

Restrição Proteica Gestacional Aumenta Níveis de RNAm de Conexina 43 no Coração de Filhotes Machos Adultos

Gestational Protein Restriction Increases Cardiac Connexin 43 mRNA levels in male adult rat offspring

Kamila Fernanda Rossini, Camila Andrea de Oliveira, Hércules Jonas Rebelato, Marcelo Augusto Marreto Esquisatto, Rosana Catisti

Programa de Pós Graduação em Ciências Biomédicas do Centro Universitário Hermínio Ometto FHO – UNIARARAS, Araras, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: A limitação dietética durante a gravidez influencia o crescimento e desenvolvimento do feto e da prole e sua saúde na vida adulta. Os mecanismos subjacentes dos efeitos adversos da restrição proteica gestacional (RPG) no desenvolvimento dos corações da prole não são bem compreendidos.

Objetivos: Avaliar os efeitos da RPG sobre a estrutura cardíaca em filhotes machos de ratas aos 60 dias após o nascimento (d60).

Métodos: Ratos fêmeas Wistar grávidas foram alimentadas com uma dieta de proteína normal (PN, 17% caseína) ou de baixa proteína (BP, caseína 6%). Os valores de pressão arterial (PA) de descendentes do sexo masculino de 60 dias de idade foram medidos por meio de um método indireto de manguito de cauda usando um eletro esfigmomanômetro. Os corações (d60) foram coletados para avaliação da expressão de RNAm da conexina 43 (Cx43) e análise morfológica e morfométrica.

Resultados: A prole BP não mostrou diferença no peso corporal, embora tenha nascido mais leve do que a prole PN. Os níveis de PA foram significativamente mais altos no grupo BP. Observou-se um aumento significativo na área ocupada pelas fibras colágenas, diminuição do número de cardiomiócitos em $104 \mu\text{m}^2$ e aumento da área de cardiomiócitos associada ao aumento da expressão de Cx43.

Conclusão: A RPG altera os níveis miocárdicos de RNAm de Cx43 em ratos adultos jovens, sugerindo que este mecanismo visa compensar o processo fibrótico pelo acúmulo de fibras de colágeno no interstício cardíaco. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(1):63-70)

Palavras-chave: Gestação; Desenvolvimento Fetal; Conexina 4; Metabolismo.

Abstract

Background: The dietary limitation during pregnancy influences the growth and development of the fetus and offspring and their health into adult life. The mechanisms underlying the adverse effects of gestational protein restriction (GPR) in the development of the offspring hearts are not well understood.

Objectives: The aim of this study was to evaluate the effects of GPR on cardiac structure in male rat offspring at day 60 after birth (d60).

Methods: Pregnant Wistar rats were fed a normal-protein (NP, 17% casein) or low-protein (LP, 6% casein) diet. Blood pressure (BP) values from 60-day-old male offspring were measured by an indirect tail-cuff method using an electro sphygmomanometer. Hearts (d60) were collected for assessment of connexin 43 (Cx43) mRNA expression and morphological and morphometric analysis.

Results: LP offspring showed no difference in body weight, although they were born lighter than NP offspring. BP levels were significantly higher in the LP group. We observed a significant increase in the area occupied by collagen fibers, a decrease in the number of cardiomyocytes by $10^4 \mu\text{m}^2$, and an increase in cardiomyocyte area associated with an increased Cx43 expression.

Conclusion: GPR changes myocardial levels of Cx43 mRNA in male young adult rats, suggesting that this mechanism aims to compensate the fibrotic process by the accumulation of collagen fibers in the heart interstitium. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(1):63-70)

Keywords: Pregnancy; Fetal Development; Connexin 43; Metabolism.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Rosana Catisti •

Av. Maximiliano Baruto 500, CEP 13607-339, Jardim Universitário, Araras, São Paulo – Brasil

E-mail: rosanacatisti@uniararas.br, rocatisti@hotmail.com

Artigo recebido em 28/09/2016, revisado em 23/01/2017, aceito em 03/03/2017

DOI: 10.5935/abc.20170081

Introdução

A restrição dietética materna é uma causa reconhecida de mortalidade ao nascimento¹ e baixo peso ao nascer.² O conceito de "programação" é utilizado para associar eventos pré-natais a mudanças no crescimento fetal que podem se tornar patológicas na idade adulta.^{3,4} Embora as alterações moleculares e fisiológicas resultantes do desequilíbrio nutricional durante a gravidez permitam que a prole sobreviva, os efeitos cardiovasculares a longo prazo impostos por essas mudanças promovem modificações estruturais e alterações nos componentes dos sistemas renal, respiratório, endócrino e nervoso central.^{5,6} Dados recentes têm mostrado alterações na bioenergética mitocondrial hepática de filhotes de 30 dias nascidos de mães submetidas a restrição proteica durante a gestação.⁷ Além disso, a restrição proteica gestacional (RPG) tem se mostrado um importante fator de risco para doenças cardiovasculares na vida adulta.⁸

Durante a atividade elétrica do coração, todos os miócitos são ativados individualmente pelo fluxo elétrico através das junções intercelulares. No sistema cardiovascular, estas junções gap incluem uma ou mais de quatro conexinas - nomeadamente, Cx37, Cx40, Cx43 e Cx45 - que trabalham em conjunto durante o início do desenvolvimento cardiovascular.⁹ As junções gap também garantem a comunicação mecânica e elétrica entre diferentes tipos de células musculares.¹⁰ Esse papel é crucial no coração, uma vez que a correta ejeção do sangue para a circulação depende necessariamente de uma contração coordenada tanto dos cardiomiócitos auriculares como ventriculares.^{11,12} Condições patológicas como diabetes e hipertensão estão associadas a deleções e alterações na regulação da expressão da conexina,¹³ enquanto que os genes da conexina podem ter efeitos deletérios na função cardíaca.¹⁴

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da RPG sobre a estrutura cardíaca em filhotes machos de ratas no dia 60 (d60) após o nascimento. Nós investigamos especificamente seus valores de pressão arterial (PA) durante a 8ª semana de vida, os parâmetros morfológicos e morfométricos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e os níveis de RNAm de Cx43. Nossa escolha para estudar o perfil molecular de Cx43 foi baseada no fato de que esta é a conexina mais abundante e expressa no coração. Este é o primeiro estudo que descreve a expressão cardíaca deste gene em ratos submetidos a RPG.

Métodos

Cuidados com animais

Todos os experimentos foram conduzidos em estrita concordância com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e aprovados pelo Comitê de Cuidados e Uso de Animais (Permissão N°. 056/2014). Ratos Wistar fêmeas virgens de dez semanas de idade, pesando 180 a 250 g, foram acasaladas com machos. Após a confirmação da prenhez pela observação de espermatozoides em um esfregaço vaginal (dia 1 da gestação), alocamos aleatoriamente as ratas prenhes (n = 12) em gaiolas individuais para receber uma dieta semisintética isocalórica e normal de sódio (AIN 93G, Pragsoluções, Jau, SP, Brasil) com um conteúdo proteico normal (17% de caseína, grupo de proteína normal [PN],

n = 6, numerado de 1 a 6: 1PN a 6PN) ou baixo teor proteico (caseína 6% BP], n = 6, numerado de 1 a 6: 1BP a 6BP) (Tabela 1), conforme descrito anteriormente.^{7,15} Os animais foram mantidos a uma temperatura controlada (21 ± 1°C) em um ciclo de luz/escurecimento de 12 h, com acesso livre à água até o nascimento dos filhotes aos 22 dias de gestação. A distância anogenital foi medida em todos os filhotes¹⁶ e as ninhadas foram sacrificadas até um máximo de 8 filhotes machos para minimizar a variação na nutrição durante o período de amamentação. Todas as crias machos vivos de cada mãe foram utilizadas nos experimentos. Quando o número de filhotes foi menor do que 8, o número foi aumentado por filhotes fêmeas até que este valor foi atingido. Após o desmame, os filhotes foram alojados em gaiolas para um máximo de 4 animais, numerados e identificados de acordo com sua afiliação. O número de gaiolas seguiu o número de identificação das mães (de 1 a 6, PN ou BP). Quando o número de filhotes machos de cada mãe excedeu quatro, as gaiolas foram identificadas pelo número da mãe mais as letras A ou B. A identificação dos filhotes nas gaiolas foi feita pela marcação na cauda: 1º (sem marcação na cauda), 2º (um traço na cauda), 3º (dois traços na cauda) e 4º (três traços na cauda). Todos os animais foram identificados por este método e o número total de ratos machos foi de 21 para o grupo PN e 37 para o grupo BP. Receberam água ad libitum e uma dieta padrão de laboratório (21,6% de proteína e 4,0% de lipídeo, Nuvilab CR-1, Nuvital, Colombo, PR, Brasil). Na 8ª semana de vida, os níveis de PA foram medidos e, após anestesia com cetamina (75 mg · kg⁻¹ de peso corporal, ip) e xilazina (10 mg · kg⁻¹ de peso corporal, ip), os corações foram removidos para análise. Os corações foram pesados e fragmentos do terço médio dos ventrículos esquerdos foram processados para análises morfológicas e moleculares. Doze animais (PN, n = 6, BP, n = 6; um macho por cada uma das mães, aleatoriamente) foram perfundidos para a medição da área da seção transversal dos cardiomiócitos.

Medição da pressão arterial

A pressão arterial sistêmica foi medida em ratos conscientes de 7 e 8 semanas de idade (BP, n = 12; PN, n = 12; 2 ratos por cada uma das mães, aleatoriamente) por meio de um método indireto de manguito de cauda usando um eletro esfigmomanômetro combinado com um transdutor/amplificador de pulso pneumático (IITC Life Science Inc., CA, EUA). Esta abordagem indireta permitiu medidas repetidas com uma estreita correlação (coeficiente de correlação = 0,975) para direcionar o registro intra-arterial. A média de três leituras consecutivas representou o nível de PA do animal.

Coleta de tecidos: histologia e análise morfométrica

Os corações foram removidos e seccionados longitudinalmente na região média em duas metades. Para análise histológica, as metades superior e inferior dos seis corações de cada animal do grupo experimental foram fixadas utilizando a solução de Millonig e tratadas para inclusão de parafina. Foram obtidas seções de 6 micrômetros de espessura de cada bloco de tecido da região média e

Tabela 1 – Composição das dietas das ratas prenhes: proteína normal (PN, 17%) e baixa proteína (BP, 6%)^{7,15}

g/kg	PN (17%)	BP (6%)
Amido de milho	397	480
Caseína (84%)	202	71.5
Dextrina (90-94%)	130.5	159
Sacarose	100	121
Óleo de soja	70	70
Fibra	50	50
Mistura de sal (AIN 93 GMX)	35	35
Mistura de vitaminas (AIN 93 VX)	10	10
L-cistina	3	1
Bitartrato de colina	2.5	2.5

coradas com azul de toluidina (AT) e picosirius-hematoxilina (PH). Três das seções coradas com TB foram utilizadas para a contagem de cardiomiócitos (número por $10^4 \mu\text{m}^2$) e três outras seções coradas com PH para a quantificação de fibras de colágeno utilizando microscopia de polarização (% de área de birrefringência em $10^4 \mu\text{m}^2$). Cinco campos representativos obtidos de cada seção longitudinal do ventrículo esquerdo de cada rato ($150.000 \mu\text{m}^2$ de área total por coração animal) foram analisados por microscopia óptica (Leica DM 2000 Photomicroscope) e capturados com uma câmara digital Leica DFC 425 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Cada imagem digital foi fotografada com o objetivo x40 e formatada com densidade de pixels fixa (8×10 polegadas a 150 dpi) usando Sigma Scan Pro (v.6.0). Em cada imagem digital, os cardiomiócitos foram contados seguindo a recomendação de Olivetti et al.¹⁷ e a área de fibras de colágeno birrefringentes foi calculada como descrito por Mendes et al.¹⁸ Para as análises, a alocação dos grupos foi feita às cegas pelos pesquisadores.

Medição da área da seção transversal dos cardiomiócitos

Os animais foram anestesiados e perfundidos pela artéria carótida esquerda com solução salina contendo heparina (5%) durante 15 min e subsequentemente com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo paraformaldeído a 4% (p/v) durante 25 min. Após a perfusão, amostras de tecido miocárdico foram obtidas a partir do septo e parede livre da parte média do ventrículo esquerdo e fixadas em 4% de formalina tamponada com fosfato durante 24 h para inclusão de parafina. Foram cortadas seções de 5 micrômetros de espessura do tecido e coradas com hematoxilina-eosina (HE). A área da seção transversal dos cardiomiócitos foi determinada em pelo menos 100 miócitos por lamela corada com HE. As medições foram realizadas com um microscópio Leica DM 2000 (lente de ampliação x40) ligado a uma câmara digital (Leica DFC 425, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e ligados a um computador pessoal equipado com o software de análise de imagem Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA). Mediu-se a área de cardiomiócitos com uma almofada de digitalização e as células selecionadas foram cortadas transversalmente com o núcleo claramente identificado no centro do miócito.¹⁹

Isolamento de RNA e reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa semiquantitativa (RT-PCR)

O RNA total foi isolado a partir de amostras de 100 mg de tecido ventricular esquerdo com o reagente TRIzol® (Invitrogen, CA, EUA) e digerido com DNase I, Grau de Amplificação (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinada medindo a absorvência de UV a 260 nm utilizando um espectrofotômetro, e a integridade foi confirmada por eletroforese em gel de formaldeído. As amostras de RNA total foram armazenadas a -80°C até análise posterior. O cDNA foi sintetizado a partir de $2 \mu\text{g}$ de RNA na presença de ditiotreitol, dNTP, primers aleatórios, RNaseOUT e Transcriptase Reversa SuperScript™ II (Invitrogen) num volume final de $20 \mu\text{L}$. A análise semiquantitativa da expressão de RNAm de Cx43 foi realizada por RT-PCR num volume final de $25 \mu\text{L}$ contendo $1 \mu\text{L}$ de DNase, $1,6 \text{ mM}$ de MgCl_2 , $200 \mu\text{M}$ de cada dNTP, $0,2 \mu\text{mol}$ de cada primer e $0,04 \text{ U}$ de DNA polimerase Taq (Invitrogen, Itapevi, SP, Brasil). Cx43 foi amplificado utilizando iniciadores específicos para o gene ($5' \text{-GATTGAAGAGCACGGCAAGG-3'}$) e reverso ($5' \text{-GTGTAGACCGCGCTCAAG-3'}$) com um amplicon esperado de 144 bp (T_m 58°C). Utilizou-se ACTB (beta-actina) como um gene constitutivo (T_m 57°C , primer direto $5' \text{-AGAGGGAAATCGTGCGTGACA-3'}$ e primer reverso $5' \text{-CGATAGTGATGACCTGACCGTCA-3'}$) produzindo um produto de amplificação de 178 bp que foi utilizado para normalizar os níveis de RNAm de Cx43. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio, visualizado e fotografado com o sistema de documentação de gel Syngene G: Box®. A intensidade do sinal das bandas foi medida densitometricamente usando o software Scion Image. Cada valor foi determinado como a média de três leituras densitométricas. Os resultados são expressos como a razão da densidade óptica relativa do produto de PCR da Cx43 em relação ao gene da beta actina.

Análise de dados

Os resultados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA,

EUA) e são relatados como a média \pm desvio padrão (DP) das medições de seis animais diferentes. Nos casos em que foram comparados dois grupos, utilizou-se o teste t de Student não pareado com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Quando apropriado, utilizamos a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste post-hoc de Tukey.

Resultados

Características dos animais

Uma análise prévia do peso dos filhotes no dia 1 após o nascimento (publicado pelo nosso grupo de pesquisa e mostrado na Figura 1A^{7,20} para validação do modelo RPG) (PN, $n = 37$, \square símbolos, peso $6,40 \pm 0,21$ g) foram significativamente mais leves do que os descendentes de mães alimentadas com uma dieta normal em proteínas (PN, $n = 21$, \blacksquare símbolos, peso $7,805 \pm 0,51$ g, $p = 0,0048$, Figura 1A).^{7,20} A Figura 1B mostra o ganho de peso corporal dos animais durante um período de 60 dias após o nascimento. No d60, não houve diferença significativa no peso entre os os animais dos grupos PN e BP (BP, $n = 37$, \square símbolos, peso final $271,8 \pm 66,66$ g, PN, $n = 21$, \blacksquare símbolos, peso final $298,3 \pm 68,68$ g).

Efeito da RPG na pressão arterial sistêmica e massa cardíaca em d60

Os valores médios de PA sistêmica da prole na 8ª semana de vida são mostrados na Figura 2A. Os valores no grupo BP ($131,8 \pm 2,7$ mmHg) foram significativamente maiores que os do grupo PN ($120,3 \pm 3,33$ mmHg, $p = 0,021$). Os corações isolados em d60 foram rapidamente pesados após o sacrifício, e seus pesos não mostraram diferença significativa (PN, $1,71 \pm 0,34$ g, BP, $1,48 \pm 0,22$ g), como mostrado na Figura 2B. De forma semelhante, a razão entre o peso do tecido cardíaco (mg) e o peso corporal (g) (Figura 2C) não mostrou diferença significativa entre os grupos (PN, $3,89 \pm 0,48$ mg/g, BP, $3,86 \pm 0,28$ mg/g).

Efeito do RPG na morfologia cardíaca

A Figura 3A mostra a quantificação da área de fibras de colágeno no coração de ratos a d60. Observamos um aumento significativo na área de fibras de colágeno no coração de animais BP em comparação com os PN. A análise morfométrica pela coloração da AT permitiu a quantificação do número de miócitos presentes no coração da linhagem PN e BP. Os resultados mostraram uma diminuição significativa no número de miócitos nos corações da descendência BP quando comparados com os PN (Figura 3B). Após a perfusão de alguns animais ($n = 6$), os ventrículos esquerdos foram coletados, pesados e processados para quantificação da área de cardiomiócitos. A relação entre o peso do ventrículo esquerdo (mg) e o peso corporal (g) (Figura 3C) não mostrou diferença significativa nos grupos PN ($2,28 \pm 0,25$ mg/g) e BP ($2,49 \pm 0,27$ mg/g). Como visto na Figura 3D, a área de miócitos foi significativamente maior no grupo BP ($188,2 \pm 4,14 \mu\text{m}^2$) em comparação com o grupo PN ($160,8 \pm 2,57 \mu\text{m}^2$).

Modulação de Cx43 no coração

Recolhemos fragmentos do ventrículo esquerdo para análise da expressão de Cx43. Os valores após análise densitométrica são mostrados na Figura 4. Em comparação com o grupo PN, o grupo BP apresentou aumentos significativos nos níveis de RNAm de Cx43 (PN, $0,695 \pm 0,058$, $n = 4$, ratos nascidos de 4 mães diferentes, BP, $0,799 \pm 0,032$, $N = 4$, ratos nascidos de 4 mães diferentes).

Discussão

Como esperado e descrito na literatura,^{7,20,21} os descendentes de ratos que receberam uma dieta de baixa proteína (grupo BP) nasceram mais leves que os descendentes de ratos alimentados com uma dieta de proteína normal (grupo PN). A exposição fetal aos glicocorticoides (GC) tem sido proposta como um dos principais fatores de risco para doenças crônicas na idade adulta.²²

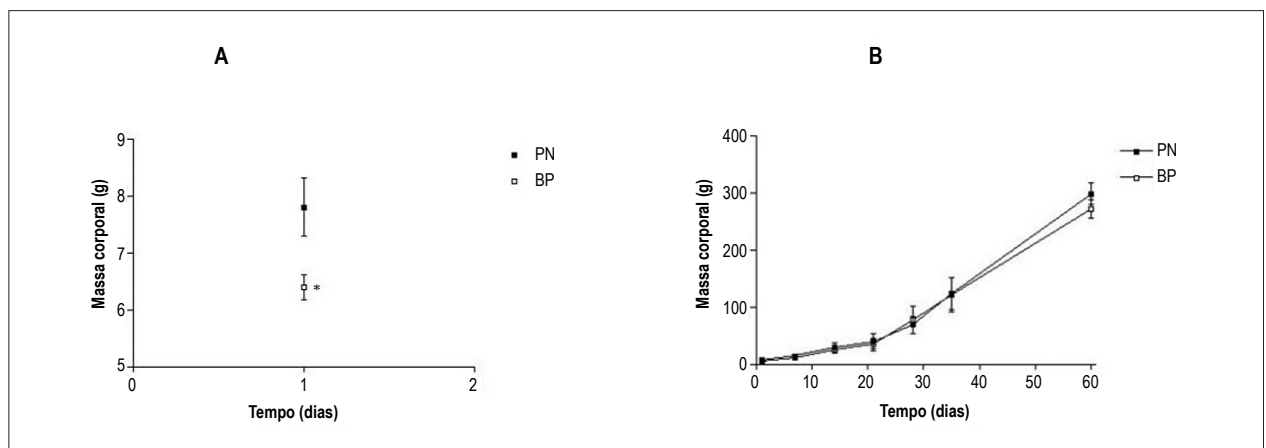


Figura 1 – Efeito da restrição protéica gestacional nos pesos da prole. (A) no dia 1 de descendência masculina de ratos alimentados com uma dieta de proteína normal (PN, 17% de proteína, \blacksquare símbolo) ou dieta de baixa proteína (BP, 6% de proteína, símbolo \square) durante a gravidez ($X \pm DP$, $*p = 0,0048$ versus PN); (B) curva de crescimento da prole desde o 1º ao 60º dia após o nascimento.

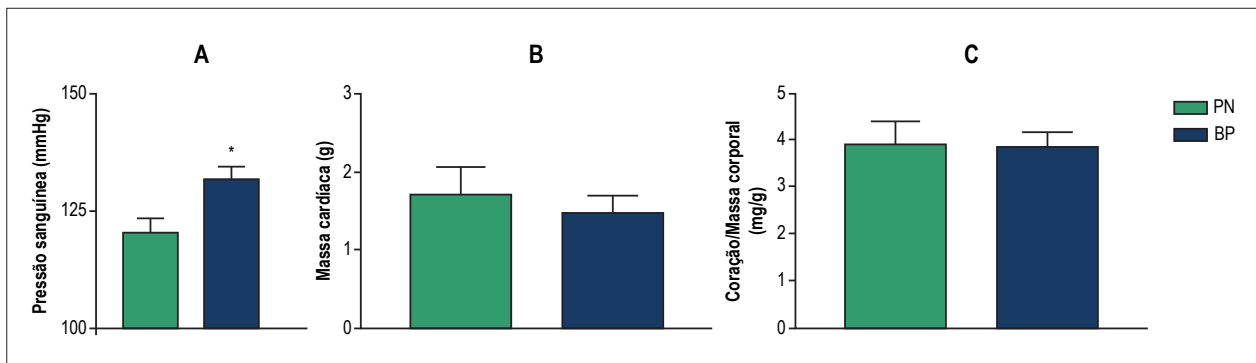


Figura 2 – Efeito da restrição protéica gestacional nos níveis de pressão arterial e massa cardíaca da prole em d60. (A) pressão sanguínea (mmHg); (B) massa cardíaca (g); (Mg/g) da massa cardíaca e da massa corporal em descendentes de machos jovens de ratos alimentados com uma dieta de proteína normal (PN, barra cheia) ou dieta de baixa proteína (BP, barras vazias) ($n = 12$; $X \pm DP$, * $p = 0,021$ versus PN).

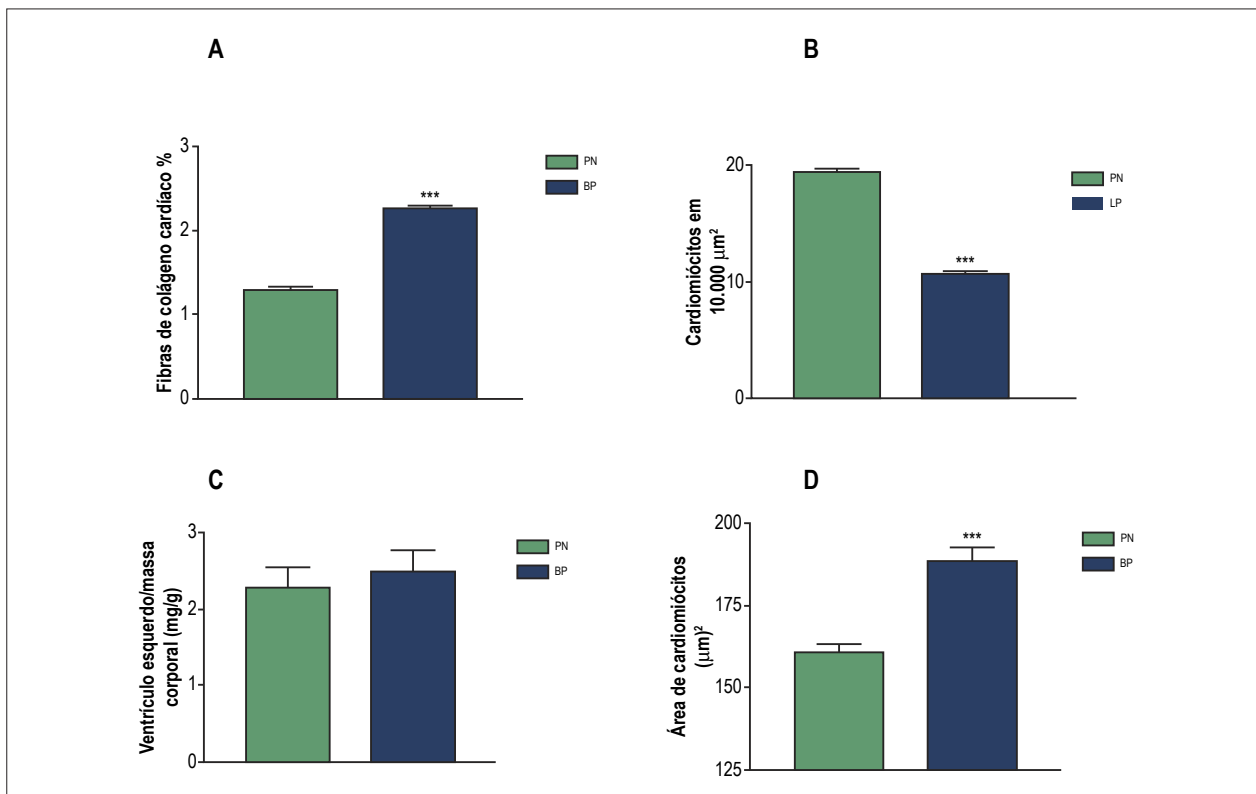


Figura 3 – Efeito da restrição protéica gestacional na morfometria cardíaca em d60. (A) porcentagem de área de fibras de colágeno / $104 \mu\text{m}^2$ em seções do ventrículo esquerdo coradas com picrossírius-hematoxilina ($n = 6$; *** $p < 0,0001$ versus PN); (B) número de miócitos / $104 \mu\text{m}^2$ nas seções do ventrículo esquerdo coradas com azul de toluidina ($n = 6$; * $p < 0,0001$ versus PN); (C) relação entre peso ventricular esquerdo e massa corporal (mg/g) aos 60 dias de descendência de ratos alimentados com uma dieta de proteína normal (PN, barras cheias) ou dieta de baixa proteína (BP, barras vazias); (D) área de seção transversal dos cardiomiócitos (μm^2 , $X \pm DP$, $n > 100$ miócitos, *** $p < 0,0001$ versus PN).

A exposição fetal exógena ou endógena (estresse materno) ao excesso de GC diminui o crescimento fetal.²³⁻²⁵ Durante a gravidez, altos níveis de cortisol (em mulheres)²⁶ e corticosterona (em ratos)²⁷ estão presentes na circulação materna.²⁴ Vários estudos em ratos mostraram que a desnutrição materna em resposta ao estresse materno aumenta os níveis de corticosterona no plasma, diminui a

expressão placentária da 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2) e aumenta a expressão placentária da 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (11 β -HSD1).^{24,28} Um estudo em fetos de ovelhas mostrou que os receptores mineralocorticoides (MR) e GC (GR), assim como o 11 β -HSD1, são expressos abundantemente nos miócitos e nos vasos sanguíneos cardíacos.²⁹ Os autores sugeriram que

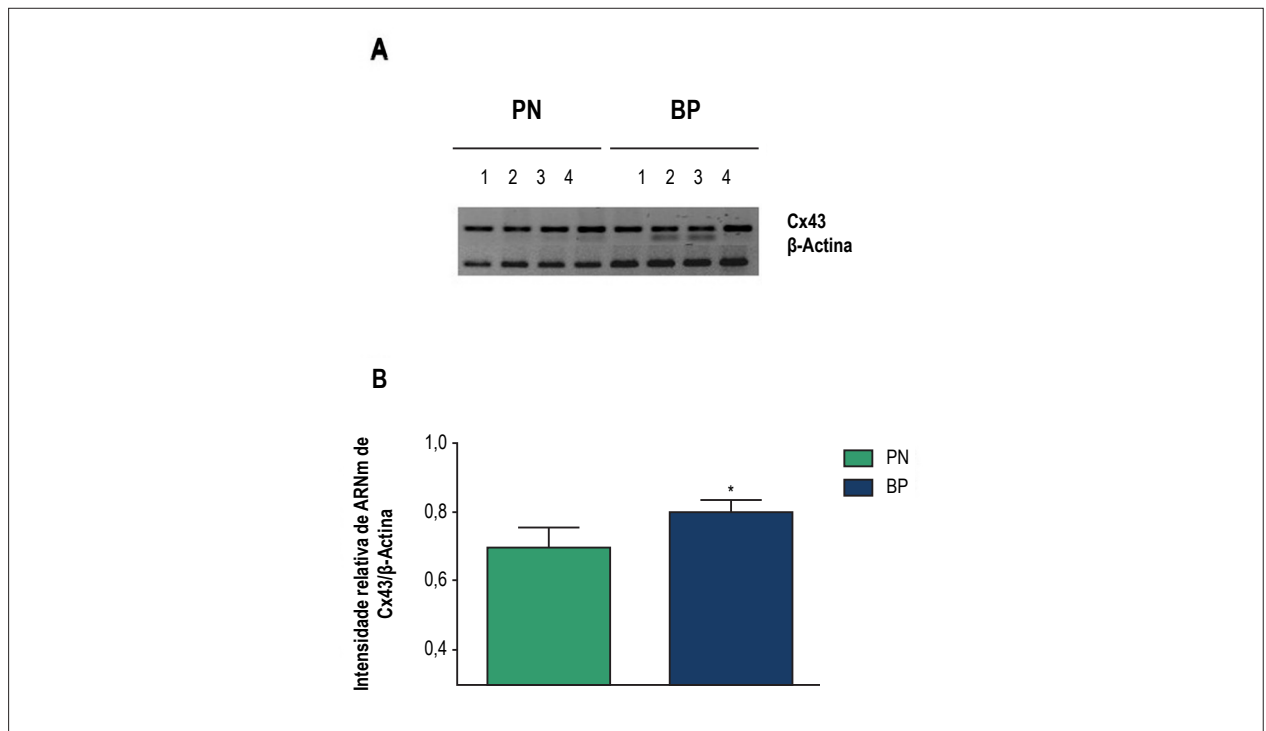


Figura 4 – RT-PCR da expressão de RNAm de Cx43 no ventrículo esquerdo (A) e análise densitométrica (B). Os descendentes masculinos jovens de ratos alimentados com uma dieta de proteína normal (PN, barra cheia) ou dieta de baixa proteína (BP, barra vazia) a d60 (n = 4; X ± DP da densidade óptica da expressão de RNA de Cx43 em relação a β-Actina; * p = 0,02 versus PN).

o GC tem acesso a MR e a GR no coração fetal e quando os níveis plasmáticos de GC são elevados durante uma dieta de baixa proteína, a ação do GC nos receptores MR e GR cardíacos também aumenta. O GC poderia estimular o crescimento cardíaco, quer por hipertrofia ou hiperplasia, ou possivelmente por ambos. A hipertrofia cardíaca também pode resultar de níveis elevados de PA³⁰. No d60 em nosso estudo, a prole BP tinha aumentado os níveis de PA sistólica em paralelo a uma área aumentada de fibras de colágeno cardíaco. No entanto, estas alterações não foram suficientes para aumentar o peso cardíaco, o que poderia caracterizar as alterações como hipertrofia cardíaca. Embora a área dos cardiomiócitos tenha aumentado, o número de cardiomiócitos diminuiu. Esse achado, observado em corações de machos jovens de prole em nosso estudo, apoia a evidência de acúmulo de colágeno intersticial, um sintoma de hipertrofia cardíaca em resposta à hipertensão em corações humanos adultos.³⁰

O sistema renina-angiotensina (RAS) desempenha um papel importante nas formas primária e secundária de hipertensão. Os componentes do RAS, como a enzima conversora da angiotensina (IECA) e a angiotensina II, são produzidos localmente nos tecidos cardíacos³¹ e são candidatos primários a fatores promotores de remodelação, principalmente hipertrofia cardíaca de miócitos e aumento da fibrose extracelular, que levam à deterioração da função cardíaca.³² Vários modelos animais experimentais foram

desenvolvidos para investigar as associações entre desnutrição fetal e doença cardiovascular na vida adulta,^{33,34} e um possível envolvimento do RAS sistêmico no desenvolvimento de hipertensão arterial foi relatado.^{35,36}

A composição da matriz extracelular em condições fisiológicas e fisiopatológicas pode afetar o grau de acoplamento elétrico em miócitos cardíacos.³⁷ A condução de impulsos elétricos no coração é determinada principalmente por três parâmetros-chave: acoplamento elétrico entre cardiomiócitos, excitabilidade de cardiomiócitos individuais e arquitetura do tecido conjuntivo.³⁷ Estes parâmetros de condução são mediados principalmente por Cx43, canais de sódio NaV1.5, e pela quantidade de fibras de colágeno, respectivamente. Nas arritmias cardíacas,³⁸ foram frequentemente observadas anomalias em qualquer um destes parâmetros de condução. Cx43 é geralmente regulado negativamente, menos fosforilado e/ou redistribuído nos discos intercalares ao longo do cardiomiócito.^{14,39,40} Nosso estudo fornece a primeira evidência de aumento da expressão de Cx43 em corações de ratos submetidos à RPG. Embora nossos resultados sejam limitados, nossa hipótese é que o aumento do acúmulo de fibras de colágeno no coração associado com aumento da pressão arterial sistólica leva a alterações na condução de impulsos elétricos cardíacos. Em resposta a esta lesão e associada à ao aumento da área de cardiomiócitos observada, a preservação da comunicação célula a célula através da regulação positiva da Cx43 miocárdica pode ser atribuída a um efeito protetor.

Conclusão

Usando um modelo de rato de restrição proteica fetal, mostramos que a RPG afeta a organização e o número de miócitos no coração da prole e aumenta a quantidade de fibras de colágeno no tecido cardíaco, mostrando claramente um processo degenerativo compatível com fibrose. Esse achado reforça a associação entre desnutrição materna com baixo peso ao nascer e o risco de morbidade cardiovascular na idade adulta. A RPG aumenta a área de cardiomiócitos e a expressão de Cx43 no miocárdio de ratos machos adultos jovens, sugerindo que este mecanismo visa compensar o processo fibrótico pelo acúmulo de fibras de colágeno no interstício cardíaco.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Daniela Neodini e Renata Barbieri pela sua excelente assistência técnica. Este trabalho foi parcialmente apoiado por doações das agências de fomento brasileiras FHO-Uniararas. KFR foi o beneficiário de uma bolsa de pós-graduação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomédicas, FHO-Uniararas.

Referências

1. Kingdom JC, Burrell SJ, Kaufmann P. Pathology and clinical implications of abnormal umbilical artery doppler waveforms ultrasound. *Obstet Gynecol.* 1997;9(4):271-86.
2. De Onis M, Blossner M, Borghi E, Frongillo EA, Morris R. Estimates of global prevalence of childhood underweight in 1990 and 2015. *JAMA.* 2004;291(21):2600-6.
3. Seckl JR. Physiologic programming of the fetus. *Clin Perinatol.* 1988;15(4):939-62.
4. Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol.* 2004;151(Suppl 3):U49-U62.
5. Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet.* 1986;1(8489):1077-81.
6. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21:29-37.
7. Moraes C, Rebelato HJ, Amaral MEC, Resende TM, Silva EV, Esquisatto MAM, Catisti. Effect of maternal protein restriction on liver metabolism in rat offspring. *J Physiol Sci.* 2014; 64(5):347-55.
8. Sathishkumar K, Elkins R, Yallampalli U, Yallampalli C. Protein restriction during pregnancy induces hypertension in adult female rat offspring - influence of oestradiol. *Br J Nutr.* 2012; 107(5):665-73.
9. Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxid Redox Signal.* 2009;11(2):251-66.
10. Spray DC, Burt JM. Structure activity relations of cardiac gap-junction channel. *Am J Phys.* 1990;258(2Pt1):C195-205.
11. Peters NS. Gap junctions and clinical cardiology: from molecular biology to molecular medicine. *Eur Heart J.* 1997;18(11):1697-702.
12. Severs NJ. Pathophysiology of gap junctions in heart disease. *J Card Electrophys.* 1994;5(5):462-75.
13. Haeffliger JA, Meda P. Chronic hypertension alters the expression of Cx43 in cardiovascular muscle cells. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(4): 431-8.
14. Fontes MS, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochim Biophys Acta* 2012;1818(8):2020-9.
15. Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr.* 1993;123(11):1923-31.
16. Zambrano E, Bautista CJ, Deás M, Martínez-Samayoá PM, González-Zamorano M, Ledesma H, et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol.* 2006; 571(Pt1):221-30.
17. Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P. Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol.* 1995;26(4):1068-79.
18. Mendes AB, Ferro M, Rodrigues B, Souza MR, Araujo RC, Souza RR. Quantification of left ventricular myocardial collagen system in children, young adults, and the elderly. *Medicina (B Aires).* 2012;72(3):216-20.
19. Silva RB, Mesquita FF, Andreo M, Assalin HB, Gontijo JAR, Boer PA. Effect of gestational protein restriction on left ventricle hypertrophy and heart angiotensin II signaling pathway in adult offspring rats. *Health.* 2013;5(4A):78-84.
20. Rebelato HJ, Esquisatto MAM, Moraes C, Amaral MEC, Catisti R. Gestational protein restriction induces alterations in placental morphology and mitochondrial function in rats during late pregnancy. *J Mol Histol.* 2013;44(6):629-37.
21. Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR. Maternal dietary protein restriction, placental glucocorticoid metabolism and the program of hypertension. *Placenta.* 1996;17(2-3):169-72.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, Análise estatística, Obtenção de financiamento e Redação do manuscrito: Catisti R; Obtenção de dados: Rossini KF, Rebelato HJ; Análise e interpretação dos dados e Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Oliveira CA, Esquisatto MAM, Catisti R.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela Fundação Hermínio Ometto.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Kamila Fernanda Rossini pelo Centro Universitário Hermínio Ometto.

22. Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(6):479-88.
23. Belkacemi L, Chen CH, Ross MG, Desai M. Increased placental apoptosis in maternal food restricted gestations: role of the Fas pathway. *Placenta.* 2009;30(9):739-51.
24. Belkacemi L, Jelks A, Chen CH, Ross MG, Desai M. Altered placental development in undernourished rats: the role of maternal glucocorticoids. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011;9:105.
25. Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann NY Acad Sci.* 2004;1032:63-84.
26. Nolten WE, Rueckert PA. Elevated free cortisol index in pregnancy: possible regulatory mechanisms. *Am J Obstet Gynecol.* 1981;139(4):492-8.
27. Neaves WB, Billingham RE. Transplantation of the testis. *Transplantation.* 1979;28(3):163-5.
28. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology.* 2001;142(5):1692-702.
29. Reini SA, Wood CE, Jensen E, Keller-Wood M. Increased maternal cortisol in late gestation ewes decreases fetal cardiac expression of 11 β -HSD2 mRNA and the ratio of AT1 to AT2 receptor mRNA. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006;291(6):R1708-16.
30. Diez J. Mechanisms of cardiac fibrosis in hypertension. *J Clin Hypertens.* 2007;9(7):546-50.
31. Varagic J, Frohlich ED. Local cardiac renin-angiotensin system: hypertension and cardiac failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002;34(11):1435-42.
32. Berecek KH, Reaves P, Raizada M. Effects of early perturbation of the reninangiotensin system on cardiovascular remodeling in spontaneously hypertensive rats. *Vasc Pharmacol.* 2005;42(3):93-8.
33. Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig.* 2003;10(7):392-9.
34. Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol.* 2001;530(Pt1):141-52.
35. Rasch R, Skriver E, Woods LL. The role of the RAS in programming of adult hypertension. *Acta Physiol Scand.* 2004;181(4):537-42.
36. Kawamura M, Itoh H, Yura S, Mogami H, Suga S, Makino H, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Sagawa N, Fujii S. Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease. *Endocrinology.* 2007;148(3):1218-25.
37. Shanker AJ, Yamada K, Green KG, Yamada KA, Saffitz JE. Matrix-protein-specific regulation of Cx43 expression in cardiac myocytes subjected to mechanical load. *Circ Res.* 2005;96(5):558-66.
38. Kleber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev.* 2004;84(2):431-88.
39. Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res.* 2008;80(1):9-19.
40. Fontes MS, Raaijmakers AJ, van Doorn T, Kok B, Nieuwenhuis S, van der Nagel R, et al. Changes in Cx43 and NaV1.5 expression precede the occurrence of substantial fibrosis in calcineurin-induced murine cardiac hypertrophy. *PLoS One.* 2014;9(1):e87226.