

Artigo
Original

Restrição Proteica na Lactação como Causa de Hiperplasia da Túnica Média da Aorta em Ratos Adultos

1

Maternal Protein Restriction During Lactation
Induces Tunica Media Hyperplasia in Adult Offspring

Karla Maria Pereira Pires, Carlos Alberto Mandarin-de-Lacerda

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Palavras-chave: Restrição proteica; Aorta; Estereologia

Key words: Aorta; Stereology; Hypertension

Resumo

Objetivo: Investigar o efeito da restrição proteica neonatal na parede da aorta de ratos Wistar adultos. **Métodos:** As lactantes-controle receberam ração-padrão com 23% proteínas, enquanto as restritas receberam dieta isocalórica e hipoproteica (9%) durante os 10 dias neonatais. A prole foi dividida em: Macho controle (MC), Fêmea controle (FC), Macho malnutrido (MM) e Fêmea malnutrida (FM). A massa corporal (BM) e a pressão arterial sistólica (PA) foram aferidas semanalmente. A eutanásia ocorreu na 36ª semana de vida e anéis com 5mm da aorta torácica foram removidos.

Resultados: As alterações do MC foram: redução de 30% nos grupos restritos aos 10 dias pós-natais, com recuperação parcial após restabelecimento de dieta-padrão, porém o grupo MM permaneceu com BM menor que o grupo MC ($p < 0,05$) ao desmame. Os grupos MM e FM apresentaram aumento de 10% da BM comparados aos grupos malnutridos. Da 24ª a 36ª semana, a PA foi 16% maior no grupo MM (interação restrição proteica x sexo – *two-way* ANOVA, $p < 0,05$). As aortas dos grupos malnutridos apresentaram maiores indicadores quantitativos do que os animais-controle: número de lamelas (50% em machos e 30% em fêmeas), espessura da túnica média (ambos 25%), densidade por área de núcleos de músculo liso (60% em machos e 35% em fêmeas), densidade de volume de músculo liso (ambos 50%) e densidade de área das lamelas (ambos 35%).

Conclusão: os dados sugerem remodelamento adverso da túnica média da aorta torácica em animais que sofreram restrição proteica neonatal, caracterizado por hiperplasia de células musculares lisas e de lamelas elásticas.

Abstract

Objective: To investigate the effect of neonatal protein restriction on thoracic aorta wall remodeling of adult Wistar mice (*Rattus Novergicus*).

Methods: Control dams received a 23% protein diet while restricted dams received an isocaloric diet of 9% protein in the first ten days of the lactation period. The offspring were divided into the following groups: Control Male (MC), Control Female (FC), Malnourished Male (MM) and Malnourished Female (FM). Body mass (BM) and blood pressure (BP) were measured weekly. Euthanasia occurred in the 36th week after birth when 5-millimeter aortic rings were removed from the animals.

Results: Body mass alterations were as follows: 30% reduction in the malnourished groups at post-natal day 10, followed by partial recovery after reintroduction of 23% protein diet; however, the MM group's BM remained smaller than that of the MC group ($p < 0.05$) at weaning. The MM and FM groups showed a 10% increase in BM compared to the malnourished groups. BP was 16% higher in the MM group from 24 to 36 weeks of age (There was an interaction between protein restriction and gender – *two-way* ANOVA, $p < 0.05$). Tunica media form malnourished groups' aortas displayed higher stereological parameters than those of the control groups: higher number of lamellae (50% in males and 30% in females), tunica media thickness (25% in both), density per area of smooth muscle cells nuclei (60% males and 35% females), volume density of smooth muscle (50% both) and surface density of lamellae (35% both).

Conclusion: These data suggest adverse remodeling of thoracic aorta tunica media in neonatal animals submitted to a protein-restricted diet and thus characterized by smooth muscle cells and elastic lamellae hyperplasia.

Introdução

Estudos epidemiológicos têm mostrado o aumento das doenças cardiovasculares nos países pobres, principalmente entre a população de baixa renda¹. Há uma relação entre o peso ao nascer e a incidência de doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e diabetes tipo II em idades mais avançadas^{2,3}. Sugere-se que a hipóxia fetal⁴, a exposição fetal aos glicocorticóides maternos³ e as alterações renais⁵ são possíveis fatores predisponentes das doenças cardiovasculares com alterações permanentes do número de glomérulos⁶, diminuição da filtração renal⁷ e disfunção endotelial⁸.

Apesar de a maioria dos estudos analisar perturbações da gestação, pesquisas com restrição proteica durante o período da lactação mostram que neste período também ocorre programação do crescimento da prole e alterações metabólicas significativas⁹⁻¹².

Neste estudo formulou-se a hipótese de que a lactação é período crítico do desenvolvimento, e o fornecimento de dieta restrita em proteínas neste período pode favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares nos filhos quando adultos. Esse tipo de estudo visa a ampliar o conhecimento sobre a influência da alimentação no desenvolvimento de doenças crônicas.

Metodologia

Fêmeas virgens de ratos Wistar, com 3 meses de idade, foram acasaladas em ambiente apropriado com temperatura ($21^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz controlados (12 horas claro-escuro) e avaliadas diariamente quanto às condições de saúde e aceitação da dieta. Após o parto, as fêmeas foram separadas em dois grupos: grupo-controle (C) e o grupo-restrição proteica (malnutrido, M) nos 10 primeiros dias da lactação. Os animais do grupo C receberam dieta padrão para ratos, AIN-93-G com 23% de proteínas¹³. Os animais do grupo M receberam dieta experimental isocalórica, manipulada em laboratório, com uma mistura de amido de milho, parte da dieta AIN-93 G e óleo de soja, equilibrada através da adição de mistura de minerais e vitaminas, contendo apenas 9% de proteínas (Tabela 1). No dia do nascimento, o número da ninhada foi fixado em seis animais (3 machos e 3 fêmeas) por mãe¹⁴ e foram aferidos a massa corporal e o comprimento rostro-anal dos filhotes. A partir do 11º dia de lactação, todas as mães receberam dieta-padrão para ratos. Aos 21 dias de idade (desmame), os filhotes foram separados das mães e passaram a se alimentar com dieta-padrão

para ratos. Os animais sofreram eutanásia aos 9 meses de vida.

A prole foi estratificada em:

- Grupo Macho-Controle (MC) – as lactantes receberam ração padrão AIN-93G com 23% de proteína e água ad libitum durante a lactação e os filhotes machos foram sacrificados aos 9 meses (n=6);
- Grupo Fêmea-Controle (FC) – as lactantes receberam ração padrão AIN-93G com 23% de proteína e água ad libitum durante a lactação e os filhotes fêmeas foram sacrificados aos 9 meses de idade (n=6);
- Grupo Macho-Malnutrido (MM) – as lactantes receberam ração padrão AIN-93G isocalórica com 9% de proteína e água ad libitum durante os 10 primeiros dias de lactação. Os filhotes machos foram sacrificados aos 9 meses de idade (n=6);
- Grupo Fêmea-Malnutrida (FM) – as lactantes receberam ração padrão AIN-93G isocalórica com 9% de proteína e água ad libitum durante os 10 primeiros dias de lactação. Os filhotes fêmeas foram sacrificados aos 9 meses de idade (n=6).

Tabela 1

Macronutrientes presentes na dieta

Macronutrientes	Ração-controle*	Ração hipoproteica**
Carboidratos	73%	87%
Proteínas	23%	9%
Lipídeos	4%	4%

* A ração do grupo-controle segue as recomendações da AIN-93 G¹³

** Adição de Mineral mix

Dia da eutanásia: Os animais foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (15mg/kg) e foi feita perfusão vascular com solução de formol tamponado (pH 7,1 0,1M tampão fosfato) com pressão constante de 90mmHg. Anéis da aorta torácica com 5mm de largura foram retirados na altura da primeira artéria intercostal e preparados tecnicamente para estudo com microscopia de luz.

Estereologia: A aorta foi clivada de acordo com o método de cortes verticais¹⁵ e, após inclusão em parafina e microtomia, lâminas foram coradas pelo tricômico de Masson. O exame foi feito com videomicroscopia (microscópio Leica BMRBE, videocâmera Kappa 15/5 e monitor Sony Triniton) e analisadas estereologicamente¹⁶: densidade de superfície de lamelas ($S_V = 2I/L_T$ onde I é o número de intersecções das lamelas aórticas sobre os arcos do sistema-teste e L_T é o comprimento total desses arcos), densidade de volume de células musculares lisas ($V_{V[smc]} = P_p/P_T$ onde P_p são os pontos que se sobrepõem às

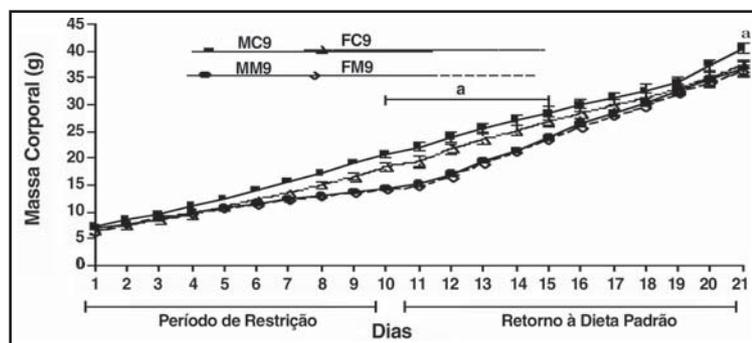


Figura 1
Evolução da massa corporal dos grupos MC, FC, MM e FM durante o período de lactação

Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: (a) - respectivo controle.

MC=controle macho; FC=controle fêmea;
MM=restrição proteica macho; FM=restrição proteica fêmea

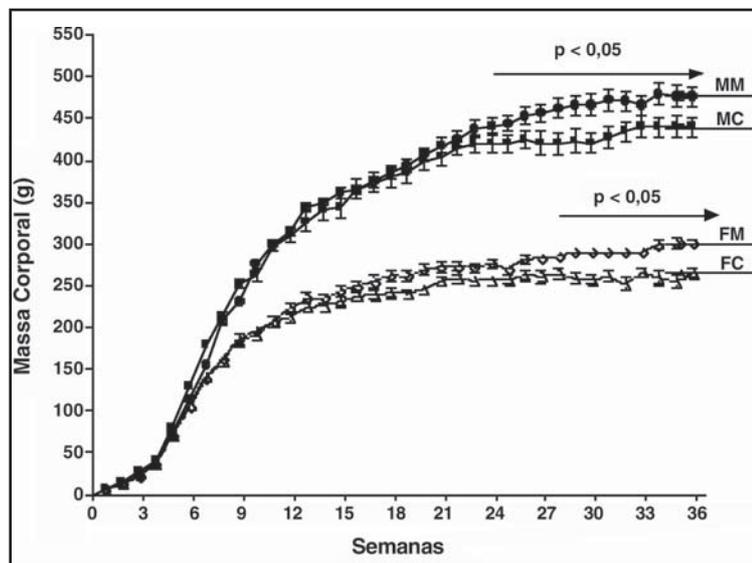


Figura 2
Evolução da massa corporal nos animais estudados
As diferenças foram testadas utilizando a análise de variância *One-way* e *post-hock test de Newman Keuls*

células musculares lisas e P_T os pontos totais do sistema-teste), densidade por área de núcleos de células musculares lisas ($Q_{A[smcn]} = N/A_T$ onde N é o número de perfis e A_T é o valor total da área-teste), área transversa média dos núcleos das células musculares lisas ($Am_{[smcn]} = V_v/2Q_A$). A espessura das túnicas média e íntima foi mensurada em quatro pontos ortogonais, a 0° , 90° , 180° e 270° graus, em cada corte assim como foi contado o número de lamelas elásticas^{17,18}.

Análise estatística: As diferenças entre os parâmetros biométricos foram testadas com análise de variância e pós-teste de Newman-Keuls. As diferenças nos parâmetros estereológicos foram testadas com Kruskal-Wallis e depois o teste de Mann-Whitney, dois a dois, para identificar entre que grupos as diferenças foram significativas. Em todos os casos foi usado o índice de significância = $0,05$ ¹⁹.

Resultados

Os resultados estão resumidos nas Tabelas de 2 a 4 e nas Figuras de 1 a 4.

As lactantes com restrição proteica apresentaram redução na massa corporal (BM) ($p < 0,05$), porém igualaram-se às lactantes-controle ao final do período de lactação (Tabela 2). No período neonatal, a massa corporal dos filhotes foi menor no grupo restrito em relação ao grupo-controle. Os grupos MC e FC apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$). No desmame, a BM do grupo MM foi menor do que a do grupo MC ($p < 0,05$) (Figura 1) e, após o desmame, os filhotes do grupo restrito apresentaram massa corporal reduzida em 30% ($p < 0,01$) quando comparados com seus respectivos controles. Aos nove meses de vida, os grupos restritos tiveram aumento de 10% na massa corporal quando comparados aos respectivos controles (Figura 2). Neste período, o sexo foi o fator de maior influência na diferença da massa corporal dos animais.

Tabela 2

Massa corporal e ingestão de ração das mães durante o período de lactação das lactantes-controle e lactantes malnutridas

Grupo de lactantes	Massa corporal (g)			Ingestão de ração (g)		
	dpn 1	dpn 10	dpn 21	dpn 1	dpn 10	dpn 21
LC	256,0±3	273,3±2	260,1±9	26,0±4	46,9±5	49,6±2
LM	265,7±7	252,1±8*	275,3±16	27,8±5	26,7±2*	48,5±2

A análise estatística utilizou o teste t-Student não pareado.

Nos casos assinalados, $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LC.

dpn=21 dias pós-natais; LC=lactantes-controle; LM=lactantes malnutridas

A partir da 24ª semana, a PA do grupo MM foi 16% maior do que no grupo MC ($p < 0,05$). Não houve diferença na PA entre os grupos FC e FM durante todo o experimento (Figura 3). Houve interação significativa entre os fatores restrição proteica e o sexo para os níveis de PA dos animais a partir da 24ª semana do experimento.

O aspecto histológico das aortas torácicas de todos os grupos está apresentado na Figura 4. Ambos os grupos restritos apresentaram parâmetros estereológicos superiores aos de seus respectivos controles: Q_A [smcn] foi 60% e 35% maior ($p < 0,01$), V_v [smcn] foi mais que 50% maior ($p < 0,05$). S_v [lam] foi mais que 35% maior. Além disso, S_v [lam] do grupo FM foi 10% maior ($p < 0,05$) que no grupo MM. Nos grupos restritos, o N [lam] foi mais que 30% maior ($p < 0,01$), e a espessura da aorta foi mais que 25% maior que nos controles (Tabela 3). O dimorfismo sexual entre os grupos-controle esteve presente na Am [smcn] e na espessura da túnica média. Com exceção da Am [smcn] que mostrou interação entre restrição proteica e o sexo (Tabela 4).

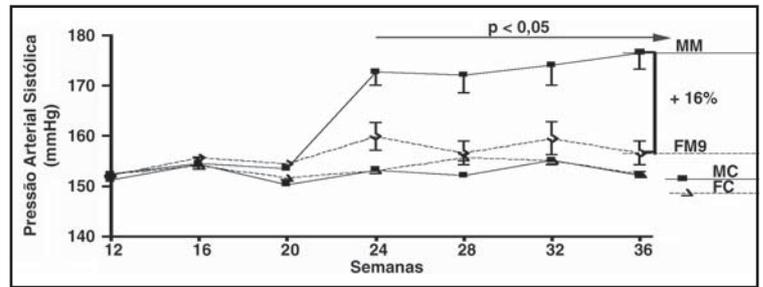


Figura 3
Evolução da pressão arterial sistólica nos animais estudados. Análise de variância *One-way* e *post-hock test de Newman Keuls*

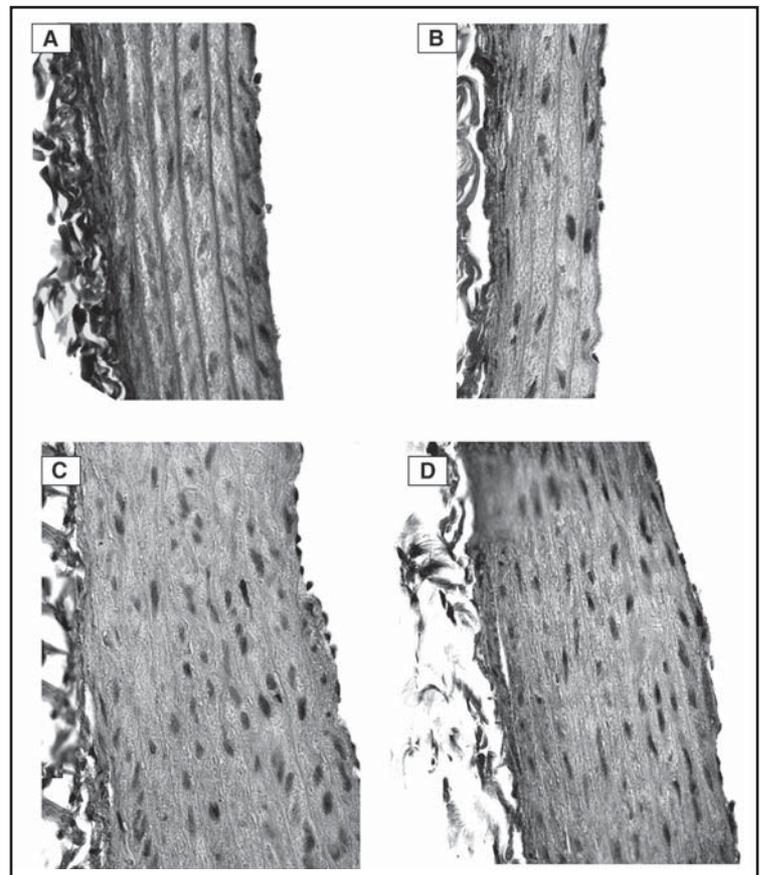


Figura 4
Fotomicrografias da aorta torácica dos animais estudados. Aumento: x40.

Os cortes foram corados em Tricrômico de Masson. A barra equivale a 35µm.

- A- Grupo-controle macho;
- B- Grupo-controle fêmea;
- C- Grupo malnutrido macho;
- D- Grupo malnutrido fêmea

Tabela 3
Análise estereológica e biométrica da túnica média da aorta torácica dos grupos estudados

Dados	Estereologia			Biometria		
	Q_A [smcn] (mm/mm ³)	S_v [lam] (mm/mm ³)	V_v [smcn] (%)	Am [smcn] (µm ²)	N [lam]	Espessura (µm)
MC	2290±215	95±5	15±3	33±7	7±0,4	74±5
FC	2525±350	104±11 ^b	12±2	24±4 ^b	7±0,3	64±7 ^b
MM	3650±501 ^a	128±11 ^a	23±5 ^a	32±6	10±1,5 ^a	92±10 ^a
FM	3422±416 ^{a,b}	142±4 ^{a,b}	18±3 ^a	27±3 ^b	9±1,4 ^a	79±8 ^{a,b}

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os testes de Kruskal Wallis seguido do teste de Mann-Whitney. Diferenças significativas ($p < 0,05$) comparadas com: (a) respectivo controle; e (b) respectivo grupo de machos

Tabela 4
Análise Two-way ANOVA

<i>Two-way</i>	Interação		Restrição proteica		Sexo	
	%	p	%	p	p	
BM						
[dpn 1]	0,3	NS	5,3	NS	11,3	0,05
[dpn 10]	1,9	NS	68,5	<0,0001	4,3	0,05
[dpn 21]	3,7	NS	14,8	<0,05	4,5	NS
[9 meses]	0,2	NS	1,4	<0,05	90,3	0,0001
RAM						
[dpn 1]	2	NS	10	NS	0	NS
[dpn 10]	11	<0,05	34	<0,0001	11	<0,05
[dpn 21]	0	NS	73	<0,0001	0	NS
[9 meses]	1	NS	1	NS	92	<0,0001
Semanas						
PA						
12	11	NS	6	NS	6	NS
16	4	NS	6	NS	1	NS
20	1	NS	1	NS	17	NS
24	13	<0,001	55	<0,0001	14	<0,001
28	30	<0,0001	35	<0,0001	12	<0,05
32	18	<0,05	40	<0,0001	15	<0,05
36	22	<0,001	43	<0,0001	21	<0,001
Estereologia						
Q _A [smcn]	3	NS	71	<0,0001	0	NS
S _v [lam]	1	NS	77	<0,0001	9	<0,01
V _v [smcn]	4	NS	34	<0,01	9	NS
N[lam]	4	<0,05	65	<0,0001	16	<0,001
Thickness	0,1	NS	48	<0,001	20	<0,01
A[nctl]	3	NS	0,1	NS	35	<0,01

A porcentagem de influência dos fatores (%) e o valor da significância (p) estão expressos na tabela. NS - p > 0,05

Discussão

Há interesse em determinar quais os períodos críticos do desenvolvimento em que as restrições alimentares podem acarretar doenças crônicas na vida adulta. O presente estudo analisou, como “janela de desenvolvimento”, o início do período de lactação em ratos. Estudaram-se os efeitos da restrição proteica durante o período neonatal na estrutura da aorta torácica de animais de ambos os sexos. Observaram-se alterações histológicas, indicando hiperplasia da túnica média da aorta dos animais restritos quando adultos. Além disso, também houve mudanças na PA e na massa corporal dos animais, sendo estas mais marcantes em machos do que em fêmeas.

A concentração de nutrientes no leite de fêmeas restritas apresenta aumento significativo no teor de lipídeos e carboidratos, resultando numa oferta calórica maior, enquanto as concentrações de lactose e proteínas totais se encontraram inalteradas e diminuídas, respectivamente¹⁰. Após a introdução da dieta-padrão, houve um ganho de massa corporal crescente em ambos os grupos restritos, mas somente fêmeas restritas igualaram-se ao

respectivo controle. Frente a essas condições adversas, a produção hormonal tireóidea das lactentes⁹ e da prole de machos²⁰, se altera. A prole apresenta hipotireoidismo, caracterizado por fenótipo de baixo peso corporal e ingestão de alimento²¹, em que hormônios importantes, como a leptina, desempenham papel significativo²². Neste trabalho foi constatado efeito anorético no grupo de machos restritos, que diminuiu ao longo do experimento. Fenótipo similar foi visto em animais que receberam leptina exógena durante os primeiros 10 dias pós-natais^{23,24}. Sugere-se um possível fenótipo de resistência à leptina, já que animais cujas lactantes foram restritas durante o mesmo período apresentam aumento significativo de receptores para esse hormônio na tireóide²⁵.

Há um efeito importante do leite materno na determinação da PA elevada em ratos espontaneamente hipertensos²⁶. Alterações renais causadas pela programação adversa do desenvolvimento estão intimamente relacionadas ao surgimento de hipertensão arterial, provavelmente interferindo com a nefrogênese normal⁶. A supressão da resposta do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) fetal pode estar

alterada quando a dieta materna é pobre, o que causaria um retardo na nefrogênese²⁷, gerando rins com glomérulos imaturos e/ou em menor número ao nascimento⁶. Admite-se que um possível efeito negativo da restrição proteica durante o desenvolvimento possa ocorrer sobre o SRAA²⁸.

Em ratos, a formação renal se estende até a primeira semana pós-natal²⁹. No presente estudo, o período de restrição ocorreu na fase de pleno amadurecimento tubular e crescimento somático glomerular³⁰. É possível ter havido prejuízo na nefrogênese, o que justificaria o aumento pressórico visto no grupo de machos restritos. Fêmeas restritas não apresentaram elevação da PA, mas os machos sim, indicando dimorfismo sexual. A manifestação de fenótipo hipertensivo não é unânime em trabalhos relacionados à programação, uma vez que diferenças no grau e período dos protocolos de restrição resultam³¹⁻³³, ou não³⁴⁻³⁶, em alterações na PA da prole. Este assunto necessita estudos posteriores para ser esclarecido.

Alterações na estrutura da túnica média da aorta por influência da idade e da hipertensão são vistas em humanos e em modelos animais. Estas são caracterizadas por diminuição do relaxamento vascular³⁷, aumento na espessura da túnica média³⁸, hipertrofia das células musculares lisas^{39,40}, alterações na matriz extracelular⁴¹ e preservação do número de lamelas⁴². No presente estudo, animais adultos restritos apresentaram aumento de todos os parâmetros estereológicos analisados na aorta, sugerindo hiperplasia da túnica média. Em modelos de programação do desenvolvimento, a produção de óxido nítrico (ON) se encontra reduzida e este efeito é sexo-dependente^{31,43}: o ON é capaz de reduzir a proliferação de células musculares lisas⁴⁴, o que poderia justificar os resultados atuais.

A aorta de ratos apresenta receptores para a leptina, sendo este hormônio capaz de induzir a angiogênese^{45,46} e a proliferação e migração de células musculares lisas⁴⁷. Além disso, a elevação da concentração plasmática de leptina estimula o aumento da PA⁴⁸. Animais adultos, cujas lactantes foram restritas durante o período pós-natal, apresentam elevada concentração de receptores tireóideos para leptina²⁵. É provável que este aumento não se restrinja somente à tireóide e esteja também presente em outros órgãos.

Efeitos benéficos protetores de hormônios sobre a PA de humanos⁴⁹ e animais⁵⁰ ocorrem por vias onde há redução da síntese de angiotensina II⁵¹ e aumento da biodisponibilidade de ON⁵², o que poderia justificar a diferença da PA vista somente em machos, apesar da hiperplasia vista também em fêmeas.

Conclusões

A restrição proteica durante o período neonatal causa elevação da pressão arterial sistólica em ratos machos adultos e origina o remodelamento adverso da túnica média da aorta torácica em ambos os sexos, resultando em marcada hiperplasia das células musculares lisas.

Referências bibliográficas

1. Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998;95:115-28.
2. Osmond C, Barker DJ. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect*. 2000;108 Suppl 3:545-53.
3. Langley-Evans SC. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc*. 2001;60:505-13.
4. Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*. 1990;301:259-62.
5. Moritz KM, Dodic M, Wintour EM. Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays*. 2003;25:212-20.
6. Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int*. 2004;65:1339-348.
7. Lucas Jr DG, Patterson T, Hendrick JW, et al. Effects of adenosine receptor subtype A1 on ventricular and renal function. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001;38:618-24.
8. Armitage JA, Lakasing L, Taylor PD, et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol*. 2005;565(1):171-84.
9. Ramos CF, Teixeira CV, Passos MC, et al. Low-protein diet changes thyroid function in lactating rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 2000;224:256-63.
10. Moura AS, Franco de Sá CC, Lopez da Costa C, Vicente LL, Guerreiro SM, Pinto AM. Association between nutrition and gender during lactation influencing glucose homeostasis and blood pressure of the adult offspring. *Biol Neonate*. 2002;82:263-70.
11. Souza Caldeira Filho J, Moura AS. Undernutrition during early lactation period induces metabolic imprinting leading to glucose homeostasis alteration in aged rats. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2000;108:213-26.
12. Barja-Fidalgo C, Souza EP, Silva SV, et al. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res*. 2003;52:470-76.
13. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993;123:1939-951.

14. Rasmussen KM. Effects of under- and overnutrition on lactation in laboratory rats. *J Nutr.* 1998;128:390S-93S.
15. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc.* 1986;142 (Pt 3):259-76.
16. Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *An Acad Bras Cienc.* 2003;75:469-86.
17. Pereira LM, Bezerra DG, Mandarim-de-Lacerda CA. Aortic wall remodeling in rats with nitric oxide deficiency treated by enalapril or verapamil. *Pathol Res Pract.* 2004;200:211-17.
18. Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Aorta wall quantitative alterations due to different long-term high-fat diet in rats. *Food Chem Toxicol.* 2003;41:1391-397.
19. Zar JH. *Biostatistical analysis.* 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1999.
20. Passos MC, Fonte Ramos C, Dutra SC, Mouco T, Moura EG. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. *Horm Metab Res.* 2002;34:40-43.
21. Passos M, Ramos C, Teixeira C, Moura E. Feeding behavior of adult rats submitted to protein malnutrition whose mothers received protein restricted diets during lactation. *Rev Nutr.* 2001;14:7-11.
22. Moura AS, Franco de Sá CC, Cruz HG, Costa CL. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults. The role of insulin and leptin. *Braz J Med Biol Res.* 2002;35:617-22.
23. Passos MC, Vicente LL, Lisboa PC, Moura EG. Absence of anorectic effect to acute peripheral leptin treatment in adult rats whose mothers were malnourished during lactation. *Horm Metab Res.* 2004;36:625-29.
24. Lins MC, Moura EG, Lisboa PC, Bonomo IT, Passos MC. Effects of maternal leptin treatment during lactation on the body weight and leptin resistance of adult offspring. *Regul Pept.* 2005;127:197-202.
25. Vicente LL, Moura EG, Lisboa PC, et al. Malnutrition during lactation in rats is associated with higher expression of leptin receptor in the pituitary of adult offspring. *Nutrition.* 2004;20:924-28.
26. Di Nicolantonio R. Blood pressure and salt appetite of cross-suckled spontaneously hypertensive and normotensive rats. *J Hypertens.* 1987;5:413-16.
27. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci.* 1999;64:965-74.
28. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res.* 2001;49:460-67.
29. Larsson L, Aperia A, Wilton P. Effect of normal development on compensatory renal growth. *Kidney Int.* 1980;18:29-35.
30. Neiss WF, Klehn KL. The postnatal development of the rat kidney, with special reference to the chemodifferentiation of the proximal tubule. *Histochemistry.* 1981;73:251-68.
31. Brawley L, Itoh S, Torrens C, et al. Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. *Pediatr Res.* 2003;54:83-90.
32. Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, et al. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta.* 1996;17:169-72.
33. Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr.* 1996;126:1578-585.
34. Kwong WY, Wild AE, Roberts P, Willis AC, Fleming TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development.* 2000;127:4195-202.
35. Langley-Evans SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond).* 1994;86:217-22; discussion 121.
36. Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. *Clin Sci (Lond).* 1996;91:607-15.
37. Imaoka Y, Osanai T, Kamada T, Mio Y, Satoh K, Okumura K. Nitric oxide-dependent vasodilator mechanism is not impaired by hypertension but is diminished with aging in the rat aorta. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33:756-61.
38. Nejjar I, Pieraggi MT, Thiers JC, Bouissou H. Age-related changes in the elastic tissue of the human thoracic aorta. *Atherosclerosis.* 1990;80:199-208.
39. Connat JL, Busseuil D, Gambert S, et al. Modification of the rat aortic wall during ageing; possible relation with decrease of peptidergic innervation. *Anat Embryol (Berl).* 2001;204:455-68.
40. Olivetti G, Melissari M, Marchetti G, Anversa P. Quantitative structural changes of the rat thoracic aorta in early spontaneous hypertension. Tissue composition, and hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells. *Circ Res.* 1982;51:19-26.
41. Martyn CN, Greenwald SE. Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension. *Lancet.* 1997;350:953-55.
42. Olivetti G, Anversa P, Melissari M, Loud AV. Morphometry of medial hypertrophy in the rat thoracic aorta. *Lab Invest.* 1980;42:559-65.

43. Franco Mdo C, Arruda RM, Dantas AP, et al. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. *Cardiovasc Res.* 2002;56:145-53.
44. Vardi N, Ztrk F, Fadillioúlu E, Otlu A, Yaúmurca M. Histological changes in the rat thoracic aorta after chronic nitric oxide synthase inhibition. *Turk J Med Sci.* 2003;33:141-47.
45. Bouloumie A, Drexler HC, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res.* 1998;83:1059-1066.
46. Park HY, Kwon HM, Lim HJ, et al. Potential role of leptin in angiogenesis: leptin induces endothelial cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases in vivo and in vitro. *Exp Mol Med.* 2001;33:95-102.
47. Oda A, Taniguchi T, Yokoyama M. Leptin stimulates rat aortic smooth muscle cell proliferation and migration. *Kobe J Med Sci.* 2001;47:141-50.
48. Shek EW, Brands MW, Hall JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertension.* 1998;31:409-14.
49. Szekacs B, Vajo Z, Acs N, et al. Hormone replacement therapy reduces mean 24-hour blood pressure and its variability in postmenopausal women with treated hypertension. *Menopause.* 2000;7:31-35.
50. van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2001;104:1419-423.
51. Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derx FH, Kurzinger S, Riegger GA. Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation.* 1997;95:39-45.
52. Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, et al. Cell-surface estrogen receptors mediate calcium-dependent nitric oxide release in human endothelia. *Circulation.* 2000;101:1594-597.