

**Daniela Araujo Mirandola**

**Resistência à insulina durante a gestação e lactação de ratas Wistar: influências sobre o metabolismo da glicose e da insulina na prole adulta**

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

Área de Concentração: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

**São Paulo**

**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Mirandola, Daniela Araujo  
Resistência à insulina durante a gestação e lactação de ratas Wistar : influências sobre o metabolismo da glicose e da insulina na prole adulta / Daniela Araujo Mirandola. -- São Paulo, 2007.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Nefrologia.

Orientador: Joel Claudio Heimann.

Descritores: 1.Efeitos tardios de exposição pré-natal 2.Resistência à insulina 3.Prenhez 4.Sacarose 5.Sistema renina-angiotensina 6.Ratos Wistar

USP/FM/SBD-397/07

Para meus queridos pais *Antonio Norberto* e *Marlene*,  
pela sua dedicação, apoio, carinho e amor  
indispensáveis na minha formação e  
em toda minha vida.

Para meu querido irmão *Fabício*,  
pelo seu apoio e carinho.

Para meu querido *Daniel*, pelo seu ombro e  
ouvido amigos, pelo seu amor, carinho e  
apoio nos momentos certos.

Sem todos vocês não chegaria aqui.

## **Agradecimentos**

*Prof. Dr. Joel C. Heimann* por mais uma vez me abrir as portas de seu laboratório e me dar a oportunidade de ter realizado este trabalho. Obrigada pela sua confiança, paciência e pela sua orientação.

*Dra. Luzia Naôko Shinohara Furukawa* pela sua ajuda indispensável na realização deste trabalho, pelo seu apoio e incentivo. Obrigada pelo seu carinho e amizade.

*Dra. Elisabete Alcântara dos Santos* por ter me ensinado os primeiros passos do meio científico e por ser um grande exemplo a ser seguido.

*Mestre Ivone Braga de Oliveira* pela sua ajuda e bom humor constantes. Por fazer a diferença no dia-a-dia do laboratório.

À minha grande amiga *Dra. Karen Lucasechi Lopes Jang* pela sua ajuda nas dosagens, pela sua força e pelos desabafos. Sem você esta tese não teria a menor graça.

À aluna de iniciação científica *Carolina Martinez Romão* por ter aparecido no momento certo, me auxiliando no desenvolvimento deste trabalho e acima de tudo me ensinando muito.

*Dra. Miriam Serman Dolnikoff* e *Dr. Carlos Nascimento* pela contribuição na interpretação dos resultados.

*Prof. Dr. Rui Toledo de Barros* por ter me aceito como aluna de pós-graduação na disciplina de Nefrologia.

Aos amigos *Nauiilo Lima Costa* e a *Débora Rothstein Ramos* pelo seu carinho e boas risadas indispensáveis.

Aos colegas do Laboratório de Hipertensão Experimental, *Daniele, Édson, Heloísa, Isis e Michella* pelo apoio.

Aos queridos amigos *Dra. Luciene Machado e Wagner Dominguez* pelas boas conversas, pelo empréstimo de equipamentos e quebra-galhos.

À amiga *Dra. Fabiana Georgeti Gracioli* pelo seu apoio, longas conversas e boas risadas.

Aos colegas do LIM 10 *Sérgio Catanozi e Jussara Cordeiro Rocha* pela grande ajuda na dosagem de triglicérides e colesterol.

Aos amigos *Walter Campestre e Janice da Graça Pião da Silva* muito obrigada pela sua ajuda no cuidado com os animais e materiais utilizados neste trabalho, pelos desabafos, boas conversas e boas risadas.

Às secretárias *Denise Cristina Duarte e Marineide Ribeiro* pela ajuda e disponibilidade constantes. Muito obrigada pelo carinho de vocês!

Aos colegas do *LIM 16* pelos momentos de descontração e apoio.

A todos meus amigos e parentes pela força e apoio durante esta longa caminhada, em especial à amiga *Morgana Aparecida da Silva*.

À *FAPESP* pelo apoio financeiro.

A todos os *animais* utilizados neste estudo, pois sem vocês nada disso poderia ter sido realizado.

E acima de tudo a *Deus*, que sempre está iluminando meu caminho e me dando forças para lutar.

*“After climb a great hill,  
one only finds that there are  
many more hills to climb.”*

Nelson Mandela

# SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas  
Lista de Figuras  
Lista de Tabelas  
Resumo  
Summary

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO .....	8
3. MÉTODOS .....	9
3.1 Animais .....	9
3.2 Protocolo Experimental .....	10
3.3 Procedimentos e Dosagens .....	15
3.4 Análise Estatística.....	22
4. RESULTADOS .....	23
4.1 Grupo Materno.....	23
4.1.1 Evolução ponderal.....	23
4.1.2 Consumo de dieta e água.....	27
4.1.3 Glicemia e insulinemia pré-gestacional .....	27
4.2 Grupo Prole.....	31
4.2.1 Evolução ponderal.....	31
4.2.1.1 Peso neonatal.....	31
4.2.1.2 Peso ao desmame.....	31
4.2.1.3 Peso na idade adulta.....	31
4.2.2 Glicemia.....	35
4.2.2.1 Neonatal .....	35
4.2.2.2 Idade adulta.....	35
4.2.3 Insulinemia .....	35
4.2.3.1 Neonatal .....	35
4.2.3.2 Idade adulta.....	35
4.2.4 Leptina sérica .....	38
4.2.5 Triglicérides e colesterol.....	40
4.2.5.1 Oitava semana de vida.....	40
4.2.5.2 Décima semana de vida .....	40

4.2.6 Pressão arterial carotídea.....	43
4.2.7 Pressão arterial caudal.....	43
4.2.9 Sensibilidade à insulina (“clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico) .....	46
4.2.9.1 Glicemia basal.....	46
4.2.9.2 Insulina plasmática.....	46
4.2.9.3 Consumo periférico de glicose .....	48
4.2.10 Avaliação do sistema renina-angiotensina (SRA).....	50
4.2.10.1 Atividade da renina plasmática.....	50
4.2.10.2 Atividade da enzima conversora da angiotensina I (ECA).....	50
4.2.10.3 Expressão gênica (mRNA) dos componentes do sistema renina-angiotensina .....	53
4.2.11 Avaliação da obesidade.....	56
4.2.11.1 Massa de tecido adiposo .....	56
4.2.11.2 Índice de adiposidade.....	56
4.2.12 Massa renal, cardíaca e hepática .....	56
5. DISCUSSÃO .....	61
6. RESUMO DOS RESULTADOS .....	68
7. CONCLUSÃO.....	70
8. ANEXOS.....	71
9. REFERÊNCIAS .....	88



## Lista de Abreviaturas

AGT	Angiotensinogênio
ARP	Atividade da renina plasmática
AT1	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina II do tipo 2
CARD	Cardíaca
Clamp	“Clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico
ECA	Enzima de conversão da angiotensina I
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPM	Erro padrão da média
EUA	Estados Unidos da América
GON	Gonadal
HEPAT	Hepática
HIP-HIS-LEU	Hippuril-Histidil-Leucina
HO	Hipossódica
MALTO	Maltodextrina
MES	Mesentérica
NR	Normossódica
PA	Pressão arterial
PAC	Pressão arterial caudal
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAS	Pressão arterial sistólica
RET	Retroperitoneal
RT-PCR	Transcriptase reversa e reação em cadeia
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
SAC	Sacarose
SRA	Sistema renina-angiotensina
T3	Hormônio triiodotironina
VE	Ventrículo esquerdo
VLDL	Lipoproteínas de ultra baixa densidade
11 $\beta$ - HSDE	11 $\beta$ - hidroxisteróide-desidrogenase

## Lista de Figuras

Figura 1 -	Protocolo experimental do grupo materno.....	13
Figura 2 -	Protocolo experimental do grupo prole.....	14
Figura 3 -	Peso ao nascimento (g) da prole feminina (A) e masculina (B) cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	33
Figura 4 -	Concentração sérica de leptina (ng/dL) na 12 <sup>a</sup> semana de vida da prole feminina cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	39
Figura 5 -	Concentração sérica de leptina (ng/dL) na 12 <sup>a</sup> semana de vida da prole masculina cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	39
Figura 6 -	Captação de glicose (mg/kg/min) da prole feminina (A) e masculina (B) cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	49

## Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Peso corpóreo de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO) da 8ª semana até a 12ª semana de idade.....	24
Tabela 2 -	Peso corpóreo de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO) da 13ª semana até a 15ª semana de idade.....	25
Tabela 3 -	Peso corpóreo de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO) da 16ª semana até a 18ª semana de idade.....	26
Tabela 4 -	Consumo de dieta (g) e água (mL) pré-gestacional de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	28
Tabela 5 -	Glicemia (mg/dL) pré-gestacional de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	29
Tabela 6 -	Insulinemia (pmoles/L) pré-gestacional de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	30

Tabela 7 -	Peso (g) ao nascimento (neonatal), ao desmame (3 <sup>a</sup> semana) e na idade adulta (12 <sup>a</sup> semana) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	34
Tabela 8 -	Glicemia (mg/dL) ao nascimento (neonatal) e na idade adulta (12 <sup>a</sup> semana) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	36
Tabela 9 -	Insulinemia (pmoles/L) ao nascimento (neonatal) e na idade adulta (12 <sup>a</sup> semana) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	37
Tabela 10 -	Concentração sérica de leptina (ng/mL) na 12 <sup>a</sup> semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	38
Tabela 11 -	Triglicérides (mg/dL) e colesterol total (mg/dL) na 8 <sup>a</sup> semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	41

Tabela 12 -	Triglicérides (mg/dL) e colesterol total (mg/dL) na 10 <sup>a</sup> semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	42
Tabela 13 -	Pressão arterial média (PAM - mmHg), pressão arterial diastólica (PAD – mmHg) e pressão arterial sistólica (PAS – mmHg) na 12 <sup>a</sup> semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	44
Tabela 14 -	Pressão arterial caudal (Pac - mmHg) na 12 <sup>a</sup> semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	45
Tabela 15 -	Concentração plasmática de glicose (mg/dL) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	46
Tabela 16 -	Concentração plasmática de insulina (pmoles/L) da prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	47
Tabela 17 -	Concentração plasmática de insulina (pmoles/L) da prole de machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	47

Tabela 18 -	Captação de glicose (mg/kg/min.) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	48
Tabela 19 -	Atividade da renina plasmática (ng/mL/h) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	51
Tabela 20 -	Atividade sérica (nmol His-Leu/min./mL) e tecidual (nmol His-Leu/min./mg) da enzima conversora de angiotensina I na prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	52
Tabela 21 -	Densidade relativa (unidade arbitrária) da expressão gênica dos componentes do SRA renal (angiotensinogênio – AGT, renina, enzima conversora da angiotensina I – ECA, receptor da angiotensina tipo I – AT1, receptor da angiotensina tipo II – AT2 ) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).....	55
Tabela 22 -	Massa de tecido adiposo (g/100g de peso corpóreo) gonadal (GON), retroperitoneal (RET) e mesentérico (MES) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20%.....	58
Tabela 23 -	Índice de adiposidade [%= soma da massa dos tecidos adiposos (g) / massa corpórea (g) x 100] da prole de fêmeas e de machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).....	58

Tabela 24 - Massa (g/100g de peso corpóreo) renal (RENAL), cardíaca (CARD), ventricular esquerda (VE) e hepática (HEPAT) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO)..... 60

## Resumo

Mirandola DA. Resistência à insulina durante a gestação e lactação de ratas Wistar: influências sobre o metabolismo da glicose e da insulina na prole adulta [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 95 p.

Diversos estudos observaram uma correlação entre doenças na idade adulta e o ambiente durante a vida fetal. O estudo realizado por Barker e colaboradores foi um dos primeiros a relatar a hipótese de um possível envolvimento do ambiente intra-uterino com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, mas os mecanismos responsáveis por esta associação ainda não são totalmente conhecidos. Estudos demonstraram uma associação entre baixo peso ao nascimento com resistência à insulina e intolerância à glicose na vida adulta. Recentemente, verificamos que o consumo de dieta hipossódica, conhecido modelo de resistência à insulina, durante a gestação e lactação está vinculado a menor sensibilidade à insulina na prole adulta. Visto que a presença de resistência à insulina durante a gestação leva a diversas alterações metabólicas na prole adulta, pode-se supor que a sobrecarga de sacarose, um modelo de resistência à insulina, durante a gestação e lactação influencie no desenvolvimento da prole. Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar a repercussão da resistência à insulina, durante a gestação sobre a prole adulta. Para tanto, ratas Wistar foram alimentadas com dieta hipo (HO) ou normossódica (NR) suplementadas ou não com sacarose (NR+SAC - 20g/dL) ou maltodextrina (NR+MALTO - 20g/dL) desde a oitava semana de vida até o final da gestação e amamentação. Na prole resultante destes animais foi observado menor peso ao nascimento nos grupos HO, NR+SAC e NR+MALTO. Esta alteração resultou no desenvolvimento de maior insulinemia, pressão arterial e maior captação de glicose na prole de fêmeas das mães do grupo NR+SAC. Os machos apresentaram menor índice de adiposidade e maior expressão gênica renal dos componentes do sistema renina-angiotensina. Tais resultados nos permitem concluir que a sobrecarga de carboidratos durante a gestação e lactação está associada a alterações no peso ao nascimento e no metabolismo da insulina na idade adulta. É possível que a ativação do sistema renina-angiotensina materno induzido pela sobrecarga de carboidrato esteja associada a alterações deste mesmo sistema observado na prole adulta.

Descritores: 1.Efeitos tardios de exposição pré-natal 2.Resistência à insulina 3.Prenhez 4.Sacarose 5.Sistema renina-angiotensina 6.Ratos Wistar



## Summary

Mirandola DA. Insulin resistance during pregnancy and lactation in Wistar rats: influence on glucose and insulin metabolism in the adult offspring [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo" (Brazil); 2007. 95 p.

Many studies observed a correlation between diseases in adult subjects and the environment during the fetal life. Barker and coworkers hypothesized that there is a possible intrauterine environment association with cardiovascular diseases in adulthood. The mechanisms responsible for this association are still not very well known. Recently, we have verified that low-salt diet consumption, a well-known model of insulin resistance, during pregnancy and lactation is associated with a lower insulin sensitivity in the adult offspring. Since insulin resistance during pregnancy leads to many metabolic alterations in the adult offspring, we suppose that sucrose overload during pregnancy and lactation could influence the offspring development. The aim of this study was to verify the effects on adult offspring of insulin resistance during pregnancy and lactation. Female Wistar rats were fed low (LSD) and normal-salt diet (NSD) supplemented or not with sucrose (SUC - 20 g/dL) or maltodextrin (MALTO - 20 g/dL) until the end of pregnancy and lactation. Lower birth weight was observed in offspring of LSD, SUC and MALTO groups. Higher plasma insulin level, blood pressure and glucose uptake was detected in the adult SUC female offspring. SUC male offspring had lower adiposity index and higher gene expression of the renal renin-angiotensin components. These results show that carbohydrate overload during pregnancy and lactation is associated with alterations in birth weight and in insulin metabolism at adult life. It is possible that the maternal renin-angiotensin system activation by the carbohydrate overload is associated with alterations in the same system observed in the adult offspring.

Descriptors: 1. Prenatal exposure delayed effects 2. Insulin resistance 3. Pregnancy, animal 4. Sucrose 5. Renin-angiotensin system 6. Rats, Wistar

## 1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos têm observado que insultos ocorridos durante a vida intrauterina estão associados com diversas anormalidades, tanto funcionais quanto estruturais na vida adulta. O estudo realizado por Baker e colaboradores <sup>1</sup> foi um dos primeiros a relatar a hipótese de um possível envolvimento do ambiente intra-uterino com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Foram analisados registros de nascimentos de homens e mulheres acima de 40 anos tendo sido verificada uma associação inversa entre baixo peso ao nascimento e morbi-mortalidade cardiovascular na idade adulta.

A partir de suas observações, Barker formulou a seguinte teoria que, modificações na programação intra-uterina geram alterações na estrutura de órgãos e tecidos, que levam ao menor peso ao nascimento e a uma maior incidência de desenvolvimento de doenças na vida adulta. Esta passou a ser conhecida como Teoria de Barker <sup>2</sup>.

Numerosos estudos desenvolvidos posteriormente por outros pesquisadores comprovaram os achados de Baker e colaboradores, indicando que um ou mais fatores que ocorrem no ambiente perinatal, que se caracteriza pelo período de gestação e lactação, podem estar relacionados com a nutrição materna e/ou fetal e são responsáveis pelo maior risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta

dos indivíduos. Mas os mecanismos responsáveis por esta associação ainda não são totalmente conhecidos <sup>3</sup>.

O fator mais importante que regula o crescimento fetal é o aporte de nutrientes, que 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. A subnutrição do feto ocorre quando a demanda de nutrientes é maior que a oferta. O fornecimento de nutrientes pode estar comprometido por diversos fatores, entre os quais a desnutrição materna, a insuficiência placentária e a demanda elevada quando há um crescimento fetal mais rápido. O feto pode se adaptar à subnutrição mudando seu metabolismo, redistribuindo seu fluxo de sangue, reduzindo sua velocidade de crescimento, alterando a produção de hormônios e a sensibilidade dos tecidos a eles. Tais adaptações podem alterar permanentemente a estrutura e função do organismo com maior probabilidade de desenvolvimento da síndrome pluri-metabólica e doenças cardiovasculares na vida adulta <sup>1, 4</sup>.

A alteração no metabolismo de insulina e glicose é uma das adaptações fetais à subnutrição materna. Foi observado em experimentos realizados com animais que o retardo no crescimento fetal pode estar ligado à deficiência na secreção de insulina devido à redução na vascularização das células das ilhotas pancreáticas <sup>5</sup>. Em estudo realizado por Mi e colab. verificou-se que o baixo peso ao nascimento está associado a maior pressão arterial (PA), a maior concentração plasmática de insulina e glicose e

elevada concentração plasmática de triacilgliceróis na idade adulta. Também foi verificado neste mesmo estudo que a oferta de aminoácidos e ácidos graxos ao feto está comprometida nos casos em que as mães são desnutridas <sup>6</sup>. Outro mecanismo descrito na desnutrição materna é uma redução da atividade da enzima 11 beta-hidroxiesteróide-desidrogenase (11  $\beta$ -HSDE) na placenta, o que resulta em um aporte elevado de glicocorticóides ao feto. Isto pode ser responsável por alterações morfo-funcionais que podem explicar alguns dos fenômenos observados na vida adulta <sup>7</sup>. Tais estudos sugerem que o baixo peso ao nascimento e desnutrição materna durante a gravidez estão associados à resistência à insulina e reduzida tolerância à glicose na vida adulta da prole <sup>5-7</sup>.

Em diversos estudos observou-se que o rim menos desenvolvido e a supressão do sistema renina-angiotensina durante o desenvolvimento da prole são os principais fatores que levam à hipertensão na vida adulta dos animais que tiveram baixo peso ao nascer <sup>3, 8</sup>. Foi constatado em outros estudos que a retenção de sódio e água ocorre em indivíduos cujos rins têm menor número de glomérulos, o que resulta em maior pressão arterial <sup>9, 10</sup>.

A dieta hipersódica é um outro fator nutricional que desencadeia várias desordens tanto na mãe quanto no feto, como foi observado no estudo realizado em nosso laboratório por Silva e colaboradores <sup>11</sup>. Neste estudo foi observado maior pressão arterial, menor peso corpóreo, menor sensibilidade da pressão arterial ao sal, aumento no conteúdo renal de angiotensina II nos glomérulos e ausência de atividade moduladora da renina plasmática em resposta a variação no consumo de sal na dieta na

prole adulta de ratas Wistar que foram alimentadas com dieta hipersódica durante a gravidez e lactação.

Tais resultados podem ser explicados pela hipótese de que a diminuição da angiotensina II materna em resposta ao aumento de sal na dieta induz uma mudança na morfologia renal.

Em outro estudo desenvolvido em nosso laboratório, Vidonho e colaboradores <sup>12</sup> observaram que a restrição de sal durante a gestação e lactação está associada a menor sensibilidade à insulina na prole adulta. Estes animais apresentaram baixo peso ao nascimento e maior concentração plasmática de colesterol e triacilgliceróis.

É bem estabelecido que a restrição de sódio na dieta é um modelo de resistência à insulina. Em diversos estudos foi observado um aumento nas concentrações de peptídeo C e na insulina sérica de jejum em humanos sob esta dieta, sem alteração na glicose sérica <sup>13, 14</sup>, sugerindo que há resistência dos tecidos alvos à insulina na captação de glicose. Em trabalho realizado em nosso laboratório, Prada e colaboradores observaram que ratos machos submetidos à restrição crônica de sal apresentaram menor sensibilidade à insulina, além de maior peso corpóreo e maior massa dos tecidos adiposos. Neste mesmo estudo foi avaliada a possível participação do sistema renina-angiotensina (SRA), ativado pela dieta hipossódica, na menor sensibilidade à insulina dos animais que foram submetidos à restrição crônica de sal. Observou-se que losartan (inibidor do receptor AT1 da angiotensina II) não modificou a sensibilidade à insulina, o que significa que apenas este bloqueio não altera a captação celular de glicose. Já o captopril

(inibidor da enzima de conversão da angiotensina I), ao contrário do losartan, aumentou a captação periférica de glicose<sup>15</sup>.

Outro modelo bastante conhecido de resistência à insulina é o de sobrecarga de sacarose. Hall e Hall<sup>16</sup>, em um estudo utilizando ratos unilateralmente nefrectomizados, adicionaram vários açúcares à salina para aumentar o consumo de sal. Observou-se que o aumento da pressão arterial ocorreu somente com a ingestão de certos açúcares, entre eles a sacarose. Neste estudo o aumento da PA foi atribuído ao maior consumo de sal e não ao efeito direto dos açúcares. Em experimentos realizados por Beebe e colaboradores<sup>17</sup>, ratos foram alimentados com dieta rica em gordura, amido de milho ou sacarose e após dez semanas a pressão arterial média foi, respectivamente, 130, 133 e 140 mmHg. De acordo com o critério utilizado por estes autores, somente os animais que ingeriram sacarose foram classificados como ligeiramente hipertensos. Contrariamente ao que propuseram Hall e Hall, estes autores sugeriram que a sacarose era responsável pela elevação da pressão arterial. Esta proposição foi bastante defendida por Ahrens e colaboradores<sup>18</sup> quando demonstraram que ao final de sete semanas, ratos alimentados com 40% de amido e 0% de sacarose tinham a pressão arterial mais baixa do que os que receberam de 10 a 20% de suas calorias como sacarose. Quando os ratos que receberam 10% de sacarose passaram a receber 10% de maltose, a pressão arterial retornou aos valores basais comprovando assim o efeito pressórico da sacarose. Apesar de não se conhecer o mecanismo exato desta alteração, sabe-se

que esta geralmente vem acompanhada de hiperinsulinemia e resistência à insulina<sup>19, 20</sup>, além de níveis circulantes elevados de angiotensina II<sup>21</sup>.

A associação entre hiperinsulinemia, resistência à insulina e hipertensão está bem estabelecida em machos sendo que poucos trabalhos investigaram esta associação em fêmeas. Estudos realizados com modelos utilizando a sacarose como indutor de resistência à insulina e hipertensão têm indicado resultados conflitantes em ratas fêmeas. Hulman e Falkner, utilizando ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas alimentados com dieta rica em sacarose desde o desmame até a 13ª semana de vida (10 semanas de dieta), observaram um aumento da PA e indução da resistência à insulina, quando esta foi avaliada por meio do “clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico (clamp)<sup>22</sup>. No entanto, Horton e colaboradores verificaram anos mais tarde, também por meio do clamp, que o consumo de sacarose em excesso durante um período de 3, 5 ou 8 semanas por ratas Wistar com 6 semanas vida não produziu resistência à insulina, sugerindo que há um dimorfismo sexual na resposta metabólica ao consumo elevado de sacarose<sup>23</sup>.

Estudos sobre os efeitos do consumo excessivo de sacarose durante a gestação são escassos. Alguns trabalhos demonstraram uma exacerbação do efeito hipertrigliceridêmico característico deste período, aumentando a secreção hepática de VLDL-triglicérides e não alterando a evolução ponderal dos animais tratados, conforme demonstrado em alguns trabalhos<sup>24-26</sup>. No entanto, a massa da placenta e o peso ao nascimento da prole de ratas alimentadas com sobrecarga de sacarose foi menor<sup>24, 25</sup>. O

perfil glicêmico durante a gestação de animais submetidos à sobrecarga de sacarose não se altera durante o período de gestação e lactação, o que de acordo com Jen e colab., deve-se ao fato de que a concentração de frutose presente na molécula de sacarose não é alta o suficiente para provocar alterações na glicose plasmática, conforme se observa em animais que recebem somente sobrecarga de frutose<sup>25</sup>.

A molécula de frutose que compõem a sacarose tem sido sugerida como a responsável pelos efeitos deletérios associados à sacarose<sup>27</sup> e que seu perfil metabólico e hormonal depende da quantidade consumida<sup>28</sup>. Um período curto de consumo de sacarose, como maior fonte de carboidrato, é denominado período de indução e se caracteriza por um aumento dos níveis de triglicérides na corrente sangüínea, no coração e fígado, além de prejudicar a tolerância à glicose. O consumo de sacarose durante um período de duração intermediária (40 a 55 dias, período de adaptação) é caracterizado pela normalização das alterações citadas acima. Já o consumo durante período longo (90 a 120 dias, período de recorrência) causa novamente anormalidades metabólicas<sup>28</sup>.

Como verificado em diversos trabalhos aqui citados, os fatores nutricionais e o ambiente perinatal, de maneira associada, podem interferir no desenvolvimento de algumas patologias.



## 2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi verificar a repercussão da resistência à insulina durante a gestação sobre a prole adulta e elucidar os possíveis mecanismos envolvidos.

Para tanto, foi utilizado como modelo de resistência à insulina, a sobrecarga de sacarose administrada na água de beber, para verificar se seu consumo durante a gestação induz alterações metabólicas na prole.

O grupo que recebeu dieta normossódica e foi suplementado com maltodextrina, foi estudado com o intuito de verificar se os efeitos observados pela sobrecarga de sacarose se deviam à molécula de frutose da sacarose ou à molécula de glicose. A maltodextrina é um carboidrato formado por 2 a 15 moléculas de glicose.

Na prole, múltiplas medidas e avaliações foram realizadas para averiguar a função do sistema renina-angiotensina, a sensibilidade à insulina, entre outros.

### 3. MÉTODOS

Este projeto de estudo foi previamente aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa nº 450/03 – vide anexo).

#### 3.1 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar com 8 semanas de idade (recém desmamadas), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que ao completarem dois meses de idade foram divididas em três grupos de acordo com a dieta (Rhostr Indústria e Comércio Ltda., Vargem Grande Paulista, SP - Brasil ou Harlan Teklad, Madison, WI - EUA) que passaram a receber:

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

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

Dieta normossódica e sacarose 20% na água de beber (NR+SAC)

Dieta normossódica e maltodextrina 20% na água de beber (NR+MALTO)

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 com dieta e água *ad libitum*.

### 3.2 Protocolo Experimental

- **Grupo Materno (Figura 1)**

Quando completaram três meses de idade (12 semanas), foram acasaladas com ratos Wistar machos que receberam dieta normossódica desde o desmame. Para o acasalamento, uma rata e um rato permaneceram por três dias na mesma gaiola. O segundo dia de permanência na gaiola foi considerado como o primeiro dia de gravidez. Após o nascimento, apenas oito recém-nascidos (4 machos e 4 fêmeas) foram mantidos com suas mães.

As dietas com diferentes conteúdos de sal foram oferecidas para as mães até o desmame da prole, assim como a suplementação com sacarose ou maltodextrina. No período pré-gestacional, na 8<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas de vida, foram coletadas amostras de sangue por punção da veia caudal para dosagem de glicose e insulina em animais acordados. Para tanto, estes animais permaneceram em jejum durante um período de 6 horas. O peso destas ratas também foi avaliado semanalmente desde seu desmame até o desmame da prole.

Também foi realizada a avaliação do consumo de dieta e água dos animais, para tanto, somente uma rata foi acondicionada em gaiola de plástico. Esta avaliação foi realizada diariamente entre a oitava e décima-quinta semana de vida, exceto no período de acasalamento que foi desconsiderado, uma vez que outro animal foi colocado na mesma gaiola.

- **Grupo Prole (Figura 2)**

O tamanho da prole, o peso dos recém-nascidos e o número de natimortos foi avaliado nas primeiras 24 horas após o nascimento. Como já mencionado, apenas oito recém-nascidos foram mantidos com suas mães e foram acompanhados durante o estudo. Os animais excluídos foram sacrificados por decapitação e tiveram o sangue coletado para dosagem de glicose e insulina.

Depois do desmame, as proles dos diferentes grupos experimentais, passaram a receber dieta normossódica. O peso da prole foi medido a partir do nascimento até a 12<sup>a</sup> semana de idade. Na 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semanas de idade foram coletadas amostras de sangue para determinação da glicemia e insulinemia, após um jejum de 6 horas. Neste mesmo período também foram coletadas amostras para dosagem de colesterol e triglicérides após jejum noturno.

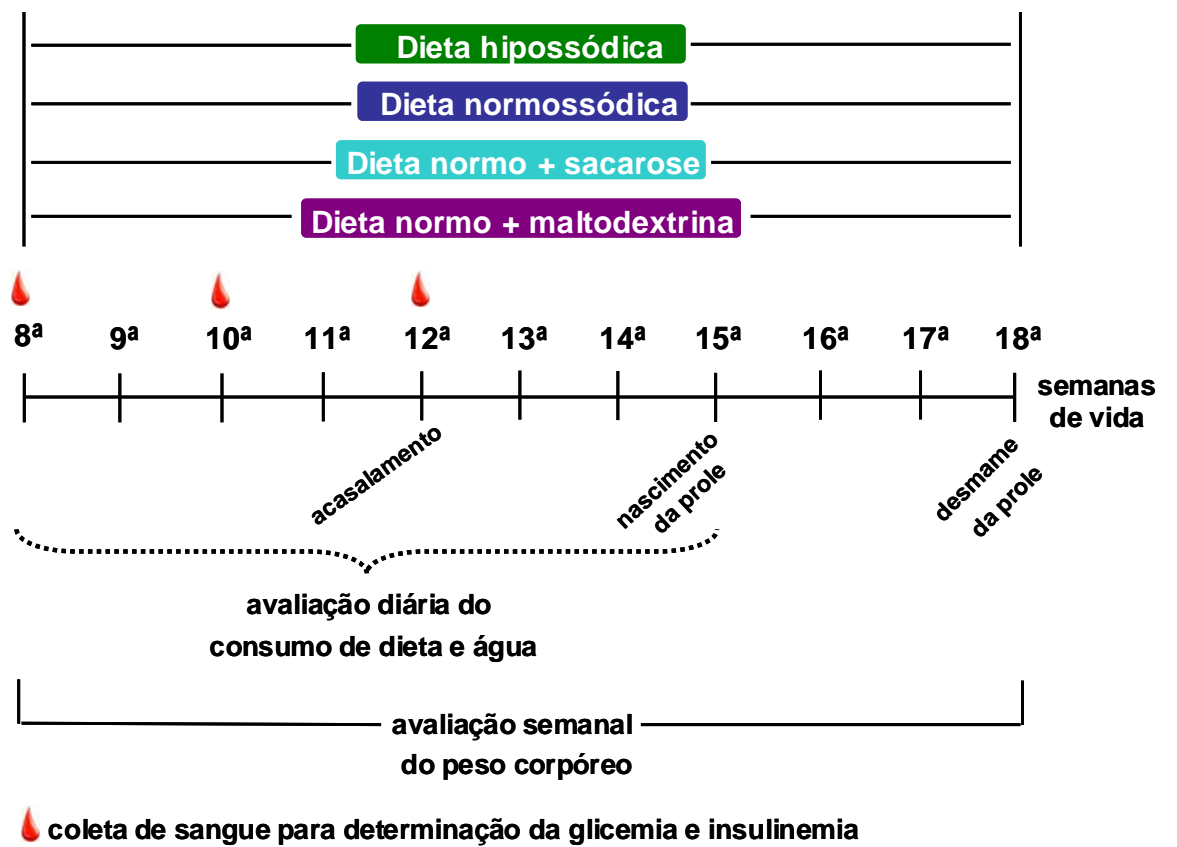
Um subgrupo de animais das diferentes proles com 12 semanas de vida foi utilizado para coleta dos tecidos adiposos das regiões epididimal ou periovariana, retroperitoneal e mesentérica, além dos rins, coração e fígado. Também foram coletadas amostras de sangue para dosagem da atividade de renina plasmática (ARP), da atividade da enzima conversora de angiotensina I (ECA) e leptina.

Um “clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico<sup>29</sup> foi realizado na prole com 12 semanas de vida para quantificar a sensibilidade à insulina. Para a realização desta técnica, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico onde foram implantados cateteres na veia jugular e na artéria

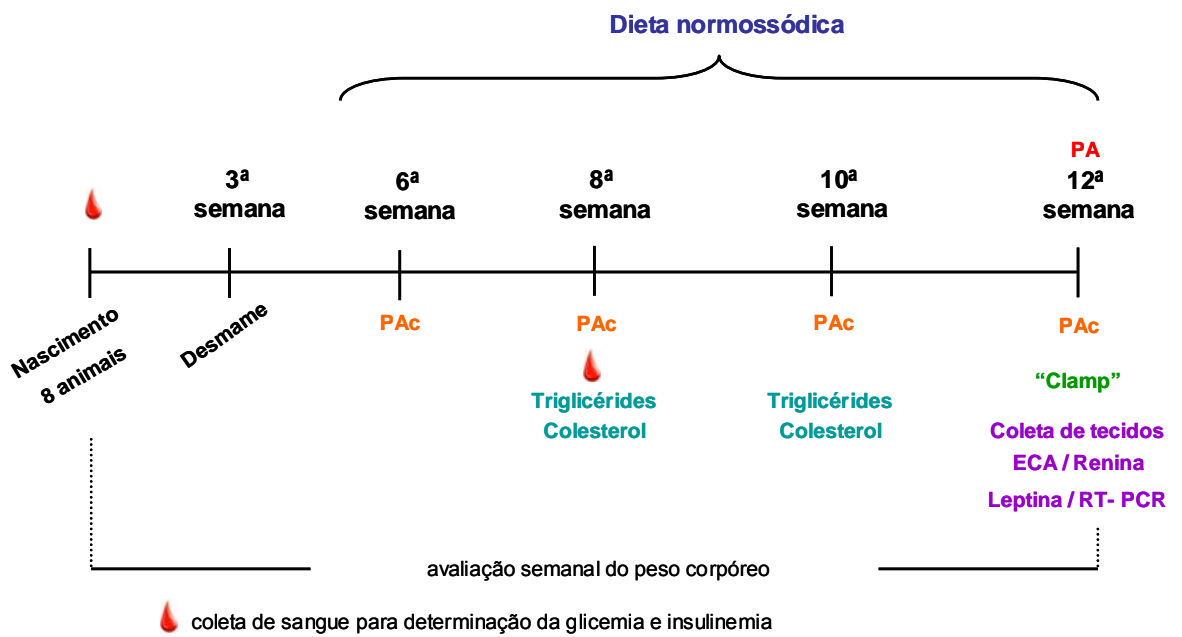
carótida. O experimento foi realizado após um período de recuperação de 3 a 5 dias.

No dia do experimento, após jejum de 6 horas, amostras de sangue foram coletadas para dosagem de glicose e insulina basais. Antes do início do clamp foi realizada uma medida de pressão arterial carotídea. Ao final do clamp foram colhidas amostras de sangue para dosagem de insulina. Após 24 a 48 horas estes animais foram decapitados para coleta de amostras de tecido (rim e coração) e de sangue para dosagem da ARP e atividade da ECA.

Animais que não foram submetidos ao processo cirúrgico tiveram a pressão arterial caudal (PAC) avaliada na 6<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semanas de idade.



**Figura 1.** Protocolo experimental do grupo materno



**Figura 2.** Protocolo experimental do grupo prole

### 3.3 Procedimentos e Dosagens

- **Procedimento cirúrgico para implantação de cateteres**

Os animais foram anestesiados com 70 mg/kg de cetamina (Ketamin, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, São Paulo, SP - Brasil) associada com 10 mg/kg de cloridrato de tiazina (Rompun, Bayer S.A. – Saúde Animal, São Paulo, SP - Brasil) por via intra peritoneal para implantação de cateteres de polietileno (PE-50, Intramedic Inc., EUA) na artéria carótida e na veia jugular. Os cateteres foram exteriorizados entre as escápulas e preenchidos com salina contendo 500 U/mL de heparina (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A, São Paulo, SP - Brasil).

Após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas individuais. O cateter implantado na artéria carótida foi utilizado para medida da pressão arterial direta (PA) e coleta de amostras de sangue. O cateter implantado na veia jugular esquerda foi utilizado para infusão de soluções.

- **Pressão arterial carotídea**

A medida de pressão arterial direta na artéria carótida foi avaliada na prole ao completar 12 semanas de vida, antes da realização do clamp.

Após um período de recuperação cirúrgica de três a cinco dias, o cateter foi conectado a um transdutor de pressão (Argon, modelo CDX III, Texas, EUA), que foi acoplado a um amplificador (Stemtech Inc., GPA-4 modelo 2, Wisconsin, USA), o qual forneceu um sinal analógico. Este sinal foi digitalizado utilizando-se um sistema computadorizado para aquisição e análise dos dados por meio do programa CODAS (DATAQ Instruments Inc.,



Ohio, EUA), permitindo a medida contínua da pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAD) após um período de 20 a 30 minutos de acomodação do animal. As medidas de pressão arterial foram efetuadas em animais conscientes sem restrição à movimentação.

- **Pressão arterial caudal**

A pressão arterial caudal e a frequência cardíaca foram medidas pelo método oscilométrico (RTBP2045 - Kent Scientific Corporation, Connecticut, EUA), sendo que os valores obtidos correspondem à pressão arterial sistólica. Antes da obtenção destas medidas, os animais foram treinados durante uma semana para se acostumarem com tal procedimento.

Na medida de PAc foi considerada a média de 4 aferições consecutivas. As medidas foram realizadas com os animais acordados e pré-aquecidos durante 10 a 15 minutos a 40 °C. Foram consideradas apenas as medidas obtidas na ausência de movimentação do animal.

- **Avaliação da sensibilidade à insulina (“clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico)**

No dia do experimento, pela manhã, a pressão arterial carotídea foi medida e a ração foi retirada 6 horas antes do início da realização do clamp. Antes de iniciar o experimento foi coletada uma amostra de sangue para determinação de glicose e insulina. Na veia jugular foi infundida uma solução de insulina suína monocomponente (Novo Nordisk Farmacêutica do Brasil Ltda., São Paulo, SP - Brasil) em velocidade constante de 3 mU/kg/min,

durante 120 minutos. Cinco minutos após o início da infusão da insulina foi iniciada a infusão de glicose 20 g/100 mL. A cada 5 minutos foram coletadas amostras de sangue (50  $\mu$ L) para determinação da glicose sangüínea por meio de um glicosímetro (Advantage, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, EUA). Esta foi mantida dentro de uma faixa de variação de 10% do valor da glicemia basal, sendo regulada pela velocidade de infusão da glicose. Foram colhidas amostras de sangue (0,6 mL) para determinação da insulina plasmática aos 105 e 120 minutos. A utilização periférica da glicose foi considerada igual à quantidade de glicose infundida nos últimos 30 minutos do clamp.

O hematócrito foi determinado antes e depois do experimento para verificar se houve hemodiluição decorrente das sucessivas coletas de amostras de sangue. As medidas de captação de glicose foram efetuadas em animais conscientes sem restrição à movimentação.

- **Determinações bioquímicas**

- Determinação da insulinemia e da glicemia

A dosagem da insulina foi realizada pelo método de radioimunoensaio através da utilização de "kit" da marca DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA - EUA).

O sangue foi coletado da artéria carótida durante o procedimento de clamp e por punção da veia caudal em outros momentos dos experimentos. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado para separação do soro. O soro foi estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da dosagem da insulina.

A glicemia, como mencionado anteriormente, foi determinada por meio de tiras reativas (Accu-Chek® Advantage II, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, EUA) analisadas em glicosímetro (Advantage, Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, EUA).

#### Determinação da atividade da renina plasmática

Um mL de sangue foi coletado por decapitação em tubos plásticos com 16 µL de EDTA pH 5,0 a 3,8% que foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 3.000 rotações por minuto. O plasma foi armazenado a -20°C e posteriormente realizou-se medida da atividade de renina plasmática usando “kit” de radioimunoensaio (CIS Bio International, Cèze, França).

#### Medida da atividade da enzima de conversão da angiotensina I (ECA)

O sangue foi coletado por decapitação em tubos de ensaio sem anticoagulante, mantidos em gelo e rapidamente centrifugados por 10 minutos a 3.000 rotações por minuto a 4°C. O soro foi armazenado a -80°C até as amostras serem processadas, o que ocorreu no prazo máximo de seis meses. A obtenção destas amostras foi feita nas proles ao completarem 12 semanas de vida.

O tecido renal e cardíaco foi coletado e homogeneizado em tampão borato com sacarose na proporção de 1g de tecido para 10 mL de tampão. As amostras foram homogeneizadas e em seguida centrifugadas a 2.500

rotações por minuto por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi separado e armazenado a -80°C até seu processamento.

A atividade da enzima foi determinada em 10 µL de soro ou 20 µL do sobrenadante de homogenatos de tecidos que foram incubados com 490 µL ou 480 µL, respectivamente, do substrato da ECA, Hippuril-Histidil-Leucina (Hip-His-Leu 5mM), a 37°C durante 15 minutos para o soro e 30 minutos para tecido. 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 enzimática, o His-Leu, e permite a sua leitura fluorimetricamente. Após 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 200 µl de HCl 3N, sempre sob agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 rotações por minuto, por 10 minutos. O sobrenadante foi então submetido à leitura da intensidade de fluorescência em espectrofluorímetro (Shimadzu Corporation, RF-1501, Kyoto, Japão) usando um comprimento de onda 365 nm para excitação e 495 nm para emissão.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, sendo que a fluorescência intrínseca das amostras foi corrigida por meio de controles onde os sobrenadantes dos homogeneizados de tecidos ou as amostras de soro foram adicionados logo após a reação ser paralisada com NaOH 0,34M, mantendo as demais etapas do ensaio inalteradas.

Uma curva padrão foi feita para cada ensaio, relacionando-se a intensidade da fluorescência com quantidades conhecidas do produto

formado (His-Leu). Os resultados foram expressos em nmol His-Leu/min/ml no soro e  $\eta$ mol His-Leu/min./mg de proteína nos tecidos.

A dosagem da proteína foi realizada nas amostras de tecidos onde se mediu a atividade da ECA, pelo método micrométrico de Bradford. Foram utilizados de 5 a 20  $\mu$ l de homogeneizado diluído em 795 a 780  $\mu$ l de PBS. Sendo acrescentados então 200 $\mu$ l de corante Coomassie® Brilliant Blue G-250. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, foi realizada leitura da absorbância no comprimento de onda de 595  $\eta$ m. Esta reação consiste na ligação da porção básica da proteína (amino) ao reagente. Uma curva padrão foi feita com concentrações conhecidas de solução da proteína, utilizando albumina sérica bovina.

#### Dosagem de triglicérides e colesterol total

Após os animais serem submetidos a um jejum de 12 horas, amostras de sangue (0,5mL) foram coletadas por punção da veia caudal em tubos contendo 5 $\mu$ L de EDTA 10%. As amostras coletadas foram centrifugadas por 3 minutos a 13.000 rpm em temperatura ambiente. O plasma foi armazenado a -20°C e posteriormente foi realizada a dosagem de triglicérides usando o “kit” comercial GPO-PAP (Roche Diagnóstica, Mannheim, Alemanha) ou Triglicérides Liquiform (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais - Brasil). O colesterol total foi dosado utilizando-se o “kit” CHOD – PAP (Roche Diagnóstica, Mannheim, Alemanha) ou Colesterol Liquiform (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Minas Gerais - Brasil).

### Dosagem de leptina sérica

Amostras de 1,0 mL de sangue foram coletadas por decapitação em tubos plásticos sem anticoagulante que foram centrifugados a 4°C por 10 minutos a 3.000 rotações por minuto. O plasma foi armazenado a -20°C e posteriormente realizou-se medida da concentração de leptina sérica usando “kit” de radioimunoensaio (LINCO Research, Missouri, EUA).

- **Expressão gênica (mRNA) da renina, angiotensinogênio, ECA e receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1) e 2 (AT2)**

A expressão gênica de todos os componentes do SRA no rim e coração foi avaliada através do método de transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) conforme descrito por Shaffer e colaboradores <sup>30</sup>. Os diversos reagentes utilizados foram adquiridos das empresas Invitrogen (Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo, SP - Brasil) e Labtrade (Labtrade do Brasil, São Paulo, SP - Brasil) e os *primers* utilizados na RT-PCR foram adquiridos de diferentes empresas (Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo, SP – Brasil; Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, IA – EUA; Imprint do Brasil Ltda., Campinas, São Paulo – Brasil; World Medical Representações S/C Ltda., Santo André, SP - Brasil).

- **Avaliação da obesidade**

Para acompanhar a evolução ponderal da prole, os animais foram pesados semanalmente desde o seu nascimento, até completarem 12 semanas de vida.

A obesidade foi quantificada através do índice de obesidade. Para calcular o índice de obesidade foi utilizada a seguinte equação: [soma da massa dos tecidos adiposos (g) / massa corpórea (g) x 100]. Foram utilizados os tecidos adiposos gonadal (periovariano ou epididimal), retroperitoneal e mesentérico.

### **3.4 Análise Estatística**

Na análise de variáveis de distribuição normal, a comparação de duas médias no mesmo grupo ou em grupos experimentais diferentes foi realizada, respectivamente, pelo teste "t" de Student pareado e não pareado. Quando o número de médias a serem comparadas era de três ou mais, o teste utilizado foi a análise de variância - de um ou dois fatores, conforme o caso - seguida de um adequado pós-teste.

Foi adotado como nível de significância  $p < 0,05$ . Todos os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 Grupo Materno**

#### **4.1.1 Evolução ponderal**

O peso corpóreo não foi diferente entre os grupos no período pré-gestacional (8<sup>a</sup> à 12<sup>a</sup> semana de idade) (Tabela 1).

No período gestacional (13<sup>a</sup> a 15<sup>a</sup> semana de idade) o peso corpóreo de fêmeas que receberam dieta HO foi menor quando comparado às fêmeas do grupo NR, na 15<sup>a</sup> semana de idade (Tabela 2).

Durante a lactação, este mesmo grupo de animais (HO) manteve o menor peso corpóreo, em todas as semanas avaliadas. Neste mesmo período, o grupo que recebeu dieta NR e foi suplementado com sacarose também apresentou menor peso quando comparado ao grupo NR, mas somente nas duas primeiras semanas (Tabela 3)



**Tabela 1.** *Peso corpóreo (g) de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO) da 8ª semana até a 12ª semana de idade.*

	<b>HO</b>	<b>NR</b>	<b>NR+SAC</b>	<b>NR+MALTO</b>
<b>8ª semana</b>	184,4±2,5 (15)	204,9±9,9 (14)	207,3±5,4 (11)	178,2±12,7 (3)
<b>9ª semana</b>	203,2±4,9 (15)	221,7±9,0 (14)	255,0±6,6 (11)	200,6±14,7 (3)
<b>10ª semana</b>	226,1±6,1 (15)	232,4±7,3 (14)	234,4±4,0 (11)	211,6±19,6 (3)
<b>11ª semana</b>	238,1±5,3 (15)	255,0±7,3 (14)	246,6±5,2 (11)	237,1±14,8 (3)
<b>12ª semana</b>	250,1±5,4 (15)	268,7±7,8 (14)	255,2±5,6 (11)	272,2±5,7 (3)

*Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados.*

**Tabela 2.** *Peso corpóreo (g) de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO) da 13ª semana até a 15ª semana de idade.*

	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>13ª semana</b>	276,3±7,5 (15)	291,7±8,9 (14)	268,3±5,7 (11)	302,3±2,4 (3)
<b>14ª semana</b>	307,1±11,0 (15)	325,7±12,3 (14)	294,1±10,4 (11)	353,2±21,5 (3)
<b>15ª semana</b>	319,2±10,9* (15)	359,5±13,0 (14)	352,6±16,9 (11)	359,9±35,6 (3)

*Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \*p<0,05 vs. NR.*

**Tabela 3.** *Peso corpóreo (g) de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO) da 16ª semana até a 18ª semana de idade.*

	<b>HO</b>	<b>NR</b>	<b>NR+SAC</b>	<b>NR+MALTO</b>
<b>16ª semana</b>	304,7±10,4* (15)	346,1±13,1 (14)	307,3±13,2* (11)	325,6±4,9 (3)
<b>17ª semana</b>	294,7±8,3* (15)	345,2±11,0 (14)	295,7±7,6* (11)	321,4±17,6 (3)
<b>18ª semana</b>	297,7±6,8 (15)	323,7±10,2 (14)	292,6±13,1 (11)	330,3±34,7 (3)

*Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \*p<0,05 vs. NR.*

#### **4.1.2 Consumo de dieta e água**

Durante todo o período observado, o consumo de ração foi menor nos animais que receberam dieta normossódica e foram suplementados com sacarose e maltodextrina, quando comparado aos grupos HO e NR, porém o grupo NR+SAC, na 14<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> semana de vida foi diferente somente do grupo HO.

O consumo de água foi maior nos animais do grupo NR+MALTO na 11<sup>a</sup> semana de vida, quando comparado aos grupos HO e NR. Na 15<sup>a</sup> semana, foi observado resultado semelhante, porém o grupo NR+MALTO apresentou maior consumo quando comparado a todos os grupos avaliados (Tabela 4).

#### **4.1.3 Glicemia e insulinemia pré-gestacional**

Na 10<sup>a</sup> semana de idade, menor glicemia foi observada nas ratas que receberam dieta HO do que nas ratas que receberam dieta NR e sacarose. (Tabela 5).

Comparado aos demais grupos, a insulinemia na 12<sup>a</sup> semana de idade foi maior nas ratas que receberam dieta normossódica e foram suplementadas com maltodextrina (Tabela 6).

**Tabela 4.** Consumo de dieta (g) e água (mL) pré-gestacional de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

	Dieta				Água			
	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>8<sup>a</sup></b>	16,71±0,93	17,46±0,71	12,06± 0,66*	10,77±0,56*	24,78±2,98	23,39±1,61	30,54±2,71	34,00±3,47
<b>semana</b>	(3)	(3)	(4)	(3)	(3)	(3)	(4)	(3)
<b>11<sup>a</sup></b>	17,47±1,08	15,23±0,99	9,23± 0,47*	9,39±0,29*	29,44±1,85	21,85±1,50	31,97±3,97	36,33±3,30*
<b>semana</b>	(3)	(3)	(4)	(3)	(3)	(3)	(4)	(3)
<b>13<sup>a</sup></b>	22,41±1,42	25,40±1,97	10,08±1,07*	10,46±0,79*	35,00±2,16	35,24±1,45	39,06±3,16	45,19±5,14
<b>semana</b>	(3)	(3)	(4)	(3)	(3)	(3)	(4)	(3)
<b>14<sup>a</sup></b>	17,62±1,26	23,53±2,62	12,97±1,37 <sup>#</sup>	9,85±1,18*	49,11± 4,42	37,52±4,34	44,42±5,48	58,13±6,11
<b>semana</b>	(3)	(3)	(4)	(3)	(3)	(3)	(4)	(3)
<b>15<sup>a</sup></b>	20,77±3,23	18,35±1,36	12,20±1,12 <sup>#</sup>	14,39±2,53	35,76± 5,45	30,63±2,30	42,39±3,73	63,00±6,42* <sup>§</sup>
<b>semana</b>	(3)	(3)	(4)	(3)	(3)	(3)	(4)	(3)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. HO e NR, <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. HO, <sup>§</sup> $p < 0,05$  vs. NR+SAC.

**Tabela 5.** Glicemia (mg/dL) pré-gestacional de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>8ª semana</b>	91,2±3,9 (12)	100,5±2,3 (11)	99,3±2,9 (12)	101,0±3,2 (3)
<b>10ª semana</b>	96,9±3,4* (12)	110,4±4,3 (12)	116,9±2,3 (14)	106,3±7,9 (3)
<b>12ª semana</b>	101,2±2,1 (18)	109,9±2,1 (14)	107,3±3,1 (19)	114,00±8,5 (3)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR e NR+SAC.

**Tabela 6.** Insulinemia ( $\mu\text{moles/L}$ ) no período pré-gestacional de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>8ª semana</b>	144,8±61,4 (9)	244,1±41,4 (9)	286,0±71,4 (9)	328,4±86,7 (3)
<b>10ª semana</b>	218,7±49,1 (8)	190,2±52,5 (11)	248,7±56,7 (13)	278,3±44,9 (3)
<b>12ª semana</b>	145,6±46,6 (9)	140,2±39,8 (8)	122,9±19,4 (15)	408,4±99,4* (3)

Os resultados obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. HO, NR e NR+SAC.

## **4.2 Grupo Prole**

### **4.2.1 Evolução Ponderal**

#### **4.2.1.1 Peso neonatal (Figura 3)**

Menor peso ao nascimento foi observado na prole de mães que receberam dieta HO, NR suplementada com sacarose e NR suplementada com maltodextrina, quando comparadas às proles cujas mães receberam dieta normossódica (Tabela 7).

Na prole de machos foi observado resultado semelhante, sendo que os animais de mães que receberam dieta HO foram diferentes somente do grupo NR+MALTO (Tabela 7).

#### **4.2.1.2 Peso ao desmame**

A prole de fêmeas de mães que receberam dieta NR e foram suplementadas com sacarose apresentou menor peso neste período (3ª semana de idade) quando comparadas às proles do grupo HO e NR. A prole de mães que receberam dieta NR e foram suplementadas com maltodextrina tiveram maior peso quando comparada a todas as proles avaliadas. O mesmo resultado foi observado na prole de machos (Tabela 7).

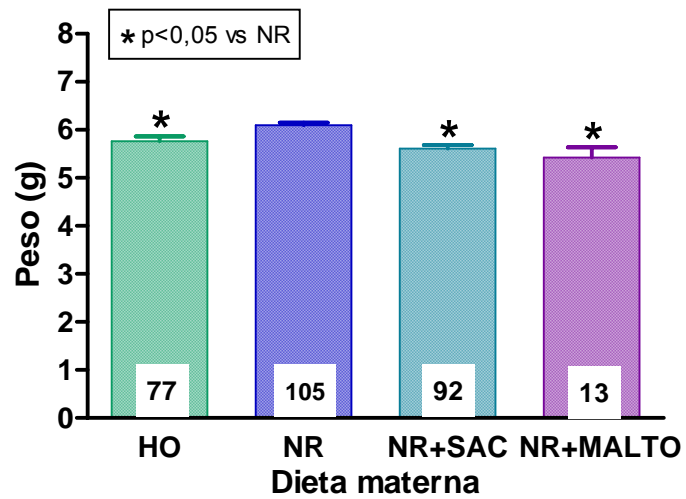
#### **4.2.1.3 Peso na idade adulta**

Com 12 semanas de idade, o peso corpóreo da prole de fêmeas de mães que receberam dieta NR e foram suplementadas com sacarose, foi menor peso quando comparado ao grupo HO e NR. Resultado semelhante foi observado na prole de machos, onde a prole das mães do grupo

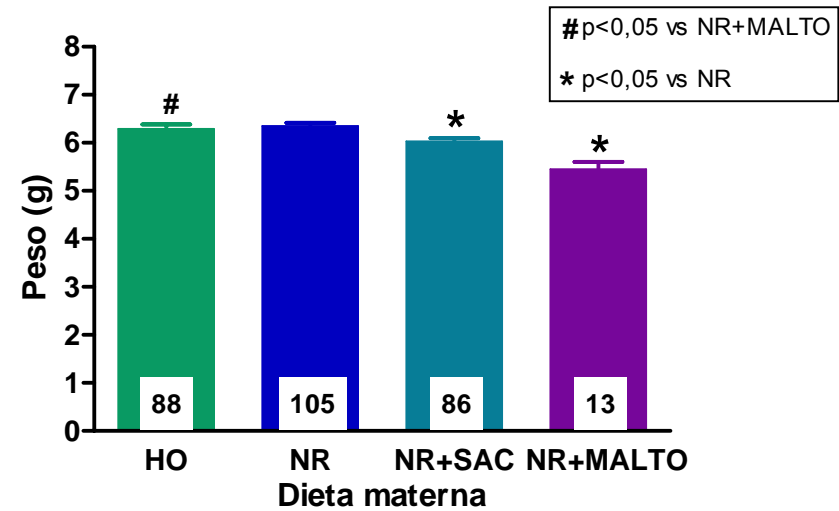


NR+SAC apresentou menor peso quando comparada ao grupo NR (Tabela 7).

A



B



**Figura 3.** Peso ao nascimento (g) da prole feminina (A) e masculina (B) cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

**Tabela 7.** Peso (g) ao nascimento (neonatal), ao desmame (3ª semana) e na idade adulta (12ª semana) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

	Fêmeas				Machos			
	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>Neonatal</b>	5,76±0,10*	6,10±0,05	5,61±0,07*	5,42±0,22*	6,29±0,09	6,35±0,06	6,03±0,07*	5,45±0,15* <sup>#</sup>
	(77)	(105)	(92)	(13)	(88)	(105)	(86)	(13)
<b>3ª semana</b>	41,28±0,79	42,98±1,06	36,42±1,42* <sup>#</sup>	52,71±1,84* <sup>#§</sup>	43,87±0,92	43,80±1,27	37,66±1,21* <sup>#</sup>	54,08±1,05* <sup>#§</sup>
	(47)	(39)	(45)	(12)	(39)	(39)	(44)	(9)
<b>12ª semana</b>	254,0±3,2	255,5±4,9	236,7±3,2* <sup>#</sup>	253,4±4,2	391,6±3,9	401,9±7,6	374,1±6,6*	410,3±5,7
	(47)	(37)	(48)	(12)	(39)	(36)	(46)	(9)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR, <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. HO, <sup>§</sup> $p < 0,05$  vs. NR+SAC.

## **4.2.2 Glicemia**

### **4.2.2.1 Neonatal**

Nenhuma diferença significativa foi observada na prole de fêmeas nos diferentes grupos avaliados. Na prole de machos não foi possível realizar a análise estatística, devido ao número insuficiente de animais estudados no grupo NR+MALTO, decorrente de uma maior proporção de fêmeas nascidas neste grupo (Tabela 8).

### **4.2.2.2 Idade adulta**

Neste período também não foi observada nenhuma diferença entre os diferentes grupos estudados, tanto na prole de fêmeas, quanto na prole de machos (Tabela 8).

## **4.2.3 Insulinemia**

### **4.2.3.1 Neonatal**

Não foi observada nenhuma diferença significativa na prole feminina. Na prole masculina, conforme descrito anteriormente, não foi possível realizar a análise estatística (Tabela 9).

### **4.2.3.2 Idade adulta**

A prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose, apresentaram maior insulinemia, quando comparada aos grupos NR e NR+MALTO. Nenhuma diferença foi observada na prole masculina (Tabela 9).

**Tabela 8.** Glicemia (mg/dL) ao nascimento (neonatal) e na idade adulta (12<sup>a</sup> semana) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

	Fêmeas				Machos			
	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>Neonatal</b>	65,7±5,7 (26)	74,5±3,7 (34)	70,1±3,2 (26)	69,0±8,1 (4)	61,3±4,1 (28)	77,4±2,8 (26)	71,5±3,1 (20)	62,0±0,0 (1)
<b>12<sup>a</sup> semana</b>	93,3±2,4 (16)	96,6±3,3 (16)	98,5±2,7 (22)	97,5±3,9 (12)	100,3±3,9 (14)	104,6±2,8 (15)	104,5±2,2 (20)	101,2±3,2 (9)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados.

**Tabela 9.** Insulinemia (pmoles/L) ao nascimento (neonatal) e na idade adulta (12ª semana) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

	Fêmeas				Machos			
	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>Neonatal</b>	65,2±17,4 (23)	56,3±12,5 (27)	70,6±14,9 (32)	66,2±0,0 (5)	91,1±30,8 (27)	87,8±24,4 (24)	98,3±38,9 (18)	29,9±0,0 (1)
<b>12ª semana</b>	162,9±37,2 (8)	117,6±30,6 (8)	271,4±39,8* (10)	87,3±13,5 (11)	157,2±21,7 (12)	166,6±32,2 (11)	164,9±26,4 (8)	140,9±14,5 (8)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR e NR+MALTO.

#### 4.2.4 Leptina sérica

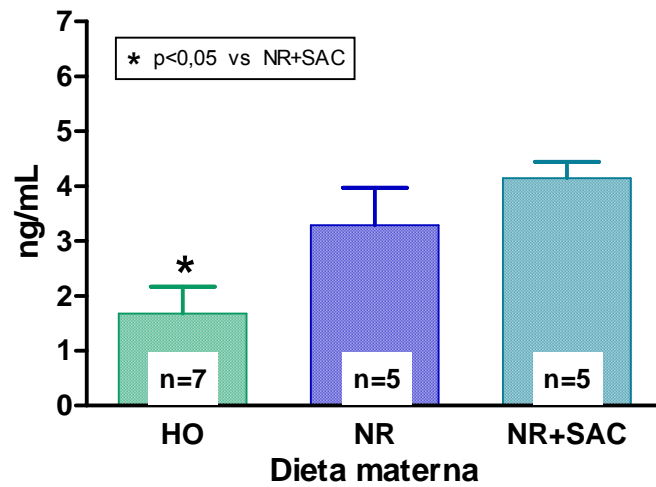
A prole de fêmeas (Figura 4) cujas mães receberam dieta hipossódica apresentou menor concentração de leptina quando comparada à prole de mães que receberam dieta normossódica suplementada com sacarose. Na prole de machos (Figura 5) destas mesmas mães observou-se o resultado oposto, ou seja, uma maior concentração de leptina, quando comparada ao grupo NR (Tabela 10).

**Tabela 10.** Concentração sérica de leptina (ng/mL) na 12ª semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

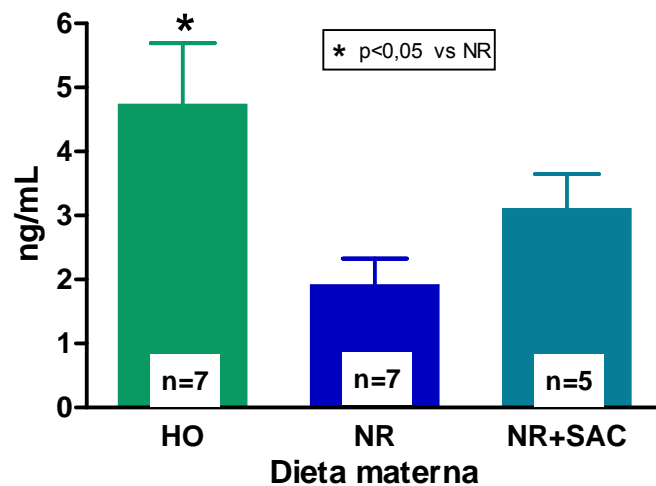
Fêmeas			Machos		
HO	NR	NR+SAC	HO	NR	NR+SAC
1,68±0,49*	3,28±0,68	4,15±0,29	4,73±0,96 <sup>#</sup>	1,91±0,41	3,10±0,55
(5)	(7)	(5)	(7)	(7)	(5)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR+SAC,

<sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. NR.



**Figura 4.** Concentração sérica de leptina (ng/dL) na 12<sup>a</sup> semana de vida da prole feminina cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).



**Figura 5.** Concentração sérica de leptina (ng/dL) na 12<sup>a</sup> semana de vida da prole masculina cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).



## **4.2.5 Triglicérides e colesterol**

### **4.2.1.1 Oitava semana de vida**

Na prole de fêmeas não foi observada nenhuma diferença nos níveis plasmáticos de colesterol, no entanto, o grupo NR+MALTO apresentou maior nível de triglicérides quando comparado aos grupos HO e NR+SAC (Tabela 10).

Já a prole de machos cujas mães receberam dieta hipossódica, apresentou maior nível plasmático de colesterol, quando comparado ao grupo NR, sem nenhuma alteração nos níveis de triglicérides (Tabela 11).

### **4.2.1.2 Décima semana de vida**

A prole de fêmeas cujas mães receberam dieta NR e foram suplementadas com maltodextrina, apresentou menor nível de triglicérides sem qualquer alteração nos níveis de colesterol. As alterações observadas previamente na prole de machos desapareceram com 10 semanas de vida (Tabela 12).

**Tabela 11.** Triglicérides (mg/dL) e colesterol total (mg/dL) na 8ª semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

Semanas	Fêmeas				Machos			
	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>Triglicérides</b>	74,2±8,1 (11)	90,1±19,4 (7)	66,9±6,7 (11)	135,7±10,9* (4)	91,1±11,4 (9)	77,0±12,9 (5)	96,3±11,5 (8)	75,3±6,9 (4)
<b>Colesterol</b>	88,2±6,6 (11)	98,3±6,9 (7)	86,8±5,8 (11)	92,9±2,4 (4)	75,7±11,4# (12)	105,7±12,9 (7)	82,8±11,5 (10)	84,7±6,9 (4)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. HO e NR+SAC, # $p < 0,05$  vs. NR.

**Tabela 12.** Triglicérides (mg/dL) e colesterol total (mg/dL) na 10ª semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

Semanas	Fêmeas				Machos			
	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>Triglicérides</b>	78,2±7,9 (11)	79,2±4,6 (11)	71,6±6,5 (11)	35,1±1,9* (4)	94,7±13,4 (11)	89,1±6,4 (11)	97,9±10,4 (11)	91,0±18,2 (4)
<b>Colesterol</b>	80,3±3,6 (11)	88,5±6,3 (11)	83,1±3,7 (11)	81,9±3,0 (4)	76,9±3,6 (11)	70,3±6,1 (11)	92,3±15,6 (12)	85,1±7,4 (4)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR, HO e NR+SAC.

#### **4.2.6 Pressão arterial carotídea**

Maior pressão arterial média foi observada nas proles de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose comparadas com as proles cujas mães receberam dieta HO ou NR. O mesmo resultado foi observado na PAS e PAD (Tabela 13).

Não houve nenhuma alteração nas proles de machos dos diferentes grupos experimentais (Tabela 13).

#### **4.2.7 Pressão arterial caudal**

Não foi observada nenhuma diferença na PAc dos grupos avaliados (Tabela 14).

**Tabela 13.** Pressão arterial média (PAM - mmHg), pressão arterial diastólica (PAD – mmHg) e pressão arterial sistólica (PAS – mmHg) na 12ª semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

	Fêmeas			Machos		
	HO	NR	NR+SAC	HO	NR	NR+SAC
<b>PAM</b>	104,8±3,31 (8)	103,3±3,35 (7)	137,1±5,13* (6)	112,0±1,60 (10)	117,9±3,76 (10)	125,0±6,38 (5)
<b>PAD</b>	86,3±2,69 (8)	85,3±3,74 (7)	119,1±5,31* (6)	93,5±1,69 (10)	99,9±4,33 (10)	108,1±8,07 (5)
<b>PAS</b>	121,5±4,24 (8)	121,5±2,51 (7)	153,5±6,58* (6)	130,6±2,43 (10)	135,8±3,29 (10)	140,7±4,90 (5)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. HO e NR.

**Tabela 14.** Pressão arterial caudal (P<sub>Ac</sub> - mmHg) na 12<sup>a</sup> semana de vida da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

Fêmeas				Machos			
HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
120,0±3,3	111,7±2,4	112,7±3,8	110,9±4,1	134,4±4,9	129,4±5,1	119,1±5,4	119,8±4,1
(8)	(5)	(7)	(12)	(6)	(5)	(8)	(9)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados.

## 4.2.9 Sensibilidade à insulina (“clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico)

### 4.2.9.1 Glicemia basal

Nenhuma diferença foi observada na concentração de glicose plasmática basal nas proles estudadas, conforme indicado na tabela 15.

**Tabela 15.** Concentração plasmática de glicose (mg/dL) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

Fêmeas			Machos		
HO	NR	NR+SAC	HO	NR	NR+SAC
91,4±3,7	95,0±4,7	102,3±8,5	90,0±3,3	94,6±3,9	91,6±3,8
(8)	(6)	(6)	(7)	(6)	(5)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados.

### 4.2.9.2 Insulina plasmática

A concentração de insulina plasmática durante o clamp (nos instantes 105 e 120 minutos) foi maior do que a insulinemia basal (avaliada antes do início do clamp) em todas as proles avaliadas (Tabelas 16 e 17). Estes resultados são consequência da infusão de insulina durante o clamp.

Também foi observada maior insulinemia basal na prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica suplementada com sacarose quando comparada com os demais grupos avaliados (Tabela 16).

**Tabela 16.** Concentração plasmática de insulina (pmoles/L) na prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

	Basal	105 min.	120 min.
<b>HO</b>	194,7±41,33 (6)	439,1±56,05* (6)	459,4±40,06* (6)
<b>NR</b>	172,6±24,37 (5)	417,5±89,51* (5)	429,6±81,98* (5)
<b>NR+SAC</b>	258,8±68,11 <sup>#</sup> (5)	495,7±96,28* (5)	557,4±119* (5)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. Basal, <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. HO e NR.

**Tabela 17.** Concentração plasmática de insulina (pmoles/L) na prole de machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

	Basal	105 min.	120 min.
<b>HO</b>	158,7±26,52 (9)	499,0±54,53* (9)	482,0±56,75* (9)
<b>NR</b>	205,9±47,62 (6)	470,0±85,01* (6)	495,5±70,60* (6)
<b>NR+SAC</b>	190,2±35,14 (5)	513,5±113,00* (5)	629,3±184,90* (5)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. Basal.



#### 4.2.9.3 Consumo periférico de glicose (Figura 6)

A captação de glicose, que representa a sensibilidade à insulina, foi maior na prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica e suplementadas com sacarose quando comparado aos demais grupos experimentais avaliados (Tabela 18).

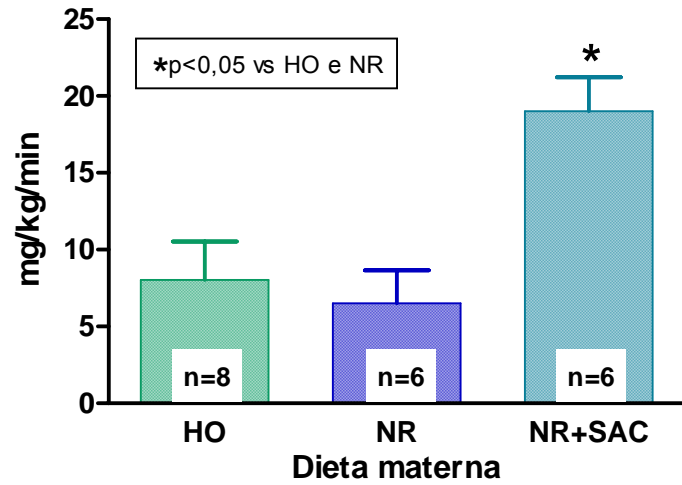
Na prole de machos não foi observada nenhuma diferença entre os grupos conforme indicado na tabela 18.

**Tabela 18.** Captação de glicose (mg/kg/min.) na prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

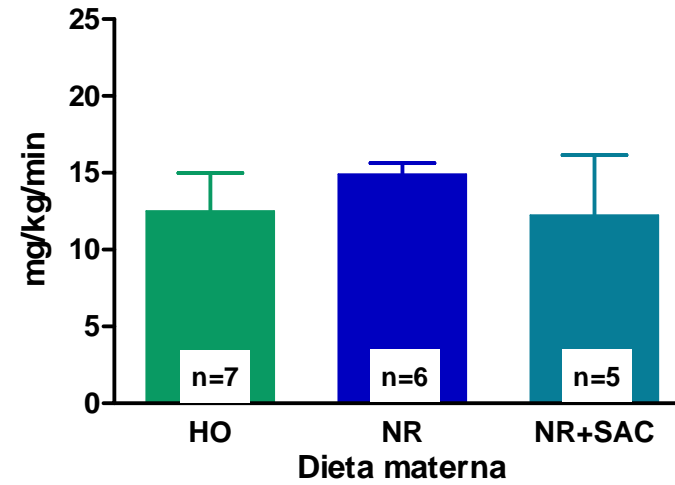
Fêmeas			Machos		
HO	NR	NR+SAC	HO	NR	NR+SAC
8,03±2,50	6,52±2,13	19,02±2,21*	12,52±2,47	14,91±0,71	12,24±3,91
(8)	(6)	(6)	(7)	(6)	(5)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. HO e NR.

A



B



**Figura 6.** Captação de glicose (mg/kg/min) da prole feminina (A) e masculina (B) cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

#### **4.2.10 Avaliação do sistema renina-angiotensina (SRA)**

##### **4.2.10.1 Atividade da renina plasmática**

A ARP foi maior nas proles adultas cujas mães receberam dieta HO em relação às proles cujas mães receberam dieta NR indicado na tabela 19.

##### **4.2.10.2 Atividade da enzima conversora da angiotensina I (ECA)**

A prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose apresentou maior atividade de ECA sérica do que no grupo NR. Nenhuma diferença entre grupos foi observada na atividade tecidual da enzima. O mesmo resultado foi observado na prole de machos (Tabela 20).

**Tabela 19.** Atividade da renina plasmática (ng/mL/h) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

Fêmeas			Machos		
HO	NR	NR+SAC	HO	NR	NR+SAC
6,14±1,06*	2,08±0,51	4,01±0,81	7,48±1,37*	2,51±0,50	6,52±1,23
(10)	(6)	(11)	(11)	(6)	(6)

Os resultados obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR.

**Tabela 20.** Atividade sérica (nmol His-Leu/min./mL) e tecidual (nmol His-Leu/min./mg) da enzima conversora de angiotensina I na prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

	Fêmeas			Machos		
	HO	NR	NR+SAC	HO	NR	NR+SAC
<b>Soro</b>	36,4±7,1 (5)	26,5±0,6 (3)	50,3± 3,1* (5)	37,3±1,2 (6)	43,7±5,3 (5)	56,7±2,6* (6)
<b>Rim</b>	468,9±18,6 (6)	509,9±53,3 (4)	866,4±161,5 (7)	549,4±69,2 (7)	442,8±45,1 (7)	552,3±85,4 (8)
<b>Coração</b>	23,8±8,7 (6)	8,91±2,5 (4)	15,7±5,2 (4)	93,1±31,9 (5)	143,1±64,1 (5)	78,3±16,0 (6)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR.

#### **4.2.10.3 Expressão gênica (mRNA) dos componentes do sistema renina-angiotensina**

- **Angiotensinogênio (AGT)**

Maior expressão gênica de AGT renal foi observada nas proles de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose, quando comparada à prole de fêmeas cujas mães receberam dieta hipo. Resultado semelhante foi observado na prole de machos deste grupo, sendo diferente não somente do grupo hipo mas também diferente das proles cujas mães receberam dieta normossódica (Tabela 21).

- **Renina**

Maior expressão gênica de renina renal foi observada na prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose. Na prole de fêmeas não foi observada nenhuma alteração (Tabela 21).

- **Enzima conversora da angiotensina I (ECA)**

Maior expressão gênica da ECA renal foi observada na prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose do que nos grupos NR e HO. Nenhuma diferença foi observada na prole de fêmeas (Tabela 21).

- **Receptor AT1 da angiotensina II**

Não foi observada nenhuma diferença na expressão gênica renal e ventricular do receptor AT1 entre os grupos avaliados (Tabela 21).

- **Receptor AT2 da angiotensina II**

Foi observada maior expressão gênica renal do receptor AT2 na prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose quando comparada aos grupos HO e NR (Tabela 21).

**Tabela 21.** Densidade relativa (unidade arbitrária) da expressão gênica dos componentes do SRA renal (angiotensinogênio – AGT, renina, enzima conversora da angiotensina I – ECA, receptor da angiotensina tipo I – AT1, receptor da angiotensina tipo II – AT2) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC).

	Fêmeas			Machos		
	HO	NR	NR+SAC	HO	NR	NR+SAC
<b>AGT</b>	0,41±0,02 (7)	0,40±0,01 (4)	0,65±0,09 <sup>#</sup> (7)	0,76±0,07 (7)	0,74±0,08 (7)	1,21±0,18* (6)
<b>Renina</b>	0,54±0,03 (7)	0,61±0,04 (4)	0,58±0,03 (7)	0,53±0,03 (7)	0,57±0,02 (7)	0,73±0,04* (6)
<b>ECA</b>	0,23±0,02 (7)	0,17±0,01 (4)	0,23±0,01 (7)	0,22±0,01 (7)	0,22±0,01 (7)	0,29±0,02* (6)
<b>AT1</b>	1,16±0,05 (7)	1,08±0,07 (4)	1,03±0,04 (7)	0,96±0,02 (7)	0,95±0,03 (7)	1,13±0,12 (6)
<b>AT2</b>	0,21±0,03 (8)	0,13±0,004 (5)	0,17±0,02 (8)	0,17±0,01 (8)	0,17±0,01 (8)	0,21±0,01* (7)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. HO e NR, <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. HO.



#### **4.2.11 Avaliação da obesidade**

##### **4.2.11.1 Massa de tecido adiposo**

Menor massa de tecido adiposo gonadal foi observada apenas nas proles de machos cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose em relação à prole cuja as mães receberam somente dieta NR (Tabelas 22).

##### **4.2.11.2 Índice de adiposidade**

Menor índice de adiposidade foi observado na prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose quando comparado a prole cujas mães receberam somente dieta normossódica. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na prole de fêmeas dos diferentes grupos avaliados, conforme indicado na tabela 23.

#### **4.2.12 Massa renal, cardíaca e hepática**

Menor massa renal (rim esquerdo) foi observada somente na prole de machos cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose, quando comparada à prole cujas mães receberam somente dieta NR (Tabela 24). O mesmo resultado foi observado na avaliação contralateral deste órgão (resultado não demonstrado).

O peso total do coração não diferiu entre os grupos de proles. No entanto, comparado a prole dos grupos HO e NR+SAC, a massa ventricular esquerda foi menor tanto na prole de fêmeas quanto na prole de machos

---

cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com maltodextrina (Tabela 24).

A prole de fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose apresentou menor massa hepática quando comparada à prole dos NR e NR+MALTO. Nenhuma diferença significativa foi observada na prole de machos (Tabela 24).

**Tabela 22.** Massa de tecido adiposo (g/100g de peso corpóreo) gonadal (GON), retroperitoneal (RET) e mesentérico (MÊS) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20%.

	Fêmeas				Machos			
	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>GON</b>	2,32± 0,16 (13)	1,92± 0,12 (16)	2,37± 0,16 (22)	1,91± 0,09 (12)	1,26± 0,08 (12)	1,48± 0,16 (15)	1,07± 0,04* (21)	1,19± 0,05 (9)
<b>RET</b>	1,14± 0,15 (13)	1,03± 0,08 (16)	1,09± 0,10 (22)	0,96± 0,06 (12)	1,09± 0,08 (12)	1,06± 0,08 (15)	0,85± 0,06 (21)	1,15± 0,14 (9)
<b>MES</b>	0,89± 0,05 (13)	0,96± 0,06 (16)	0,96± 0,06 (22)	0,85± 0,04 (12)	0,89± 0,07 (12)	0,95± 0,09 (15)	0,74± 0,04 (21)	0,80± 0,04 (9)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos

realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR.

**Tabela 23.** Índice de adiposidade [%= soma da massa dos tecidos adiposos (g) / massa corpórea (g) x 100] da prole de fêmeas e de machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

Fêmeas				Machos			
HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
2,32± 0,16	1,92± 0,12	2,37± 0,16	1,91± 0,09	1,26± 0,08	1,48± 0,16	1,07± 0,04*	1,19± 0,05
(13)	(16)	(22)	(12)	(12)	(15)	(21)	(9)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de

experimentos realizados. \* $p < 0,05$  vs. NR.

**Tabela 24.** Massa (g/100g de peso corpóreo) renal (RENAL), cardíaca (CARD), ventricular esquerda (VE) e hepática (HEPAT) da prole de fêmeas e machos cujas mães receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), normossódica suplementada com sacarose 20% (NR+SAC) ou normossódica suplementada com maltodextrina 20% (NR+MALTO).

	Fêmeas				Machos			
	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO	HO	NR	NR+SAC	NR+MALTO
<b>RENAL</b>	0,36± 0,015 (12)	0,36± 0,013 (16)	0,33± 0,006 (22)	0,33± 0,006 (12)	0,38± 0,015 (12)	0,41± 0,029 (15)	0,34± 0,010* (21)	0,35± 0,007 (9)
<b>CARD</b>	0,33± 0,015 (13)	0,33± 0,010 (16)	0,33± 0,007 (22)	0,32± 0,006 (12)	0,32± 0,011 (12)	0,33± 0,011 (15)	0,33± 0,008 (21)	0,31± 0,013 (9)
<b>VE</b>	0,26± 0,008 (8)	0,24± 0,007 (10)	0,25± 0,005 (16)	0,23± 0,004 <sup>§</sup> (12)	0,24± 0,010 (7)	0,23± 0,005 (9)	0,24± 0,005 (15)	0,21± 0,003 <sup>§</sup> (9)
<b>HEPAT</b>	3,45± 0,07 (18)	3,68± 0,08 (20)	3,32± 0,06 <sup>#</sup> (26)	3,67± 0,12 (12)	4,02± 0,12 (20)	4,12± 0,16 (14)	3,93± 0,09 (22)	4,36± 0,17 (9)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de experimentos realizado. \* $p < 0,05$  vs. NR, <sup>§</sup> $p < 0,05$  vs. HO e NR+SAC, <sup>#</sup> $p < 0,05$  vs. NR e NR+MALTO.

## 5. DISCUSSÃO

O consumo de dieta hipossódica, normossódica e normossódica suplementada com sacarose não altera a evolução ponderal das ratas no período pré-gestacional. Porém, no período gestacional, na 15ª semana de vida, comparado ao grupo alimentado com dieta normossódica, o peso corpóreo do grupo submetido à restrição de sal foi menor e assim se manteve até o final da segunda semana de lactação. Neste mesmo período da lactação, comparado ao grupo NR, o peso corpóreo do grupo que recebeu dieta normossódica e foi suplementado com sacarose também foi menor.

Uma possível explicação para este resultado observado nos animais do grupo que foi submetido à restrição de sal, seria um consumo reduzido de ração, o que não ocorreu. Desta forma, resta a explicação de um maior gasto energético que seria o responsável pelo menor peso corpóreo retro-mencionado. Diversos mecanismos podem aumentar o gasto energético, tais como aumento da atividade do tecido adiposo marrom em resposta a uma estimulação dos sistemas renina-angiotensina e nervoso simpático. É conhecido que restrição no consumo de sal estimula estes dois sistemas, mas há que se salientar que a diferença no peso corpóreo somente ocorreu durante a gestação e amamentação. Além disso, em estudo prévio <sup>31</sup> do nosso laboratório foi verificado que ratos Wistar machos alimentados com

dieta hipossódica desenvolvem obesidade o que é um resultado parcialmente conflitante com o observado neste estudo.

O peso corpóreo menor observado nas ratas alimentadas com dieta normossódica suplementada com sacarose na água de beber, talvez possa ser explicado pelo menor consumo de ração observado neste grupo. No grupo NR+MALTO o menor peso corpóreo está dissociado de alteração no consumo de ração que não foi diferente do verificado nos demais grupos.

Confirmando os resultados observados no presente estudo em ratas não-gestantes, Munilla e Herrera <sup>26</sup> também verificaram que a sobrecarga de carboidratos não influencia a evolução ponderal dos animais.

A menor glicemia observada no grupo submetido à restrição de sal e a maior insulinemia no grupo com suplementação de maltodextrina foram observadas somente antes da gestação. Estas alterações por ocorrerem somente em um momento específico prévio ao período de gestação e não persistirem, provavelmente não exerceram qualquer influência em suas proles.

A restrição de sódio e a sobrecarga de carboidratos durante a gestação e lactação está associado com diminuição de peso corpóreo da prole ao nascimento. Este mesmo resultado foi observado no estudo de Soria e colab. <sup>24</sup>, que observaram menor peso nos fetos de mães que receberam dieta rica em sacarose (630 g/kg de dieta) durante toda a gestação e no estudo de Vidonho e colab. <sup>12</sup> que submeteram as mães à restrição de sal. O baixo peso ao nascimento é um sinal da oferta restrita de nutrientes ou de oxigênio para o feto, que responde a isto com uma menor

divisão celular durante os períodos críticos da vida pré-natal<sup>32</sup>. A redução da oferta de nutrientes e oxigênio ao feto, pode estar relacionada a subnutrição materna<sup>33</sup> ou a fatores hemodinâmicos envolvendo o complexo uteroplacentário<sup>34</sup>. O que pode possivelmente explicar o baixo peso encontrado na prole de mães dos grupos HO, NR+SAC e NR+MALTO. Estudos adicionais são necessários para confirmação ou não desta explicação.

Uma possível correlação entre o consumo de dieta restrita em sal e da sobrecarga de sacarose durante a gestação com o baixo peso ao nascimento de suas proles, pode ser a ativação do sistema renina-angiotensina materno<sup>35-37</sup>. É conhecido que a angiotensina II inibe a invasão trofoblástica, o que pode comprometer a função placentária e a nutrição fetal<sup>38</sup>, levando a redução do peso ao nascimento. Além disso, em um trabalho desenvolvido por Holcberg e colab.<sup>39</sup> foi observado que a angiotensina II também age aumentando o fator- $\alpha$  de necrose tumoral em perfusato de cotilédones isolados de fetos normais. Sabe-se que o fator- $\alpha$  de necrose tumoral é uma poderosa citocina pró-inflamatória, que pode contribuir para a vasoconstrição do leito vascular placentário e para uma conseqüente isquemia fetal<sup>39</sup>. Sendo assim, estes mecanismos podem ser uma explicação para o baixo peso ao nascimento encontrado nestes grupos.

Dentre as proles que apresentaram baixo peso ao nascimento, somente a prole de mães que receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose, mantiveram menor peso durante todo seu desenvolvimento. A prole cujas mães receberam dieta normossódica e foram



suplementadas com maltodextrina, o peso corpóreo no desmame foi maior e na idade adulta não diferiu do grupo NR e HO. A recuperação ao longo do crescimento do peso corpóreo baixo ao nascimento, é denominado “catch-up growth” e provavelmente também ocorreu na prole de mães que receberam dieta hipossódica, pois estes animais também apresentaram peso normal na idade adulta. Este fenômeno é caracterizado por uma aceleração no crescimento, acima dos limites da normalidade para idade e/ou maturidade, durante um período definido de tempo, e seguida por uma progressiva desaceleração até se alcançar a taxa de crescimento normal, ocorrendo após um período de retardo no crescimento <sup>40</sup>.

O crescimento acelerado em decorrência a um baixo peso ao nascimento, observado no fenômeno de “catch-up growth”, leva a diversas alterações metabólicas na idade adulta, como obesidade e resistência à insulina. Tal fenômeno não foi observado na prole de mães que receberam dieta normossódica e foram suplementadas com sacarose.

A sobrecarga de sacarose levou a um aumento da insulinemia na idade adulta da prole de fêmeas e neste mesmo período foi observada maior captação de glicose quando comparada aos demais grupos avaliados. No estudo realizado por Fernandez-Twinn e colab. <sup>41</sup>, foi observada hiperinsulinemia na prole de fêmeas cujas mães foram submetidas à restrição protéica durante a gestação e lactação, que também apresentava baixo peso ao nascimento. Galipeau e colab. <sup>42</sup> observaram através do tratamento crônico com insulina exógena, que fêmeas Wistar hiperinsulinêmicas, permanecem mais sensíveis à insulina do que os

machos submetidos ao mesmo tratamento durante um teste de tolerância à glicose. Este dimorfismo sexual pode estar relacionado a diferenças na distribuição do tecido adiposo e/ou ao metabolismo de lípidos <sup>43</sup>.

A maior insulinemia provavelmente pode ter influenciado no aumento da pressão arterial (média, sistólica e diastólica) observada nestes animais na idade adulta, uma vez que é bem estabelecido que a insulina tem efeito pressórico ao estimular o sistema nervoso simpático <sup>44</sup>, promover o crescimento da vasculatura muscular lisa <sup>45</sup>, alterar o metabolismo do cálcio celular <sup>46</sup> e aumentar a reabsorção renal de sódio <sup>47</sup>.

Estudos prévios verificaram um vínculo entre baixo peso ao nascimento e resistência à insulina na vida adulta <sup>48</sup>. Por isso, a maior captação de glicose na prole de fêmeas cujas mães receberam sobrecarga de sacarose foi um resultado inesperado, podendo ser explicado pela ausência do fenômeno de “catch-up growth”. Este aumento de captação também pode se explicado pelo aumento de eficiência celular, pelo aumento da secreção de insulina pelas células  $\beta$  e/ou por uma menor degradação periférica da insulina.

Foi observado dimorfismo sexual na concentração circulante de leptina nas proles de mães alimentadas com dieta hipossódica. A prole de fêmeas apresentou menor concentração, enquanto os machos apresentaram resultado oposto. Tais resultados são semelhantes aos encontrados na literatura, onde se observa maior concentração de leptina em mulheres do que em homens. Este dimorfismo sexual se deve em parte a diferença de localização dos depósitos de gordura e também está correlacionada aos

níveis de testosterona. Nos homens, os níveis de leptina são inversamente correlacionados aos níveis de testosterona, sugerindo uma influência supressora da testosterona na expressão de leptina <sup>49</sup>. No presente estudo, verificou-se que a suplementação de sacarose nas mães está associada a uma diminuição do índice de adiposidade na prole de machos. Resultado semelhante foi observado por Anguita e colab. <sup>50</sup>, que estudaram a prole de machos e fêmeas cujas mães eram malnutridas (redução na ingestão de 50%). Neste estudo se observou também a diminuição da triiodotironina o que pode ser resultado de uma alteração na regulação hipotalâmica do controle energético, uma vez que é conhecido que o hipotálamo regula os hormônios tireoideanos e o uso de energia. Loireau e colab. <sup>51</sup> observaram que ratos geneticamente obesos e com disfunção no hipotálamo apresentavam menores níveis circulantes de hormônio tireoideano. Além disso, estes hormônios exercem um importante controle sobre a síntese do hormônio do crescimento na glândula pituitária e na síntese da maquinaria lipogênica no fígado e da lipólise no tecido adiposo branco <sup>52,53</sup>. Desta forma, baixos níveis de hormônios tireoideanos podem prejudicar o crescimento e interferir no controle do metabolismo de gordura.

Estes animais, além de apresentarem menor índice de adiposidade, surpreendentemente apresentaram maior expressão gênica dos componentes do SRA e maior atividade sérica da ECA. Resultado semelhante foi observado no estudo realizado por Grigore e colab. <sup>54</sup>, onde a prole masculina de mães com redução na perfusão placentária, apresentou maior expressão gênica da renina e angiotensinogênio renais na idade

adulta, além de maior atividade da ECA renal. Porém estes animais também desenvolveram hipertensão, o que não foi observado no presente estudo, o que pode ser devido ao fato do uso de um modelo de restrição de crescimento diferente.

A prole de machos cujas mães foram suplementadas com sacarose apresentou menor massa renal e na prole de fêmeas, observou-se menor massa hepática. No grupo tratado com maltodextrina foi observada menor massa ventricular esquerda, sem alteração no peso total do coração. Estas alterações estruturais observadas nestes órgãos podem estar relacionadas a programação intra-uterina, ou seja, durante o desenvolvimento, o DNA pode ser modificado epigeneticamente através de alterações na expressão gênica sem mudanças na sua seqüência. Estas mudanças ocorrem principalmente pela metilação das histonas da cromatina e também na transcrição do DNA e podem ser induzidas por fatores ambientais que levam a alterações quantitativas na síntese de proteínas. As modificações ocorridas na síntese protéica podem ser responsáveis por alterações estruturais e modificações na capacidade funcional do órgão <sup>55</sup>.

Os resultados obtidos neste estudo, permitem conjecturar que a frutose é a possível responsável pelas alterações metabólicas ocasionadas pela sobrecarga de sacarose. Tal afirmativa está embasada no fato de que a maioria das alterações observadas foi nos animais cujas mães foram suplementadas com sacarose e não com maltodextrina.

## 6. RESUMO DOS RESULTADOS

### Grupo Materno

Os principais resultados observados neste grupo foram:

- menor peso corpóreo nas ratas HO na última semana de gestação e durante toda a lactação.
- menor peso corpóreo nas ratas NR+SAC somente nas primeiras semanas de lactação.
- menor consumo de dieta nas ratas submetidas à sobrecarga de carboidratos (sacarose e maltodextrina) durante todo o período avaliado.
- menor glicemia na 10<sup>a</sup> semana de vida nas ratas HO.
- maior insulinemia na 12<sup>a</sup> semana de vida nas ratas NR+MALTO.

### Grupo Prole

Os principais resultados observados neste grupo foram:

- menor peso ao nascimento na prole dos grupos HO, NR+SAC e NR+MALTO, que persistiu até a idade adulta somente na prole NR+SAC.
- maior insulinemia na idade adulta na prole de fêmeas do grupo NR+SAC, que foi acompanhada de maior consumo periférico de glicose e aumento na pressão arterial.

- 
- menor concentração de leptina na prole de fêmeas do grupo HO e maior concentração nos machos desta prole, que também apresentou maior atividade de renina plasmática em ambos os gêneros.
  - maior nível de triglicérides na prole de fêmeas do grupo NR+MALTO, na 8<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semanas de vida.
  - maior atividade sérica da enzima conversora da angiotensina I na prole de fêmeas e machos do grupo NR+SAC.
  - maior expressão gênica renal de angiotensinogênio, renina, ECA e AT2 na prole de machos do grupo NR+SAC.
  - menor índice de adiposidade na prole de machos do grupo NR+SAC.
  - menor massa renal na prole de machos do grupo NR+SAC e menor massa hepática na prole de fêmeas deste mesmo grupo.
  - menor massa ventricular esquerda na prole de machos e fêmeas do grupo NR+MALTO.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que a sobrecarga de carboidratos durante a gestação e lactação está associada a alterações no peso ao nascimento e no metabolismo da insulina na idade adulta. É possível que a ativação do sistema renina-angiotensina materno induzido pela sobrecarga de carboidrato esteja associada a alterações deste mesmo sistema observado na prole adulta.

## 8. ANEXOS



HOSPITAL DAS CLÍNICAS  
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CAIXA POSTAL, 3471 – SÃO PAULO - BRASIL

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

### **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.06.03, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **450/03**, intitulado: "Resistência à insulina durante a gestação e lactação de ratas Wistar: influências sobre o metabolismo da glicose e da insulina na prole adulta" apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Pesquisador(a) Responsável: PROF. DR. JOEL CLÁUDIO HEIMANN

Pesquisador(a) Executante: SRA. DANIELA ARAUJO MIRANDOLA

CAPPesq, 26 de Junho de 2003.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

**OBSERVAÇÃO:** Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")



Artigo submetido para publicação na revista *Nutritional Metabolism and Cardiovascular Research*.

**“Sucrose overload during pregnancy and lactation: effects on adult female and male offspring in Wistar rats”**

**ABSTRACT**

A link between diseases in adulthood and the environment during fetal life is already known. This study examined the consequences of perinatal sucrose overload (SUC), a model of insulin resistance, on blood pressure (BP), body weight (BW), renal renin angiotensin system (RAS) gene expression and glucose uptake (euglycemic-hyperinsulinemic clamp) in adult offspring. After weaning, the offspring received only regular chow (C). BW (g) was lower at birth in the offspring from SUC dams (females: C  $6.1 \pm 0.05$ , SUC  $5.6 \pm 0.07$ ; males: C  $6.4 \pm 0.07$ , SUC  $6.0 \pm 0.07$ ) and this difference was maintained until 12 weeks of age (females: C  $255.5 \pm 4.9$ , SUC  $236.7 \pm 3.2$ ; males: C  $401.9 \pm 7.6$ , SUC  $374.1 \pm 6.6$ ). Higher BP (mmHg) and glucose uptake (GU - mg/kg/min) was observed in female offspring of SUC dams (BP - C  $103 \pm 3.4$ , SUC  $137 \pm 5.1$ ; GU - C  $6.5 \pm 2.1$ , SUC  $19.0 \pm 2.2$ ). Except for AT1, higher renal RAS components gene expression (arbitrary units) was observed in male offspring of SUC dams (angiotensinogen: C  $0.74 \pm 0.07$ , SUC  $1.21 \pm 0.18$ ; renin: C  $0.58 \pm 0.02$ , SUC  $0.73 \pm 0.04$ ; angiotensin converting enzyme: C  $0.22 \pm 0.01$ , SUC  $0.29 \pm 0.02$ ; angiotensin-II type I receptor: C  $0.95 \pm 0.03$ , SUC  $1.13 \pm 0.12$ ; angiotensin-II type II receptor: C  $0.17 \pm 0.01$ , SUC  $0.21 \pm 0.01$ ). Only angiotensinogen and ACE renal gene expression were higher in female offspring of SUC dams (angiotensinogen: C  $0.40 \pm 0.01$ , SUC  $0.65 \pm 0.09$ ; angiotensin converting enzyme: C  $0.17 \pm 0.01$ , SUC  $0.23 \pm 0.01$ ). In conclusion, maternal sucrose overload during

pregnancy and lactation has long-term influences on arterial pressure, glucose metabolism, and renal renin-angiotensin system of the offspring.

## **INTRODUCTION**

It is known that in many countries, chronic diseases are among the major health problems. Several studies have observed that there is a link between these diseases and the environment during fetal and/or early neonatal life [1-3]. Low birth weight is one of the phenotypes related with functional and structural alterations later in life. The most common causes leading to low birth weight are global undernutrition through a 30 to 50% reduction in regular chow intake or low-protein diet consumption during pregnancy. Undernutrition during some critical periods of development leads to functional and structural alterations in the fetus, increasing the risk of diseases in adulthood. It was also shown that salt restriction during pregnancy is associated with low birth weight in male and female offspring [4, 5]. In the study of Vidonho Jr. et al., it was observed that adult male but not female offspring of salt restricted dams during pregnancy have lower insulin sensitivity with no alterations in blood pressure and body weight [4]. Beside the hemodynamic effects, salt restriction is also a well-known model of insulin resistance [6]. Therefore, the metabolic effects of low salt intake during pregnancy may be an explanation for the results previously described by Vidonho Jr. et al. [4]. The mechanisms by which salt restriction during pregnancy reduces birth weight and increases insulin resistance in adult male offspring are not fully understood. High fructose or sucrose intake is another model of insulin resistance [7,8] that is associated with high blood pressure, hypertriglyceridemia [9,10] and high angiotensin II levels [11].

In order to get some more insight on the effects of insulin resistance during the perinatal period on phenomena that occur later in life, the aim of this study was to

observe the effect of high sucrose intake during pregnancy on metabolic alterations in adulthood.

## **METHODS**

**Maternal groups:** Female Wistar rats obtained from the Institutional Animal Facility were fed a regular rat chow (control – C, Rhoister, Vargem Grande Paulista, SP – Brazil or Harland Teklad, Madison, WI – USA) since weaning. Starting at eight weeks of age, a subgroup of female rats received a 20% sucrose solution for drinking (SUC). The animals were housed under controlled conditions of temperature (25°C) and lighting (lights on at 06:00 AM and lights off at 06:00 PM) with free access to food and tap water or 20% sucrose solution. Body weight was evaluated since eight weeks of age until the end of lactation. For food intake determination, the animals were housed in individual plastic cages and food intake was measured from the 8th week of age until one week before matching and during the whole pregnancy.

**Offspring groups:** After birth, only eight pups (four male and four female) were kept with their mothers. In the exceeding animals, blood samples were obtained by decapitation, within the first 24 hrs after birth in no fasting condition, for determination of neonatal blood glucose and plasma insulin levels. After weaning, all offspring received C. Body weight was evaluated at 12 weeks of age. With 12 weeks of age, catheters were inserted under anesthesia (pentobarbital, 50 mg/kg body weight) into the jugular vein and carotid artery for blood pressure measurement and to perform a euglycemic-hyperinsulinemic clamp.

**Intra-arterial mean BP:** Three to five days after catheter insertion, intra-arterial mean BP (MBP) was measured in conscious, freely moving animals. The catheter was attached to a pressure transducer (Gould Statham Instruments Inc., model P23DB, Hato Rey, Puerto Rico, USA) that was connected to an amplifier (Stemtech Inc., GPA-4 model 2, Menomonee Falls, WI, USA) that provided the analog BP

signal, which was digitized by a computer-based monitoring system (DATAQ Instruments, Akron, OH). The average of MBP determinations during 10 minutes was used for calculations.

**Euglycemic-hyperinsulinemic clamp:** On the same day of MBP determination, a euglycemic-hyperinsulinemic clamp was performed after 6 hrs of fasting with free access to water, in conscious freely moving animals. Briefly, after blood sample collection for determination of basal glucose and insulin levels, a continuous infusion of regular human insulin ( $3.0 \text{ mU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  - Actrapid, Novo Nordisk A/S) was performed through the jugular catheter during 2 hrs. Insulin was diluted in  $26.61 \mu\text{mols/L}$  of BSA solution. For maintaining serum glucose levels similar to basal values, a glucose infusion ( $1.11 \text{ mmols/L}$  D-glucose) was started 5 minutes after the beginning of the insulin infusion through the jugular vein. The infusion rate was corrected by a servo-controlled negative feedback principle based on plasma glucose that was measured every 5 minutes. Blood samples for plasma insulin determinations were collected at 90, 105, and 120 min after the beginning of the clamp for confirmation of the steady state. The amount of glucose infused during the steady state was considered as the peripheral glucose uptake. Experiments in which the coefficient of variation of blood glucose or plasma insulin during the steady state was more than 10% were excluded.

**Adiposity index:** 2 to 3 days after the euglycemic-hyperinsulinemic clamp, the animals were decapitated and the retroperitoneal, mesenteric and perigonadal adipose tissues were excised. The tissues were weighed and the adiposity index was calculated by the following formula: total adipose tissue mass (g) / body weight (g) x 100.

**Renin-angiotensin renal gene expression:** Total RNA was extracted from left kidney using Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) according to the

manufacturer's instructions. Quality and concentration of total RNA were assessed by spectrophotometry. Total RNA was reverse transcribed to cDNA using Superscript II RNA-reverse transcriptase (Invitrogen). The mRNA levels of angiotensinogen (primers: sense 5'-AGC ACG ACT TCC TGA CTT GG-3' and antisense 5'-TAG ATG GCG AAC AGG AAC GG-3', product of 313 bp), renin (primers: sense 5'-CAT TAC CAG GGC AAC TTT CAC-3' and antisense 5'-TCA TCG TTC CTG AAG GGA TTC-3', product of 332 bp), angiotensin converting enzyme (ACE - primers: sense 5'-ACA GCT ATA ACT CGA GTG-3' and antisense 5'-ATG TCG TAA ATG TTC TCC-3', product of 746 bp) and angiotensin receptor one (AT1 - primers: sense 5'-TCG AAT TCC ACC TAT GTA AGA TCG CTT C-3' and antisense 5'-TCG GAT CCG CAC AAT CGC CAT AAT TAT CC-3', product of 446 bp) and two (AT2 – primers: sense 5'-GCA TGA GTG TTG ATA GGT ACC AAT CGG-3' and antisense 5'-CCC ATA GCT ATT GGT CTT CAG CAG ATG-3', product of 325 bp) were measured. Amplification was performed using *Taq* polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.) for 24–35 cycles with an automated thermal cycler (PTC-200, Peltier Thermal Cycler, BIO-RAD, Hercules, CA, U.S.A.). Each cycle consisted of the following steps: denaturation at 94°C, annealing between at 51.5 and 63°C depending on the gene, and extension at 72°C. The same RT mix and PCR mix were added to all samples. Amplification product was loaded onto a 2% agarose gel stained with ethidium bromide. The density of each PCR band was measured and analysed by AlphaEase (Alpha Imager™ 1220, Alpha Innotech, San Leandro, CA, U.S.A.) software using  $\beta$ -actin gene (primers: sense 5'-TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG-3' and antisense 5'-TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT-3', product of 331 bp) as a standard. As a negative control, amplification was done without cDNA but with all other reagents.

**Plasma renin activity assay**

Plasma renin activity was measured by a commercial radioimmunoassay kit (CIS Bio International, France).

**Angiotensin-converting enzyme activity assay**

Angiotensin-converting enzyme activity was determined by a fluorometric assay based on the rate of generation of His-Leu by hydrolysis of Hip-His-Leu substrate (Sigma Chemical, St Louis, USA) [12]. Serum (10  $\mu$ L) was incubated during 15 minutes with 490  $\mu$ L of assay buffer, containing 5 mM Hip-His-Leu in 0.4 M sodium borate buffer, pH 8.3 and 0.9 M NaCl at 37°C. The reaction was halted by the addition of 1.2 mL of 0.34 N NaOH. *o*-phthaldialdehyde (100  $\mu$ L, 20 mg/mL, Sigma Chemical) was then added to the aliquots. The reaction was interrupted with 3 N HCl and the fluorescence of the His-Leu product was measured at 495 nm with an excitation wavelength of 365 nm (Shimadzu, model RF-1501, Japan). All assays were performed in triplicate.

**Glucose and insulin determination:** Blood glucose concentration was measured by a glucometer (Advantage; Eli Lilly do Brasil Ltda, São Paulo, Brazil). Insulin was measured by RIA kits for rat insulin (Linco Research, St. Charles, MO).

**Statistical analysis:** Values are expressed as means  $\pm$  standard error of the mean. Comparison between two means was made by unpaired *t* test. Null hypothesis was rejected at  $p < 0.05$ .

**RESULTS**

**Maternal groups:** Body weight was not different between maternal groups during the whole follow-up period, but daily food intake was lower in the SUC compared with the C group. No differences were observed in water and sucrose intake (Table 1).

**Offspring groups:** Birth weight was lower in both male and female offspring from SUC compared with offspring from C dams. Neonatal blood glucose and plasma

insulin were not influenced by sucrose intake during pregnancy in both male and female offspring (Table 2).

At 12 weeks of age, body weight was still lower in the SUC compared to the C offspring in both genders. Blood glucose was not different between both adult offspring groups. Sucrose intake during pregnancy was associated with higher plasma insulin levels in adult female but not in male offspring (Table 2). Although, body weight was lower in both genders of adult offspring of the SUC group, adiposity index was lower only in male SUC compared with C offspring. In adult male, although not significant, serum leptin was 63% higher in the SUC than in the C group. In female offspring, serum leptin was not influenced by sucrose overload during the perinatal period (Table 2). A higher glucose uptake was observed in SUC compared to C female but not in male offspring (Table 2).

In adult offspring, intra-arterial mean BP was higher in SUC than in C females (SUC:  $137 \pm 5.1$ , n=6; C:  $103 \pm 3.4$ , n=7 - mmHg). No differences were observed in mean BP of adult male offspring (SUC:  $125 \pm 6.4$ , n=5; C:  $118 \pm 3.8$ , n=10 - mmHg).

Plasma renin activity was higher in male but not in female offspring of SUC compared to C dams (Table 2). Serum ACE activity was higher in male and female offspring of SUC dams compared to the control group (Table 2).

As shown in table 3, angiotensinogen and ACE gene expression were higher in female offspring from the SUC compared with the C group. In male offspring of the SUC group, gene expressions of all RAS components, except for AT1, were higher compared with the C group.

## **DISCUSSION**

It was observed in the present study that birth weight was lower in male and female offspring of dams that received a 20% sucrose solution for drinking during pregnancy. This observation was similar to what was verified in a previous study in offspring of dams fed a low salt diet during the same period [4]. Another similarity

between both studies is a gender dimorphic effect in adult offspring in response to feeding changes of dams during pregnancy. Compared to the C, adult female offspring of the SUC group had higher plasma insulin, peripheral glucose uptake and mean blood pressure. On the other side, compared to C, adult male offspring of the SUC group had higher gene expression of the renal components of the renin-angiotensin system and lower adiposity index.

Low birth weight is a consequence of restricted offer of nutrients and/or oxygen to the fetus, which responds with slower cell division during critical periods of prenatal life [13]. A wide variety of factors, apart from maternal undernutrition during pregnancy, can also cause fetal undernourishment. These include poor maternal nutritional reserves, inadequate uterine blood flow, or defective placental transfer of nutrients. As a consequence of the operation of one or more of these factors, the nutrient demand of the fetus might exceed the nutrient supply, with detrimental consequences for fetal growth and development. Since maternal food intake in the SUC was lower than in the C dams, undernutrition is a possible explanation for the lower birth weight in this group but it is unlikely because no difference in body weight was observed. The absence of body weight changes in response to high dietary sucrose intake was also observed by Munilla and Herrera [14] that fed Sprague-Dawley rats with a sucrose rich diet during pregnancy and by Jen *et al.* [15] that fed the same strain of rats with the same diet during pregnancy and lactation. It was not among the aims of the present study to evaluate the mechanisms of low birth weight in response to high sucrose intake during pregnancy. However, there are some possible explanations that may be explored in future studies. In a recent study, Freitas *et al.* have shown that compared to a control group, sucrose overload in male Wistar rats is associated with higher renal sympathetic activity, evidences in favor of a systemic and renal renin-angiotensin system activation, a higher hemodynamic total peripheral resistance and insulin resistance. If these effects of



high sucrose intake are reproducible in pregnant females, they may be an explanation for low uterine perfusion and consequent low birth weight [16]. Another mechanism involved in low birth weight could be the RAS activation in response to sucrose overload [11,16]. It is well reported that angiotensin II inhibits trophoblast invasion, which could damage placental function and fetal nutrition [17], leading to reduced weight at birth. Therefore, this mechanism may be a possible explanation for the low birth weight observed in adult offspring submitted to a high sucrose environment during fetal life.

It is known that glucose and insulin metabolic alterations in the fetus are linked with changes in birth weight [18]. In the present study, this mechanism is unlikely since no differences were detected in blood glucose and plasma insulin between the two newborn groups. Many studies have already shown that low birth weight is associated with cardiovascular and metabolic alterations in adulthood [19-21]. Hypertension, diabetes type 2, insulin resistance, obesity are some of these alterations [22]. The results from the present study and from the study of Vidonho Jr. et al [4] indicate that the effects of low birth weight on alterations during adulthood are gender specific. Adult female but not male offspring of sucrose fed dams disclosed higher plasma insulin, peripheral glucose uptake and blood pressure. These results were unexpected, once previous studies have shown a link between low birth weight and adult insulin resistance [18]. In the majority of these previous studies [18,21,22], the phenomenon called catch-up growth occurred what was not observed in the present study. The absence of catch-up growth together with female gender is a mechanism that is worth to be evaluated in order to explain the increased glucose uptake in female offspring of sucrose dams. Increased glucose uptake can be explained by increased cellular efficiency, by increased insulin secretion by  $\beta$  cells and/or by lower peripheral insulin degradation. The higher plasma insulin in female offspring of SUC dams is in favor of the former two

mentioned mechanisms. Another interesting new information obtained in this study was the higher blood pressure observed only in females of the adult SUC offspring. No experiments were performed to determine the hypertensive mechanisms responsible for this finding. According to Guyton [23], long term high blood pressure is only due to one or both of the following mechanisms: a shift to the right of the pressure-natriuresis curve and a high dietary salt intake. Since C and SUC females were fed with the same diets and there are no evidences in favor of different amount of diet consumed between groups, an alteration of the renal function curve is an explanation for higher blood pressure in adult SUC female offspring.

Circulating and renal renin-angiotensin system of adult offspring was influenced by sucrose intake during pregnancy in a different manner according to the sex. Similarly, gender specific effects in response to the prenatal environment were previously observed in low protein intake and glucocorticoid excess during pregnancy (24). Despite higher plasma renin and ACE activity detected in male offspring of SUC dams, they did not disclose higher blood pressure compared to the C group. One reason for this result may be the elevated ratio between renal AT2 and AT1 receptor gene expression.

A finding from this study that was never reported before is the lower adiposity index in adult male offspring of SUC dams. A possible explanation is a lower chow intake due to higher plasma leptin. Although there was no significant difference in plasma leptin, the circulating concentration of this hormone was 63% higher in adult male offspring of SUC dams. It is known that plasma leptin concentration is an indicator of adipose tissue mass [25]. In the present study an opposite result was verified - lower adiposity index with higher leptin - indicating a possible primary alteration in leptin synthesis or secretion with a consequent appetite inhibition.

In conclusion, high sucrose intake during pregnancy influences blood pressure, glucose and insulin metabolism and adiposity in adult offspring in a gender specific manner.

## REFERENCES

1. McClellan R, Novak D. Fetal nutrition: how we become what we are. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 233-244.
2. McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev* 2005; 85: 571-633.
3. Lawlor DA, Smith GD. Early life determinants of adult blood pressure. *Curr Opin Nephrol and Hypertens* 2005; 14: 259-264.
4. Vidonho AF Jr, da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa LN, Campos RR, de Toledo Bergamaschi CM, Carpinelli AR, Quintão EC, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. *Pediatr Res* 2004; 56: 842-848.
5. Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 180: 608-613.
6. Prada P, Okamoto MM, Furukawa LN, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension* 2000; 35 (1 Pt 2): 424-429.
7. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987; 10: 512-516.

8. Pagliassotti MJ, Prach PA, Koppenhafer TA, Pan DA. Changes in insulin action, triglycerides, and lipid composition during sucrose feeding in rats. *Am J Physiol* 1996; 271: R1319-R1326.
9. Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ, Gomez Dumm CL. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* 1996; 45: 1527-1532.
10. Bernal C, Basilico MZ, Gutman R, Lombardo YB. Secretion and removal rates of very low density lipoprotein triglycerides at the three metabolic periods of hypertriglyceridemia induced by a sucrose rich diet. *Nutr Rep Int* 1989; 40: 71-83.
11. Shi SJ, Preuss HG, Abernethy DR, Li X, Jarrell ST, Andrawis NS. Elevated blood pressure in spontaneously hypertensive rats consuming a high sucrose diet is associated with elevated angiotensin II and is reversed by vanadium. *J Hypertens* 1997; 15: 857-862.
12. Santos RA, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorimetric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension* 1985; 7: 244-252.
13. Barker DJ. The fetal origins of hypertension. *J Hypertens Suppl* 1996; 14: S117-S120.
14. Munilla MA, Herrera E. Maternal hypertriglyceridemia during late pregnancy does not affect the increase in circulating triglycerides caused by the long-term consumption of sucrose-rich diet by rats. *J Nutr* 2000; 130: 2883-2888.
15. Jen KL, Rochon C, Zhong SB, Whitcomb L. Fructose and sucrose feeding during pregnancy and lactation in rats changes maternal and pup fuel metabolism. *J Nutr* 1991; 121: 1999-2005.
16. Freitas RR, Lopes KL, Carillo BA, Bergamaschi CT, Carmona AK, Casarini DE, Furukawa L, Heimann JC, Campos RR, Dolnikoff MS. Sympathetic and renin-

angiotensin systems contribute to increased blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Hypertens* 2007; 20: 692-698.

17. Xia Y, Wen HY, Kellems RE. Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation. *J Biol Chem* 2002; 277 (27): 24601-24608.

18. Ozanne SE, Hales CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* 1999; 58: 615-619.

19. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 1989; 298: 564-567.

20. Reynolds RM, Phillips DIW. Long-term consequences of intrauterine growth retardation. *Horm Res* 1998; 49 (suppl 2): 28-31.

21. Forsén T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 2000; 133: 176-182.

22. Barker DJ. The malnourished baby and infant. *Br Med Bull* 2001; 60: 69-88.

23. Guyton AC. Long-term arterial pressure control: an analysis from animal experiments and computer and graphic models. *Am J Physiol* 1990; 259: 865-877.

24. McMullen S, Langley-Evans SC. Sex-specific effects of prenatal low-protein and carbenoxolone exposure on renal angiotensin receptor expression in rats. *Hypertension* 2005; 46: 1374-1380

25. Himms-Hagen J. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1999; 36: 575-655.

**Table 1** - Effects of sucrose overload on body weight, food and water intake in female Wistar rats before and during pregnancy (from the 13<sup>th</sup> to the 15<sup>th</sup> week of age)

Weeks of age	C					SUC				
	8	11	13	14	15	8	11	13	14	15
Body Weight (g)	205±9.9 (14)	255±7.4 (14)	292±8.9 (14)	326±12.3 (14)	360±13.0 (14)	207±5.4 (11)	247±5.2 (11)	268±5.7 (11)	294±10.4 (11)	353±16.9 (11)
Food intake (g)	17.5±0.7 (3)	15.4±0.2 (3)	25.4±1.9 (3)	23.5±2.6 (3)	18.3±1.4 (3)	12.1±0.7* (4)	9.2±0.5* (4)	10.1±1.1* (4)	12.9±1.4* (4)	12.2±1.1* (4)
Water or sucrose solution intake (mL)	23.4±1.6 (3)	21.8±1.5 (3)	35.2±1.4 (3)	37.5±4.3 (3)	31.5±1.9 (3)	30.5±2.7 (4)	31.9±3.9 (4)	35.8±4.3 (4)	44.4±5.5 (4)	42.7±2.9 (4)

Data are reported as mean ± SEM. Number of measurements is between parentheses. \*p<0.05 vs C.

**Table 2** - Effects of sucrose overload during pregnancy on neonatal and adult offspring body weight, blood glucose, plasma insulin levels, glucose uptake, adiposity index and serum leptin levels

	MALE				FEMALE			
	NEONATAL		ADULT		NEONATAL		ADULT	
	C	SUC	C	SUC	C	SUC	C	SUC
Body weight	6.4±0.07	6.0±0.07*	401.9±7.6	374.1±6.6*	6.1±0.05	5.6±0.07*	255.5±4.9	236.7±3.2*
(g)	(105)	(86)	(36)	(46)	(105)	(92)	(37)	(48)
Blood glucose	77.4±2.8	71.5±3.1	104.6±4.3	104.5±2.2	74.5±3.7	70.1±3.2	96.6±3.3	98.5±2.7
(mg/dL)	(26)	(20)	(15)	(20)	(34)	(26)	(16)	(22)
Serum insulin	87.8±24.4.1	98.4±39.0	166.6±32.2	164.9±26.4	56.34±12.5	70.6±14.9	117.6±30.6	271.4±39.9*
(pmols/L)	(6)	(4)	(11)	(8)	(6)	(6)	(8)	(10)
Glucose uptake			14.9±0.7	12.2±3.9			6.5±2.1	19.0±2.2*
(mg/kg/min)			(6)	(5)			(6)	(6)
Plasma renin			3.2±0.8	6.5±1.2*			3.7±1.7	5.3±1.5
activity (ng/mL/hr)			(7)	(6)			(7)	(12)
Serum ACE activity			43.7±5.3	56.7±2.6*			26.5±0.6	50.3±3.1*
(nmol His-Leu/min./mL)			(5)	(6)			(3)	(5)
Adiposity index (%)			3.5±0.3	2.6±0.1*			4.2±0.3	4.4±0.3
			(15)	(21)			(16)	(22)
Serum leptin (ng/mL)			1.9±0.4	3.1±0.5			3.3±0.7	4.1±0.3
			(7)	(5)			(7)	(5)

Data are reported as mean ± SEM. ACE - angiotensin converting enzyme. Number of measurements is between parentheses. \*p <0.05 vs C.

**Table 3** - Effects of sucrose overload during pregnancy on adult offspring renal RAS components gene expression

	MALE		FEMALE	
	C	SUC	C	SUC
Angiotensinogen (arbitrary unit)	0.74±0.07 (7)	1.21±0.18* (6)	0.40±0.01 (4)	0.65±0.09* (7)
RENIN (arbitrary unit)	0.58±0.02 (7)	0.73±0.04* (6)	0.61±0.04 (4)	0.58±0.03 (7)
ACE (arbitrary unit)	0.22±0.01 (7)	0.29±0.02* (6)	0.17±0.01 (4)	0.23±0.01* (7)
AT1 (arbitrary unit)	0.95±0.03 (7)	1.13±0.12 (6)	1.08±0.07 (4)	1.03±0.04 (7)
AT2 (arbitrary unit)	0.17±0.01 (7)	0.21±0.01* (6)	0.13±0.004 (4)	0.17±0.02 (7)

Data are reported as mean ± SEM. Number of measurements is between parentheses. ACE – angiotensin converting enzyme, AT1 and AT2 – angiotensin II type 1 and 2 receptor. \*p <0.05 vs C.



## 9. REFERÊNCIAS

1. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986; 1: 1077-81.
2. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989; 298: 564-7.
3. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatric Research*. 2001; 49: 460-7.
4. Barker DJ. The malnourished baby and infant. *Br Med Bull*. 2001; 60: 69-88.
5. Forsén T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker DJ. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med*. 2000; 133: 176-82.
6. Mi Jie, Law C, Zhang KL, Osmond C, Stein C, Barker DJP. Effects of infant birthweight and maternal body mass index in pregnancy on components of the insulin resistance syndrome in China. *Ann Med*. 2000; 132: 253-60.

7. Edwards CRW, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl FR. Dysfunction of glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet*. 1993; 341: 355-7.
8. Mackenzie HS, Brenner BM. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis*. 1995; 26: 91-8.
9. Woods LL, Rasch R. Perinatal All programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *Am J Physiol*. 1998; 275: R-1593-9.
10. Woods LL. Fetal origins of adult hypertension: a renal mechanism? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000; 9: 419-25.
11. da Silva AA, de Noronha IL, de Oliveira IB, Malheiros DM, Heimann JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adults rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2003; 13: 133-9.
12. Vidonho AFJ, Da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, et al. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult Wistar rats. *Pediatr Res*. 2004; 56: 842-8.
13. Fliser D, Nowack R, Allendorf-Ostwald N, Kohl B, Hübinger A, Ritz E. Serum lipid changes on low-salt effect of alpha-1 adrenergic blockade. *Am J Hypertens*. 1993; 6: 320-4.
14. Lind L, Lithell H, Gustafsson IB, Pollare T, Ljunghall S. Metabolic cardiovascular risk factors and sodium sensitivity in hypertensive subjects. *Am. J Hypertens*. 1992; 5: 502-5.

15. Prada PA, Okamoto MM, Furukawa LN, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension*. 2000; 35: 424-9.
16. Hall CE, Hall O. Comparative effectiveness of glucose and sucrose in enhancement of hypersalivation and salt hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1966; 123: 370-4.
17. Beebe CG, Schemmel R, Mickelsen O. Blood pressure of rats as affected by diet and concentration of NaCl in drinking water. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1976; 151: 395-9.
18. Ahrens RA, Denuth P, Lee MK, Majkowski JW. Moderate sucrose ingestion and blood pressure in the rat. *J Nutr*. 1980; 110: 725-31.
19. Hwang I-S, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*. 1987; 10: 512-6.
20. Reaven GM, Ho H, Hoffmann BB. Attenuation of fructose-induced hypertension in rats by exercise training. *Hypertension*. 1988; 12: 129-32.
21. Shi SJ, Preuss HG, Abernethy DR, Li X, Jarrell ST, Andrawis NS. Elevated blood pressure in spontaneously hypertensive rats consuming a high sucrose diet is associated with elevated angiotensin II and is reversed by vanadium. *J Hypertens*. 1997; 15: 857-62.
22. Hulman S, Falkner B. The effect of excess dietary sucrose on growth, blood pressure, and metabolism in developing Sprague-Dawley rats. *Pediatr Res*. 1994; 36: 95-101.

23. Horton TJ, Gayles EC, Prach PA, Koppenhafer TA, Pagliassotti MJ. Female rats do not develop sucrose-induced insulin resistance. *Am J Physiol.* 1997; 272: R1571-6.
24. Soria A, Chicco A, Mocchiutti N, Gutman RA, Lombardo YB, Martín-Hidalgo A, Herrera E. A sucrose-rich diet affects triglyceride metabolism differently in pregnant and nonpregnant rats and has negative effects on fetal growth. *J Nutr.* 1996; 126: 2481-6.
25. Jen KL, Rochon C, Zhong SB, Whitcomb L. Fructose and sucrose feeding during pregnancy and lactation in rats changes maternal and pup fuel metabolism. *J Nutr.* 1991; 121: 1999-2005.
26. Munilla MA, Herrera E. Maternal hypertriglyceridemia during late pregnancy does not affect the increase in circulating tryglicerides caused by the long-term consumption of a sucrose-rich diet by rats. *J Nutr.* 2000; 130: 2883-8.
27. Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr.* 1989; 49: 1155-63.
28. Gutman RA, Basílico MZ, Bernal CA, Chicco A, Lombardo YB. Long-term hypertriglyceridemia and glucose intolerance in rats fed chronically an isocaloric sucrose-rich diet. *Metabolism.* 1987; 36: 1013-20.
29. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979; 237: E214-23.

30. Shaffer AL, Wojnar W, Nelson W. Amplification, detection, and automated sequencing of gibbon interleukin-2 mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1990; 190: 292-6.
31. Coelho MS, Passadore MD, Gasparetti AL, Bibancos T, Prada PO, Furukawa LL 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: 148-55.
32. Barker DJ. The fetal origins of hypertension. *J Hypertens Suppl.* 1996; 14:S117-20.
33. Molina-Font JA. Nutrition and fetal growth. *Early Hum Dev.* 1998; 53:S51-S60.
34. Lang U, Baker RS, Braems G, Zygmunt M, Kunzel W, Clark KE. Uterine blood flow-a determinant of fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2003; 110:S55-S61.
35. Binder ND, Laird MR, Faber JJ. Interrelationships between the renin angiotensin system and uteroplacental blood flow-a recent perspective. *Reprod Fertil Dev.* 1995; 7:1437-42.
36. Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol.* 1994; 102: 252-61.

37. Freitas RRA, Lopes KL, Carillo BA, Bergamaschi CT, Carmona AK, Casarini DE, et al. Sympathetic and renin-angiotensin systems contribute to increased blood pressure in sucrose-fed rats. *Am J Hypertens*. 2007; 20: 692-8.
38. Xia Y, Wen HY, Kellems RE. Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation. *J Biol Chem*. 2002; 277: 24601-8.
39. Holcberg G, Huleihel M, Sapir O, Katz M, Tsadkin M, Furman B, et al. Increased production of tumor necrosis factor- $\alpha$  TNF- $\alpha$  by IUGR human placentae. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001; 94: 69–72.
40. Bart B e Wit JM. Catch-up growth. *Endocr Rev*. 1997; 18: 646–61.
41. Fernandez-Twinn DS, Wayman A, Ekizoglou S, Martin MS, Hales CN, Ozanne SE. Maternal protein restriction leads to hyperinsulinemia and reduced insulin-signaling protein expression in 21-mo-old female rat offspring. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2005; 288: 368-73.
42. Galipeau D, Verma S, McNeill JH. Female rats are protected against fructose-induced changes in metabolism and blood pressure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 ;283:H2478-84.
43. Corry DB. Sex related differences in the insulin resistance syndrome. *Curr Hypertens Rep*. 2001; 3: 124–8.

44. Rowe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallotta J, Landsberg L. Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes*. 1981; 30: 219-25.
45. Pfeifle B, Ditschuneit H. Effect of insulin on growth of cultured human arterial smooth muscle cells. *Diabetologia*. 1981; 20: 155-8.
46. Sowers JR. Insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Endocrinol*. 1990; 74: C87-9.
47. De Fronzo RA. The effect of insulin on renal sodium metabolism. A review with clinical implications. *Diabetologia*. 1981; 21: 165-71.
48. Ozanne SE, Hales CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc*. 1999; 58: 615-9.
49. Himms-Hagen J. Physiological roles of the leptin endocrine system: differences between mice and humans. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 1999; 36: 575-655.
50. Anguita RM, Sigulem DM, Sawaya AL. Intrauterine food restriction is associated with obesity in young rats. *J Nutr*. 1993; 123: 1421-28.
51. Loireau A, Dumas P, Autissier N, Michel R. Influence of thyroid status on body weight gain, food intake and serum lipid levels in genetically obese Zucker rats. *J Nutr*. 1987; 117: 159-63.
52. Danforth E Jr, Burger AG. The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action. *Annu Rev Nutr*. 1989; 9: 201-27.

- 
53. Lebrazi H, Chomard P, Dumas P, Autissier N. Lipolysis in isolated epididymal adipocytes from genetically obese Zucker rat treated with 3,5,3'-L-triiodothyronine. *Acta Endocrinol.* 1990; 122: 379-84.
54. Grigore D, Ojeda NB, Robertson EB, Dawson AS, Huffman CA, Bourassa EA et al. Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293: R804-11.
55. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda)* 2006; 21: 29-37.