massa de tecido adiposo marrom interescapular da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON).

Figura. 8- Massa de tecido adiposo marrom interescapular da prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON).

Figura. 9 -Tecido adiposo marrom interescapular da prole de fêmeas cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100 mg /L (NR CAP), normossódica e losartan 200 mg /L (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII).

Figura. 10 -Tecido adiposo marrom interescapular da prole de machos cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100 mg /L (NR CAP), normossódica e losartan 200 mg /L (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII).

* $p < 0,05$ vs. HO CON

Figura. 11- Tecido adiposo marrom interescapular da prole de fêmeas cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e captopril 100mg/L (HO CAP).

Figura. 12- Tecido adiposo marrom interescapular da prole de machos cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e captopril 100mg /L (HO CAP).

Figura. 13 -Tecido adiposo marrom interescapular da prole de fêmeas cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HR CON) ou normossódica e angiotensina II $150 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (HR AII).

Figura. 14-Tecido adiposo marrom interescapular da prole de machos cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HR CON) ou normossódica e angiotensina II $150 \text{ ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (HR AII).

Massa Renal

Não foram observadas diferenças na massa dos rins entre as proles controles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 17). Na prole

masculina cujas mães receberam dieta normossódica e losartan, observou-se menor massa renal ($p<0,05$) em comparação à prole cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela. 18), fato que não foi observado na prole feminina (tabela 18).

As proles machos cujas mães receberam dieta hipossódica associada ao captopril, apresentaram maior massa renal ($p<0,05$) em relação à prole HO controle (tabela 19). As proles de fêmeas deste mesmo grupo não apresentaram diferença no peso dos rins (tabela 19). A massa renal da prole masculina cujas mães receberam dieta hipersódica, com e sem angiotensina II foi menor ($p<0,05$) do que a prole que recebeu apenas a dieta hipersódica (tabela 20), esta diferença não foi encontrada na prole feminina (tabela 20).

Massa cardíaca

Menor massa cardíaca foi observada na prole masculina cujas mães receberam dieta hipossódica ($p<0,05$) (tabela 17), nenhuma diferença na massa cardíaca foi observada outros grupos avaliados (tabela 17 a 20).

Tabela. 17- Massa cardíaca e renal (g /100g) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica.

Massa	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
Cardíaca	0,45±0,04 (12)#	0,43±0,01 (10)	0,42±0,03 (10)	0,36±0,01 (11)*	0,42±0,03 (10)	0,41±0,03 (10)
Renal esquerda	0,40±0,03 (12)	0,39±0,01 (10)	0,36±0,01 (10)	0,36±0,01 (11)	0,39±0,02 (10)	0,38±0,01 (10)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados.

*p < 0,05 comparado com NR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela 18- Massa cardíaca e renal (g /100g) de proles cujas mães receberam dieta normossódica.

Fêmeas					Machos			
Massa	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
Cardíaca	0,43±0,01 (10)	0,42±0,02 (11)	0,44±0,02 (6)#	0,42±0,02 (4)	0,42±0,03 (10)	0,43±0,02 (11)	0,37±0,02(9)	0,37±0,09 (3)
Renal esquerda	0,39±0,01 (10)	0,39±0,01 (11)	0,36±0,02 (6)	0,35±0,01 (4)	0,39±0,02 (10)	0,41±0,08 (11)	0,35±0,08 (9)*	0,36±0,01 (3)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Massa corrigida por 100g de peso corpóreo das proles cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII). *p < 0,05 comparado com NR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela. 19- Massa cardíaca e renal (g /100g) de proles cujas mães receberam dieta hipossódica.

	Fêmeas		Machos	
Massa	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
Cardíaca	0,45±0,04 (12)#	0,42±0,02 (10)	0,36±0,01 (11)	0,41±0,02 (7)*
Renal esquerda	0,40±0,03 (12)	0,38±0,02 (10)	0,36±0,01 (11)	0,38±0,02 (9)*

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Massa corrigida por 100g de peso corpóreo das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP). *p < 0,05 comparado com HO CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela. 20- Massa cardíaca e renal (g /100g) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica.

	Fêmeas		Machos	
Massa	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
Cardíaca	0,42±0,03 (10)	0,44±0,03 (6)#	0,41±0,03 (10)	0,36±0,09 (9)
Renal esquerda	0,36±0,01 (10)	0,37±0,01 (6)	0,38±0,01 (10)	0,36±0,01 (9)*

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Massa corrigida por 100g de peso corpóreo das proles cujas mães receberam apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII). *p < 0,05 comparado com HR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Quantidade e volume dos adipócitos

O volume foi maior (p<0,05) e o número de adipócitos foi menor (p<0,05) no tecido adiposo retroperitoneal da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica comparado com a prole feminina cujas mães receberam dieta normossódica (tabelas 21 e 22). Não foram detectadas diferenças nos tecidos adiposos, inguinal e marrom. Na prole masculina não foi observada nenhuma diferença no volume, nem no número de adipócitos (tabelas 21 e 22).

O volume de células do tecido adiposo marrom da prole feminina de mães alimentadas com dieta normossódica e que receberam losartan foi menor ($p<0,05$), enquanto que na prole cujas mães receberam angiotensina II foi maior ($p<0,05$) quando comparado à prole feminina de mães que receberam somente a dieta (tabela 23). A prole feminina cujas mães receberam a dieta normossódica e losartan apresentou maior número de células adiposas no tecido adiposo marrom ($p<0,05$) do que a prole feminina cujas mães receberam apenas a dieta (tabela 24).

O número de adipócitos foi maior ($p<0,05$) no tecido adiposo retroperitoneal da prole masculina cujas mães receberam a dieta normossódica e angiotensina II comparado com a prole cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 23). O volume celular e o número de células foi maior ($p<0,05$) na prole masculina cujas mães receberam a dieta normossódica e losartan quando comparado à prole cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabelas 23 e 24).

O volume celular foi menor e o número de células foi maior ($p<0,05$) no tecido adiposo marrom das proles de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica associado ao tratamento com captopril em relação ao grupo hipossódico controle (tabelas 25 e 26). Não foram verificadas diferenças no volume, nem no número de adipócitos dos outros tecidos adiposos avaliados. Na prole masculina cujas mães receberam dieta hipossódica e captopril, o volume celular no tecido adiposo inguinal foi menor ($p<0,05$) quando comparada ao grupo cujas mães receberam apenas a dieta hipossódica (tabelas 27 e 28).

Menor volume celular ($p<0,05$) e maior número de adipócitos ($p<0,05$) foram encontrados nos tecidos adiposos retroperitoneal e marrom da prole feminina cujas mães receberam dieta hipersódica e angiotensina II quando comparados à prole

feminina cujas mães receberam apenas a dieta hipersódica. No tecido adiposo inguinal destas proles (tabelas 29 e 30) não foram observadas diferenças no número nem no volume celular. O número de células do tecido adiposo inguinal foi maior na prole masculina cujas mães receberam dieta hipersódica associada a angiotensina II do que na prole cujas mães receberam apenas a dieta hipersódica (tabela 31).

Tabela 21- Volume celular (μm^3) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica.

Volume do adipócito	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
RET	963±187 (4)	285±97 (6)	441±64 (6) [#]	510±9 0(3)	629±153 (6)	1184±318 (6)
ING	730±141 (4) [#]	323±89 (6)	774±30 (6)	241±58 (3)	308±58 (6)	456±120 (6)
BAT	61,5±4,1 (4) ^{#*}	38,4±7,7 (6)	19,1±3,6 (6)	46,3±9, 4 (3)	30,7±6,6 (6)	45,5± 14 (6)

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular de proles controles (CON) cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO) ou hipersódica (HR). * $p < 0,05$ comparado com NR e $\#p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela 22- Número de adipócitos (adipócitos / μ g) dos tecidos adiposos, retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica.

Número de adipócitos	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
RET	1,2 $\pm$ 0,2 (4) [#]	5,2 $\pm$ 1,6 (5)	3,0 $\pm$ 0,6 (6)	2,3 $\pm$ 0,4 (3)	2,7 $\pm$ 0,8 (6)	1,6 $\pm$ 0,5 (6)
ING	1,9 $\pm$ 0,6 (4) [#]	4,8 $\pm$ 1,1 (6)	5,0 $\pm$ 2,3 (6)	5,2 $\pm$ 1,3 (3)	4,5 $\pm$ 0,3 (5)	3,5 $\pm$ 0,9 (6)
BAT	57,7 $\pm$ 7,1 (3) [#]	37,0 $\pm$ 3,3 (6)	71,3 $\pm$ 14,8 (6) [#]	26,4 $\pm$ 6,1 (3)	46,0 $\pm$ 9,8 (6)	50,5 $\pm$ 21 (6)

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular das proles controles (CON) cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO) ou hipersódica (HR). * $p < 0,05$ comparado com NR CON e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela 23- Volume celular (μm^3) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) da prole feminina cujas mães receberam dieta normossódica.

Volume do adipócito	Fêmeas				Machos			
	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
RET	285±,98 (6)	484±161 (4)	379±75 (6)	368±163 (4)	629±,153 (6)	642±91 (7)	449±136 (6)	292±103 (4) *
ING	323±90 (6)	188±56 (4)	213±39 (6)	287±49 (4)	307±58 (6)	253±68 (7)	394±80 (6)	224±67 (4)
BAT	38,7±7,7 (6)	71,0±25 (5) [#]	11,8±3,2(6) ^{#*}	76,1±3,2 (4) ^{#*}	30,7±6,6 (6)	46,6±12 (5)	13,7±4,7 (6) *	55,5±2,2 (4)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular das proles cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII). *p < 0,05 comparado com NR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela 24- Número de adipócitos (adipócitos/ μg) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) das proles cujas mães receberam dieta normossódica.

Número de adipócitos	Fêmeas				Machos			
	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
RET	5,2 $\pm$ 1,6 (5)	2,1 $\pm$ 0,6 (3)	3,8 $\pm$ 0,9 (6)	4,6 $\pm$ 1,3 (4)	2,7 $\pm$ 0,8 (6)	2,0 $\pm$ 0,32 (7)	3,3 $\pm$ 0,6(6)	5,2 $\pm$ 1,4 (4)
ING	4,8 $\pm$ 1,1 (6)	7,8 $\pm$ 1,9 (4)	6,3 $\pm$ 1,3 (6)	4,3 $\pm$ 0,7 (4)	4,5 $\pm$ 0,3 (5)	7,1 $\pm$ 1,9 (7)	3,5 $\pm$ 0,7 (6)	3,9 $\pm$ 0,5 (3).
BAT	37 $\pm$ 3,3 (6)	76 $\pm$ 2,9 (3)	144 $\pm$ 43 (6) ^{#*}	31,8 $\pm$ 17 (4)	46,6 $\pm$ 9,8 (6)	43,1 $\pm$ 13,4 (6)	143,6 $\pm$ 40,6 (6) *	27,6 $\pm$ 6,5 (4)

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular das proles cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII). * $p < 0,05$ comparado com NR CON e # $p < 0,05$ comparado com machos

Tabela 25- Volume celular (μm^3) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) das proles cujas mães receberam dieta hipossódica.

	Fêmeas		Machos	
Volume do adipócito	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
RET	963±187 (4)	625±174 (6)	510±90 (3)	392±74 (6)
ING	730±142 (4) [#]	331±103 (6)*	241±58 (3)	288±73 (6)
BAT	61,5±41 (4)	39,6±10 (6) [#]	46,3±9,4 (3)	11,9±1,4 (6)*

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e aptopril 100mg/ml (HO CAP). * $p < 0,05$ comparado com HO CON e $\#p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela. 26- Número de células (adipócitos/ μg) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) das proles cujas mães receberam dieta hipossódica.

	Fêmeas		Machos	
Número de adipócitos	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
RET	1,2±0,2 (4) [#]	2,8±10 (6)	2,3±0,4 (3)	3,4±0,7 (6)
ING	1,9±0,6 (4) [#]	5±1,3 (6)	5,2±1,3 (3)	4,7±0,8 (6)
BAT	57,7±7,1 (3) [#]	73,4±24 (6)	26,4±6,1 (3)	98,8±11 (6)*

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP). * $p < 0,05$ comparado com HO CON e $\#p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela 27- Volume celular (μm^3) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) das proles cujas mães receberam dieta hipersódica.

Volume do adipócito	Fêmeas		Machos	
	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
RET	441±65 (6) ^{#*}	162±40 (4)	1184±318 (6)	292±173 (4)
ING	774±305 (6)	279±161 (4)	456±120 (6)	142±51 (4)
BAT	19,1±3,6 (6)	7,8±2,1 (6) [#]	45,5±14,2 (6)	20,4±8,1 (4)

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular das proles cujas mães receberam apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 $\text{ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (HR AII). * $p < 0,05$ comparado com HRCON e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela. 28- Número de células (adipócitos / μg) dos tecidos adiposos retroperitoneal (RET), inguinal (ING) e marrom (TAM) das proles cujas mães receberam dieta hipersódica.

Número de adipócitos	Fêmeas		Machos	
	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
RET	3±0,7 (6)*	8,3±2,3 (4)	1,6±0,5 (6)	13,3±7,6 (6)
ING	5,0±2,3 (6)	8,2±2,9 (4)	3,5±0,9 (6)*	12,3±0,4,2 (4)
BAT	71,3±15 (6) ^{#*}	168±33 (4)	50,5±21 (6)	77,9±22,3 (4)

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, inguinal e marrom interescapular das proles cujas mães receberam apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 $\text{ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (HR AII). * $p < 0,05$ comparado com HRCON e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Índice de adiposidade

O índice de adiposidade foi maior na prole feminina cujas mães receberam dieta hipossódica (8,6±0,9 % $p < 0,05$) do que na prole feminina cujas mães

receberam dieta normossódica ($6,3 \pm 0,6$ %) (figura 15). Nas proles masculinas não foram observadas diferenças (figura 16). Captopril, losartan ou angiotensina II não interferiram no índice de adiposidade da prole adulta (tabela 29).

* $p < 0,05$ vs. NR CON e HR CON

Figura 15- Índice de adiposidade (%) da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON).

Figura 16- Índice de adiposidade (%) da prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), dieta hipossódica (HO CON) ou dieta hipersódica (HR CON).

Tabela 29- Índice de adiposidade (%) das proles cujas mães receberam dieta normossódica, hipossódica e hipersódica.

Grupo	Fêmeas	Machos
NR CAP	5,3±0,5 (3)	5,2±0,7 (5)
NR LOS	7,0±0,4 (6)	4,1±0,6 (6)
NR AII	5,6±0,3 (6)	4,4±0,3 (6)
HO CAP	7,7±0,9 (6)	5,3±0,5 (6)
HR AII	5,9±0,3 (6)	4,6±0,3 (4)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam os números de experimentos realizados. Foram avaliados os tecidos adiposos retroperitoneal, gonadal, mesentérico e inguinal das proles cujas mães receberam dieta normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), dieta normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS), dieta normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII), dieta hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP) ou dieta hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII).

Atividade da renina plasmática (ARP)

Observamos uma maior atividade da renina plasmática ($p < 0,05$) da prole masculina cujas mães receberam dieta hipossódica (tabela 30) em relação à prole em dieta normossódica, no entanto não observamos diferenças na prole feminina (tabela 30).

Não observamos diferenças na ARP, nas proles de machos e fêmeas em que as mães receberam dieta normossódica associada a captopril, losartan ou angiotensina II (tabela 31).

Tanto as proles de machos quanto às de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica associada ao captopril, apresentaram menor ARP em relação à prole HO controle (tabela 32). Proles cujas mães receberam dieta hipersódica não apresentaram diferenças na ARP (tabela 33).

Atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA)

Soro

Não foi observada nenhuma alteração na atividade da ECA nas proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 30). As proles masculinas cujas mães receberam dieta normossódica associada a losartan ou captopril, apresentaram uma maior atividade da ECA no soro ($p < 0,05$) em relação ao grupo no qual as mães receberam apenas a dieta (tabela 31). A atividade da ECA foi maior ($p < 0,01$) na prole feminina cujas mães receberam captopril comparado com as proles cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 31).

Na prole masculina cujas mães receberam dieta hipossódica, não foi observada nenhuma diferença na atividade da ECA entre os grupos experimentais (tabela 32). Nas fêmeas das mesmas proles, observamos menor ($p < 0,05$) atividade da ECA quando associamos o captopril à dieta materna (tabela 32).

Em relação à dieta hipersódica não foi verificada alteração na atividade da ECA no soro nem na prole masculina nem na prole feminina (tabela 33).

Coração

Foi observado que a prole de machos cujas mães receberam dieta hipossódica tem menor ($p < 0,05$) atividade de ECA no coração quando se compara com a prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 30), no entanto a prole feminina deste mesmo grupo não apresentou nenhuma diferença. (tabela 30).

As proles cujas mães foram tratadas com dieta normossódica associada a losartan, captopril ou angiotensina II não apresentaram alteração na atividade da

ECA no coração em relação ao grupo no qual as mães receberam apenas a dieta (NR CON) (tabela 31).

Na prole masculina cujas mães foram tratadas com dieta hipossódica, não foi observada nenhuma diferença na atividade da ECA no coração entre os grupos experimentais (tabela 32). Nas fêmeas das mesmas proles, observamos menor atividade da enzima quando associamos o captopril à dieta materna ($p < 0,05$) (tabela 32).

Proles de machos de mães que receberam dieta HR associada a AII apresentaram menor atividade de ECA no coração do que o grupo controle ($p < 0,05$) (tabela 33). Fêmeas cujas mães receberam dieta hipersódica associada a AII não apresentaram diferenças na atividade da ECA como se pode observar na tabela 33.

Rim

Não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa na atividade de ECA renal nos grupos avaliados no presente estudo.(tabela 30 a 33).

Tabela 30- Atividade da renina plasmática (ARP) ($\text{ng.mL}^{-1}.\text{hr}^{-1}$) e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) no soro ($\text{nmol His-Leu/min/ml}$), coração ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) e rim ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) de proles cujas mães receberam dieta hipo, normo e hipersódica.

	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
ARP	9,6±2,4 (11)	6,9±3,1 (6)	6,8±2,6 (9)	8,2±0,86 (11)*	4,2±0,6 (9)	8,6±1,9 (9)
ECA SORO	116,3±7,2 (11)	94,6±6,5 (5)	96,1±2,9 (5)	105,6±5,2 (12)	100,8±8,3 (12)	109,5±7,3 (8)
ECA CORÇÃO	18,0±7,2 (11)	27,0±12,6 (9)	24,0±1,6(6)	11,2±3,4 (4)*	23,9±13,8 (5)	21,5±4,9 (5)
ECA RIM	0,44±0,08 (5)	0,62±0,1 (5)	0,43±0,09 (5)	0,56±0,21(3)	0,58±0,06 (5)	0,68±0,13 (6)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A atividade de renina foi avaliada no plasma e atividade de ECA foi avaliada no soro, coração e rim das proles controles (CON) cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO) ou hipersódica (HR). * $p < 0,05$ comparado com NR CON.

Tabela. 31- Atividade da renina plasmática (ARP) ($\text{ng.mL}^{-1}.\text{hr}^{-1}$), e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) no soro ($\text{nmol His-Leu/min/ml}$), coração ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) e rim ($\text{nmol His-Leu/min/mg}$) de proles cujas mães receberam dieta normossódica.

	Fêmeas				Machos			
	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
ARP	6,9 $\pm$ 3,1 (6)	6,5 $\pm$ 1,7 (8)	4,9 $\pm$ 1,6 (8)	8,6 $\pm$ 3,3 (9)	4,2 $\pm$ 0,6 (9)	3,5 $\pm$ 0,4(9)	2,6 $\pm$ 0,7 (6)	8,3 $\pm$ 4,4 (7)
ECA SORO	94,6 $\pm$ 6,5 (5)	131,0 $\pm$ 4,0 (9)*	111,7 $\pm$ 5 (15)	120 $\pm$ 7 (5)	100,8 $\pm$ 8,3 (12)	126,8 $\pm$ 12 (8)*	128 $\pm$ 12 (16)*	123,2 $\pm$ 8,2 (3)
ECA CORAÇÃO	27,0 $\pm$ 12,6 (9)	12,9 $\pm$ 3,2 (4)	21,5 $\pm$ 3,2 (6)	19,3 $\pm$ 4,9(4)	23,9 $\pm$ 13,8 (5)	12,7 $\pm$ 12,3 (3)	14,4 $\pm$ 3,3 (7)	13,6 $\pm$ 4,2 (3)
ECA RIM	0,62 $\pm$ 0,1 (5)	0,97 $\pm$ 0,2 (5) [#]	0,53 $\pm$ 0,2 (5)	0,38 $\pm$ 0,05 (3)	0,58 $\pm$ 0,06 (5)	0,40 $\pm$ 0,06 (6)	0,60 $\pm$ 0,1 (5)	0,5 $\pm$ 0,02 (3)

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A atividade de renina foi avaliada no plasma e atividade de ECA foi avaliada no soro, coração e rim das proles cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NRCON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 $\text{ng.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (NR AII). * $p < 0,05$ comparado com NR CON e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela. 32-Atividade da renina plasmática (ARP) (ng.mL⁻¹.hr⁻¹) e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) no soro (nmol His -Leu/min/ml), coração (nmol His -Leu/min/mg) e rim (nmol His -Leu/min/mg) de proles cujas mães receberam dieta hipossódica.

	Fêmeas		Machos	
	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
ARP	9,6±2,4 (11)	2,6±0,8 (6)*	8,2±0,86 (11)	5,3±1,4 (7)
ECA soro	116,3±7,2 (11)	90,8±7,6 (6)* [#]	105,6±5,2 (12)	115±6,3 (19)
ECA coração	18,0±7,2 (11)	6,1±0,8 (4)*	11,2±3,4 (4)	9,8±3,8 (4)
ECA rim	0,44±0,08 (5)	0,47±0,06 (4)	0,56±0,21 (3)	0,56±0,1 (7)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A atividade de renina foi avaliada no plasma e a atividade de ECA foi avaliada no soro, coração e rim das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica, (HOCON) ou hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP). *p < 0,05 comparado com HO CON e # p<0,05 comparado com machos.

Tabela. 33- Atividade da renina plasmática (ARP) (ng.mL⁻¹.hr⁻¹) e da enzima conversora de angiotensina I (ECA) no soro (nmol His -Leu/min/ml), coração (nmol His -Leu/min/mg) e rim (nmol His -Leu/min/mg) de proles cujas mães receberam dieta hipersódica.

	Fêmeas		Machos	
	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
ARP	6,8±2,6 (9)	4,7±4 (5)	8,6±1,9 (9)	10,3±2,3 (13)
ECA soro	96,1±2,9 (5)	114±8,2 (6)	109,5±7,3 (8)	101,6±3,3 (7)
ECA coração	24,0±1,6 (6)	31,7±8,0 (5) [#]	21,5±4,9 (5)	10,8±1,7 (5)*
ECA rim	0,43±0,09 (5)	0,30±0,3 (3)	0,68±0,13 (6)	0,48±0,1 (6)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A atividade de renina foi avaliada no plasma e a atividade de ECA foi avaliada no soro, coração e rim das proles cujas mães receberam apenas dieta hipersódica (HRCON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII). *p < 0,05 comparado com HR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Western Blotting

Rim

Angiotensinogênio

Maior ($p<0,05$) expressão protéica de angiotensinogênio foi observada na prole masculina cujas mães receberam dieta hipersódica e na prole feminina cujas mães receberam dieta hipossódica em relação à prole cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 34). Importante observarmos que quando a mãe recebeu captopril e dieta normossódica, tivemos maior expressão protéica ($p<0,05$) na prole feminina destas mães em relação às proles cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 35), as proles femininas cujas mães receberam a dieta hipossódica e captopril tiveram menor expressão protéica de angiotensinogênio ($p<0,05$) em relação as proles cujas mães receberam apenas a dieta hipossódica.(tabela 36).

Não foram verificadas diferenças na expressão de angiotensinogênio nas proles dos outros grupos experimentais estudados (tabelas 34 a 37).

Renina

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica de renina no rim nas proles controles (tabela 38), no entanto observamos menor expressão protéica de renina nas proles masculinas cujas mães receberam dieta normossódica e captopril ($p<0,05$) e as proles cujas mães receberam dieta normossódica e angiotensina II($p<0,05$) em relação as prole cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 39). Não foi observada nenhuma alteração nas proles cujas mães receberam

dieta hipossódica, no entanto observamos menor expressão protéica de renina na prole feminina cujas mães receberam dieta hipersódica e angiotensina II em relação a prole cujas mães receberam apenas a dieta hipersódica (tabela 40).

Enzima de conversão de angiotensina I (ECA)

Não foi observada nenhuma alteração na expressão de ECA no rim das proles controles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 34).

Proles de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica e captopril tiveram maior expressão protéica de ECA no rim em relação à prole cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 35).

Não há nenhuma diferença nas proles cujas mães receberam dieta hipossódica ou hipersódica (figuras 36 e 37).

Receptores de angiotensina II (AT₁ e AT₂)

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica dos receptores AT₁ no rim das proles de machos e fêmeas controles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 34). Por outro lado podemos observar que a expressão protéica do receptor de angiotensina II do tipo dois (AT₂) foi maior ($p<0,05$) na prole de machos cujas mães receberam dieta hipersódica em relação à prole cujas receberam dieta normossódica (tabela 34).

Nas proles de machos e fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica, não houve diferença na expressão do receptor AT₁ (tabela 35) entre os diferentes grupos experimentais, mas houve um aumento ($p<0,05$) na expressão de receptores do tipo AT₂ nas proles de machos cujas mães receberam captopril ou losartan (tabela

35). Não observamos diferença na expressão protéica dos receptores de angiotensina II nas proles de fêmeas (tabela 35).

Proles femininas cujas mães receberam dieta hipersódica e angiotensina II tiveram menor ($p<0,05$) expressão protéica de AT_1 no rim do que as proles cujas mães receberam apenas a dieta hipersódica (tabela 37). As proles masculinas não apresentaram diferenças na expressão dos receptores do tipo AT_1 nem do tipo AT_2 . (tabela 37).

Coração

Angiotensinogênio

A prole masculina cujas mães receberam dieta hipossódica teve maior ($p<0,05$) expressão protéica de angiotensinogênio no coração do que as proles cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 38).

Não foram verificadas diferenças na expressão de angiotensinogênio nas proles cujas mães receberam dieta normossódica, hipossódica com tratamentos (tabelas 39 e 40).

No entanto a prole feminina cujas mães receberam dieta hipersódica e AII apresentou menor expressão de angiotensinogênio no coração do que as proles cujas mães receberam apenas a dieta hipersódica (tabela 41).

Renina

Menor ($p<0,05$) expressão protéica de renina no coração foi observada na prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa nos machos desta mesma prole (tabela 38).

Maior ($p < 0,05$) expressão protéica de renina no coração foi encontrada nas proles femininas cujas mães receberam dieta normossódica e captopril em relação as prole cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 39).

Não foi observada nenhuma alteração nas proles cujas mães receberam dieta hipossódica (tabela 40). Observamos maior ($p < 0,05$) expressão protéica de renina na prole feminina cujas mães receberam dieta hipersódica e angiotensina II em relação às proles cujas mães receberam apenas a dieta hipersódica (tabela 41).

Enzima de conversão de angiotensina I (ECA)

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica de ECA no coração das proles controles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 38).

Maior ($p < 0,05$) expressão protéica de ECA foi encontrada na prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica e losartan, também foi observado maior ($p < 0,05$) expressão protéica de ECA nas proles femininas cujas mães receberam dieta normossódica e captopril em relação as prole cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 39).

Não há nenhuma diferença estatisticamente significante nas proles cujas mães receberam dieta hipossódica (tabela 40).

A expressão protéica de ECA no coração foi maior ($p < 0,05$) na prole feminina cujas mães receberam dieta hipersódica e AII em relação as proles cujas mães receberam apenas a dieta, não foi observada diferença nos machos deste grupo (tabela 41).

Receptores de angiotensina II (AT₁ e AT₂)

Menor ($p < 0,05$) expressão protéica do receptor AT₁ no coração foi observada nas proles femininas cujas mães receberam dieta hipossódica em relação as proles cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 38). Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica dos receptores do tipo AT₁ no coração das proles de machos controles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta e também não observamos nenhuma diferença nas proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal e captopril, losartan ou AII (tabelas 38 a 41). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada na expressão protéica dos receptores de angiotensina II do tipo dois nas proles controles (tabela 38)

Nas proles de machos cujas mães receberam dieta normossódica e AII foi observado menor expressão de receptores do tipo AT₂ (tabela 39). Não observamos diferença na expressão protéica dos receptores de angiotensina II nas proles de fêmeas destas mesmas proles (tabela 39).

Menor ($p < 0,05$) expressão protéica de AT₂ foi observada nas proles de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica e captopril em relação às proles cujas mães receberam apenas a dieta hipossódica. (tabela 40).

Proles cujas mães receberam dieta hipersódica não apresentaram diferenças na expressão protéica de receptores do tipo AT₂ (tabela 41).

Tecido adiposo marrom

Angiotensinogenio

A expressão protéica de angiotensinogênio no TAM, tanto na prole masculina como na prole feminina, dos 8 grupos experimentais estudados não foi diferente (tabelas 42 a 44).

Renina

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica de renina no tecido adiposo marrom das proles de todos os grupos experimentais (tabelas 42 a 45).

Enzima de conversão de angiotensina I (ECA)

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica de ECA no TAM das proles controles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 42).

Maior expressão protéica de ECA foi observada nas proles de machos cujas mães receberam dieta normossódica e losartan em relação à prole cujas mães receberam apenas a dieta normossódica (tabela 43).

Não há nenhuma diferença nas proles cujas mães receberam dieta hipossódica ou hipersódica (tabela 44 e 45).

Receptores de angiotensina II (AT₁ e AT₂)

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica dos receptores do tipo AT₁ no TAM das proles de machos e fêmeas de todos os grupos experimentais (tabelas 42 a 45).

Por outro lado podemos observar que a expressão protéica do receptor de angiotensina II do tipo (AT₂) na prole de machos cujas mães receberam dieta hipersódica foi maior ($p<0,05$) em relação à prole cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 42). A expressão protéica do receptor do tipo AT₂ da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica foi menor em relação às proles cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 42).

Maior ($p<0,05$) expressão de receptores do tipo AT₂ foi observado nas proles de machos cujas mães receberam dieta normossódica e losartan (tabela 43). Não observamos diferença na expressão protéica dos receptores de angiotensina II nas proles de fêmeas deste mesmo grupo (tabela 43).

Não foram diferentes as expressões protéicas dos receptores de AII nas proles cujas mães receberam dieta hipossódica com captopril (tabela 44).

Tecido adiposo retroperitoneal

Angiotensinogênio

Não foi observada nenhuma diferença na expressão protéica de angiotensinogênio no RET nas proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 45).

Renina

A expressão protéica de renina no tecido adiposo RET foi maior ($p<0,05$) na prole cujas mães receberam dieta hipossódica em relação às proles cujas mães receberam dieta normossódica. Não foram verificadas diferenças nos outros grupos de proles controles (tabela 45).

Enzima de conversão de angiotensina I (ECA)

Foi observado menor expressão protéica de ECA no tecido adiposo RET apenas na prole feminina cujas mães receberam dieta hiperssódica em relação às proles cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 45).

Receptores de angiotensina II (AT₁ e AT₂)

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica dos receptores de angiotensina II do tipo AT₁ e do tipo AT₂ no tecido adiposo RET das proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 45).

Tecido adiposo inguinal**Angiotensinogênio**

Não foi observada nenhuma diferença na expressão protéica de angiotensinogênio no tecido adiposo ING, nas proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 46).

Renina

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica de renina no tecido adiposo inguinal das proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 46).

Enzima de conversão de angiotensina I

Maior expressão protéica de ECA foi encontrada no tecido adiposo ING da prole feminina cujas mães receberam dieta hipossódica em relação às proles cujas mães receberam dieta normossódica (tabela 46).

Receptores de angiotensina II (AT₁ e AT₂)

Não foi observada nenhuma alteração na expressão protéica dos receptores de angiotensina II do tipo AT₁ e do tipo AT₂ no tecido adiposo ING das proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sal na dieta (tabela 46).

Tabela 34 - Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no rim de proles cujas mães receberam dieta , hipo, normo ou hipersódica.

WB	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
AGT	13576±1883(10)*	4976±1304(4)	11554±2480(6)	7477±2428(6)	7864±1720(6)	13735±1488(5)*
REN	16977±1316(5)	13023±2597(5)	14001±2052(5)		10907±2593(7)	13172±3203(6)
ECA	8651±1863(9)	8512±2116(4)	10729±885(4)	8598±4241(4)	9595±2313(8)	10728±3075(8)
AT₁	10152±4196(3)	12253±1617(4)	15011±260(3)	10931±2626(3)	11430±826(4)	9642±2347(4)
AT₂	9116±2221(7)	12044±1849(5)#	13357±5474(2)	9736±1764(6)	3961±386(2)	12319±1701(5)*

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no rim das proles controles (CON) cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO) ou hipersódica (HR). *p < 0,05 comparado com NR CON.

Tabela. 35- Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no rim de proles cujas mães receberam dieta normossódica.

	Fêmeas				Machos			
WB	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
AGT	4976±1304 (4)	10264±761 (6)*	8664±1441 (7)	9242±1003 (7)	7864±1720 (6)	12281±782 (6)	9294±2105 (5)	124941±1539 (2)
REN	13023±2597 (5)	10765±2807 (5)	12371±2172 (7)	11624±2475 (6)	10907±2593 (7)	7163±694 (3)*	11771±1616 (7)	4072±620 (2)*+ #
ECA	8512±2116 (4)	15013±1115 (6)*	13580±1971 (4)	10660±1167 (8)	9595±2313 (8)	14092±1671 (6)	13626±1128 (4)	7942±770 (3)
AT₁	12253±1617 (4)	12767±2276 (3)	7012±1276 (3)	11758±2225 (2)	11430±826 (4)	11133±1444 (5)	7600±3968 (3)	
AT₂	12044±1849 (5)#	13008±3355 (3)	10345±1151 (8)	13864±2109 (6)	3961±386 (2)	12339±1995 (4)*	14093±1689 (4)*	10543±3060 (3)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no rim das proles controles (CON) cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII). *p < 0,05 comparado com NR CON e #p<0,05 comparado com machos

Tabela 36—Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no rim de proles cujas mães receberam dieta, hipossódica.

Fêmeas			Machos	
WB	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
AGT	13576±1883 (10)	11999±1091 (3)*	7477±2428 (6)	6257±502 (4)
REN	16977±1316 (5)	9605±3177 (2)		
ECA	8651±1863 (9)	5467±2051 (3)	8598±4241 (4)	16309±165 (2)
AT ₁	10152±4196 (3)		10931±2626 (3)	
AT ₂	9116±2221 (7)		9736±1764 (6)	

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no rim das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e captopril 100mg/ml (HO CAP)., * $p < 0,05$ comparado com HO CON e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela 37—Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no rim de proles cujas mães receberam dieta, hipersódica.

Fêmeas			Machos	
WB	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
AGT	11554±2480 (6)	11407±2062 (5)	13735±1488 (5)	10780±1134 (8)
REN	14001±2052 (5)	7672±20804 (4)*	13172±3203 (6)	6008±1313 (4)
ECA	10729±885 (4)	9697±451 (3)	10728±3075 (8)	9634±2223 (6)
AT ₁	15011±260 (3)	7841±2017 (3)*	9642±2347 (4)	11444±2281 (6)
AT ₂	13357±5474 (2)	16559±3780 (4)	12319±1701 (5)	12756±1362 (4)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no rim das proles cujas mães receberam apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII). * $p < 0,05$ comparado com HRCON e # $p < 0,05$ comparado com machos

Tabela 38—Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no coração de proles cujas mães receberam dieta, hipo, normo ou hipersódica.

WB	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
AGT	12897±1923 (8)	13651±1951 (6)	17334±2198 (3)	13779±1636 (7)*	7599±1842 (8)	9982±2178 (7)
REN	9338±1165 (4)*	13274±1090 (5)	2998±3462 (3)*	10302±1357 (5)	9174±14873 (9)	8819±2237 (7)
ECA	12670±4334 (4)#	16211±1562 (6)#	10145±3285 (4)	6228±1385 (5)	9320±2011 (7)	10129±1689 (5)
AT₁	7431±980 (3)*#	13944±1071 (4)	12838±5083 (3)	12667±1474 (3)	11139±1731 (5)	7174±1453 (7)
AT₂	13468±1433 (8)	11643±2345 (4)	11646±2512 (4)	13615±1906 (7)	12770±1485 (7)	10853±3157 (5)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no coração das proles controles (CON) cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO) ou hipersódica (HR).

*p < 0,05 comparado com NR CON.

Tabela. 39- Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no coração de proles cujas mães receberam dieta normossódica.

Fêmeas					Machos			
WB	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII
AGT	13651±1951 (6)	14665±2795 (5)	15787±3069 (4)	12085±1580 (5)	7599±1842 (8)	6450±4134 (3)	10401±2495 (6)	11452±3345(3)
REN	11811±1723 (6)	18550±1855 (4)*	12782±3801 (4)	14023±4029 (4)	9174±14873 (9)	13615±5874 (2)	9648±1614 (7)	
ECA	16211±1562 (6)#	10963±4485 (3)	8641±2764 (3)	8624±3464 (3)	9320±2011 (7)	14343±10592 (2)	20169±1077 (3)*#	
AT ₁	13944±1071 (4)	10850±3855 (3)	14922±6628 (2)	9818±1835 (5)	11139±1731 (5)		14423±1394 (4)	6187±1328(2)+
AT ₂	11643±2345 (4)	14981±1705 (3)	15116±1386 (4)	12206±1805 (7)	12770±1485 (7)	12451±1794 (5)	12475±2959 (4)	1836±830(2)*#

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no coração das proles cujas mães receberam dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou dieta e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII). *p < 0,05 comparado com NR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela 40—Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no coração de proles cujas mães receberam dieta, hipossódica.

	Fêmeas		Machos	
WB	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
AGT	12897±1923 (8)	10097±3736 (2)	13779±1636 (7)	12959±1358 (3)
REN	7811±1774 (5)		10302±1357 (5)	14944±4029 (4)
ECA	12670±4334 (4)#		6228±1385 (5)	12808±20212 (3)*
AT ₁	7431±980 (3)#	14156±4790 (2)	12667±1474 (3)	6831±2795 (4)
AT ₂	13468±1433 (8)	7591±2694 (4)*	13615±1906 (7)	13868±2519 (6)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no coração das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e aprotinil 100mg/ml (HO CAP), *p < 0,05 comparado com HO CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela 41—Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no coração de proles cujas mães receberam dieta, hipersódica.

	Fêmeas		Machos	
WB	HR CON	HR AII	HR CON	HR AII
AGT	17334±2198 (3)	6371±1970 (5)*	9982±2178 (7)	13465±2265 (7)
REN	2998±3462 (3)	13773±3077 (4)*	8819±2237 (7)	10453±2361 (3)
ECA	10145±3285 (4)	3386±694 (6)*	10129±1689 (5)	5538±1469 (4)
AT ₁	12838±5083 (3)	11312±2458 (4)	7174±1453 (7)	7606±2629 (4)
AT ₂	11646±2512 (4)	11058±972 (6)	10853±3157 (5)	9940±2499 (7)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no coração das proles cujas mães receberam apenas dieta hipersódica (HR CON) ou hipersódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (HR AII). *p < 0,05 comparado com HRCON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela 42-Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo marrom de proles cujas mães receberam dieta , hipo, normo ou hipersódica.

	Fêmeas			Machos		
WB	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
AGT	13024±3487 (4)	14988±2185 (5)	14097±2600 (5)	11276±1486 (5)	13952±3606 (5)	15424±2074 (4)
REN	10579±2148 (5)	13475±3514 (3)	14445±4281 (5)	10978±1663 (5)	14370±7057 (3)	108184±899 (3)
ECA	16068±2843 (3)#	9901±4346 (3)	13368±1119 (3)	7707±965 (4)	10323±1432 (3)	22231±4819 (3) [#]
AT₁	8716±2170 (5)	13694±1052 (4)#	12845±2243 (3)	11134±3335 (5)	8226±53 (2)	12089±2020 (3)
AT₂	7623±1441 (3)*	12194±3747 (5)	16228±1631 (5)	11683±1983 (5)	7272±622 (2)	16664±1954 (4)*

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no tecido adiposo marrom interescapular das proles controles (CON) cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO) ou hipersódica (HR). * $p < 0,05$ comparado com NR CON.

Tabela. 43- Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo marrom de proles cujas mães receberam dieta normossódica.

WB	Fêmeas				Machos		
	NR CON	NR CAP	NR LOS	NR AII	NR CON	NR CAP	NR LOS
AGT	14988±2185 (5)	18266±5965 (2)			13952±3606 (5)	9243±4030 (3)	10770±2493 (2)
REN	13475±3514 (3)	13341±3532 (2)			14370±7057 (3)	18830±1629 (2)	15091±548 (2)
ECA	9901±4346 (3)	213971±1440 (3)	10924±1774 (2)	2876±304 (2)	10323±1432 (3)	6602±16359 (3)	20288±602 (2)*
AT₁	13694±1052 (4)#	16611±1811 (3)	15067±1202 (2)	7129±3402 (2)	8226±53 (2)	11106±4108 (2)	8594±3886 (4)
AT₂	12194±3747 (5)	20446±5853 (4)	18701±519 (3)	18319±2555 (3)	7272±622 (2)	12491±2142 (4)	14578±1048 (5)*

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no tecido adiposo marrom interescapular das proles cujas mães receberam apenas dieta normossódica (NR CON), normossódica e captopril 100mg/ml (NR CAP), normossódica e losartan 200mg/ml (NR LOS) ou normossódica e angiotensina II 150 ng.kg⁻¹.min⁻¹ (NR AII). *p < 0,05 comparado com NR CON e #p<0,05 comparado com machos.

Tabela 44- Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo marrom de proles cujas mães receberam dieta, hipossódica.

	Fêmeas		Machos	
WB	HO CON	HO CAP	HO CON	HO CAP
AGT	13024±3487 (4)	9167±2249 (2)	11276±1486 (5)	10468±578 (2)
REN	10579±2148 (5)	16145±5728 (2)	10978±1663 (5)	13424±4454 (3)
ECA	16068±2843 (3)#	7537±3553 (3)	7707±965 (4)	11595±1849 (4)
AT ₁	8716±2170 (5)	9016±1523 (2)#	11134±3335 (5)	9430±2261 (4)
AT ₂	7623±1441 (3)	8287±1696 (5)#	11683±1983 (5)	15010±1466 (5)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no tecido adiposo marrom interescapular das proles cujas mães receberam apenas dieta hipossódica (HO CON) ou hipossódica e aptopril 100mg/ml (HO CAP). * $p < 0,05$ comparado com HO CON e # $p < 0,05$ comparado com machos.

Tabela 45—Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo branco retroperitoneal de proles cujas mães receberam dieta, hipo, normo ou hipersódica.

WB	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
AGT	9913±2517 (5)	12497±2024 (5)	12894±2185 (4)	16167±3173 (4)	16617±2260 (2)	1403±23786 (3)
REN	17681±850 (4)*	13299±1892 (4)		16012±3531 (5)	13047±3143 (4)	15030±5139 (3)
ECA	12385±3412 (4)	18106±3846 (3)	6408±1324 (3)*	14233±980 (3)	10810±5545 (2)	11765±3274 (3)
AT₁	8912±2859 (4)	15450±5491 (5)	11348±3341 (2)	15169±2286 (3)	11980±184 (2)	11032±386 (25)
AT₂	13438±1801 (4)	9188±99 (2)	15650±5752 (2)	8242±3398 (2)	12132±4787 (2)	14185±2808 (3)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no tecido adiposo branco retroperitoneal das proles controles (CON) cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO) ou hipersódica (HR). *p < 0,05 comparado com NR CON.

Tabela 46—Expressão protéica realizada por Western blotting unidades arbitrárias (UA), das proteínas do SRA, Angiotensinogênio (AGT), renina (REN), enzima conversora de angiotensina I (ECA) e receptores de angiotensina II AT₁ e AT₂ no tecido adiposo branco inguinal de proles cujas mães receberam dieta, hipo, normo ou hipersódica.

WB	Fêmeas			Machos		
	HO CON	NR CON	HR CON	HO CON	NR CON	HR CON
AGT	7902±6258(2)	9250±4562(3)	13072±3824(5)	14168±2500(5)	18282±3042(3)	11512±24227(4)
REN	14854±1764(2)	16835±7505(3)	13810±560(3)	15418±1925(4)	11099±4176(3)	18711±5807(3)
ECA	13624±969(3)*#	7390±507(3)	9142±1942(5)	6528±1944(5)	10518±4257(3)	9545±688(3)
AT ₁	19415±2849(2)	16465±24147(3)	14657±1949(5)		16140±3491(4)	13936±5691(3)
AT ₂	9675±4018(3)	16214±4015(3)	11938±3362(6)	9763±2113(6)	7238±2333(3)	11888±1070(4)

Resultados expressos como média ± erro padrão da média. Valores entre parênteses representam o número de experimentos realizados. A expressão protéica foi avaliada no tecido adiposo branco inguinal das proles controles (CON) cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO) ou hipersódica (HR). * $p < 0,05$ comparado com NR CON.

5. DISCUSSÃO

Estudos foram realizados em nosso laboratório para avaliar o efeito da sobrecarga e da restrição de sal durante o período perinatal sobre aspectos funcionais e estruturais na prole adulta. Tais estudos revelaram alterações no sistema renina-angiotensina circulante e renal [12], menor sensibilidade à insulina e maior concentração de lípidos circulantes [17] na prole adulta. Foi observado que a prole adulta de mães que consumiram dieta hipersódica durante o período perinatal tem maior conteúdo renal de angiotensina II e não modulam a atividade de renina plasmática frente a variações no conteúdo de sal na dieta. Há que se salientar que as mencionadas alterações endócrinas ocorrem na prole adulta de mães que consomem dieta hipossódica na gestação e amamentação e somente em machos e não em fêmeas. Nestes estudos prévios também foi observado que a prole masculina e feminina adulta de mães alimentadas com dieta hipersódica durante o período perinatal tem maior pressão arterial e menor peso corpóreo. O conjunto destas observações permite afirmar que a variação no consumo de sal durante a gestação e amamentação resulta em importantes modificações na prole adulta.

O presente estudo é continuação da linha de pesquisa que pretende entender melhor o efeito do sal durante a gestação e amamentação sobre a prole na idade adulta. Este estudo gerou uma grande quantidade de resultados importantes, dificultando uma interpretação do conjunto das observações. Foram selecionados alguns dos resultados que serão objeto da presente discussão.

No atual estudo, prole de mães que receberam restrição ou sobrecarga de sal com ou sem inibidor da enzima conversora de angiotensina I (captopril) e do receptor

AT1 (losartan) e suplementação exógena de angiotensina II durante a gestação e lactação, tiveram menor peso ao nascimento como uma das conseqüências.

Na gravidez normal ocorrem mudanças hemodinâmicas, como diminuição da resistência vascular, diminuição da pressão arterial e redistribuição do débito cardíaco. Concomitantemente com estas alterações hemodinâmicas já é conhecido que a atividade de renina plasmática está elevada na gravidez tanto em seres humanos quanto em animais de experimentação [18]. É conhecido que o excesso e a restrição no consumo de sal na dieta, respectivamente, diminui e eleva a atividade da renina plasmática [19]. Este efeito decorrente da variação no consumo de sal pode interferir na fisiologia da gestação, com repercussão sobre o conceito.

O baixo peso ao nascimento observado em vários grupos experimentais deste estudo pode ser decorrente de inúmeros fatores. O aporte de nutrientes é o fator mais importante que regula o crescimento fetal. Este aporte de nutrientes está relacionado à composição e tamanho corpóreo da mãe, ao estoque de nutrientes maternos, aos alimentos ingeridos durante a gravidez, ao transporte de nutrientes para a placenta e transferência de nutrientes através da placenta [20]. Um outro fator já descrito é a inadequada implantação placentária na parede uterina, o que pode ser devido ao excesso de angiotensina II [21] em alguns dos grupos experimentais. Há que se enfatizar que o excesso de angiotensina II é um possível mecanismo somente em alguns dos grupos experimentais cuja prole nasceu com baixo peso. O feto torna-se subnutrido quando a demanda de nutrientes é maior que a oferta. O fornecimento de nutrientes pode estar comprometido quando a mãe é desnutrida ou ainda quando há insuficiência placentária ou quando a demanda está alta devido a um crescimento fetal mais rápido. A insuficiência placentária ocorre quando há um comprometimento

da perfusão uterina, com repercussões no sistema de trocas materno-fetal, determinando alterações na placenta como [22]. O feto adapta-se à subnutrição mudando o seu metabolismo, alterando a produção de hormônios fetais e placentários que controlam seu crescimento, redistribuindo seu fluxo de sangue e reduzindo sua velocidade de crescimento. As citadas adaptações que acontecem durante o desenvolvimento fetal podem alterar permanentemente a estrutura e função do organismo estando associadas a maior probabilidade de desenvolvimento da síndrome pluri-metabólica (hipertensão, diabetes, obesidade e dislipidemia) e doenças cardiovasculares na idade adulta [23, 24].

Alterações nutricionais em fases precoces da vida estão associadas com a distribuição e quantidade de tecido adiposo tanto na infância quanto na idade adulta[25]. A associação entre peso ao nascimento e massa de tecido adiposo na idade adulta é usualmente negativa[25]. Ravelli e et al.descreveram que baixo aporte de nutrientes nas fases iniciais da gestação resultam em maior massa adiposa na idade adulta, mas tal fenômeno não é observado quando a restrição nutricional ocorrer no último trimestre da gravidez [26]. Vários estudos mostram que ser magro ao nascimento e obeso na idade adulta está associado a um risco elevado de desenvolvimento de resistência à insulina e doenças cardiovasculares [25].

No presente estudo um maior índice de adiposidade foi observado somente na prole feminina de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação e amamentação, indicando um dimorfismo sexual. Isto mostra que baixo peso ao nascimento não é sempre associado à obesidade na idade adulta, uma vez que alguns grupos de proles com peso reduzido ao nascimento não tiveram maior índice de adiposidade na fase adulta. A ausência de obesidade nas proles femininas de mães

HO CAP e NR CAP, apesar do baixo peso ao nascimento, pode ser um indicativo de que a angiotensina II tem algum efeito no feto que pode estar vinculado à obesidade na idade adulta. Esta afirmativa tem suporte no conhecimento de que a angiotensina II tem efeito adipogênico[10], mas cuja manifestação pode ocorrer somente na idade adulta. Poder-se-ia argumentar que na eventualidade desta explicação ser correta, esperar-se-ia observar obesidade na prole feminina de mães NR AII. Talvez isto não tenha acontecido pelo fato de que a infusão de angiotensina II exógena não simula aquilo que ocorre quando há um estímulo fisiológico tal como a restrição crônica de sal na dieta. Tal possibilidade encontra suporte em um estudo anterior do nosso laboratório [27]. Neste estudo foi observado que na vigência de dieta hipossódica, não há aumento generalizado de angiotensina II circulante e tecidual em ratos machos. A exceção foi no tecido adiposo branco periepidual aonde o conteúdo de angiotensina II foi menor do que nos grupos sob dieta normo e hipersódica. Diferentes efeitos sobre a massa de tecido adiposo também foram observados em resposta a dieta hipossódica e a infusão de angiotensina II. Em ratos alimentados com dieta hipossódica verificou-se desenvolvimento de obesidade [27] e o oposto em animais que foram infundidos com angiotensina II [28].

Alem do dimorfismo sexual detectado na quantidade de tecido adiposo, também foi notada uma diferença de atividade de renina plasmática entre gêneros. Na prole masculina adulta de mães NR CON, a ARP foi menor do que na prole masculina de mães HO CON. Resultado semelhante não foi observado em fêmeas adultas dos mesmos grupos experimentais. Também foi observado dimorfismo sexual na atividade da ECA. No entanto, este dimorfismo variou entre tecidos. A atividade da ECA no coração da prole masculina de mães HO CON foi menor do que

na prole masculina de mães NR CON. Resultado semelhante não foi observado nos rins e no soro. A atividade de renina plasmática, de ECA no soro e no miocárdio foi menor na prole feminina de mães HO CAP do que de mães HO CON. O mesmo fenômeno não foi verificado na prole masculina. Isto indica que o bloqueio da enzima conversora da angiotensina I durante o período perinatal tem repercussão sobre o sistema renina-angiotensina de fêmeas na idade adulta. Trata-se de mais uma evidência de dimorfismo sexual nas consequências de modificações do ambiente perinatal sobre a prole adulta.

O dimorfismo sexual manifestado na obesidade, na atividade de renina plasmática e na atividade de ECA miocárdica observada em alguns grupos de proles no presente estudo permitem supor um possível papel dos estrógenos. Estudos adicionais são necessários para avaliação desta hipótese de trabalho.

O sistema renina-angiotensina é importante na regulação da pressão arterial e no crescimento e desenvolvimento celular. Este sistema está localizado em inúmeros tecidos, tais como as glândulas adrenais, rins, coração, vasos sanguíneos e tecido adiposo, tendo a angiotensina II como principal efetor final. [5, 7, 29]

A AII é capaz de estimular diversos fatores, tais como as prostaglandinas, o cAMP, catecolaminas, proteína UCP1, PRL e enzimas lipogênicas como a glicerol-3-fosfato desidrogenase e a ácido graxo sintase. Todos estes fatores podem alterar o metabolismo do tecido adiposo.

No tecido adiposo, a AII também é responsável pela redução do fluxo sanguíneo. Quando este fluxo é reduzido, pode haver acúmulo de ácidos graxos livres ou uma diminuição do pH intracelular devido ao aumento da concentração de lactato, responsável por uma inibição da lipólise. Com a inibição da lipólise e o

acúmulo de ácidos graxos livres pode ocorrer um aumento do estoque de gorduras nos adipócitos [8]. É sabido que os pré-adipócitos aumentam seu volume e conteúdo de gordura em resposta a angiotensina II. [30, 31]

Confirmando estes efeitos da angiotensina II, um estudo mostrou que a administração de antagonistas de AII em ratos leva a uma diminuição do tamanho do adipócito [32]. Teboul e colaboradores observaram menor peso corpóreo, menor massa de tecido adiposo inguinal, menor índice de adiposidade em ratos nocautes para angiotensinogênio com 20 semanas de idade quando comparados aos controles. Em outro estudo foi observado que ratos com aumento da expressão de angiotensinogênio tinham maior massa de tecido adiposo epididimal, hipertrofia do adipócito, aumento do índice de adiposidade e aumento de AGT circulante, indicando que o angiotensinogênio participa na geração de obesidade [33]. Diversas alterações detectadas no sistema renina-angiotensina nas proles de alguns grupos experimentais junto com o conhecimento de que este sistema pode alterar a estrutura e função do tecido adiposo, justifica-se a necessidade de estudos adicionais para esclarecer uma eventual participação do SRA na obesidade da prole feminina de mães HO CON.

Um resultado que merece ser comentado é a maior massa de tecido adiposo marrom na prole feminina cujas mães receberam restrição de sal na dieta comparado com a prole cujas mães receberam dieta normossódica. Dois são os aspectos interessantes deste resultado. O primeiro é uma evidência adicional do já citado dimorfismo sexual e o segundo é que muito provavelmente há uma discrepância entre a massa e a função do tecido adiposo marrom. Há que se lembrar que em sendo

a prole feminina de mães HO CON obesa, é lógico imaginar que esteja ocorrendo menor atividade termogênica do tecido adiposo marrom.

A programação intra-uterina pode gerar mudanças estruturais e funcionais nos genes, células, tecidos e até mesmo em órgãos. Durante o desenvolvimento, o DNA pode ser modificado epigeneticamente, ou seja, pode ocorrer uma alteração na expressão gênica sem mudança na sequência de DNA. Estas mudanças ocorrem principalmente pela metilação das histonas da cromatina. Mudanças na transcrição induzidas por fatores ambientais levam a alterações quantitativas na síntese de proteínas [34]. Estas alterações podem ser responsáveis por alterações estruturais e modificações na capacidade funcional do órgão [34].

As alterações estruturais e funcionais observadas nas proles de alguns dos grupos experimentais no presente estudo podem ser decorrentes dos citados mecanismos epigenéticos.

Para uma adequada compreensão dos resultados da expressão das proteínas do sistema renina-angiotensina nos diversos tecidos, há necessidade de medidas adicionais para aumentar o número em alguns grupos experimentais. Por este motivo, não discutimos tais resultados neste momento.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que modificações do conteúdo de sal na dieta, durante a gestação e lactação, estão associadas à alterações no peso ao nascimento e na massa de tecido adiposo na prole adulta. É possível que as modificações no sistema renina-angiotensina materno induzido pela variação no consumo de sal estejam associadas às alterações deste mesmo sistema observado na prole adulta.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Guan, H., et al., *Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **288**(4): p. E663-73.
2. Barker, D.J., et al., *Weight in infancy and death from ischaemic heart disease*. Lancet, 1989. **2**(8663): p. 577-80.
3. Hales, C.N. and D.J. Barker, *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis*. Diabetologia, 1992. **35**(7): p. 595-601.
4. Ozanne, S.E., et al., *Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet*. Clin Sci (Lond), 2004. **106**(2): p. 141-5.
5. Cassis, L.A., et al., *Characterization and regulation of angiotensin II receptors in rat adipose tissue*. Angiotensin receptors in adipose tissue. Adv Exp Med Biol, 1996. **396**: p. 39-47.
6. Wright, J.W. and J.W. Harding, *Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses*. Neurosci Biobehav Rev, 1994. **18**(1): p. 21-53.
7. Mallow, H., A. Trindl, and G. Loffler, *Production of angiotensin II receptors type one (AT1) and type two (AT2) during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes*. Horm Metab Res, 2000. **32**(11-12): p. 500-3.
8. Goossens, G.H., E.E. Blaak, and M.A. van Baak, *Possible involvement of the adipose tissue renin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders*. Obes Rev, 2003. **4**(1): p. 43-55.
9. Crandall, D.L., et al., *Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation*. Endocrinology, 1999. **140**(1): p. 154-8.
10. Saint-Marc, P., et al., *Angiotensin II as a trophic factor of white adipose tissue: stimulation of adipose cell formation*. Endocrinology, 2001. **142**(1): p. 487-92.
11. Serazin, V., et al., *cAMP-positive regulation of angiotensinogen gene expression and protein secretion in rat adipose tissue*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004. **286**(3): p. E434-8.
12. da Silva, A.A., et al., *Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2003. **13**(3): p. 133-9.
13. Cassis, L.A., *Angiotensin II in brown adipose tissue from young and adult Zucker obese and lean rats*. Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. E453-8.
14. Di Girolamo, M., S. Mendlinger, and J.W. Fertig, *A simple method to determine fat cell size and number in four mammalian species*. Am J Physiol, 1971. **221**(3): p. 850-8.
15. Lima, F.B., S. Bao, and W.T. Garvey, *Biological actions of insulin are differentially regulated by glucose and insulin in primary cultured adipocytes. Chronic ability to increase glycogen synthase activity*. Diabetes, 1994. **43**(1): p. 53-62.

16. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
17. Vidonho, A.F., Jr., et al., *Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats*. Pediatr Res, 2004. **56**(6): p. 842-8.
18. Rosenfeld, C.R., *Mechanisms regulating angiotensin II responsiveness by the uteroplacental circulation*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2001. **281**(4): p. R1025-40.
19. Stahl, W.M., *The pressure control of renin release by the kidney*. Vasc Dis, 1966. **3**(3): p. 180-91.
20. Fowden, A.L., et al., *Programming placental nutrient transport capacity*. J Physiol, 2006. **572**(Pt 1): p. 5-15.
21. Xia, Y., H.Y. Wen, and R.E. Kellems, *Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24601-8.
22. Cross, J.C. and L. Mickelson, *Nutritional influences on implantation and placental development*. Nutr Rev, 2006. **64**(5 Pt 2): p. S12-8; discussion S72-91.
23. Barker, D.J., *Fetal origins of cardiovascular disease*. Ann Med, 1999. **31 Suppl 1**: p. 3-6.
24. Barker, D.J., *The malnourished baby and infant*. Br Med Bull, 2001. **60**: p. 69-88.
25. McMillen, I.C., et al., *Regulation of leptin synthesis and secretion before birth: implications for the early programming of adult obesity*. Reproduction, 2006. **131**(3): p. 415-27.
26. Ravelli, G.P., Z.A. Stein, and M.W. Susser, *Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy*. N Engl J Med, 1976. **295**(7): p. 349-53.
27. Coelho, M.S., et al., *High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on body weight, food intake and energy balance in rats*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. **16**(2): p. 148-55.
28. Cassis, L.A., et al., *Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 1): p. E867-76.
29. Engeli, S., R. Negrel, and A.M. Sharma, *Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system*. Hypertension, 2000. **35**(6): p. 1270-7.
30. Crandall, D.L., et al., *Distribution of angiotensin II receptors in rat and human adipocytes*. J Lipid Res, 1994. **35**(8): p. 1378-85.
31. Townsend, R.R., *The effects of angiotensin-II on lipolysis in humans*. Metabolism, 2001. **50**(4): p. 468-72.
32. Massiera, F., et al., *Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation*. Faseb J, 2001. **15**(14): p. 2727-9.
33. Ailhaud, G., et al., *Angiotensinogen, angiotensin II and adipose tissue development*. Int J Obes Relat Metab Disord, 2000. **24 Suppl 4**: p. S33-5.
34. Fowden, A.L., D.A. Giussani, and A.J. Forhead, *Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences*. Physiology (Bethesda), 2006. **21**: p. 29-37.