



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

EMMANUEL VERÍSSIMO DE ARAÚJO

**EFEITOS DA DISLIPIDEMIA MATERNA SOBRE OS NÍVEIS DE
PRESSÃO ARTERIAL, CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO E
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA PROLE DE FÊMEAS**

JOÃO PESSOA – PB

2019

EMMANUEL VERÍSSIMO DE ARAÚJO

**EFEITOS DA DISLIPIDEMIA MATERNA SOBRE OS NÍVEIS DE
PRESSÃO ARTERIAL, CONTROLE CARDIORRESPIRATÓRIO E
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NA PROLE DE FÊMEAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia- SBFis, associada ao Centro de Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba (Cbiotec-UFPB), como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz de Brito
Alves

JOÃO PESSOA – PB

2019

D278e De Araujo, Emmanuel Verissimo.

Efeitos da dislipidemia materna sobre os níveis de pressão arterial, controle cardiorrespiratório e parâmetros bioquímicos na prole de fêmeas / Emmanuel Verissimo de Araujo. - João Pessoa, 2020.

84 f. : il.

Orientação: José Luis de Brito Alves.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Dislipidemia materna. 2. Fêmeas. 3. Hipertensão arterial. 4. Controle cardiorrespiratório. 5. Atividade autonômica. I. Alves, José Luis de Brito. II. Título.

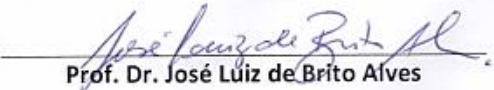
UFPB/BC

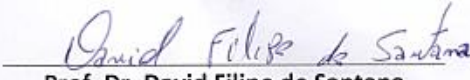


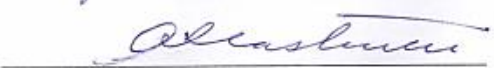
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Ata da 17ª Sessão de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Associada Universidade Federal da Paraíba, realizada em 31 de Janeiro de 2020.

No trigésimo primeiro dia do mês de janeiro de dois mil e vinte, às nove horas, foi realizada, na sala 02 do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, a defesa pública da Dissertação de Mestrado do discente **Emmanuel Veríssimo de Araújo** intitulada “Efeitos da dislipidemia materna sobre os níveis de pressão arterial, controle cardiorrespiratório e parâmetros bioquímicos na prole de fêmeas”. A banca examinadora foi constituída pelo orientador, o **Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves** (Universidade Federal da Paraíba), pela 1ª examinadora, **Prof.ª Dr.ª Ana Maria de Lauro Castrucci** (Universidade Federal de São Paulo) e pelo 2º examinador **Prof. Dr. David Filipe de Santana** (Universidade Federal de Pernambuco). Após a apresentação pública do trabalho, iniciou-se a arguição do candidato por cada membro, tendo o candidato o mesmo tempo para responder a cada examinador. Na sequência, a Banca Examinadora se reuniu em caráter sigiloso e considerou o candidato Aprovado. De acordo com o artigo 98 da Resolução 35/2019 do CONSEPE, o discente terá até 60 (sessenta) dias, a partir da presente data, para fazer as correções solicitadas pela banca examinadora e entregar as cópias corrigidas da Dissertação à Biblioteca Central da UFPB e à secretaria deste Programa, contendo obrigatoriamente a ficha catalográfica fornecida pela Biblioteca Central da UFPB, cabendo à esta Universidade a expedição do diploma para gozo das prerrogativas legais do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.


Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves


Prof. Dr. David Filipe de Santana


Prof.ª Dr.ª Ana Maria de Lauro Castrucci

*Dedico aos meus pais, por todo
amor, apoio e confiança.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Dona Carminha e Seu Adélio**, por me proporcionarem a estrutura necessária para cursar mestrado em fisiologia, que apesar de não conhecerem, me apoiaram incondicionalmente.

Deixo aqui registrado meu sentimento de gratidão aos meus irmãos, **Patrícia, Pollyana e Eduardo**, e aos meus sobrinhos, **Eduardo Filho e Thaís**, por me apoiarem e estarem ao meu lado durante esses dois anos de mestrado.

Preciso agradecer aos meus amigos, **Djihermerson e Eduardo**, que me deram força para eu seguir sempre em frente.

Outros amigos como **Mickael, Micaelle e Lucas** foram verdadeiros parceiros de experimentos e juntos compartilhamos bastante conhecimento e aprendizado. Sou grato por isso.

Presto meus agradecimentos a minha namorada, **Deyse**. Sou grato por todo o apoio, por ter me ouvido e estado ao meu lado nesse momento difícil que a pesquisa brasileira tem passado. Apesar do nosso relacionamento recente, vivi ótimos momentos com você e pretendo levar essas boas lembranças onde eu for.

Agradeço também aos meus amigos e colegas do **LACONCHA** e do **LANUHAS**.

Deixo um agradecimento especial para o meu orientador, pesquisador e professor universitário brasileiro, **José Luiz**, ele foi o cara que me inseriu no mundo das ciências fisiológicas, foi meu principal crítico e apoiador na produção de trabalhos científicos. Acredito que dentre suas qualidades, a paciência que ele tem diante de adversidades ocorridas durante a condução de experimentos e sua perseverança em extrair o melhor resultado em cada momento, seja na bancada do laboratório ou ao analisar os dados, me fizeram admirá-lo e certamente venho tentando me espelhar nele.

A **todos os professores** do Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da UFPB, por todo conhecimento transmitido e pela contribuição na minha formação.

Aos professores membros da Banca Examinadora, **Ana e David**, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento desse trabalho. Agradeço imensamente.

Agradecer também a todos os demais que criticaram, questionaram, discutiram, opinaram e contribuíram para a realização desta obra.

“When I understand my enemy well enough to defeat him, then in that moment, I also love him.”

A. E. Wiggi

RESUMO

A hipertensão arterial evidenciada em ratos adultos expostos a dislipidemia materna pode ser dependente do sexo. Neste trabalho, investigamos os efeitos da dislipidemia durante a gestação e lactação sobre parâmetros cardiorrespiratórios e metabólicos na prole fêmea. Ratas foram divididas em dois grupos: um recebeu dieta controle (CTL) e outro recebeu dieta dislipidêmica (DLP) durante a gestação e lactação. Parâmetros antropométricos e bioquímicos, foram realizados nos filhotes dessas ratas aos 30 e 90 dias de idade, tais como: peso e comprimento da prole, testes oral de tolerância à glicose (TOTG), tolerância à insulina (TTI), colesterol total (CT), lipoproteínas de alta (HDL), baixa (LDL), muito baixa densidade (VLDL), triglicerídeos (TG) e o malondialdeído (MDA). Além disso, parâmetros respiratórios, tais como frequência respiratória (FR), volume corrente (VT) e ventilação (VE), foram avaliadas por pletismografia de corpo inteiro durante um período basal e após ativação de quimiorreceptores respiratórios com mistura hipercápnica (7 % CO₂). Aos 90 dias de idade, a pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) foram mensuradas em condições basais e após administração de cianeto de potássio (KCN, 0,04%) para avaliação do quimiorreflexo periférico, e do hexametônio (30 mg/kg), para avaliação do tônus simpático. Finalmente, avaliamos a variabilidade da FC e PA em condições basais. O grupo DLP apresentou baixo peso ao nascer ($P<0.05$), porém sem diferenci-lo na fase adulta. Aos 30 dias de idade, os níveis séricos de TG e CT estavam aumentados na prole DLP ($P<0.05$). As fêmeas DLP também apresentaram aumento na FR basal, e maior resposta ventilatória à hipercapnia comparado ao grupo CTL ($P<0.05$). Aos 90 dias, a prole DLP apresentou maior área sob a curva no TOTG e TTI em comparação ao grupo CTL. Em condições basais, a FR, VT, VE, foram semelhantes entre os grupos, mas a prole DLP apresentou uma resposta cardiovascular e ventilatória elevada à hipercapnia quando comparada ao grupo CTL ($P<0.0001$). Os níveis pressóricos das ratas DLP estavam elevados ($P<0.05$), mas sem alteração na FC. Na análise espectral, foi observado que o componente LF da PA sistólica e a razão LF/HF do intervalo cardíaco foram elevados no grupo DLP ($P<0.05$). Os desafios farmacológicos impostos pelo KCN, revelou maior resposta pressórica do grupo DLP ($P<0.05$), mas sem alterar o delta de FC. Após administração do hexametônio, as fêmeas DLP demonstraram uma tendência a tônus simpático ($P<0.06$). Esses achados foram combinados com elevados níveis séricos de MDA ($P<0.05$). A prole de ratas DLP apresentaram hipertensão arterial na vida adulta combinada com hiperatividade simpática e respostas ventilatórias e autonômicas amplificadas frente à hipóxia e hipercapnia.

Palavras-chave: Dislipidemia materna. Fêmeas. Hipertensão arterial. Controle cardiorrespiratório. Atividade autonômica.

ABSTRACT

High blood pressure evidenced in adult rats exposed to maternal dyslipidemia may be sex dependent. In this work, we investigate the effects of dyslipidemia during pregnancy and lactation on cardiorespiratory and metabolic parameters in female offspring. Rats were divided into two groups: one received a control diet (CTL) and another received dyslipidemic diet (DLP) during pregnancy and lactation. Anthropometric and biochemical parameters were performed in the pups of these rats at 30 and 90 days of age, such as: weight and length of offspring, oral glucose tolerance (OGT), insulin tolerance (IT), total cholesterol (TC) tests, high (HDL), low (LDL) and very low density (VLDL) lipoproteins, triglycerides (TG), and malondialdehyde (MDA). In addition, respiratory parameters such as respiratory frequency (RF), tidal volume (VT), and minute ventilation (VE) were assessed by whole body plethysmography during a baseline period and after activation of hypercapnic mixture (7% CO₂) respiratory chemoreceptors. At 90 days of age, blood pressure (BP) and heart rate (HR) were measured under basal conditions and after administration of potassium cyanide (KCN, 0.04%) to evaluate peripheral chemoreflex, and hexamethonium (30 mg / kg) to assess sympathetic tone. Finally, we evaluated the HR and BP variability under baseline conditions. The DLP group had low birth weight ($P<0.05$), but without differing weight in adulthood. At 30 days of age, serum TG and TC levels were increased in DLP offspring ($P<0.05$). DLP females also had an increase in basal RF, and a higher ventilatory response to hypercapnia compared to the CTL group ($P<0.05$). At 90 days, the DLP offspring presented larger area under the curve in OGT and IT compared to CTL group. At baseline, RF, VT, VE were similar between groups, but DLP offspring had a high cardiovascular and ventilatory response to hypercapnia when compared to CTL group ($P<0.0001$). The blood pressure levels of the DLP rats were high ($P<0.05$), but without change in HR. In the spectral analysis, it was observed that the LF component of systolic BP and the LF / HF ratio of cardiac interval were elevated in the DLP group ($P<0.05$). The pharmacological challenges imposed by the KCN revealed higher pressure response of the DLP group ($P<0.05$) but without altering the HR delta. After hexamethonium administration, DLP females showed a tendency to sympathetic tone ($P<0.06$). These findings were combined with elevated serum MDA levels ($P<0.05$). The offspring of DLP rats presented arterial hypertension in adulthood combined with sympathetic hyperactivity and amplified ventilatory and autonomic responses to hypoxia and hypercapnia.

Keywords: Maternal dyslipidemic. Females. Hypertension. Cardiorespiratory control. Autonomic activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Vista representativa do metabolismo sistêmico de lipídios.....	22
Figura 2 - Metabolismo de ácidos graxos no tecido periuterino <i>in situ</i> de ratas durante a gestação.....	23
Figura 3 - Vista esquemática das localizações dos quimiorreceptores e dos barorreceptores.....	27
Figura 4 - Regiões do tronco encefálico responsáveis pelo controle respiratório, cardiovascular e autonômico.....	29
Figura 5 - Demonstração fisiológica do quimiorreflexo periférico e barorreflexo.....	33
Tabela 1 - Composição nutricional da dieta.....	42
Figura 6 - Resumo do desenho experimental do estudo.....	43
Tabela 2 - Parâmetros somáticos (peso corporal, comprimento e índice de Lee) na prole fêmea de mães dislipidêmicas (DLP, n = 9) e controles (CTL, n = 9)	49
Figura 7 - Padrão ventilatório em repouso e sob hipercapnia das proles fêmea CTL e DLP aos de 30 dias de idade.....	50
Figura 8 - Padrão ventilatório e variabilidade respiratória sob condições basais das proles fêmeas CTL e DLP aos de 30 dias de vida.....	51
Figura 9 - Testes para o metabolismo glicídico, perfil lipídico e níveis de MDA das proles CTL e DLP com 30 dias de vida.....	52

Figura 10 - Padrão ventilatório em repouso e sob hipercapnia das proles CTL e DLP com 90 dias de idade.....	53
Figura 11 - Testes para o metabolismo glicídico, perfil lipídico e níveis de MDA da prole com 90 dias de vida.....	54
Figura 12 - Parâmetros cardiovasculares basais das proles CTL e DLP aos 90 dias de idade.....	56
Tabela 3 - Variáveis do eletrocardiograma sobre condições basais das proles dos grupos DLP e CTL aos 90 dias de vida.....	57
Figura 13 - Respostas cardiorrespiratória durante a indução da hipercapnia em descendentes de mães DLP e CTL.....	58
Figura 14 - Respostas cardiovasculares frente ao desafio do quimiorreflexo periférico provocadas pela hipóxia citotóxica (KCN) nas ratas descendentes de mães DLP e CTL..	60
Figura 15 - Efeito do bloqueador ganglionar (hexametônio) sobre os níveis de PAM da prole de ratas DLP e CTL com 90 dias de vida.....	61
Figura 16 – Sumarização de resultados dos efeitos da dislipidemia materna sob a prole de fêmeas.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

V DBD	Quinta Diretriz Brasileira de Dislipidemias
ΔFC	Delta da frequência cardíaca
ΔFR	Delta da frequência respiratória
ΔPAM	Delta da pressão arterial média
ANOVA	Análise de variância
Aug-E	Grupo de neurônios expiratórios
BötC	Região botzinger
SBRS	Sensibilidade barorreflexa espontânea
CO₂	Dióxido de carbono
CONCEA	Conselho nacional de controle de experimentação animal
CRV	Coluna respiratória ventral
CT	Colesterol total
CTL	Controle
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CVLM	Região ventrolateral caudal do bulbo
cVRG	Grupo respiratório ventral caudal
DC	Débito cardíaco
DLP	Dislipidêmico
DMG	Diabetes <i>mellitus</i> gestacional
DMT2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Early-I	Grupo de neurônios inspiratórios precoce
E-2	Fase expiratória
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	Lipoproteína de alta densidade circulante
HF	Do inglês “high frequency”

I	Fase inspiratória
Icam-1	Molécula de adesão intercelular-1
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-1b	Interleucina 1 beta
IMC	Índice de massa corporal
INaP	Canais de sódio persistentes
Late-E	Grupo de neurônios expiratórios tardios
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	Lipoproteína de baixa densidade circulante
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LF	Do inglês “low frequency”
LF/HF	Razão baixa frequência e alta frequência ou razão simpatovagal
LLP	Lipase lipoproteica placentária
LPL	Lipase lipoproteica
MDA	Malonaldeído
N₂	Molécula de nitrogênio
NA	Núcleo ambíguo
NaCl	Cloreto de sódio
NF-Kb	Fator de transcrição nuclear kappa b
NOS	Óxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
O₂	Molécula de oxigênio
PA	Pressão arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial hidrogeniônico
P-I	Fase pós-inspiratória
pré-I	Grupo de neurônios pré inspiratórios
Pré-BöTC	Região pré-botzinger
Post-I	Grupo de neurônios pós inspiratórios
PO₂	Pressão parcial de oxigênio

PCO₂	Pressão parcial de dióxido de carbono
Ramp-I	Grupo de neurônios inspiratórios em rampa
RNA_m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAs	Ácidos ribonucleicos
rVRG	Grupo respiratório ventral rostral
RTN	Núcleo retrotrapezóide
RV	Registro ventilatório
RVH	Registro ventilatório sob hipercapnia
RVLM	Região rostral ventrolateral do bulbo
RVP	Resistência vascular periférica
SBRS	Barorreflexo espontâneo
SD1	Desvio padrão de parâmetros não lineares em curto prazo
SD2	Desvio padrão de parâmetros não lineares em longo prazo
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SNC	Sistema nervoso central
SNA	Sistema nervoso autonômico
SNAP	Sistema nervoso autônomo parassimpático
SNAS	Sistema nervoso autônomo simpático
TG	Triglicerídeos
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
TTI	Teste de tolerância à insulina
VC	Volume corrente
VE	Volume minuto
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDLR	Receptor de lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Hipótese da Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (DOHaD).....	17
1.2 Metabolismo Lipídico Gestacional e Dislipidemia Materna.....	19
1.3 Fisiologia do Controle Cardiorrespiratório.....	26
1.4 Hipertensão Arterial Sistêmica: Um problema de saúde pública.....	34
1.5 Hipertensão e Dimorfismo Sexual.....	35
2 OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 Animais e desenho experimental.....	41
4.2 Avaliação de características somáticas da prole.....	43
4.3 Testes de tolerância à glicose e insulina.....	43
4.4 Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo.....	44
4.5 Procedimento cirúrgico para registro direto de PA em ratas aos 90 dias de idade.....	44
4.6 Medições e análises da pressão arterial e avaliação cardiorrespiratória.....	45
4.7 Análise do ECG.....	46
4.8 Análise espectral da pressão arterial.....	46
4.9 Análise estatística.....	47
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Parâmetros Antropométricos.....	49
5.2 Efeitos da dislipidemia materna sobre a ventilação em repouso e a função quimiorreflexa dos filhotes com 30 dias de vida.....	49
5.3 Efeitos da dislipidemia materna sobre o metabolismo lipídico, glicídico e os níveis de MDA dos filhotes aos 30 dias de idade.....	51
5.4 Efeitos da dislipidemia materna sobre a respiração em repouso e a função quimiorreflexa aos 90 dias de idade.....	51
5.5 Efeitos da dislipidemia materna sobre o metabolismo lipídico, glicídico e os níveis de MDA dos filhotes com 90 dias de vida.....	53
5.6 Efeitos da dislipidemia materna sobre os parâmetros cardiovasculares.....	55
5.7 Efeitos da dislipidemia materna sobre repostas cardiovasculares a hipercapnia da prole aos 90 dias de vida.....	55

5.8 Efeitos da dislipidemia materna nas respostas cardiovasculares através da ativação do quimiorreflexo periférico na prole fêmea com 90 dias de idade.....	59
5.9 Efeitos da dislipidemia materna sobre o tônus simpático aos 90 dias de idade.....	60
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	70
ANEXO.....	82
ANEXO A – Artigo publicado na revista Applied Physiology Nutrition and Metabolism.....	82
ANEXO B – Artigo publicado na revista Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.....	83
ANEXO C – Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais (CEUA).....	84

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.2 Hipótese da Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (DOHaD)

Em meados da década de 80, Barker e Osmond publicavam um artigo na revista *The Lancet* intitulado, “*Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales*”, onde demonstraram uma forte correlação de proporção direta entre indivíduos expostos a condições adversas no início da vida, a exemplo de maior taxa de mortalidade infantil com quantitativo de pessoas adultas acometidas por doença isquêmica cardíaca naquela população estudada (BARKER; OSMOND, 1986). Desde então pesquisadores têm tentado entender como o ambiente materno ou perinatal impactam sobre o desenvolvimento de saúde ou de doença nos descendentes (WADHWA *et al.*, 2009).

O termo plasticidade fenotípica é descrito como sendo a capacidade de um único genótipo produzir mais de uma forma alternativa de morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento em resposta às condições ambientais (WEST-EBERHARD., 1989). Combinado a isso, é bem descrito que mamíferos apresentam uma maior suscetibilidade a mudanças fenotípicas (maior plasticidade) nos estágios de gestação, lactação e infância (HANSON *et al.*, 2011), toda via, entre as faixas etárias que compreendem a puberdade e as fases avançada da vida também estão sujeitas a mudanças fenotípicas (DOLINOY *et al.*, 2007).

Estudos têm demonstrado que o surgimento de alterações fisiopatológicas e metabólicas (fenótipos) na prole adulta de ratos que passaram por um ambiente nutricional adverso durante as primeiras fases da vida está associado com mudanças no padrão de expressão gênica (DE BRITO ALVES *et al.*, 2016; AGARWAL *et al.*, 2018). Foi proposto então que mudanças na expressão de genes ou mecanismos epigenéticos ocorrem em virtude da oferta nutricional e funcional do ambiente, com o propósito de adaptar as demandas e garantir a sobrevivência do indivíduo em desenvolvimento (AGARWAL *et al.*, 2018).

Mudanças epigenéticas implicam em alteração nos padrões de expressão gênica ou a quantidade expressa do gene. Os mecanismos relacionados aos padrões de expressão gênica são decorrentes de reações químicas como: metilação do DNA, fosforilação,

acetilação ou ubiquitinação de histonas (proteínas responsáveis pela organização e compactação da fita de DNA), ou ainda de alterações na expressão de RNAs não codificantes (JIMENEZ-CHILLARON *et al.*, 2012).

Os padrões de expressão gênica podem ser passados entre gerações ou podem ser modificados nos indivíduos por meio de interações com fatores ambientais, dentre eles, os efeitos da dieta é alvo de investigação (JIMENEZ-CHILLARON *et al.*, 2012; CHENG; ZHENG; ALMEIDA, 2018). Tem-se observado, por exemplo, que ratos expostos a restrição calórica durante a gestação, e transitar para um ambiente em abundância dietética durante o período pós-natal, apresenta maiores chances de desenvolver doenças metabólicas na fase adulta (GLUCKMAN; HANSON, 2004).

Apesar da constante interação do indivíduo e o ambiente, é interessante destacar que as fases iniciais da vida dos mamíferos são consideradas críticas, pois mudanças epigenéticas parecem ser mais susceptíveis e podem favorecer o aparecimento de doenças ou a manutenção da saúde dos indivíduos adultos (JIMENEZ-CHILLARON *et al.*, 2012). Recentemente foi encontrada em algumas amostras de placentas de mulheres gestantes e dislipidêmicas uma correlação positiva entre baixas concentrações de HDL e o envelhecimento epigenético placentário (SHRESTHA; WORKALEMAHU; TEKOLA-AYELE., 2019). Por sua vez, o envelhecimento placentário está associado a partos prematuros espontâneos (POLETTINI *et al.*, 2015), o qual é um fenótipo característico de roedores que são expostos a um ambiente materno estressor (DE ASSIS; SEGURO; HELOU, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2017).

Estudos têm demonstrado que um ambiente nutricional desfavorável para o desenvolvimento adequado de roedores e humanos durante a gestação e/ou lactação se configura como um fator de risco para o aparecimento de desordens cardiovasculares associadas ao aumento de marcadores de estresse oxidativo (LIGUORI *et al.*, 2007; DE BRITO-ALVES *et al.*, 2016; RAMAIYAN; BETTADAHALLI; TALAHALLI, 2016) e inflamatórios (BREETHA; RAMAPRASAD, 2018).

A hipótese da biologia dos telômeros tenta elucidar como variáveis do ambiente materno metabólico, endócrino, imunológico e oxidativo contribuem para a regulação do comprimento dos telômeros e a atividade da enzima telomerase, a principal responsável pela regulação do tamanho do telômero. Os telômeros são estruturas de DNA não codificantes localizadas nas extremidades dos cromossomos e seu tamanho diminui à

medida que o indivíduo envelhece (ENTRINGER *et al.*, 2018). A enzima telomerase participa do processo de encurtamento dos telômeros e esse mecanismo parece ser determinante para a longevidade, senescência e o desenvolvimento de doenças crônicas e metabólicas, tais como hipertensão arterial e diabetes *mellitus* (ENTRINGER *et al.*, 2018).

Curiosamente, há alguns anos o grupo da professora Alexander, observou que ratos jovens com 12 semanas de vida submetidos a restrição de crescimento intrauterino desenvolvem hipertensão, mas não as ratas (ALEXANDER, 2003). O grupo testou a hipótese de que as fêmeas desenvolveriam hipertensão em uma idade mais avançada, no mesmo modelo experimental. Os resultados observados demonstraram que as ratas com crescimento restrito apresentaram níveis elevados de pressão arterial média (PAM) aos 12 meses de vida (INTAPAD *et al.*, 2013). O grupo da professora Alexander sugeriu que os efeitos da restrição do crescimento intrauterino nas descendentes fêmeas antecipam a senescência reprodutiva combinada com aumento de PAM, pois, segundo o grupo, esses fenótipos são apenas observados em fêmeas controles por volta dos 18 meses de idade (DAVIS *et al.*, 2019; DAVIS *et al.*, 2019).

Atualmente outros fatores ambientais maternos são estudados, dentre eles estão os que investigam o impacto da idade materna avançada (COOKE *et al.*, 2018), os efeitos do tabagismo (RICHMOND *et al.*, 2018), da hipóxia materna (WALTON *et al.*, 2018), da ingestão do bisfenol A pela mãe (uma substância usada basicamente na fabricação de garrafas e embalagens onipresentes no ambiente urbano) (DUNDER *et al.*, 2018) e os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica materna sobre o risco de desenvolver doenças cardiovasculares nas mães e em seus descendentes (GOHIR *et al.*, 2019; PINHEIRO *et al.*, 2019). Em suma, todos esses trabalhos exprimem uma noção do quão sensível é esse período inicial da vida de roedores e outros mamíferos para o desenvolvimento de desordens cardiovasculares e metabólicas.

Diante das evidências demonstradas aqui é dedutível dizer que o ambiente no qual indivíduos estão inseridos no início da vida é de grande importância para a manutenção ou não da saúde em fases posteriores da vida. Dentre os fatores destacados, a nutrição materna ou o estado metabólico materno talvez tenha um impacto mais contundente na população, visto que mães ou mulheres jovens consomem dietas inadequadas (BIELEMANN *et al.*, 2015) e levam uma vida mais sedentária durante a gestação (FAZZI *et al.*, 2017).

1.1 Metabolismo Lipídico Gestacional e Dislipidemia Materna

Os lipídios possuem um papel chave no fornecimento de grandes quantidades de energia química para os mamíferos, podendo ser estocado no tecido adiposo, como também na musculatura esquelética e fígado, principalmente na forma de triglicerídeos (VAN MEER *et al.*, 2008; FALUDI *et al.*, 2017). Há uma grande versatilidade de funções biológicas nas quais os lipídios participam, dentre algumas, pode-se citar: função estrutural do colesterol nas membranas celulares e organelas, comunicação entre células (mensageiros químicos) e tecidos (hormônios), reconhecimento e endereçamento de substâncias para alvos celulares (VAN MEER *et al.*, 2008). Visto sua importância, é essencial que haja quantidades adequadas de lipídios para atender a demanda metabólica em todos os tecidos e células do organismo.

Existem duas maneiras de atender a demanda metabólica por lipídios dos indivíduos: uma fornecida por fontes dietéticas e outra por via endógena de biossíntese (Figura 1). As gorduras e óleos exógenos ou advindos da dieta são absorvidos pelos enterócitos na forma de ácidos graxos, fosfolipídios, colesterol e outras estruturas mais simples dessas moléculas apolares (YAGER; PITTMAN; OCKNER, 1972). Após serem absorvidos no intestino, formam-se complexos lipoproteicos ricos em triglicerídeos denominados quilomícrons, os quais são levados pelos vasos linfáticos até a circulação venosa (WINDMUELLER; SPAETH, 1972). Devido à ação de lipases lipoproteicas (LPL) no lúmen dos vasos sanguíneos, ácidos graxos são clivados dos quilomícrons e difundidos entre os tecidos do corpo. Após perderem boa parte do seu conteúdo lipídico na circulação, os quilomícrons remanescentes são metabolizados no fígado (GREEN; HIGGINS, 1966; WINDMUELLER; SPAETH, 1972).

Dietas gordurosas (GUIMARÃES *et al.*, 2017) podem contribuir para o aumento dos lipídios e lipoproteínas plasmáticas, caracterizando condições patológicas em ratos, assim como dietas densamente calóricas (MEDONÇA *et al.*, 2016), a exemplo das dislipidemias (GUIMARÃES *et al.*, 2017) e da obesidade (LOCHE *et al.*, 2018). Além disso, o consumo de dietas gordurosas contribui para o aumento momentâneo (lipemia pós prandial) de triglicerídeos sérico, essas maiores concentrações de lipídios séricos podem ser sustentadas caso o indivíduo consuma esse tipo de dieta durante as refeições. O efeito da lipemia pós prandial está intimamente relacionado ao surgimento de doenças cardiovasculares (JACKSON; POPPIT; MINIHANE, 2012).

Caso a dieta não atenda a demanda metabólica de lipídios, o próprio organismo consegue suprir parte de sua necessidade a partir de biossíntese (lipogênese) no interior celular dos hepatócitos (HINKELMAN; SCHNEIDER; FRANTZ, 1954; ANKER; CATRAVAS, 1957; CHAIKOFF *et al.*, 1958). O fígado agrega lipídeos às apoproteínas formando lipoproteínas ricas em triglicerídeos e fisicamente caracterizadas por serem de muito baixa densidade (VLDL) quando liberadas na circulação (RADDING; BRAGDON; STEINBERG, 1958). Assim como acontece com os quilomícrons, as VLDL perdem ácidos graxos devido a ação da LPL presente na parede dos vasos e no fígado (WINDMUELLER; SPAETH, 1972). À medida que as VLDLs são catabolizadas, há uma redução de tamanho tornando-se um pouco mais densas e gerando lipoproteínas de densidade intermediária (IDL) que rapidamente podem ser depletadas no plasma sanguíneo. Parte das IDLs sofre ação enzimática contínua imposta pela LPL, resultando na formação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) proporcionalmente mais ricas em colesterol (PAV; WENKEOVA, 1960; REARDON; FIDGE; NESTEL, 1978; SURGI; TARG; ROBINSON, 1978).

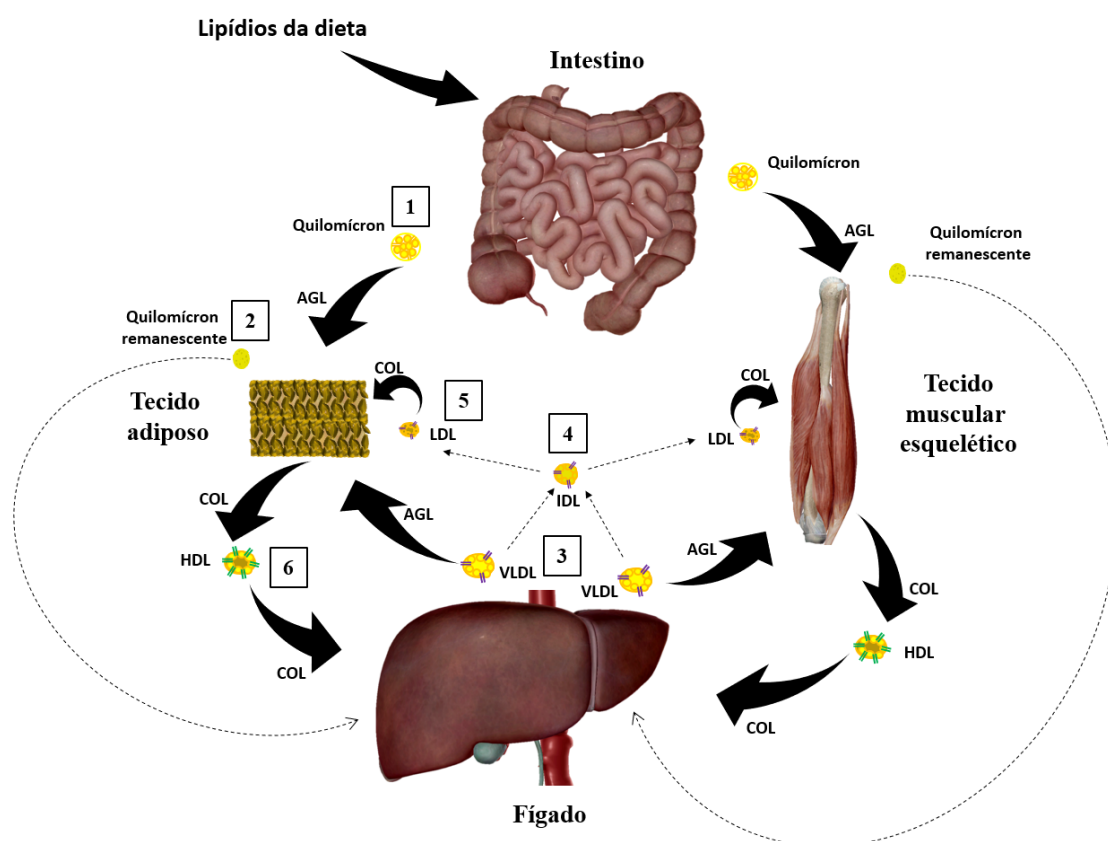
As lipoproteínas de baixa densidade são grandes fornecedoras de colesterol para os tecidos, isso acontece após se ligarem ao receptor de LDL (RLDL) presentes nas células dos tecidos periféricos que capturam essas lipoproteínas. O fígado exerce um papel chave na regulação das concentrações de LDL circulante nos indivíduos (REARDON; FIDGE; NESTEL, 1978; SURGI; TARG; ROBINSON, 1978; TADA *et al.*, 2019). Concentrações elevadas de LDL estão intimamente relacionadas com o surgimento de doenças cardiovasculares, as quais são responsáveis pela morte de milhares de pessoas em todo o mundo (BENJAMIN *et al.*, 2019).

Além de depurar as LDLs, o fígado também sintetiza lipoproteínas que circulam e captam colesterol livre da periferia de volta para o tecido hepático, ou seja, fazem o transporte reverso do colesterol, são as chamadas lipoproteínas de alta densidade (HDL) (RADDING; BRAGDON; STEINBERG, 1958) (Figura 1). Ao contrário da LDL, a HDL está relacionada a saúde cardiovascular, participando dos processos de prevenção da formação de placas ateroscleróticas (TALL, 1995; KORNMUELLER; VIDAKOVIC; PRASSL, 2019).

Como visto, as lipoproteínas circulantes são grandes distribuidores e fornecedores de lipídios para os tecidos do indivíduo. Em um dado momento da vida de mamíferos (ex.: ratos ou humanos) ocorre uma interessante mudança logística do fluxo das

lipoproteínas, quando passa a existir a circulação placentária-fetal durante a gestação (HERRERA, 2002). É observado uma série de mudanças metabólicas, fisiológicas e comportamentais que favorecem um estado anabólico materno no início da gestação (HERRERA, 2002; LAIN; CATALANO, 2007).

FIGURA 1 - Vista representativa do metabolismo sistêmico de lipídios.



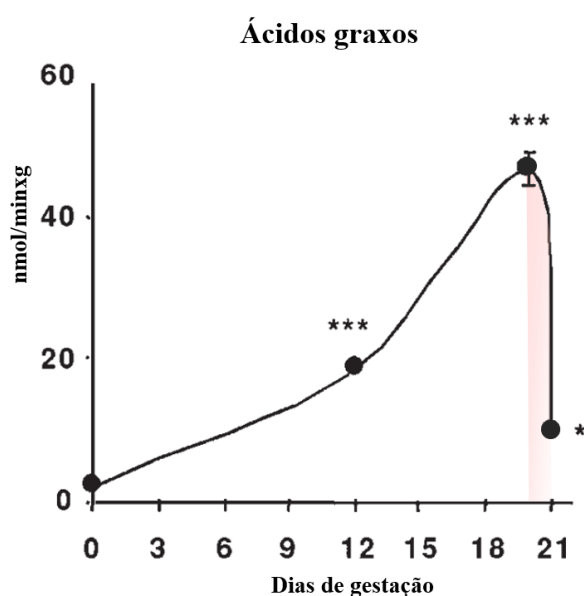
Fonte: Autor, 2019. A sequência de eventos descritas no texto segue uma ordem crescente numérica na figura. **AGL**: ácidos graxos livres; **COL**: colesterol total; **VLDL**: lipoproteínas de muito baixa densidade; **IDL**: lipoproteínas de densidade intermediária; **LDL**: lipoproteínas de baixa densidade; **HDL**: lipoproteínas de alta densidade.

Do ponto de vista metabólico, o início da gestação é acompanhado por um aumento dos estoques de gordura no tecido adiposo, devido aos efeitos da hiperfagia materna, lipogênese e aumento da atividade da LPL que hidrolisa os triglicerídeos das VLDLs e os estocam em células periféricas como os adipócitos (HERRERA, 2002). Além disso é observado um aumento da disponibilidade plasmática de colesterol, ácidos graxos essenciais e aminoácidos, fundamentais para o início da vida fetal (HERRERA, 2002; DUTTARROY, 2009). É relevante salientar que a manutenção ou mesmo um leve aumento

da sensibilidade da insulina tem participação importante nesses processos fisiológicos descritos e que o feto usa glicose como principal fonte de substrato energético (LAIN; CATALANO, 2007).

No último trimestre da gestação, o feto encontra-se mais desenvolvido, porém suas necessidades energéticas são ainda maiores. Essa demanda metabólica é garantida graças ao aumento dos níveis de estrógenos e de catecolaminas, os quais contribuem para um estado catabólico das reservas maternas e um súbito enriquecimento do plasma sanguíneo com VLDLs e ácidos graxos (Figura 2) (HERRERA, 2002; LAIN; CATALAMO, 2007). Dentre os efeitos do catabolismo estão a lipólise do tecido adiposo juntamente com a diminuição da atividade da LPL e produção e liberação de corpos cetônicos a partir dos ácidos graxos livres que buscam atender a demanda do feto que está em sua taxa máxima de crescimento (HERRERA, 2002).

FIGURA 2 - Metabolismo de ácidos graxos no tecido periuterino *in situ* de ratas durante a gestação.



Fonte: Adaptado de HERRERA, 2002. O gráfico mostra o crescente acúmulo dos estoques de ácidos graxos no tecido adiposo periuterino sintetizados a partir da glicose. É interessante notar que entre o 19º - 20º dias de gestação ocorre um rápido catabolismo desse tecido adiposo (destacado em vermelho) inundando o plasma com lipídios para o feto em fase final de desenvolvimento gestacional. * comparação estatística com fêmeas virgens (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

A placenta tem um papel importante na obtenção e transporte de substratos para o feto. Uma das formas de captar ácidos graxos, por exemplo, é a partir de receptores (LDLR e VLDLR) e da lipase lipoproteica placentária (LLP), a qual hidrolisa os triacilgliceróis das lipoproteínas LDL e VLDL, aumentando o suprimento desse macronutriente para o feto (LOUWAGIE *et al.*, 2018). Interessantemente, a atividade da LLP foi aumentada em gestantes diabéticas (DMG) tipo 1 e associadas ao supercrescimento fetal. Esses dados são compatíveis com a hipótese de que alterações na atividade da LLP placentária contribuem para mudanças na oferta de ácidos graxos ao feto e, consequentemente, maior crescimento (LOUWAGIE *et al.*, 2018).

Curiosamente, Zhang e colaboradores observaram que a placenta de gestantes hipercolesterolêmicas (concentrações de colesterol acima do normal para a gestação) expressava mais receptores LDLR, VLDLR, porém a biodisponibilidade de colesterol para o feto não foi aumentada, quando comparada com a de gestantes controles. Esse trabalho mostra que mães hipercolesterolêmicas apresentam menor eficiência ou prejuízo no transporte de lipídios para o feto, pois além da maior concentração de lipoproteínas no soro materno, a placenta expressou mais LDLR e VLDLR, mas sem aumentar o aporte desse nutriente para o feto (ZHANG *et al.*, 2017). Dessa forma, mesmo havendo maior quantidade de nutrientes/substratos circulantes no plasma materno como acontece no DMG, a hiperlipidemia parece causar prejuízo no transporte placentário.

Outros trabalhos mostram que descendentes de ratos (DE ASSIS; SEGURO; HELOU, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2017) e mulheres (JIANG *et al.*, 2017) dislipidêmicas ou hipercolesterolêmicas nascem com baixo peso (DE ASSIS; SEGURO; HELOU, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2017) e prematuros (JIANG *et al.*, 2017). Além disso, recentemente demonstrou-se que o quadro de dislipidemia materna em humanos estava associado com disfunção endotelial placentária e que, pelo menos em parte, foi causado por um desbalanço entre a atividade da NOS e o transporte de L-arginina (FUENZALIDA *et al.*, 2018).

Não se sabe com clareza como a dislipidemia pode provocar efeitos deletérios nos descendentes, porém alguns trabalhos têm demonstrado de forma convincente que o estresse oxidativo plasmático, placentário ou observado no cordão umbilical de gestantes hipercolesterolêmicas pode ser a causa subjacente dos efeitos maléficos da dislipidemia materna (LIGUORI *et al.*, 2007; RAMAIYAN; BETTADAHALLI; TALAHALLI, 2016). Em adição a isso, Breetha e Ramaprasad investigaram o aspecto imunológico da

gestação dislipidêmica em ratas e constataram a presença de concentrações elevadas de marcadores inflamatórios como IL-1b, TNF-alfa e PGE2 no plasma materno, assim como NF-Kb, ICAM-1 na placenta e NK-Kb no fígado do feto (BREETHA; RAMAPRASAD, 2018). Esses achados sugerem que a dislipidemia está envolvida no prejuízo da função placentária e podem ajudar a explicar o baixo peso ao nascer e os partos prematuros observados em descendentes de mães dislipidêmicas.

Pode-se dizer que a dislipidemia materna é uma condição clínica, caracterizada por alterações das concentrações plasmáticas maternas de lipídios para valores encontrados fora da faixa considerada de normalidade, embora os pontos de corte para diagnóstico não estejam bem definidos (FEITOSA *et al.*, 2017). Historicamente a dislipidemia materna é considerada normal para a gestação, dessa forma assumia o *status* de uma condição metabólica de pouca relevância clínica (WILD; WEEDIN; WILSON, 2015). O quadro de dislipidemia pode ser caracterizado por um aumento ou diminuição de frações do perfil lipídico, como os níveis séricos de HDL, LDL, triglicerídeos e/ou colesterol total, para concentrações consideradas “anormais” para uma população saudável (FALUDI *et al.*, 2017).

Estudos experimentais em roedores (DE ASSIS; SEGURO; HELOU, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2017) usam os termos hipercolesterolemia e dislipidemia materna baseados em uma afirmação estatística resultante da comparação entre grupos experimentais e controle, porém há uma dificuldade para estabelecer critérios de diagnóstico e classificação de dislipidemia em humanos. Trabalhos têm estabelecido alguns valores baseados em achados que levam em consideração a segurança ou prejuízo que determinadas concentrações de lipídios podem trazer a gestação em humanos (FEITOSA *et al.*, 2017; FUENZALIDA *et al.*, 2018). Como fez Fuenzalida e colaboradores, quando utilizaram o ponto de corte para o diagnóstico de hipercolesterolemia como sendo a concentração de colesterol total materno: ≥ 280 mg/dL. Observaram que acima desse valor, eram grandes as chances de haver prejuízo vascular placentário (FUENZALIDA *et al.*, 2018).

Outro estudo usou a V Diretriz Brasileira de Dislipidemia (V DBD) e o “Critério dos Percentis” que classifica valores de CT, LDL e TG superiores ao percentil 95 e de HDL inferiores ao percentil 5 para a idade gestacional, como critério diagnóstico de dislipidemia materna, se pelo menos uma das frações lipídicas estiver alterada. Foi constada uma maior incidência diagnóstica quando utilizada a V DBD para diagnosticar

o quadro dislipidêmico, quando comparado ao “Critério dos Percentis”, no entanto, ambos os parâmetros utilizados para diagnóstico de dislipidemia materna foram associados ao aumento de comorbidades gestacionais, em relação a gestantes não dislipidêmicas (FEITOSA *et al.*, 2017).

Como visto, a hiperlipidemia fisiológica observada na gestação é importante para o desenvolvimento fetal, mas quando esses valores sobem para níveis suprafisiológicos podem acompanhar uma série de prejuízos para a gestação, embora esse aspecto não pareça ser uma pauta importante nas diretrizes de saúde, uma vez que o rastreio dessa condição metabólica é pouco explorado e dificultado por não haver um consenso entre os critérios de diagnóstico. Além disso, apesar dos esforços para entender mais sobre os efeitos deletérios causados por essa condição metabólica, é preciso esclarecer alguns pontos como os mecanismos envolvidos nos partos prematuros e nos descendentes que nascem com baixo peso, pois essas condições de nascimento podem estar relacionadas com o desenvolvimento de doenças nos indivíduos adultos (GLUCKMAN; HANSON, 2004).

1.3 Fisiologia do Controle Cardiorrespiratório

Os sistemas cardiovascular e respiratório são essenciais para a manutenção da vida. Juntos, esses sistemas regulam as pressões parciais de oxigênio (PO_2) e dióxido de carbono (PCO_2), o pH plasmático e os níveis pressóricos na circulação sanguínea para melhor perfusão dos tecidos. Essas funções são realizadas com grande eficiência devido a estrutura dos órgãos efetores e a complexa organização de redes neurais que detectam e processam estímulos ambientais, produzindo respostas reflexas que buscam adaptar o organismo ao ambiente (ABDALA *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2014).

A respiração pode ser descrita como um evento mecânico composto por uma inspiração e uma expiração basicamente. No entanto, a gênese do ritmo respiratório, sua regulação pelo sistema nervoso e a interação com outros sistemas tornam a respiração consideravelmente mais complexa e interessante (MACHADO *et al.*, 2017). Como dito, do ponto de vista mecânico, a respiração é dividida em inspiração e iniciada a partir de eferências de regiões ventrais do bulbo via nervo motor somático frênico para estimulação e contração do músculo diafragma, considerado o principal músculo inspiratório, havendo assim a expansão da caixa torácica juntamente com a entrada de ar ambiente para o

interior dos pulmões devido em grande parte as diferenças de pressão e volume entre o ambiente e o interior da caixa torácica (o ar tende a ir para o gradiente de menor pressão). A expiração ocorre em sequência onde é observado o relaxamento passivo do diafragma e consequente expulsão de ar rico em CO₂ de volta para o ambiente externo (SARNOFF; WHITTENBERGER; HARDENBERGH, 1948; FRY; HYATT, 1960).

Um dos mecanismos que torna o sistema respiratório eficiente é sua capacidade de detectar os níveis de PO₂, PCO₂ e gerar uma resposta (ex.: aumento da frequência respiratória na presença elevada da PCO₂) a fim de manter a homeostasia do sistema. Para tanto, o sistema respiratório é provido de quimiorreceptores arteriais periféricos especializados na detecção da PO₂, localizados estrategicamente nas proximidades da bifurcação das carótidas (compondo o corpo carotídeo) e no arco aórtico (Figura 3) (COSTA *et al.*, 2014).

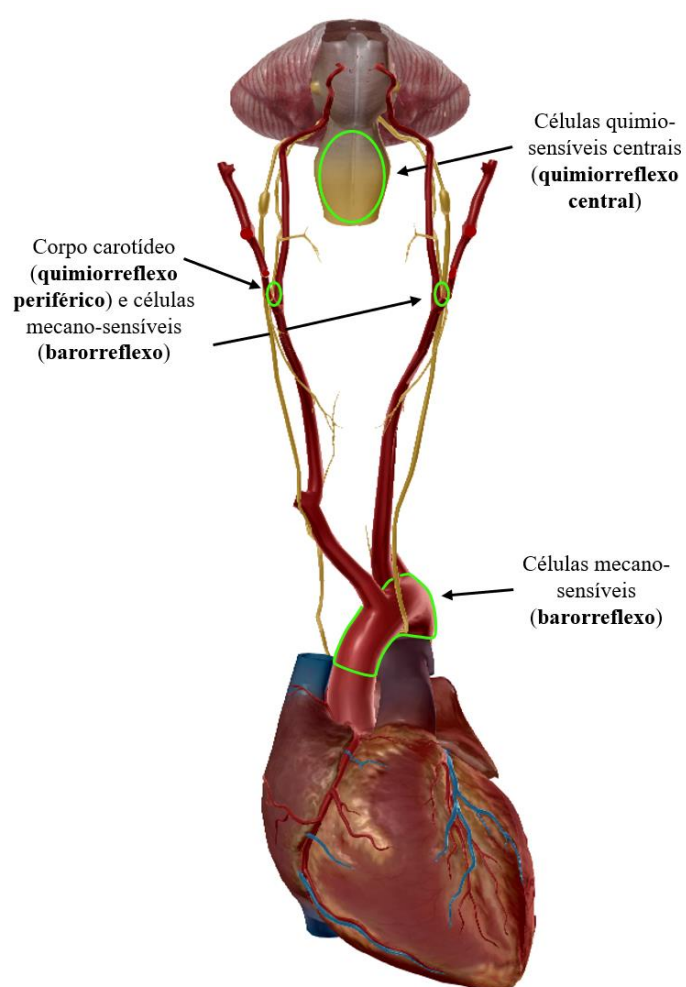
O corpo carotídeo se trata de uma minúscula estrutura arredonda, formada por células tipo 1 (células glômus ou quimiossensíveis) e tipo 2 (células de suporte) que recebe inervação do nervo do seio carotídeo, uma ramificação do nervo aferente glossofaríngeo que faz sinapse excitatória com células do núcleo do trato solitário (NTS), localizados dorsalmente no bulbo, onde são integradas as informações sensitivas vindas da periferia (LOPEZ-BARNEO *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2014).

Além disso, outras células quimiossensíveis centrais detectam mudanças do pH causadas pelas variações da PCO₂ e estão localizadas no tronco encefálico, sendo mais concentradas em uma região do bulbo conhecida como núcleo retrotrapezóide (RTN) (Figura 4) (GUYENET; BAYLISS, 2015). De modo geral, quando essas células quimiossensíveis são estimuladas, seja por diminuição da PO₂ ou aumento da PCO₂, o indivíduo responde com taquipneia e aumento da pressão arterial (MACHADO *et al.*, 2017). Outras áreas do tronco encefálico, como o grupo respiratório ventral rostral (rVRG), Botzinger (BöTC) e pré- Botzinger (pré-BöTC) (todos fazem parte da coluna respiratória ventral (CRV)) (Figura 4), são as principais responsáveis pela geração e o ritmo adequado da respiração (SMITH *et al.*, 2007).

O mecanismo neural responsável pela geração do ritmo respiratório possui 3 fases, sendo uma fase pós-inspiratória (P-I) ou expiratória inicial, uma fase expiratória (E-2) e a fase inspiratória (I) (Figura 4). Esse padrão trifásico depende, em parte, de influências da ponte e do núcleo retrotrapezoide, já o padrão bifásico (inspiração e expiração) é o

resultado de interações inibitórias recíprocas entre as populações neuronais do BotC e Pre-BotC, finalmente a respiração de uma única fase (apenas inspiração) parece ser dependente da atividade marcapasso e pode ser gerada por meio de canais de sódio persistentes (INaP) localizados nas populações do Pre-BotC e é caracterizada pela ausência de atividade expiratória. Nesse sentido, um indivíduo com integridade do sistema respiratório apresenta um padrão ventilatório trifásico (SMITH *et al.*, 2007; ABDALA *et al.*, 2009).

FIGURA 3 - Vista esquemática das localizações dos quimiorreceptores e dos barorreceptores



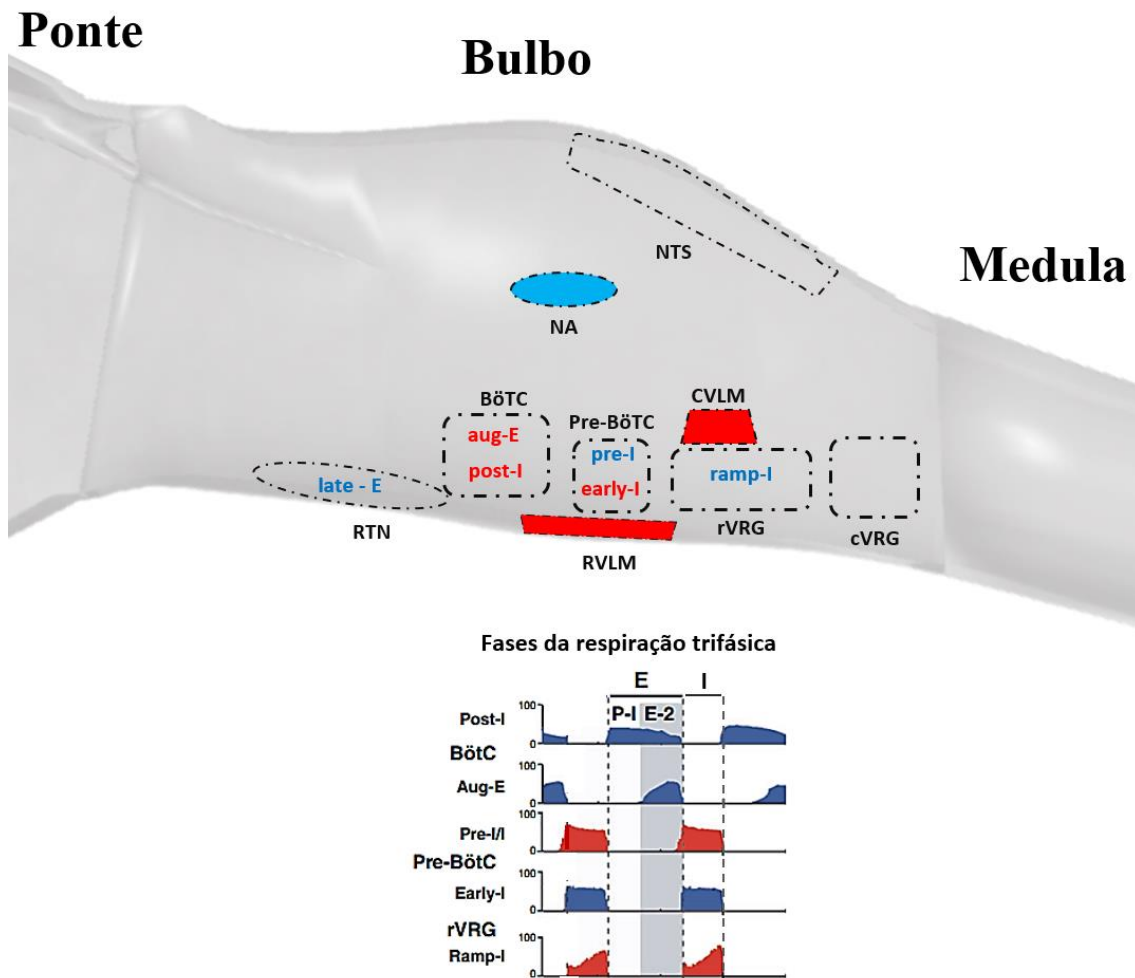
Fonte: Autor, 2019. Os quimiorreceptores centrais estão localizados no tronco encefálico e os barorreceptores assim como os quimiorreceptores periféricos são comumente encontrados na bifurcação carotídea e arco aórtico (regiões destacadas em verde). O corpo carotídeo é um conjunto de células nervosas quimiossensíveis que detectam a PO_2 arterial.

De modo mais detalhado, as 3 fases do circuito respiratório consistem inicialmente em uma atuação inibitória de neurônios pós inspiratórios (Post-I) do BöTC sobre praticamente todos os neurônios da rede respiratória (BöTC e Pre-BöTC), caracterizando a primeira metade da expiração (fase P-I) (Figura 4). Com a progressiva redução da atividade do grupo Post-I, a população de neurônios inibitórios expiratórios (Aug-E do BöTC) começa a disparar, terminando a parte final da expiração (fase E-2). Em seguida, a população de neurônios pré inspiratórios (Pre-I/I) é liberada da inibição e ativa a população de células inspiratórias precoces (Early-I) do Pré-BötC que por sua vez inibe todas as populações inibitórias do BöTC (Post-I e Aug-E). Como resultado, a população de neurônios excitatórios em rampa (Ramp-I) (são neurônios que possuem um padrão de disparos crescentes que caracterizam uma rampa) do grupo respiratório ventral rostral (rVRG) é liberada da inibição (com pequeno atraso em relação ao pré-I) imposta pelo BöTC e excitada pelas células do Pre-I, por sua vez, os neurônios em rampa disparam excitando os neurônios motores somáticos do frênico dando início a fase inspiratória (fase I (Figura 4)). (EZURE; MANABE; YAMADA, 1988; SMITH *et al.*, 2007).

É importante salientar que os grupamentos respiratórios do BöTC e Pre-BöTC, com destaque para os neurônios post-I e pre-I recebem estímulos tônicos de populações neuronais localizadas na ponte. Foi demonstrado que a respiração consegue ser mantida sem a ponte, porém o padrão respiratório torna-se bifásico (expiração e inspiração) e a amplitude de disparos do nervo frênico diminui em mais de 50% (SMITH *et al.*, 2007).

Diferentemente da respiração, no sistema cardiovascular, a geração do ritmo e da bomba cardíaca é realizada por células marcapasso no próprio coração, como as do nodo sino atrial, que possuem canais de sódio auto-despolarizantes também conhecidos como canais de corrente *funny* e são essenciais para atividade auto-rítmica observada no coração (DIFRANCESCO, 2010). Para tanto, o sistema cardiovascular, que é composto pelo coração e vasos sanguíneos, é responsável por perfundir os tecidos com sangue e precisa manter uma diferença de pressão dentro do sistema para a manutenção da circulação de sangue na maioria dos tecidos. A pressão arterial pode ser representada matematicamente pelo produto do débito cardíaco (DC) e da resistência vascular periférica (RVP). O DC é diretamente proporcional a frequência cardíaca (FC) e ao volume de sangue ejetado pelo ventrículo em cada contração. Já a RVP é uma variável fortemente associada as mudanças no diâmetro dos vasos (RAVEN; CHAPLEAU, 2014).

FIGURA 4 - Regiões do tronco encefálico responsáveis pelo controle respiratório, cardiovascular e autonômico.



Fonte: Adaptado de MOLKOV et al., 2017. As áreas bulbares envolvidas na geração do ritmo respiratório (BötC, Pre-BötC e rVRG), de quimiossensibilidade central (RTN), de integração das informações dos barorreceptores e quimiorreceptores periféricos (NTS) e as principais geradoras e reguladoras da atividade autonômica central (NA, RVLm e CVLM) estão em destaque. As palavras em azul representam agrupamentos de neurônios excitatórios e as palavras em vermelho representam neurônios inibitórios. Já as figuras geométricas em azul são áreas envolvidas na via autonômica parassimpática e as figuras em vermelho são de regiões envolvidas na atividade simpática. **NTS**: Núcleo do trato solitário; **NA**: Núcleo ambiguo; **RTN**: Núcleo retrotrapezoide; **rVRG**: grupo respiratório ventral rostral; **cVRG**: grupo respiratório ventral caudal; **RVLm**: região rostral ventrolateral do bulbo; **CVLM**: região rostral ventrolateral caudal; **late-E**: neurônios expiratório tardio; **aug-E**: neurônios expiratório; **pré-I**: neurônios pré inspiratórios; **post-I**: neurônios pós inspiratórios; **early-I**: neurônios inspiratórios precoce; **ramp-I**: neurônios inspiratórios em rampa.

Embora o coração isoladamente seja capaz de contrair ritmicamente, ele é modulado pelo sistema nervoso autonômico, o qual desempenha o papel de melhorar as respostas cardiorrespiratórias de acordo com a demanda do indivíduo. O sistema nervoso

autonômico (SNA) é dividido em simpático (SNAS), conhecido por secretar os neurotransmissores noradrenalina e adrenalina, e parassimpático (SNAP), onde seus neurônios secretam acetilcolina na fenda sináptica. Vale salientar que as ações do sistema autonômico sobre o organismo vão muito além do que será visto aqui com foco na modulação cardiovascular (WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016).

A atividade autonômica é gerada no tronco encefálico, e uma das principais populações de neurônios pré simpáticos responsáveis pela geração da atividade simpática está localizada na região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM) (Figura 4). Essa região tem atividade tônica e excitatória sobre os neurônios pré-ganglionares simpáticos (DAMPNEY *et al.*, 1981; WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016).

Se a atividade dos nervos simpáticos estiver aumentada, a PA se elevará em consequência do aumento do DC e da RVP (DAMPNEY *et al.*, 1981; WEHRWEIN; ORER; BARMAN, 2016). Em contrapartida, a atividade parassimpática causa um efeito bradicárdico que contribui para a diminuição da PA. A atividade parassimpática pode ser gerada em uma região próxima ao RVLM, conhecida como núcleo ambíguo (NA) (Figura 4), que também possui atividade tônica através de eferências do nervo vago e exerce atividade parassimpato-excitatória sobre o coração (GOURINE *et al.*, 2016).

Alguns trabalhos demonstram que a atividade autonômica oscilatória parece ser gerada e mantida por neurônios respiratórios pontinos e bulbares (BAEKEY; DICK; PATON, 2008; ZOCCAL *et al.*, 2008; BAEKEY *et al.*, 2010). Durante o início da expiração, em condições basais, neurônios post-I (pós inspiratórios ou expiratórios iniciais) inibem de forma transitória o RVLM que é continuamente excitado, pelo menos em parte, por populações neuronais pontinas, como foi observado por Bakey, Dick e Paton (2008). Em condições de hipercapnia ou durante o exercício (altas concentrações de PCO_2) a expiração, que em repouso era passiva, passa a ser ativamente realizada pelo recrutamento de músculos abdominais inervados pelo nervo motor somático abdominal, além disso a frequência de disparo do nervo frênico também é aumentada. Também em condições de hipercapnia, foi demonstrado que ratos jovens apresentam aumento substancial da atividade simpática, a qual parece ser decorrente da atividade excitatória de neurônios tardios (late-E) do RTN em neurônios pré simpáticos do RVLM e do cVRG, por onde partem as eferências para o nervo abdominal (BAEKEY; DICK; PATON, 2008; MOLKOV *et al.*, 2011).

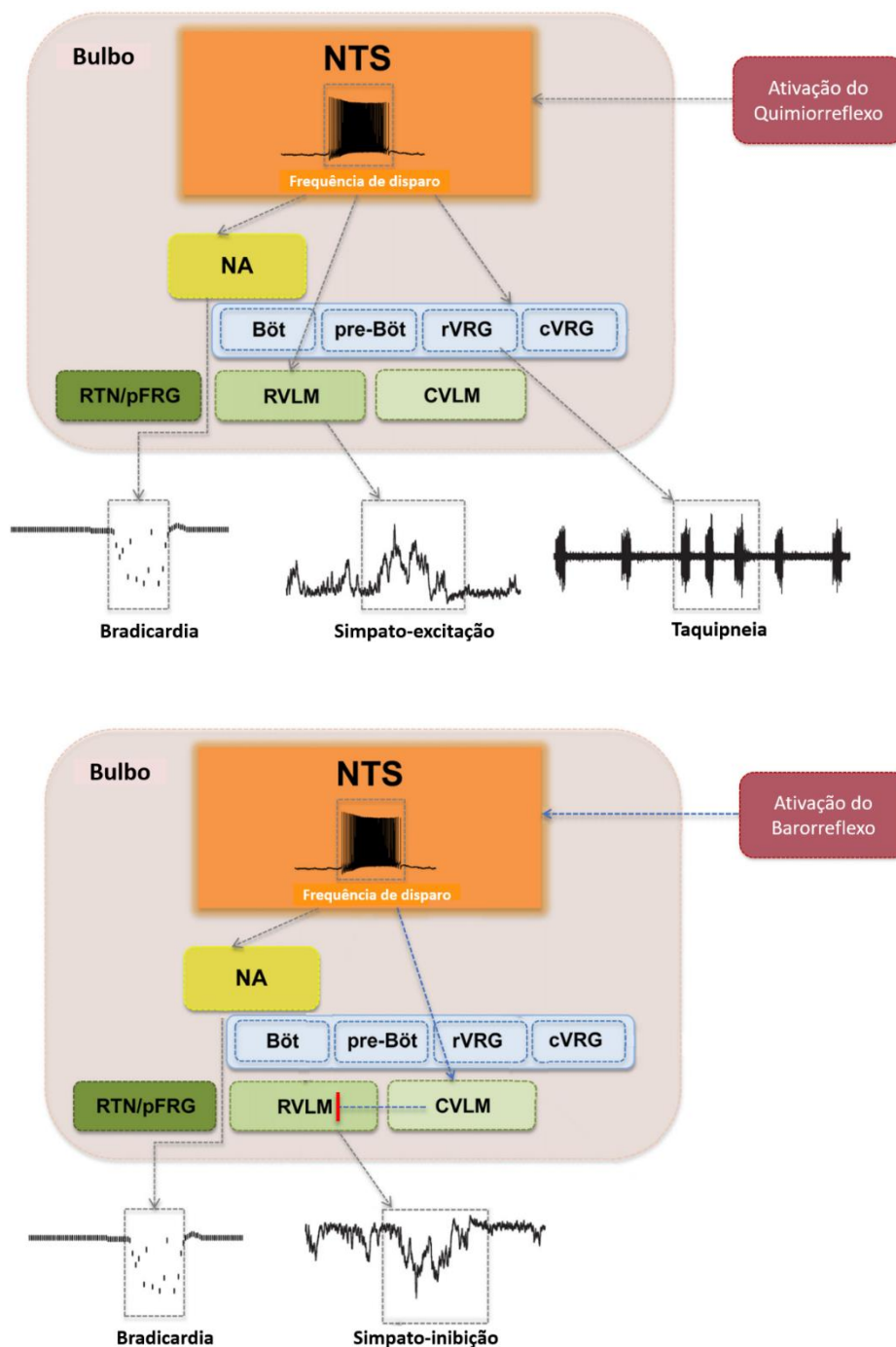
Além da participação dos quimiorreceptores no controle da PA, outras células sensíveis a estimulação mecânica (ex.: aumento de PA) ou mecanorreceptores, mais conhecidos como barorreceptores arteriais participam da regulação por ajustes rápidos da PA. Os mecanorreceptores arteriais são constituídos de neurônios onde os corpos celulares dessas células estão localizados nos gânglios nodosos e petrosos e suas terminações estão em contato com vasos sanguíneos arteriais do seio carotídeo e arco aórtico (Figura 3) (BAEKEY *et al.*, 2010).

Esses terminais detectam alterações mecânicas causadas pela pressão arterial do sangue sobre o lúmen das artérias, causando estiramento no diâmetro do vaso, que estimulam sinapses excitatórias e esse sinal por sua vez é integrado na região dorsal medial do NTS. Nesse sentido, pode-se dizer pelo menos em parte, que os níveis pressóricos arteriais são consequência das concentrações arteriais de O₂, CO₂ e da própria PA que assim são retroalimentadores dos reflexos que ajudam a regular as respostas compensatórias de ventilação e de pressão arterial (BAEKEY *et al.*, 2010).

Como esquematizado na Figura 5, a ativação do quimiorreflexo periférico gera uma simpatoexcitação e taquipneia (pode causar bradicardia se o estímulo for muito elevado) (COSTA *et al.*, 2014), por sua vez, o barorreflexo excita neurônios do NTS que se projetam para neurônios da região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) que inibem a atividade do RVLM e para o NA gerando atividade parasimpato-excitatória (bradicardia) (BAEKEY *et al.*, 2010; GOURINE *et al.*, 2016).

Curiosamente ratos, após serem submetidos a um protocolo de hipóxia intermitente, apresentam um incremento do tônus simpático em condições de normoxia (ZOCCAL *et al.*, 2008). Além disso, em condições de normoxia os animais apresentam atividade excitatória dos neurônios late-E, maior quimiossensibilidade do corpúsculo carotídeo ao cianeto de potássio e hipertensão arterial (MORAES; MACHADO; ZOCCAL, 2014; MOLKOV *et al.*, 2017). Outros trabalhos demonstraram que insultos maternos como desnutrição e dislipidemia durante gestação e lactação contribuem para mudanças nos padrões ventilatórios e nos reflexos rápidos de controle cardiorrespiratórios, além do desenvolvimento de hipertensão arterial (DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2017). Esses achados sugerem que a rede neuronal respiratória é plástica e passível de mudança no seu padrão de funcionamento, além disso, essa plasticidade do circuito nervoso pode estar envolvida na origem ou manutenção de alguns casos de hipertensão arterial.

FIGURA 5 - Demonstração fisiológica da ativação do quimiorreflexo periférico e do barorreflexo



Fonte: Adaptado de COSTA et al., 2014. A estimulação quimiorreflexa, pode ocorrer devido ao aumento da PCO_2 , que gera respostas cardiorrespiratórias como bradicardia, aumento da pressão arterial (simpato-excitação) e taquipneia (aumento de frequência respiratória). A estimulação dos barorreceptores arteriais, causada pelo aumento de pressão arterial (PA), gera uma simpato-inibição (diminuição da PA) e bradicardia (diminuição da frequência cardíaca). **NTS**: Núcleo do trato solitário; **NA**: Núcleo ambiguo; **RTN**: Núcleo retrotrapezoide; **pFRG**: grupamento parafacial; **rVRG**: grupo respiratório ventral rostral; **cVRG**: grupo respiratório ventral caudal; **RVLM**: região rostral ventrolateral do bulbo; **CVLM**: região rostral ventrolateral caudal.

1.4 Hipertensão Arterial Sistêmica: Um Problema de Saúde Pública.

Projeções sugerem que em 2015 houve uma prevalência de 874 milhões de pessoas com hipertensão sistólica (> 140 mmHg). Além disso, 3,5 bilhões com potencial quadro pré-hipertensivo estão mais susceptíveis a mortes por isquemias e hemorragias. É o que diz um estudo que reúne dados de mais de 190 países e publicado recentemente (FOROUZANFAR *et al.*, 2017). Mais de 90% das pessoas hipertensas apresentam a forma essencial, na qual não há uma causa totalmente estabelecida ou conhecida (LIM *et al.*, 2012). São conhecidos diversos fatores de risco envolvidos na etiologia da hipertensão arterial sistêmica (HAS), como obesidade, diabetes *mellitus*, dislipidemias, sedentarismo, idade avançada, tabagismo e herança genética (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

A origem ou a causa da hipertensão é de grande complexidade e parece que seu entendimento está longe de ser alcançado, apesar dos progressos realizados até então (WOLF *et al.*, 2018). Nessa perspectiva, recentemente Toral e colaboradores transplantaram a microbiota fecal de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) para ratos normotensos (Wistar-Kyoto) e alguns dias depois os ratos normotensos apresentaram aumento de pressão arterial, hiperatividade simpática e marcadores de estresse oxidativo (aumento de espécies reativas de oxigênio e diminuição da atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), por exemplo). O que foi ainda mais interessante é que os ratos SHR que receberam a microbiota fecal dos ratos Kyoto apresentaram diminuição da pressão arterial assim como da atividade simpática (TORAL *et al.*, 2019).

Além de complexa, a hipertensão pode ser de difícil tratamento como é observado em alguns indivíduos que, ao fazerem uso terapêutico de três fármacos anti-hipertensivos, continuam apresentando níveis pressóricos elevados, sendo necessária a administração de quatro ou mais fármacos (beta bloqueadores, diuréticos e inibidores da ECA, por exemplo) para manter a pressão arterial (PA) em níveis considerados adequados ou próximos a isso, sendo esse um caso de hipertensão arterial resistente (MALACHIAS *et al.*, 2016; BENJAMIN *et al.*, 2019;).

Devido a sua crescente incidência mundial, a complexa etiologia e a falta de medicamentos eficazes para o público hipertenso em geral, a HAS é considerada um problema de saúde pública e que gera um custo estimado de mais de 50 bilhões de dólares por ano apenas para os Estados Unidos (BENJAMIN *et al.*, 2019). Sendo assim, pesquisas que buscam entender mais da complexidade desse mal para o mundo são importantes.

Muito tem se estudado para entender quais mecanismos são precursores da hipertensão arterial sistêmica. Algumas pesquisas sugerem que o controle da pressão arterial a curto prazo prejudicado, como é o caso do aumento da quimiossensibilidade dos corpos carotídeos, contribuiria para uma exacerbada atividade do sistema nervoso simpático (hiperatividade simpática) resultando em maior resistência vascular periférica e aumento da PA (DE BRITO ALVES *et al.*, 2015; MACHADO; ZOCCAL; MORAES, 2017).

Outros demonstraram que um prejuízo do controle barorreflexo está envolvido no desbalanço autonômico e no aumento da atividade simpática (MEGURO *et al.*, 1989). A manutenção da atividade barorreflexa fisiológica é de grande importância para o controle da PA, atualmente vem sendo usado na Europa um dispositivo endovascular de amplificação do barorreflexo, como forma de tratamento da HAS resistente (VAN KLEEF; BATES; SPIERING, 2018). Além disso, ainda outros sistemas como o renal e o endócrino (CHAN, 1983) são alvos de investigação de pesquisadores comprometidos em entender sistemicamente a fisiopatologia dessa condição clínica (WOLF *et al.*, 2018).

1.5 Hipertensão e Dimorfismo Sexual

Estudos epidemiológicos revelaram que homens adultos jovens apresentam maior prevalência de HAS quando comparados a mulheres de idade semelhante, porém a prevalência inverte nos indivíduos após os 65 anos de idade, onde as mulheres apresentam a maioria dos casos de HAS (BENJAMIN *et al.*, 2019) e coincidem com o período pós menopausa que acontece por volta dos 50 a 52 anos de idade nas mulheres (TIKHONOFF *et al.*, 2019).

Um dos principais fatores que diferenciam homens de mulheres ou fêmeas de machos (mamíferos) são os hormônios circulantes, onde as concentrações de estrogênios são evidentemente maiores em mulheres/fêmeas jovens quando comparadas aos machos (RECKELHOFF; FORTEPIANI, 2004; TIKHONOFF *et al.*, 2019). O estrogênio possui propriedades antioxidante (VEDDER *et al.*, 1999), vasodilatadora (GISCLARD; MILLER; VANHOUTTE, 1988) e capacidade de reduzir citocinas pro-inflamatórias (TIKHONOFF *et al.*, 2019). Esses achados, por sua vez, sugerem que mulheres mais velhas podem apresentar HAS devido à grande diminuição do estrogênio sérico observada após menopausa.

Uma recente revisão demonstrou que mulheres após a menopausa apresentavam maior pressão arterial sistólica do que mulheres férteis, no entanto, quando os grupos foram subdivididos de acordo com a idade e o IMC as diferenças anteriormente observadas desaparecem (TIKHONOFF *et al.*, 2019). Esse achado indica que a menopausa por si só não é uma variável preditora absoluta para o desenvolvimento de HAS nessas mulheres, pois o desfecho (HAS) nesse grupo, também está relacionado a variável idade e IMC.

Modelos experimentais de hipertensão neurogênica ajudam a entender a participação do sexo nos mecanismos envolvidos na gênese de HAS. Um desses modelos é o de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) onde, semelhantemente aos humanos, as fêmeas apresentam menor pressão arterial comparadas aos machos quando jovens, porém após o fim da fase reprodutiva, por volta dos 16 – 18 meses de idade, as fêmeas passam a apresentar quadro hipertensivo semelhante aos machos (RECKELHOFF; FORTEPIANI, 2004).

Alguns dos mecanismos descritos para o desenvolvimento de HAS nesse modelo é o aumento de androgênios nas fêmeas em idade avançada (inférteis) que estimula a produção de angiotensinogênio e contribui para a síntese de angiotensina 2 a qual aumenta a produção de endotelinas, essa combinação de alterações parece estar envolvida no aumento da PA e no desenvolvimento do estresse oxidativo que também é observado nesses animais (RECKELHOFF; FORTEPIANI, 2004).

Além disso, foi demonstrado que o tratamento de ratos SHR jovens com antioxidantes causou diminuição da PA nos machos mas não nas fêmeas, interessante quando os animais foram tratados a partir do desmame observou-se uma atenuação da PA em ambos os sexos, sugerindo que o estresse oxidativo pode estar desempenhando um papel no desenvolvimento da hipertensão em ambos os sexos, mas apenas nos machos a manutenção da hipertensão é mediada pelo estresse oxidativo (FORTEPIANI; RECKELHOFF, 2005).

Outro modelo experimental que mimetiza a HAS relacionada a apneia do sono demonstra que tanto os machos quanto as fêmeas jovens desenvolvem hipertensão, aliada com hiperatividade simpática observada a partir da análise do delta da pressão arterial média produzido após administração de um bloqueador ganglionar simpático (ZOCCAL *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2016). Apesar dessas semelhanças, o acoplamento simpato-

respiratório basal apresentou mais disparos do nervo simpático torácico durante a fase expiratória nos machos, já nas fêmeas a maior atividade do nervo simpático abdominal foi observado na fase inspiratória (ZOCCAL *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2016), esse desacoplamento está relacionado com maior atividade simpática basal e consequente desenvolvimento de HAS nesse modelo experimental.

Além disso, em um outro modelo de hipertensão em ratos com restrição de crescimento uterino, demonstrou-se que as ratas jovens apresentam aumento de PA associado a semelhanças seja nos níveis plasmáticos de estradiol ou do peso do útero, sendo esse último um marcador indireto do estradiol circulante (DAVIS *et al.*, 2019).

Assim, os achados do presente exposto permitem sugerir que, apesar do potencial efeito cardioprotetor dos hormônios femininos, a hipertensão arterial é um problema complexo e de etiologia multifatorial, impossibilitando afirmar que o surgimento da hipertensão seja dependente do sexo. Diante desse contexto, a hipótese do trabalho é que a dislipidemia materna altera o metabolismo, o controle cardio-respiratório e contribui para o quadro de hipertensão arterial sistêmica na prole fêmea em idade adulta.

Os resultados desse trabalho podem ajudar a elucidar algumas especificidades fisiopatológicas decorrentes do insulto nutricional materno causado pela dislipidemia e do dimorfismo sexual, além de poder contribuir para alternativas mais eficientes no tratamento da hipertensão e assim trazer mais qualidade de vida para a população hipertensa.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Geral: Investigar os efeitos da dislipidemia materna sobre os níveis de pressão arterial, mecanismos de controle cardiorrespiratórios e parâmetros bioquímicos na prole de ratas.

Específicos: Na prole de ratas em diferentes idades provenientes de mães com dislipidemia durante gestação e lactação:

A partir do nascimento (0, 21, 30, 60 e 90 dias de vida):

- ✓ Pesar e medir o comprimento do animal.

A partir da juventude (30 e 90 dias de vida):

- ✓ Estudar o padrão respiratório em condições basais;
- ✓ Avaliar a resposta dos quimiorreceptores respiratórios após a exposição à hipercapnia (mistura gasosa com 7 % de CO₂);
- ✓ Avaliar o perfil lipídico;
- ✓ Avaliar a eficiência do metabolismo glicídico a partir do TOTG;
- ✓ Mensurar os níveis de MDA.

Apenas na fase adulta (90 dias de vida):

- ✓ Realizar cirurgia para registro de pressão arterial;
- ✓ Aferir os níveis de pressão arterial em condições basais;
- ✓ Avaliar indiretamente e farmacologicamente variáveis de função autonômica;
- ✓ Investigar a sensibilidade dos quimiorreceptores periféricos;
- ✓ Avaliar a eficiência do metabolismo glicídico a partir do TTI.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o guia brasileiro de produção, manutenção ou utilização de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica (CONCEA, 2016). O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo comitê institucional de cuidados e uso de animais (protocolo CEUA-UFPB 014/2016), Universidade Federal da Paraíba, Brasil (Anexo C).

4.1 Animais e desenho experimental

Dez ratas *Wistar* fêmeas virgens (*Rattus norvegicus*), com cerca de 90 dias de idade, foram mantidas confinadas em uma sala com condições físicas ambientais controladas (22 ± 1 ° C; das 18:00 - 6:00 h no ciclo escuro, e restante do dia em ciclo claro (12/12 h). Com dieta labina (52% de carboidratos, 21% de proteína e 4% de lipídios - Purina Agriband, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum*. Ao iniciar o protocolo experimental, as ratas foram submetidas a um período de adaptação dietética, com duração de uma semana, sendo: dieta controle (grupo CTL, n = 5) e dislipidêmica (grupo DLP, n = 5) livre. Passado o período de adaptação, as ratas foram estimuladas a acasalarem, onde passaram a ficar com um macho na gaiola por períodos intermitentes. Após a confirmação da gravidez (por esfregaço vaginal), as ratas então eram alocadas em caixas individualmente (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

A dieta controle foi produzida de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e a dieta dislipidêmica foi adquirida da empresa Rhoster® (Araçoiaba da Serra, São Paulo, Brasil). As dietas (Tabela 1) foram consumidas a partir de adaptação até o final da lactação.

Vinte e quatro horas após o nascimento, a prole foi distribuída aleatoriamente, com proporção de oito filhotes por lactante, para garantir suporte nutricional suficiente até o desmame. Ao desmamar (dia 22 pós-natal), a prole fêmea foi alojada separadamente (cerca de quatro por gaiola) com acesso livre a água e dieta labina durante todo o experimento (Figura 6).

Ao final do desmame, foram coletadas amostras sanguíneas das mães para a confirmação da dislipidemia como demonstrado pelo nosso grupo anteriormente (GUIMARÃES *et al.*, 2017). Os filhotes foram submetidos aos experimentos, sendo 9 no

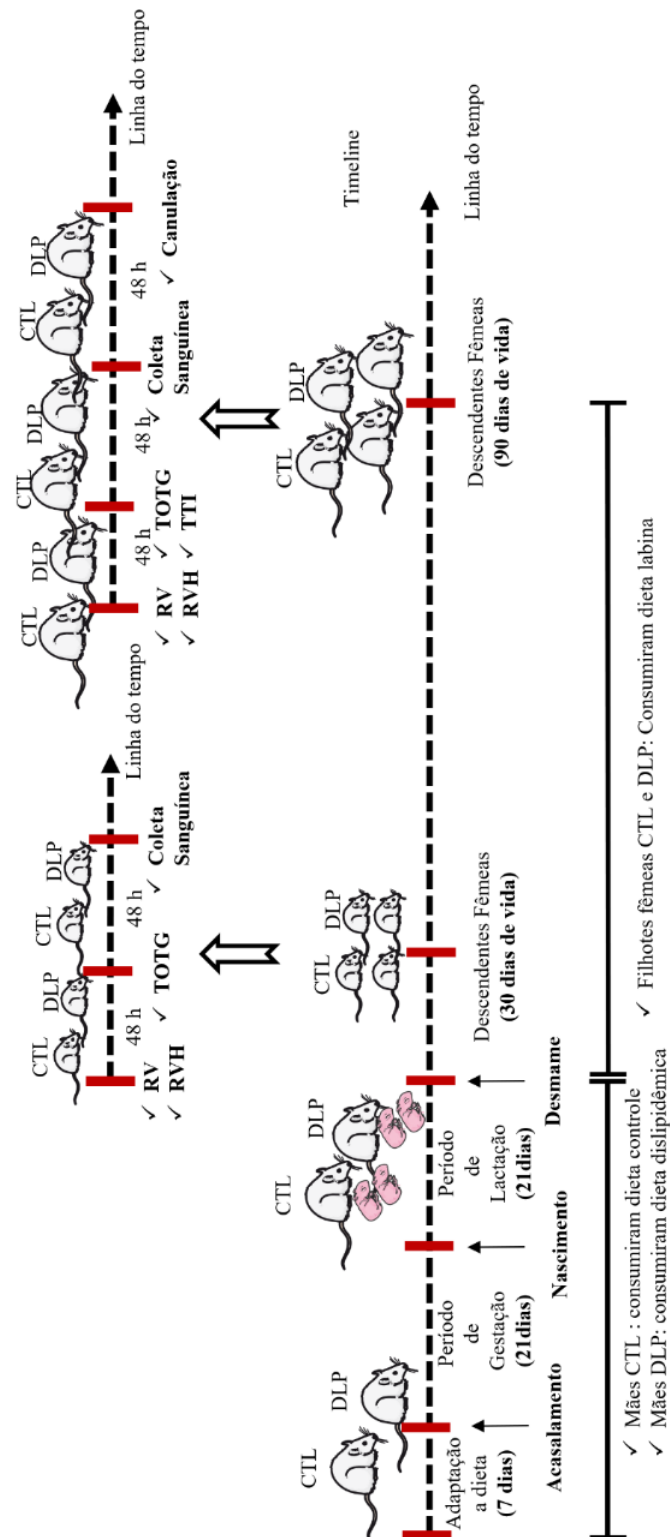
grupo CTL e 9 no grupo DLP. Foi investigado o impacto da dislipidemia materna sobre os parâmetros de lipídios plasmáticos, do metabolismo glicídico, concentração sérica de malonaldeído e comportamento respiratório em ratas com 30 dias de vida. Em seguida, as ratas foram mantidas com água e ração padrão de laboratório *ad libitum* até a idade adulta, onde esses parâmetros foram reavaliados (aos 90 dias) com a inclusão de cardiorrespiratórios (Figura 6).

TABELA 1 - Composição nutricional dietética (g/100g)

Nutrientes	Dieta Controle	Dieta Dislipidêmica
Caseína (85 %)*	20	19.86
Amido dextrinizado	13	15.5
Celulose	5	5
Sacarose	10	6
Amido de milho	39.7	33.6
Óleo de soja	7	3
Banha de porco	0	6
Gordura vegetal hidrogenada	0	5
Ácido cólico (Sigma)	0	0.5
Colesterol (Sigma)	0	0.5
Colina	0.25	0.25
Metionina	0.3	0.3
Mix de vitaminas	1	1
Mix de minerais	3.5	3.5
T-BHQ	0.014	0.014

Fonte: Empresa Rhoster®. * A caseína possui 85% de pureza (sendo 85 g de caseína realmente, em cada 100 g)

FIGURA 6 – Resumo do desenho experimental do estudo.



Fonte: Autor, 2019. O esquema acima descreve de forma simplificada de praticamente todos os protocolos experimentais, compreendendo desde o período de adaptação a dieta, acasalamento, gestação, lactação e os descendentes adultos. **RV**, registro ventilatório; **RVH**, registro ventilatório sob hipercapnia; **TOTG**, teste oral de tolerância à glicose; **TTI**, teste oral de tolerância à insulina.

4.2 Avaliação de características somáticas da prole.

O peso corporal foi medido no 1º, 21º, 30º, 60º e 90º dias após o nascimento, em balança digital (model AS-1000; Marte). O comprimento do corpo foi medido com uma fita métrica, a distância entre o “nariz e o ânus” (naso-anal). Os dados de peso e comprimento foram usados para determinar o índice de Lee (dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal (g) pelo comprimento nasoanal (cm) e multiplicando-se o resultado por 1000) (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014).

4.3 Testes de tolerância a glicose (TOTG) e insulina (TTI)

Aos 30 e aos 90 dias de idade, os ratos foram submetidos a um jejum de 8 horas (noturno) para a realização dos TOTG e TTI, conforme previamente descrito.

O TOTG consiste primeiramente em realizar um corte transversal na extremidade distal da cauda do animal, quase que imediatamente é escoada uma pequena quantidade de sangue, usada para se fazer a primeira aferição glicídica. Em seguida foi administrada solução glicosada (2 g / kg) via gavagem e posteriormente foram feitas aferições em séries, aos 15, 30, 60 e 90 min, utilizando-se o mesmo acesso sanguíneo.

Para o TTI, o procedimento inicial é semelhante ao TOTG e se diferencia pela administração intraperitoneal de insulina (0,75 UI / kg de peso corporal), e pelos intervalos de tempo onde as concentrações glicídicas são mensuradas (0, 30, 60, 90 e 120 minutos). Todas as medidas de concentração de glicose plasmática foram realizadas com um glicosímetro Accu-Check (Bayer) (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

4.4 Parâmetros bioquímicos e de estresse oxidativo

Foram determinados com amostras de soro de animais com 30 e 90 dias de nascido. Para isso os descendentes de ambos os grupos passaram por jejum (de 8 horas para os animais com 30 dias de idade ou 12 horas para os adultos), em seguida foram anestesiados com cetamina (80 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg) e amostras de sangue (aproximadamente 2 mL) foram coletadas pelo rompimento do plexo retro-orbital. As amostras foram então centrifugadas a 300 g, 25 ° C, durante 15 minutos e o soro obtido foi congelado e armazenado (à -80 Cº) (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014).

As amostras de soro foram usadas para quantificação de CT, HDL, VLDL, LDL, triglicerídeos e glicose com kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, Brasil).

A concentração de malonaldeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica, é usada como indicador de estresse oxidativo. Neste ensaio, o MDA reage com o ácido tiobarbitúrico para produzir um complexo vermelho-colorido. Resumidamente, foram adicionados 400 µL de ácido perclórico (7%) a 250 µL de soro plasmático, misturados e centrifugados a 600 g, 4 ° C, durante 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido, adicionado a 400 µL de ácido tiobarbitúrico (0,6%), aquecido a 100 ° C durante 1 hora e a absorbância lida a 532 nm. Uma curva padrão de MDA foi construída e os resultados foram expressos como nmol de MDA / mL (CAVALCANTI *et al.*, 2016). A quantificação das análises foi realizada por espectrofotometria.

4.5 Procedimento cirúrgico para registro direto de PA em ratas com 90 dias de idade.

Ratas (CTL, n = 9; DLP, n = 9) foram anestesiados com cetamina (80 mg / kg) e xilazina (10 mg / kg) para a inserção de cateteres de polietileno na artéria e veia femoral. Os cateteres foram tunelizados e exteriorizados na região anterior dorsal. Após o procedimento cirúrgico, foi administrado um anti-inflamatório (ketoprofeno, 5 mg / kg) por via subcutânea. Cada rato foi submetido a um período de recuperação de 24 h após a cirurgia, até que os experimentos para obtenção dos registros de pressão arterial fossem iniciados (DE BRITO ALVES *et al.*, 2015). A pressão arterial (PA) e a frequência cardíaca (FC) foram aferidas em animais conscientes, através da conexão entre o cateter arterial e um transdutor de pressão para sinal elétrico, que alimentava um software de computador em plataforma Windows (LabChart 7 Pro, ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália).

4.6 Análise da pressão arterial e avaliação cardiorrespiratória

A pressão pulsátil (PAP) foi inicialmente registrada por cerca de 40-50 min em condições basais, e os valores da pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média (PAM) e FC foram calculados a partir da seleção

de um trecho de 10min do registro, para cada animal. Este mesmo período foi utilizado para obtenção do eletrocardiograma (ECG) e dos dados usados para a análise espectral.

Quarenta minutos após o registro cardiovascular, as medidas de frequência respiratória (FR) foram realizadas usando o método de pletismografia do corpo inteiro (MALAN, 1973). Onde foi possível criar uma atmosfera controlada para o animal que se encontrava em repouso na caixa. Cada rato foi submetido a curtos períodos (3 min) de confinamento na caixa hermeticamente fechada e os dados respiratórios foram captados por um transdutor diferencial de pressão, conectado a um amplificador de sinal (ML141 Spirometer, PowerLab; ADInstruments).

Depois de registrar os parâmetros cardiorespiratórios basais, foi feita uma “lavagem” da câmara pletismográfica com uma mistura de gás hipercápnico (7% de CO₂, 21% de equilíbrio de O₂ e N₂, Linde Gás), conforme descrito anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014).

A FR, o volume corrente (VC) e a ventilação minuto (VE) foram determinados na condição de ar ambiente (basal) e durante hipercapnia. Um período de 10 segundos foi selecionado para a determinação da FR média. O VC foi calculado utilizando a fórmula descrita anteriormente por Malan (MALAN, 1973) e a VE calculada através do produto FR x VC. O registro ventilatório foi realizado nos animais com 30 dias de idade e refeito nas mesmas ratas com 90 dias de idade e que sofreram procedimento cirúrgico.

Os dados do registro basal ventilatório foram utilizados para a construção do gráfico de *point care* e quantificados pela análise da variabilidade dos intervalos respiratórios de curto prazo (SD1) e de longo prazo (SD2) (TOLEDO *et al.*, 2017).

Análise dos valores de PAM e FC foi realizada durante a “lavagem” da câmara com a mistura hipercápnica. Um período de 30 s de PA e FC foi selecionado em 1, 2, 3, 4 e 5 min de fluxo de gás. Dez minutos após os estímulos hipercápnicos, o quimiorreflexo periférico foi ativado através da injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN, 40 mg / 100 mL por rato) de acordo com trabalhos anteriores (FRANCHINI; KRIEGER, 1993; DE BRITO ALVES, *et al.*, 2015). A diferença entre PAM, FC e FR basais e o pico apreciado após o estímulo (Δ PAM; Δ FC e Δ FR) foi avaliada para análise, respectivamente, dos componentes simpático, parassimpático e respiratório.

Por fim, foi avaliada a contribuição do tônus vascular simpático para a manutenção da PA por meio da administração intravenosa de um bloqueador ganglionar (hexametônio, 30 mg.kg⁻¹, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). O tônus simpático foi calculado pela diferença entre a PAM após o bloqueador e a PAM basal. Todos os dados foram analisados com o uso de software apropriado (LabChart 7 Pro; ADInstruments) e no final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com uma superdosagem endovenosa de 0,5 ml de cetamina em concentração comercial.

4.7 Análise do ECG

Os registros de ECG foram processados por *software* de computador (módulo de análise ECG para *LabChart Pro*; *ADInstruments*) para detecção automática das ondas R e cálculo “beat-by-beat” do intervalo RR. Para a detecção de ECG foi utilizado 12 ms para a largura típica do QRS e para as ondas R, pelo menos, 100 ms de distância. Para a análise ECG foi utilizada 70 ms para PR máximo e 90 ms para RT máximo.

4.8 Análise espectral da pressão arterial

A avaliação autonômica cardiovascular foi realizada utilizando a análise de domínio de frequência do SAP e do intervalo de pulso (PI) por um programa de software apropriado (*CardioSeries-v.2.4*; www.danielpenteado.com). Os espectros foram integrados nas bandas LF (0,2-0,75 Hz) e HF (0,75-3 Hz). Para avaliar o índice simpatovagal, calculou-se a relação LF / HF da variabilidade. Além disso, a sensibilidade barorreflexa espontânea foi calculada através de um método de sequência.

4.9 Análise estatística

Cada grupo experimental incluiu pelo menos um ou dois animais de cada prole. O teste de *Bartlett* foi realizado para avaliar a homogeneidade de dados em parâmetros respiratórios e cardiovasculares, e os resultados estatísticos apoiaram o uso do teste t de *Student* não pareado. Testes ANOVA two-way e post hoc de Bonferroni foram usados para a análise do TOTG, TTI e reflexo cardiorrespiratório para hipercapnia. A análise estatística foi realizada com o programa *GraphPad Prism 5* para Windows (*GraphPad*

Software®. Inc., La Jolla, CA, EUA). Os valores são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (D.P.) e os valores de * $P < 0,05$; ** valores de $P < 0,01$ e valores de **** $P < 0,0001$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros Antropométricos

A Tabela 2 mostra os parâmetros somáticos desde o nascimento até os 90 dias de idade dos filhotes. O peso corporal ao nascer foi menor nas ratas expostas a dislipidemia materna. Entre os 30 e 90 dias de vida o peso foi similar entre os grupos CTL e DLP (Tabela 2). Apesar das diferenças no peso corporal no início da vida, nenhuma diferença foi observada no comprimento naso-caudal ou índice de Lee.

Tabela 2 – Parâmetros somáticos (peso corporal, comprimento e índice de Lee) na prole fêmea de mães dislipidêmicas (DLP, n = 9) e controles (CTL, n = 9)

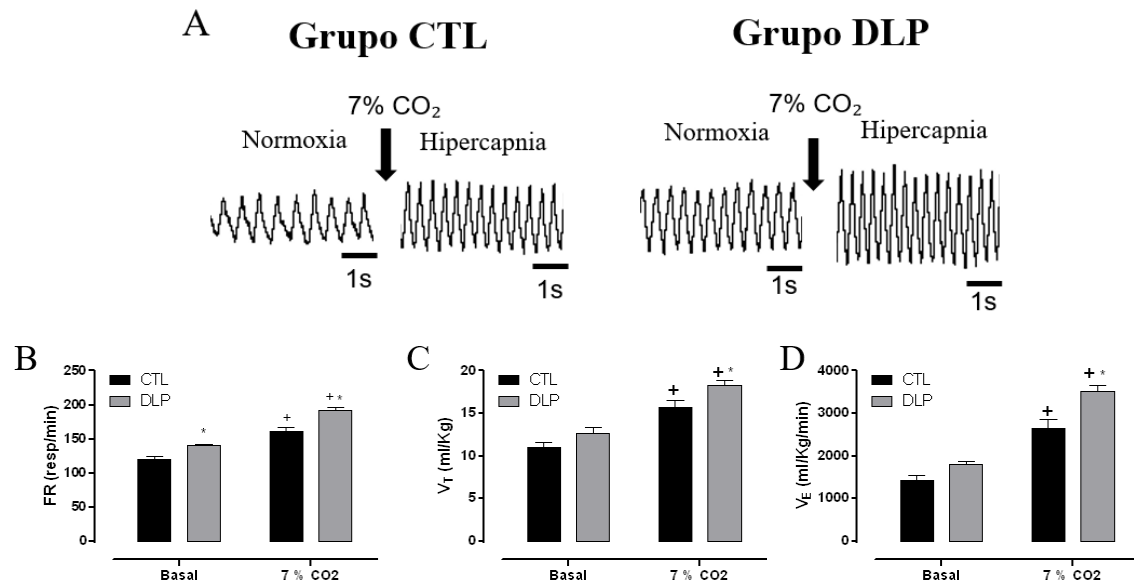
Parâmetros somáticos	Nascimento		21d		30d		60 d		90 d	
	CTL	DLP	CTL	DLP	CTL	DLP	CTL	DLP	CTL	DLP
Peso (g)	5.2±0.1	4.9±0.1*	42±1	37±0.7*	97.1±2	92.4±3	184±3	178±3	217.6±5	219±7.7
Comp. (cm)	4.5±0.07	4.5±0.1	10.9±0.2	10.8±0.1	14.2±0.2	13.8±0.2	18.6±0.1	18.6±0.3	20±0.1	20.3±0.5
Índice de Lee ($\sqrt[3]{g/cm}$)	0.39±0.007	0.38±0.005	0.32±0.003	0.32±0.009	0.32±0.004	0.33±0.003	0.30±0.001	0.30±0.004	0.30±0.002	0.30±0.005

Nota: Valores são expressos como média ± desvio padrão. *P < 0,05 vs. grupo CTL usando teste t de Student's.

5.2 Efeitos da dislipidemia materna sobre a ventilação em repouso e a função quimiorreflexa dos filhotes aos 30 dias de vida

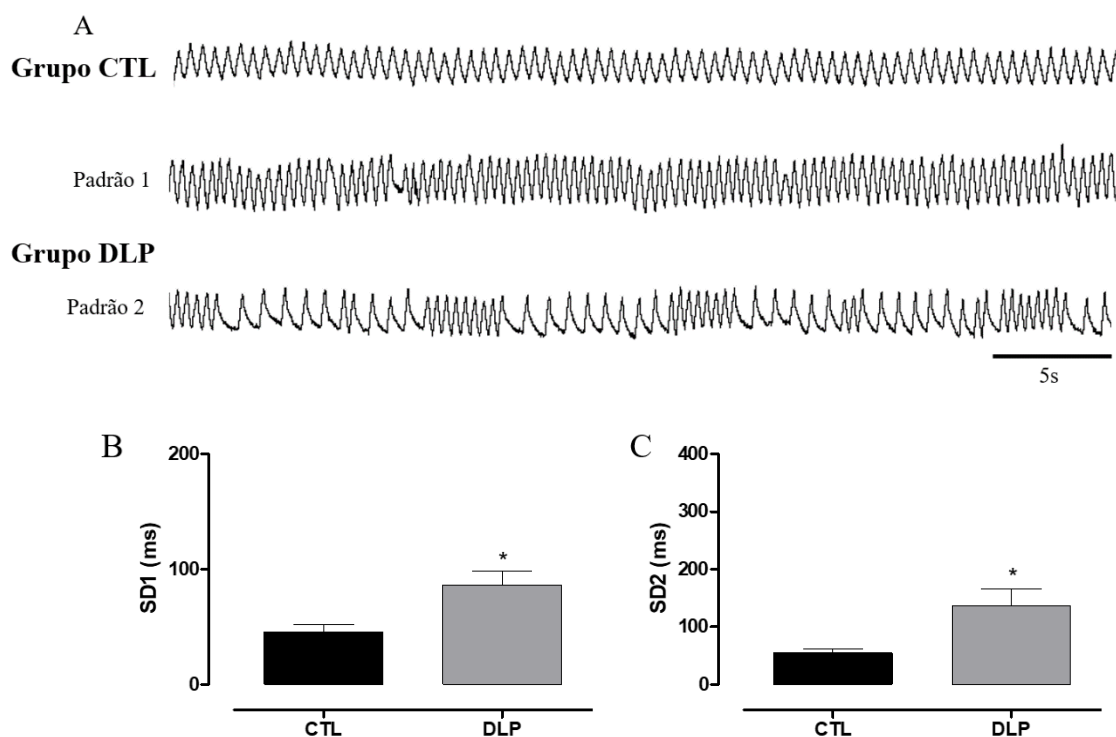
Em condições basais os descendentes DLP apresentaram um aumento da F_R (Figura 7B) quando comparada com as fêmeas CTL, mas V_T e V_E foram similares entre os grupos DLP e CTL (Figura 7C e 7D). Hipercapnia (7% CO_2) produziu um aumento de F_R , V_T e V_E em ambos os grupos CTL e DLP (Figura 7). Em comparação com a prole CTL, os ratos DLP exibiram um aumento nos valores de F_R , V_T e V_E após a hipercapnia (Figura 7B, 7C e 7D). O registro ventilatório representativo de cada grupo DLP e CTL durante condições basais e hipercápnica é mostrado na Figura 7A. Foram observados dois padrões basais irregulares nos filhotes do grupo DLP comparado com o CTL (Figura 8A). Entre os animais do grupo DLP, 5 filhotes exibiram o padrão ventilatório 1 e os outros quatro do grupo apresentaram o padrão ventilatório 2 (Figura 8A). Nos animais do grupo CTL não foram encontradas alterações no padrão ventilatório basal. Além disso, ambas as variáveis SD1 e SD2 para a variabilidade respiratória estavam aumentadas no grupo DLP (Figura 8B e 8C).

Figura 7 – Traçado representativo e análises ventilatórias em repouso e sob hipercapnia das proles fêmea CTL e DLP aos de 30 dias de idade



Traçado representativo do registro ventilatório por pletismografia de corpo inteiro em repouso e sob hipercapnia na prole fêmea (A). Avaliação da frequência respiratória (FR, B), volume corrente (VT, C) e ventilação minuto (VE, D) em repouso e após hipercapnia (7% CO₂). Grupos: grupo controle (CTL; n = 9) e grupo dislipidêmico (DLP; n = 9). Valores são médias ± DP. *, P < 0,05 versus grupo CTL; ++, P < 0,05 versus condições basais usando *two-way* ANOVA e o teste *post hoc* de Bonferroni.

Figura 8 – Padrão ventilatório e variabilidade respiratória sob condições basais das proles fêmea CTL e DLP de 30 dias de vida



Traçado representativo dos padrões ventilatórios dos filhotes do CTL e do grupo DLP (5 animais exibiram o padrão 1 e 4 animais exibiram o padrão 2 (A)). Foram avaliadas a variabilidade do intervalo respiratório de curto prazo (SD1, B) e de longo prazo (SD2, C) em repouso. Grupos: grupo controle (CTL; n = 9) e grupo dislipidêmico (DLP; n = 9). Valores são médias $\pm$ DP. *, $P < 0,05$ versus grupo CTL; usando teste t de Student.

5.3 Efeitos da dislipidemia materna sobre o metabolismo lipídico, glicídico e os níveis de MDA dos filhotes aos 30 dias de idade.

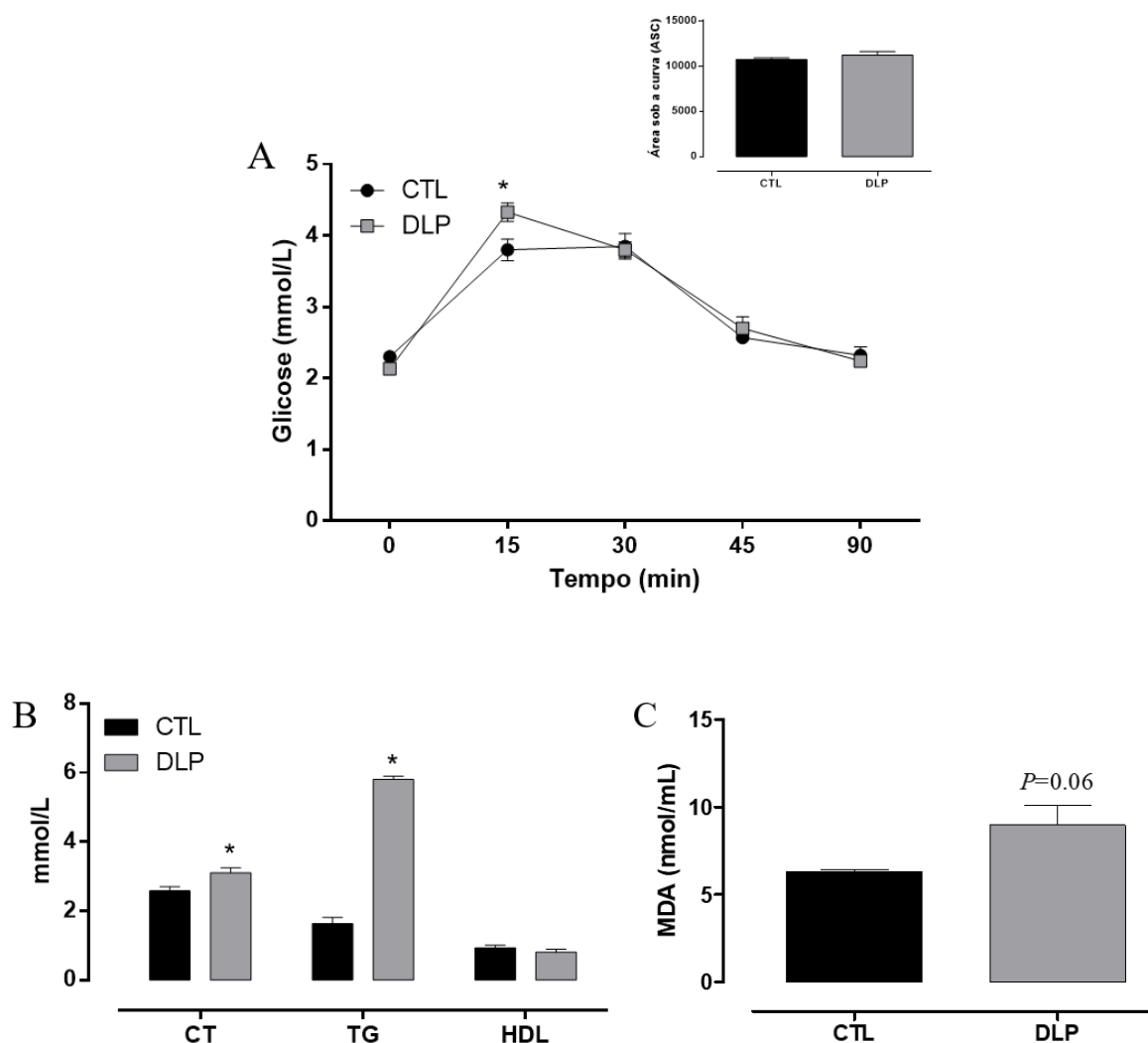
O TOTG foi similar entre os grupos (Figura 9A, $P > 0,05$). As concentrações séricas de CT e TG estavam maiores na prole DLP fêmea (Figura 9B). Finalmente, os níveis plasmáticos de MDA tenderam a um aumento no grupo DLP com 30 dias de idade ($P = 0,06$, Figura 9C).

5.4 Efeitos da dislipidemia materna sobre a respiração em repouso e a função quimiorreflexa aos 90 dias de idade.

Em condições basais aos 90 dias de idade, os valores de F_R , V_T , e V_E foram similares entre os grupos (Figura 10B, 10C e 10D). A hipercapnia produziu um aumento na F_R , V_T , e V_E em ambos os grupos CTL e DLP. Em condições de hipercapnia, a prole DLP exibiu um aumento nos valores de F_R e V_E , mas sem diferenciar o volume corrente

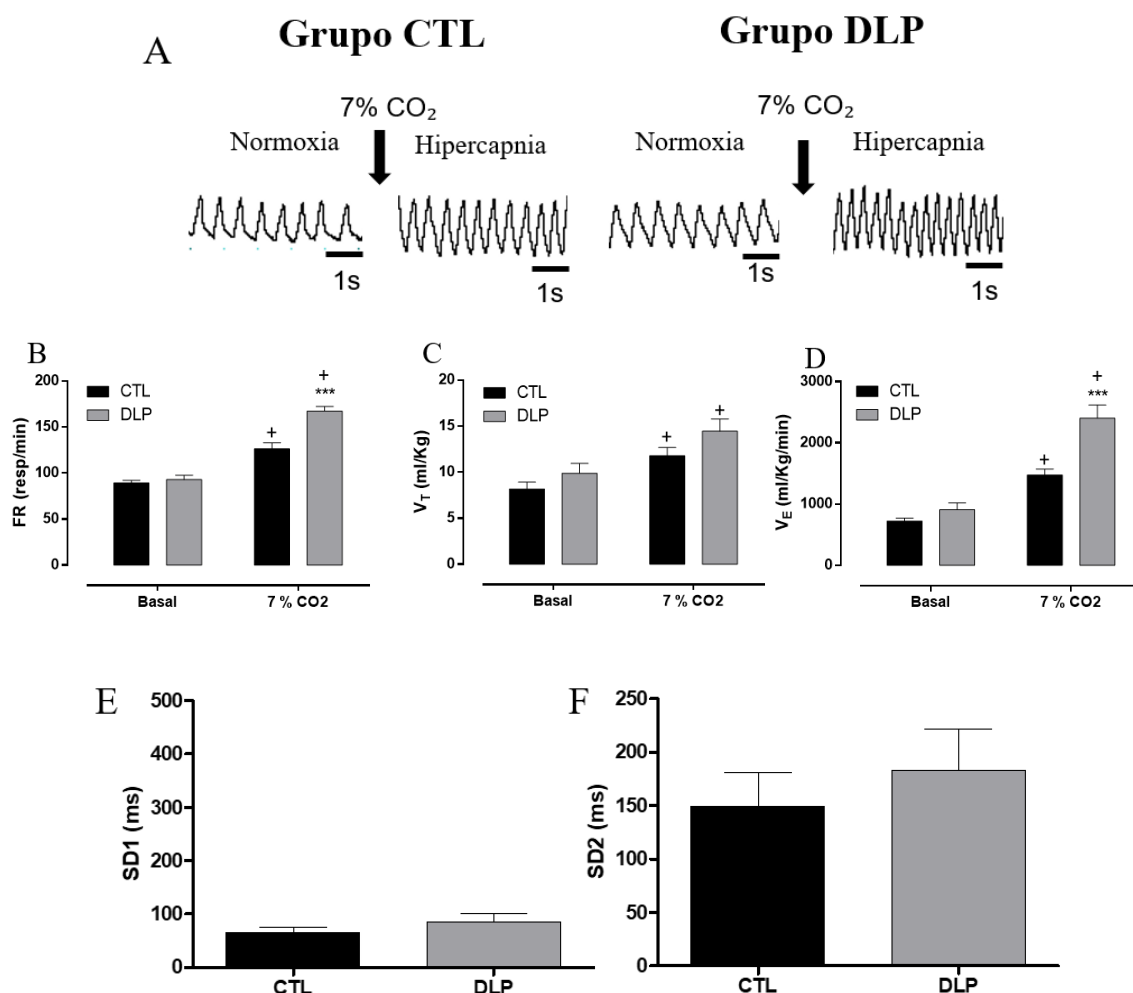
(Figura 10C, $P > 0,05$). Tanto o SD1 como o SD2 foram parecidos entre os grupos (Figura 10E e 10F).

Figura 9 – Testes para o metabolismo glicídico, perfil lipídico e níveis de MDA das proles CTL e DLP com 30 dias de vida



Avaliação do teste oral de tolerância à glicose (A), concentrações séricas de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de alta densidade (HDL) (B) e malonaldeído (MDA; C). Grupos: grupo controle (CTL; $n = 9$) e grupo dislipidêmico (DLP; $n = 9$). Valores são médias $\pm$ DP. *, $P < 0,05$ versus grupo CTL usando *two-way* ANOVA e teste *post hoc* de Bonferroni ou teste t de Student.

Figura 10 - Padrão ventilatório em repouso e sob hipercapnia das proles CTL e DLP com 90 dias de idade



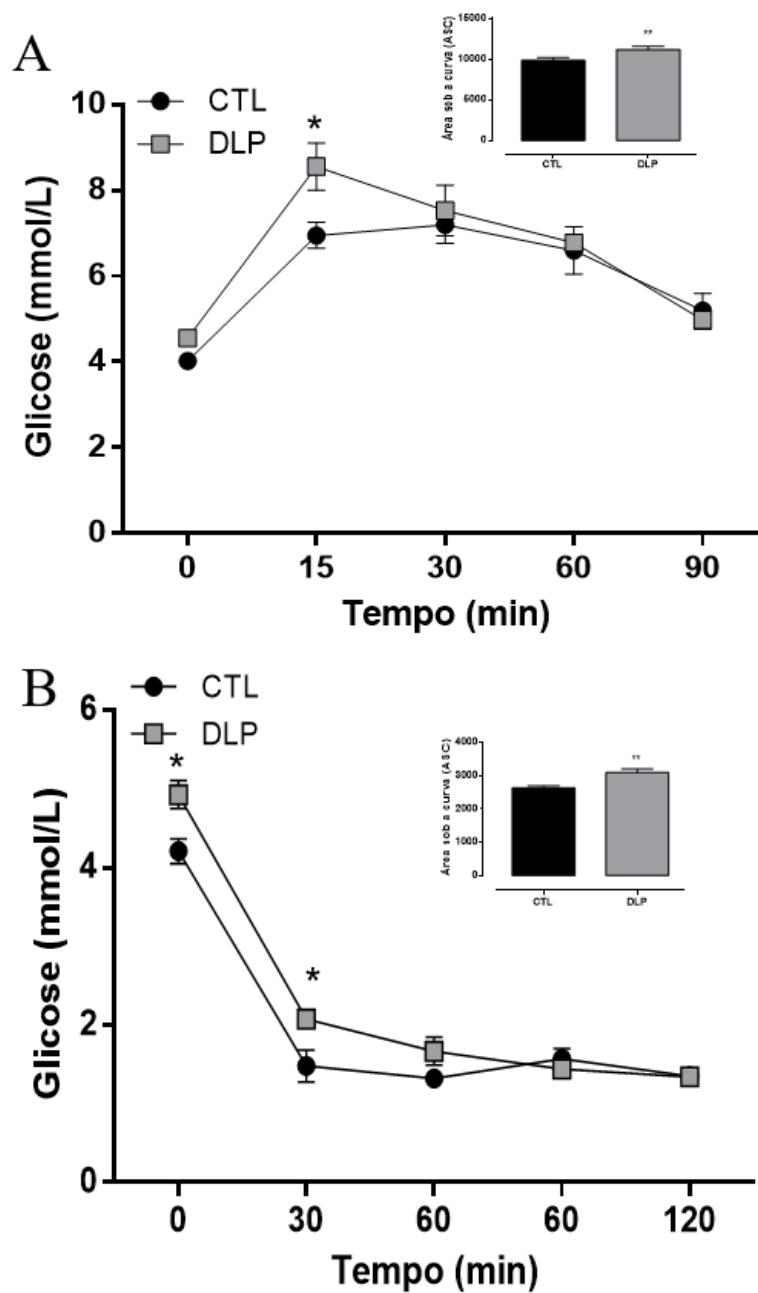
Traçado representativo do registro ventilatório por pletismografia de corpo inteiro em repouso e sob hipercapnia na prole fêmea CTL e DLP aos 90 dias de idade (A). Avaliação da frequência respiratória (FR; B), volume corrente (VT; C) e ventilação minuto (VE; D) em repouso e após hipercapnia (7% CO₂). Além disso, avaliação da variabilidade do intervalo respiratório de curto prazo (SD1; E) e de longo prazo (SD2; F) em repouso. Grupos: grupo controle (CTL; n = 9) e grupo dislipidêmico (DLP; n = 9). Valores são médias ± DP. ***, P < 0,0001 versus grupo CTL; +, P < 0,05 versus condição basal usando *two-way ANOVA* e teste *post hoc* de Bonferroni ou teste t de Student.

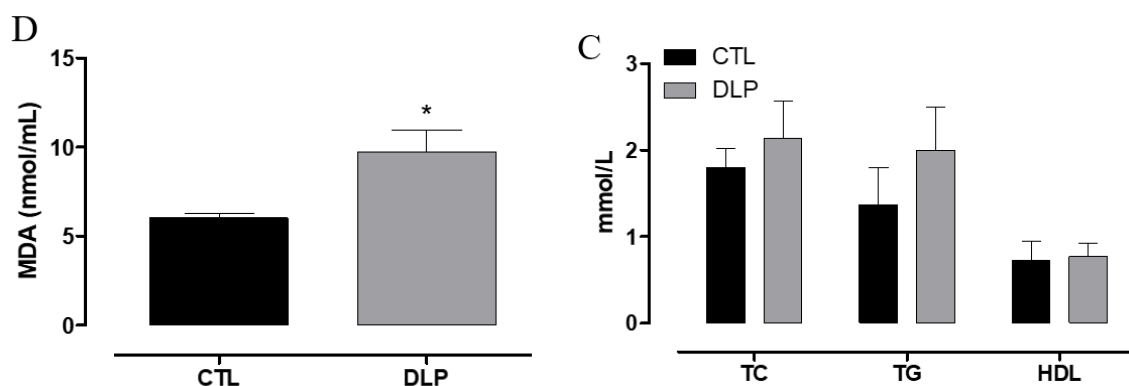
5.5 Efeitos da dislipidemia materna sobre o metabolismo lipídico, glicídico e os níveis de MDA dos filhotes com 90 dias de vida

Como demonstrado na Figura 11^a, os animais do grupo DLP exibiram maior área sob a curva após o TOTG e no TTI com a administração de insulina (Figura 11B). As concentrações plasmáticas de colesterol total, triglicerídeos e lipoproteína de alta densidade foram similares entre os grupos (Figura 11C). Os filhotes de mães

dislipidêmicas apresentaram maiores níveis de MDA sérico do que a prole das mães controles (Figura 11D).

Figura 11 - Testes para o metabolismo glicídico, perfil lipídico e níveis de MDA da prole com 90 dias de vida





Avaliação do teste oral de tolerância à glicose e insulina (A, B); concentrações séricas de colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), lipoproteína de alta densidade-colesterol (HDL) (C) e malonaldeído (MDA; D). Grupos: grupo controle (CTL; n = 9) e grupo dislipidêmico (DLP; n = 9). Valores são médias $\pm$ DP. *, $P < 0,05$ versus grupo CTL usando *two-way ANOVA* e teste *post hoc* de Bonferroni ou teste *t* de Student.

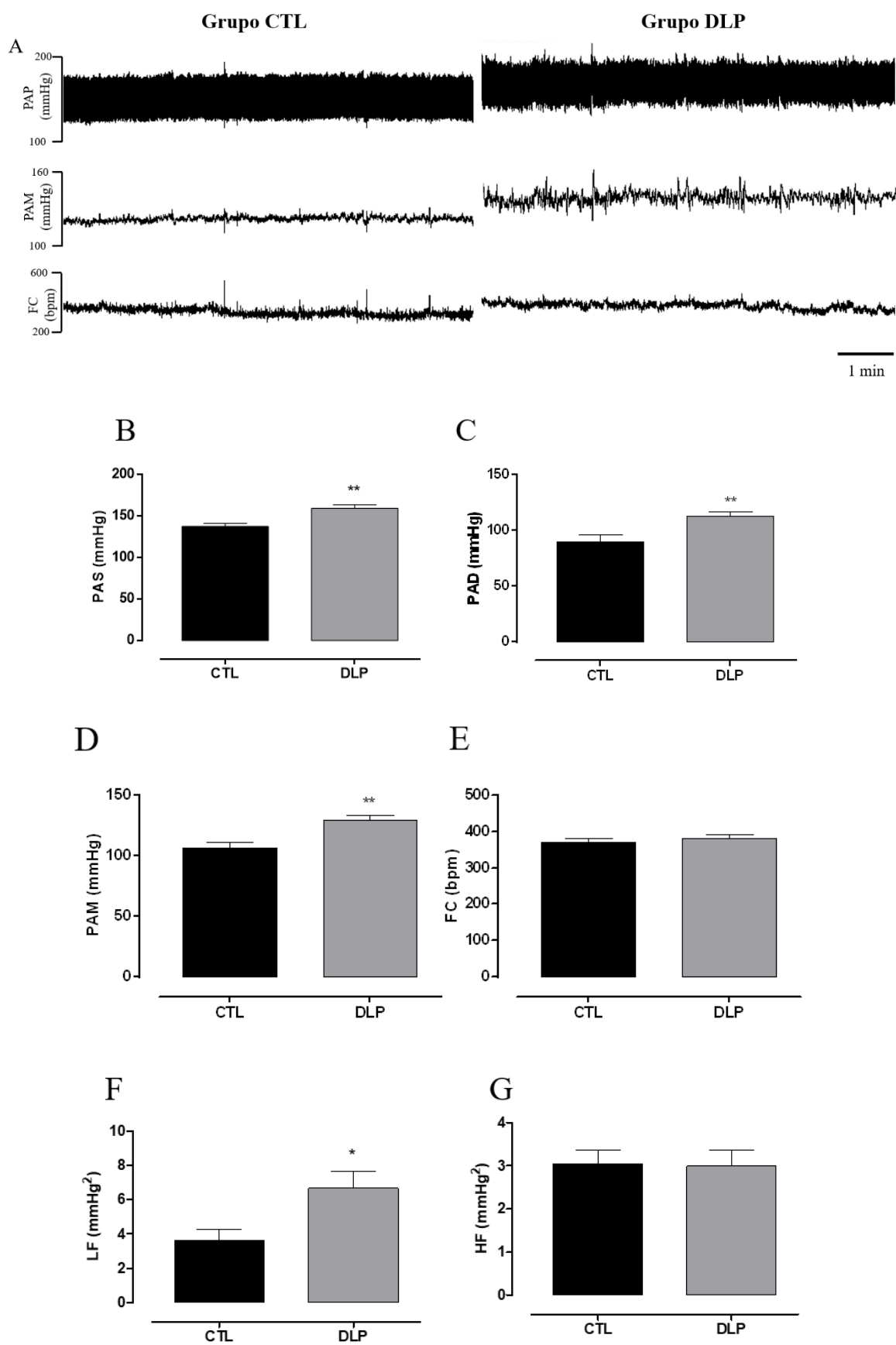
5.6 Efeitos da dislipidemia materna sobre os parâmetros cardiovasculares

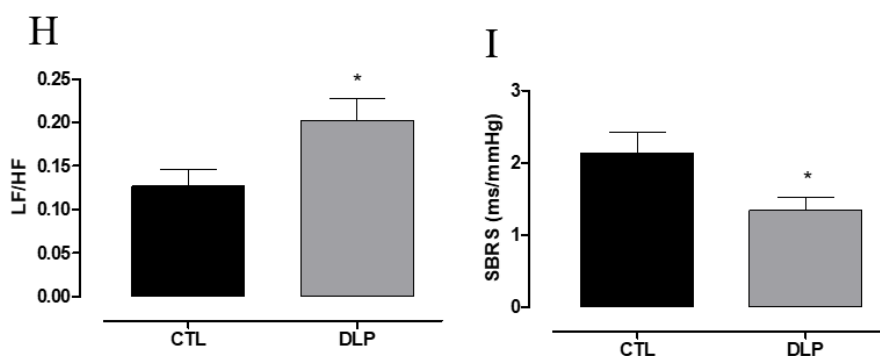
Um trecho representativo do registro de PAP, PAM e FC da prole fêmea das ratas é mostrado na Figura 12 A. Os níveis de PAS, PAD e PAM foram significativamente maior nos descendentes das ratas dislipidêmicas (Figura 12 B, C e D), mas sem diferir a FC entre os grupos. Além disso, a análise espectral do registro de pressão arterial basal demonstrou que a faixa que compreende o LF da PAS e a razão LF/HF do intervalo cardíaco aumentaram no grupo DLP (Figura 12 F e H). Em relação ao SBRS, a prole DLP exibiu menor sensibilidade barorreflexa espontânea em relação ao grupo controle (Figura 12 I).

5.7 Efeitos da dislipidemia materna sobre respostas cardiovasculares a hipercapnia da prole aos 90 dias de vida

A hipercapnia produziu respostas pressora e bradicárdica em ambos os grupos (Figura 13 A). As respostas pressoras e bradicárdicas a estimulação da hipercapnia foram maiores nas fêmeas filhas de mães dislipidêmicas (Figura 13 B e C). A análise espectral de mostrou que o *range* das ondas de baixa frequência (LF) da PAS foi maior nas ratas DLP, em contra partida as ondas de alta frequência (HF) estavam reduzidas no grupo DLP e a razão LF/HF do intervalo cardíaco foi maior no grupo DLP (Figura 13 D, E e F).

Figura 12 – Parâmetros cardiovasculares basais das proles CTL e DLP aos 90 dias de idade





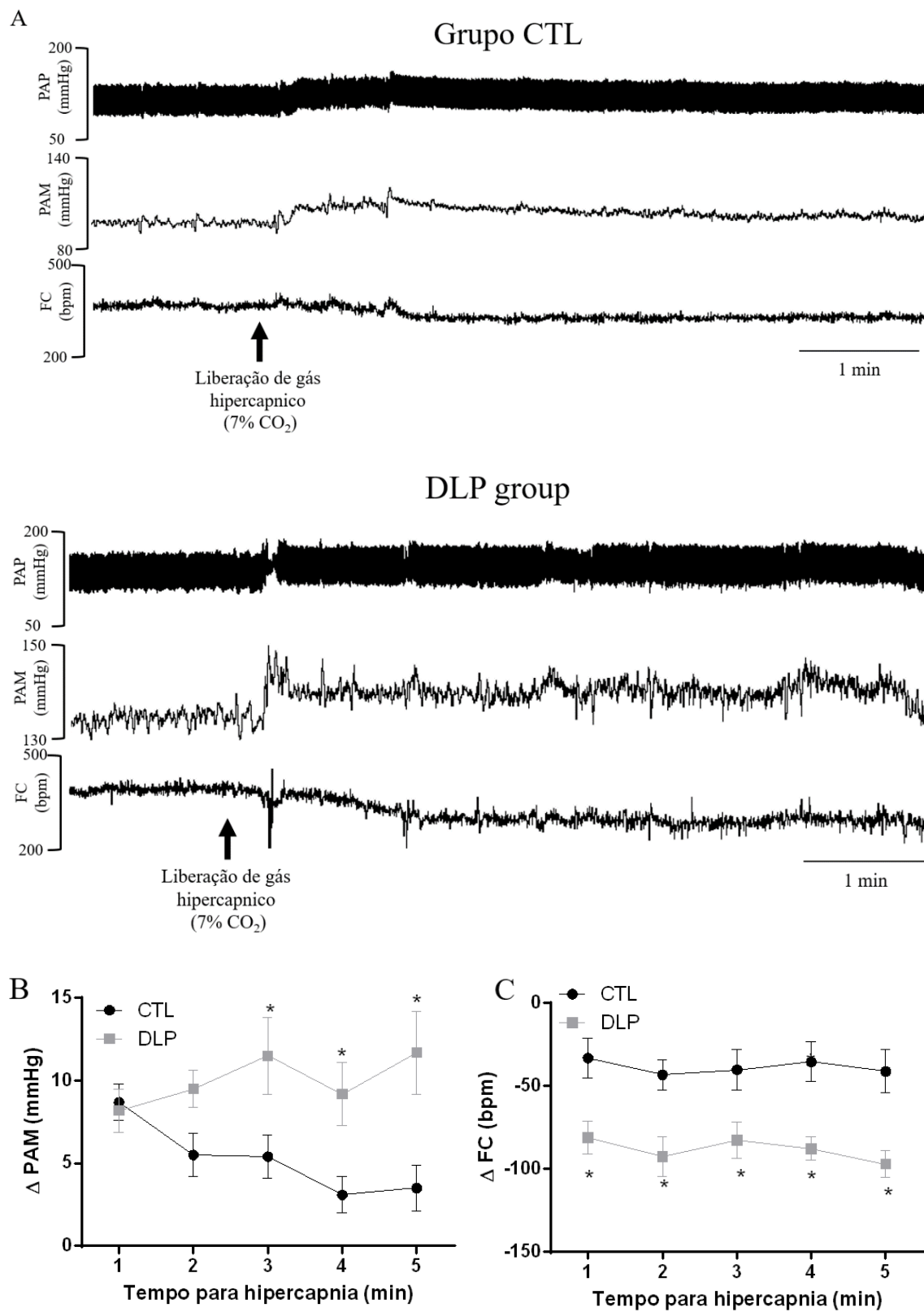
Traçado representativo da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de 1 animal da prole fêmea CTL e 1 da prole DLP aos 90 dias de idade (A). Avaliação da pressão arterial sistólica (PAS; B), pressão arterial diastólica (PAD; C), PAM (D); FC (E); ondas de baixa frequência da análise espectral da PA (LF) (F), ondas de alta frequência (HF) (G), a razão LF / HF, (H) e a sensibilidade barorreflexa espontânea (SBRs) (I) em filhotes fêmeas aos 90 dias de idade de mães expostas a dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: grupo controle (CTL, n = 9) e grupo dislipidêmico (DLP, n = 9). Valores são médias $\pm$ DP. *, P < 0,05; **, P < 0,01 versus grupo CTL usando o teste t de *Student*.

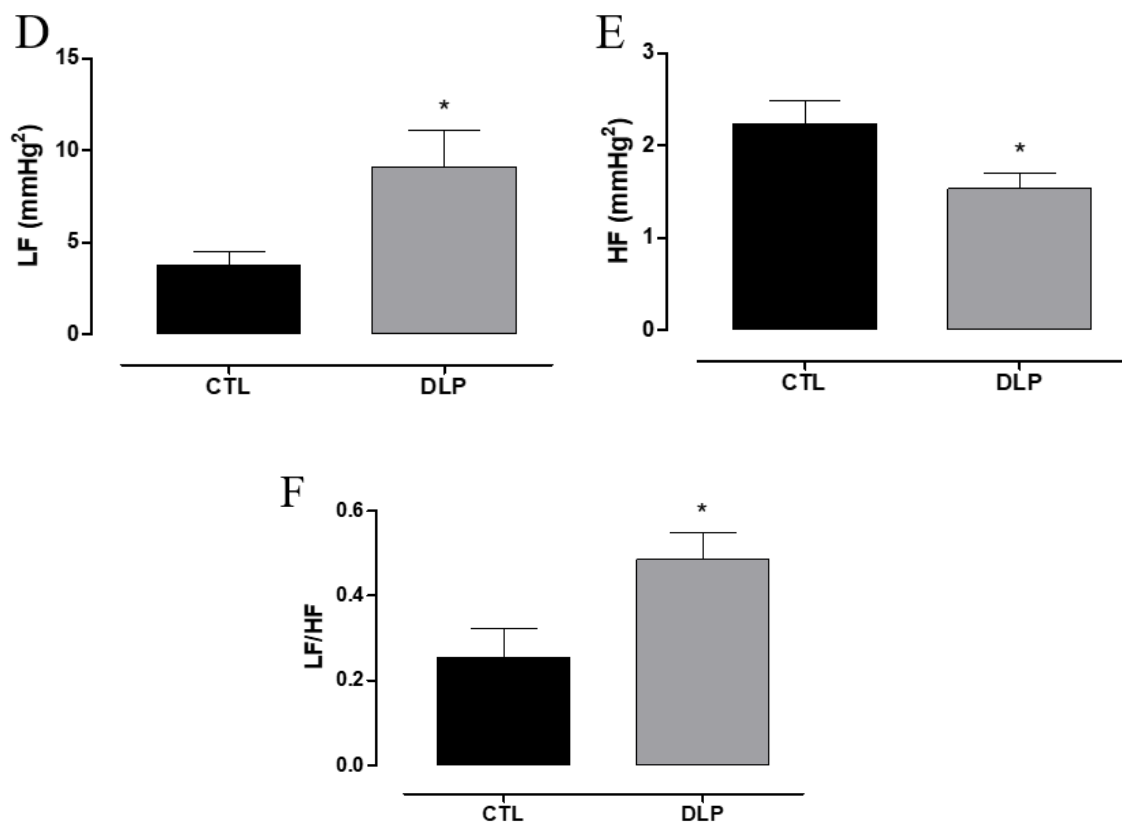
Tabela 3 – Variáveis do eletrocardiograma sob condições basais das proles dos grupos DLP e CTL aos 90 dias de vida

Cardiovascular parameters	CTL group (n=9)	DLP group (n=9)
Duração da ejeção (s)	0.097 $\pm$ 0.005	0.10 $\pm$ 0.005
Duração da não ejeção (s)	0.064 $\pm$ 0.004	0.061 $\pm$ 0.003
Duração do ciclo (s)	0.16 $\pm$ 0.004	0.17 $\pm$ 0.008
Intervalo RR (s)	0.17 $\pm$ 0.005	0.18 $\pm$ 0.005
Intervalo PR (s)	0.048 $\pm$ 0.001	0.046 $\pm$ 0.001
duração da onda P (s)	0.026 $\pm$ 0.0005	0.03 $\pm$ 0.001
Intervalo QRS (s)	0.032 $\pm$ 0.002	0.03 $\pm$ 0.002
Intervalo QT (s)	0.078 $\pm$ 0.003	0.078 $\pm$ 0.002

Análise dos parâmetros do ECG em filhotes fêmeas aos 90 dias de idade de mães expostas a dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: grupo controle (CTL, n = 9) e grupo dislipidêmico (DLP, n = 9). Valores são médias $\pm$ DP. *, P < 0,05 versus grupo CTL usando o teste t de *Student*.

Figura 13 – Respostas cardiopulmonares durante a indução da hipercapnia em descendentes de mães DLP e CTL



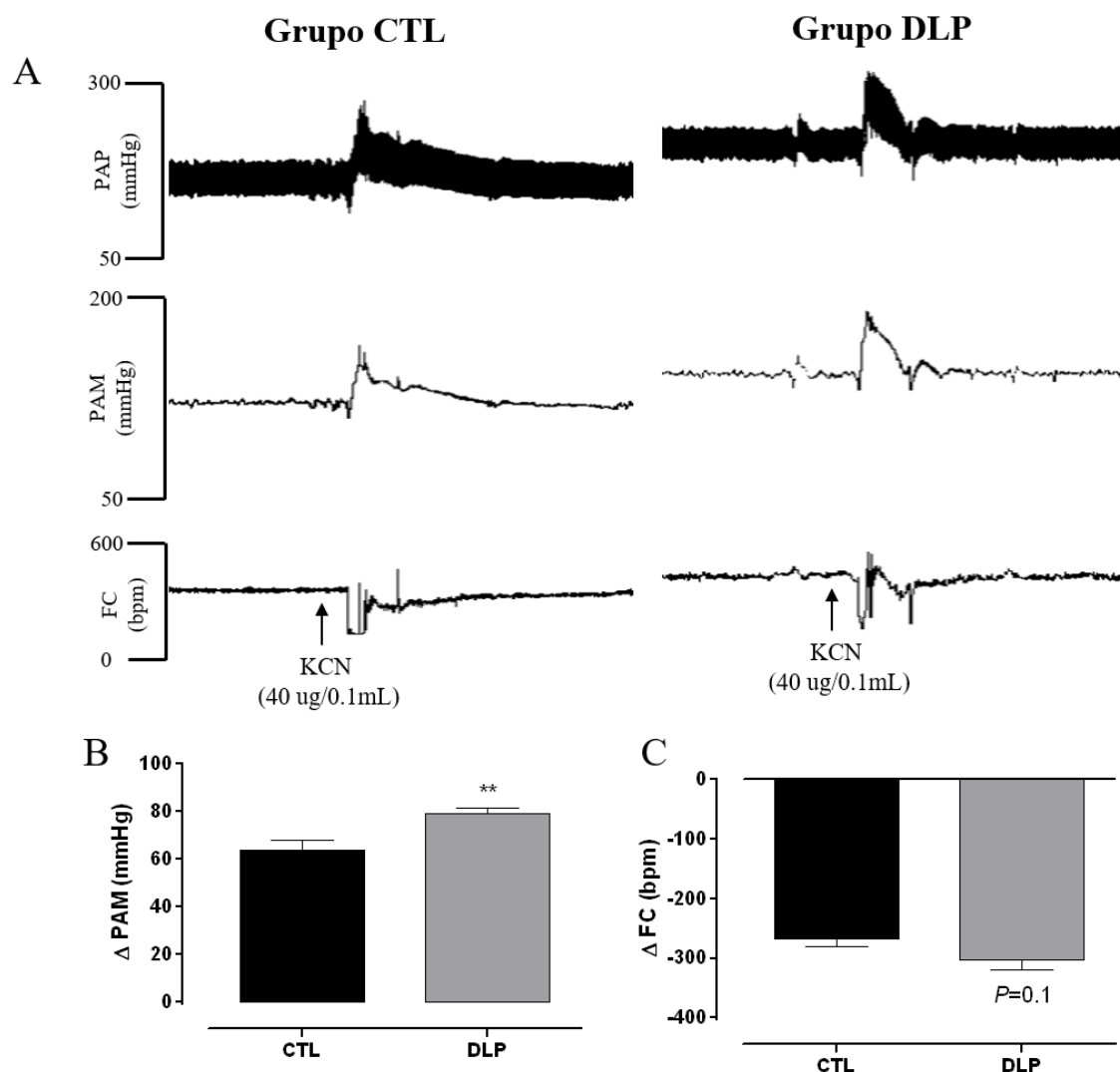


Traçado representativo do registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e FC durante a estimulação da hipercapnia aguda (A) aos 90 dias de idade. Avaliação do delta da PAM (B) e FC (C), ondas de baixa frequência (LF) (D), ondas de alta frequência (HF) (E), relação LF / HF (F) e sensibilidade barorreflexa espontânea (SBRS) (G) durante a ativação aguda do quimiorreflexo central (7% CO₂) em filhotes de mães expostas a dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: grupo controle (CTL; n = 7) e grupo dislipidêmico (DLP; n = 7). Valores são médias $\pm$ DP. *, P < 0,05 versus grupo CTL usando *two-way* ANOVA e teste *post hoc* de Bonferroni ou teste t de Student.

5.8 Efeitos da dislipidemia materna nas respostas cardiovasculares através da ativação do quimiorreflexo periférico na prole fêmea com 90 dias de idade

A ativação do quimiorreflexo periférico produz resposta pressora e bradicárdica em ambos os grupos (Figura 14 A). Os dados mostram que a resposta pressora foi maior nas ratas descendentes do grupo DLP (Figura 14 B), porém a frequência cardíaca não diferiu entre os grupos (Figura 14 C).

Figura 14 – Respostas cardiovasculares frente ao desafio do quimiorreflexo periférico provocadas pela hipóxia citotóxica (KCN) nas ratas descendentes de mães DLP e CTL

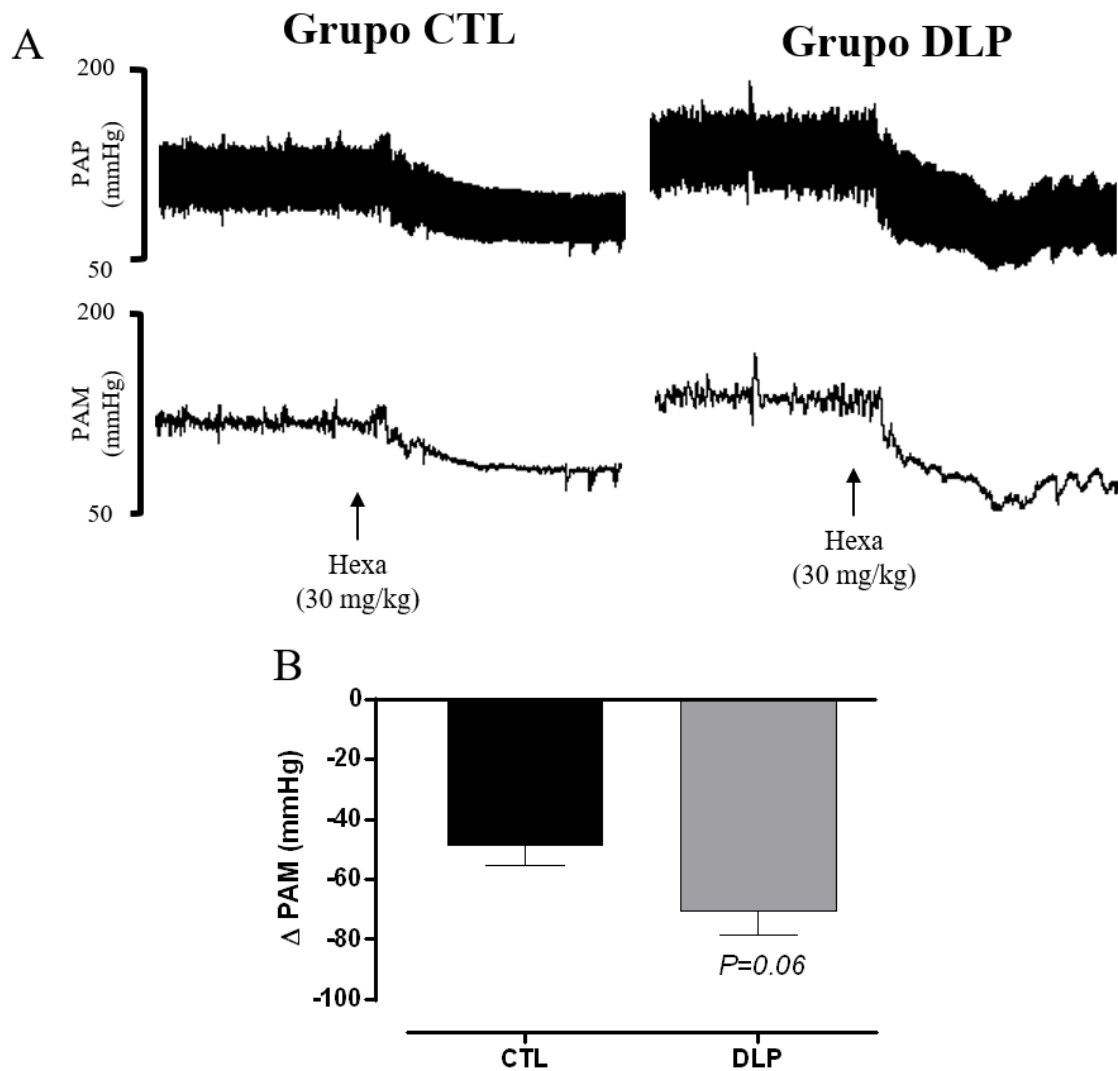


Traçado representativo do registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e FC durante a ativação quimiorreflexa periférica (A) aos 90 dias de idade dos animais. Avaliação do delta da PAM (B) e da FC (C) durante a ativação quimiorreflexa periférica (cianeto de potássio (KCN), 0,04 g / 0,1 mL por rato) em filhotes de mães expostas a dislipidemia materna durante a gestação e lactação. Grupos: grupo controle (CTL; n = 8) e grupo dislipidêmico (DLP; n = 9). Valores são médias $\pm$ DP. **, $P < 0,01$ versus grupo CTL usando o teste t de Student.

5.9 Efeitos da dislipidemia materna sobre o tônus simpático aos 90 dias de idade

Para avaliar se o tônus simpático foi aumentado na prole DLP, mudanças na PAM (Δ PAM) foram avaliadas após administração de um bloqueador ganglionar farmacológico. Os filhotes de mães dislipidêmicas apresentaram uma tendência a aumento no Δ PAM (Figura 15 B, $P = 0,06$) quando comparadas as ratas do grupo CTL.

Figura 15 – Efeito do bloqueador ganglionar (hexametônio) sobre os níveis de PAM da prole de ratas DLP e CTL com 90 dias de vida



Traçado representativo do registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (PAM) após o bloqueio ganglionar autonômico (hexametônio (Hexa)) (A) na prole fêmea CTL e DLP aos 90 dias de idade. Delta de PAM (B) em filhos de fêmeas aos 90 dias de idade de mães CTL ou DLP. Grupos: grupo controle (CTL; $n = 6$) e grupo dislipidêmico (DLP; $n = 6$). Valores são médias $\pm$ DP. *, $P < 0,05$ versus grupo CTL usando o teste t de Student.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Nós desenvolvemos um modelo de dislipidemia materna induzido pelo consumo de dieta por ratas, caracterizado por níveis séricos aumentados de CT, VLDL, LDL e TG, reduzidas concentrações de HDL juntamente com o comprometimento da tolerância à glicose e da sensibilidade à insulina (GUIMARÃES *et al.*, 2017). Usando este modelo experimental, demonstramos anteriormente que os filhotes machos adultos (90 dias de vida) desenvolveram hipertensão associada à hiperatividade simpática e aumento da sensibilidade quimiorreflexa sem alterações nos parâmetros lipídicos e glicêmicos (GUIMARAES *et al.*, 2017). Embora os mecanismos não sejam totalmente compreendidos, tem sido sugerido que as perturbações nutricionais no útero possam afetar a funcionalidade de alguns órgãos de maneira dependente do sexo (ROSENFELD, 2015; DRAYCOTT *et al.*, 2019).

Nesse trabalho demonstramos pela primeira vez que os filhos de mães alimentadas com uma dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação exibiram estresse respiratório, maior quimiossensibilidade ao CO₂ e alteração no perfil lipídico aos 30 dias de idade, além de elevados níveis de pressão arterial, resistência à insulina, aumento da sensibilidade quimiorreflexa, prejuízo do barorreflexo e aumento de atividade simpática aos 90 dias de idade (DE ARAÚJO *et al.*, 2019).

Em concordância com estudos anteriores, observamos que filhotes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica apresentam baixo peso ao nascer e ao desmame, mas recuperaram o peso a partir dos 30 dias de idade (THORNBURG *et al.*, 2010; GUIMARAES *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2017). Analisando a respiração em repouso aos 30 dias de idade, descobrimos que as fêmeas apresentam aumento na F_R em repouso. Esse fenótipo respiratório é típico de ratos nascidos com baixo peso (DE BRITO ALVES *et al.*, 2014, 2015; GUIMARÃES *et al.*, 2017). Dessa forma, consideramos que o baixo peso ao nascer é decorrente da dislipidemia materna que indiretamente pode alterar F_R dos animais em estado de repouso.

Prejuízos na fisiologia respiratória podem desempenhar um papel central no desenvolvimento da hipertensão arterial (SOUZA *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2017; TOLEDO *et al.*, 2017). Demonstramos que a prole fêmea de mães com dislipidemia apresenta um padrão respiratório irregular, caracterizado por aumentos na variabilidade

dos intervalos respiração-a-respiração. Demonstramos aqui que a dislipidemia materna promove 2 fenótipos do padrão respiratório na prole fêmea jovem: 1 padrão taquipnéico (padrão 1) e outro padrão com episódios alternados entre hipopneia e taquipneia (padrão 2). Curiosamente, aos 90 dias de idade, apenas duas proles DLP exibiram o padrão respiratório 2. Isso demonstra a plasticidade do sistema de controle respiratório contra insultos ambientais (BAVIS; MACFARLANE, 2017). Além disso, como o sistema nervoso central e dentre ele os grupamentos neuronais responsáveis pela geração e controle do ritmo respiratório amadurecem durante o período de lactação, é pertinente pensar que a dislipidemia materna possa influenciar o amadurecimento do sistema respiratório desses animais nas fases iniciais da vida (WONG-RILEY; LIU; GAO, 2019).

Os quimiorreceptores centrais e periféricos estão envolvidos no controle da ventilação e da atividade simpática (GUYENET *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2017). Estudos demonstraram que o CO₂ estimula constantemente os neurônios respiratórios do grupo respiratório ventral e pré-simpáticos localizados na região ventral do tronco encefálico (SPYER; GOURINE 2009; MOLKOV *et al.*, 2011). Está bem estabelecido que a estimulação aguda desses quimiorreceptores respiratórios provocada por hipóxia ou hipercapnia aumenta a atividade simpática e a PA (HANNA *et al.*, 1981; TRZEBSKI, 1984; SOMERS *et al.*, 1989; FRANCHINI; KRIEGER, 1993; LIOY; NATTIE *et al.*, 1993).

Embora as respostas ventilatórias à hipercapnia e hipóxia variem nas diferentes fases do ciclo menstrual em mulheres (REGENSTEINER *et al.*, 1989), as respostas respiratórias em repouso, estimuladas pela hipóxia (MARQUES *et al.*, 2017) ou hipercapnia (MARQUES *et al.*, 2015), não são alteradas nas fases proestro, estro, metaestro e diestro do ciclo estral em ratos fêmeas. Portanto, sugerimos que a respiração desordenada e a sensibilidade aumentada dos quimiorreceptores observadas nas ratas oriundas de mães dislipidêmicas se deve principalmente aos insultos nutricionais submetidos a esses animais durante a gestação, lactação e provavelmente não às variações hormonais.

No presente estudo, demonstramos que a prole fêmea de mães DLP apresentou PA elevada em condições de repouso associada a um prejuízo do barorreflexo espontâneo, aumento de sensibilidade quimiorreflexa e da atividade autonômica simpática desses animais com 90 dias de idade. Da mesma forma, ratos e ratas jovens de mães alimentadas com uma dieta pobre em proteínas durante a gestação exibiram PA sistólica aumentada

(MCMULLEN; LANGLEY-EVANS, 2005). Outro estudo demonstrou que o consumo de dieta rica em frutose durante a gestação é um fator de risco para o desenvolvimento de obesidade, hipertensão e disfunção metabólica na prole de ambos os gêneros (SAAD *et al.*, 2016). Por fim, foi demonstrado que ratas muito jovens e/ou adultas expostas à um protocolo de hipóxia intermitente crônica desenvolveram hipertensão associada à hiperatividade simpática (SOUZA *et al.*, 2015; SOUZA *et al.*, 2016). Os achados do nosso grupo e os resultados do presente trabalho mostram que os insultos nutricionais maternos podem contribuir para a PA aumentada tanto nos filhotes machos quanto fêmeas.

A função barorreflexa prejudicada pode estar associada à hiperatividade simpática e à hipertensão arterial (MEGURO *et al.*, 1989). Além disso, as eferências simpáticas e a pressão arterial podem ser moduladas pela ritmicidade da atividade nervosa respiratória (DEMPSEY *et al.*, 2002) e parte desse efeito modulador é influenciado pelos quimiorreceptores respiratórios periféricos e centrais.

A prole de ratas filhas de mães DLP exibiram aumento de LF, da razão LF / HF e uma tendência ao aumento do delta de PAM após administração de hexametônio, sugerindo que a PA elevada em repouso observada em nosso modelo poderia estar associada a um aumento do tônus simpático. Nossos achados também demonstraram que as ratas da prole DLP tinham maior resposta pressora à hipercapnia e hipóxia. Além disso, essas ratas também exibiram maior resposta pressora associada ao aumento de LF e da razão LF / HF durante a estimulação pela hipercapnia, sugerindo que as vias simpáticas e quimiorreflexa central são mais responsivas na prole DLP.

Aqui, demonstramos que a prole DLP apresentou maiores concentrações de lipídios séricos aos 30 dias de idade, porém aos 90 dias os níveis de lipídios foram semelhantes entre os grupos. Um trabalho comparou dois modelos de hipercolesterolemia ou dislipidemia em camundongos gestantes, um modelo induzido por dieta e o outro era de forma espontânea devido a modificações genéticas, o interessante do trabalho é que apesar dos roedores apresentarem grande concentração de colesterol plasmático, o leite materno não teve sua composição alterada do ponto de vista do colesterol/lipídios, demonstrado que camundongos lactantes que consomem dieta hiperlipídica ou que são naturalmente dislipidêmicas não apresentam aumento considerável de colesterol no leite materno (DIMOVA *et al.*, 2018). Nos acreditamos que os filhotes tenham consumido a

dieta materna nos últimos dias de lactação e isso tenha contribuído para as maiores concentrações de lipídios aos 30 dias de idade.

Aos 90 dias de idade, observamos aumento na sensibilidade quimiorreceptora, no tônus simpático e aumento da resistência à insulina na prole DLP. Existem evidências substanciais que apoiam a associação entre hiperatividade simpática e disfunção metabólica, como é observado na síndrome metabólica (THORP, SCHLAICH, 2015), além disso, tem sido demonstrado que o aumento da atividade quimiorreflexa, seja por estresse oxidativo, inflamação ou a hiperinsulinemia, leva a um incremento da atividade simpática que contribui para o desenvolvimento de hipertensão e resistência à insulina (CONDE *et al.* 2017).

O estresse oxidativo aumenta a sensibilidade quimiorreflexa, diminui a sensibilidade barorreflexa e contribui para a hiperatividade simpática (CHAN; CHAN, 2012; MORGAN *et al.*, 2016). No presente estudo, os níveis de MDA, um biomarcador usado para avaliar os níveis de peroxidação lipídica, foram aumentados na prole adulta de mães alimentadas com dieta DLP durante a gestação e lactação. Esse achado sugere, pelo menos em parte, que o estresse oxidativo pode exercer um papel na hipertensão arterial e na resistência à insulina induzida pela dislipidemia materna.

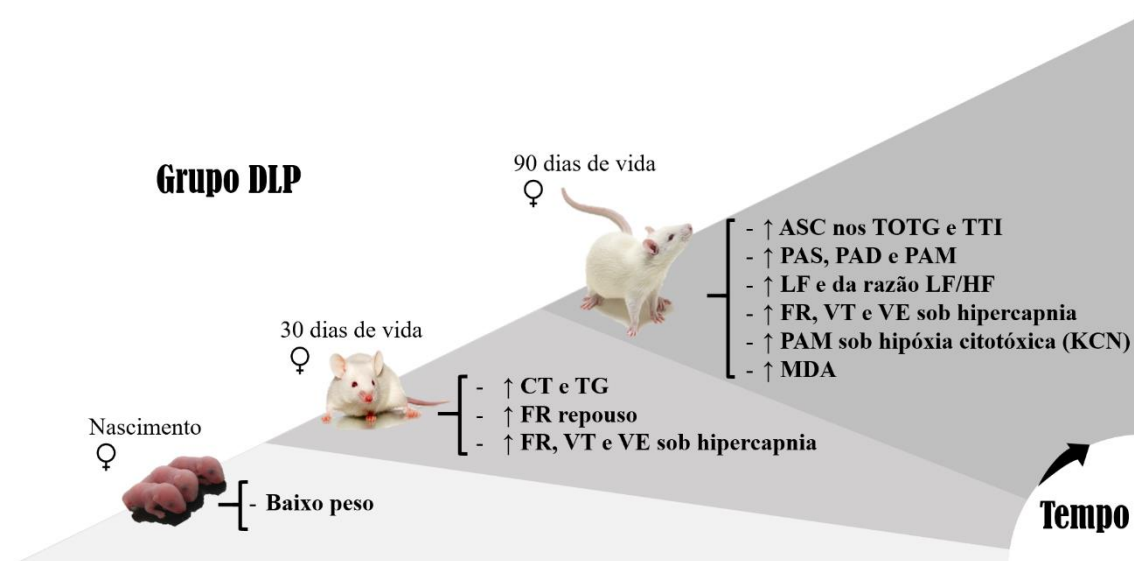
Dessa forma, estudos futuros serão necessários para entender se o estresse oxidativo é a causa subjacente da respiração desordenada, quimiossensibilidade aumentada, barorreflexo comprometido, tônus simpático e pressão arterial aumentados e resistência à insulina na prole fêmea de mães DLP. Pois, apesar das maiores concentrações de MDA encontradas na prole DLP adulta, esse resultado não é suficiente para caracterizar o quadro de estresse oxidativo (desequilíbrio entre componentes oxidantes e antioxidantes).

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Esses resultados demonstram que as ratas de mães dislipidêmicas apresentam algumas alterações somáticas ao nascer e, no início da vida apresentam indícios de prejuízo no controle cardiorrespiratório e metabólico, que se repetem na fase adulta e podem, em partes, explicar o quadro hipertensivo observado nesses animais (FIGURA 16).

FIGURA 16 - Sumarização de resultados dos efeitos da dislipidemia materna sob a prole de fêmeas



Fonte: Autor, 2020. ↑, estatisticamente maior comparado ao grupo controle; **CT**, colesterol total; **TG**, triglicerídeos; **FR**, frequência respiratória; **VT**, volume corrente; **VE**, volume minuto; **ASC**, cálculo da área sob a curva; **TOTG**, teste oral de tolerância a glicose; **TTI**, teste oral de tolerância à insulina; **PAS**, pressão arterial sistólica; **PAD**, pressão arterial diastólica; **PAM**, pressão arterial média; **LF**, banda de ondas de baixa frequência; **LF/HF**, razão banda de ondas de baixa frequência por ondas de alta frequência; **MDA**, níveis plasmáticos de malondialdeído.

REFERÊNCIAS

Referências:

Abdala, A. P., et al.; Multiple pontomedullary mechanisms of respiratory rhythmogenesis. **Respir Physiol Neurobiol**, v.168, n.1-2, p.19-25, 2009.

Agarwal, P. et al.; Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.55, n.2, p.71-101, 2018.

Alexander, B. T.; Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. **Hypertension**, v.41, n.3, p.457-462, 2003.

Baekey, D. M.; Dick, T. E.; Paton, J. F.; Pontomedullary transection attenuates central respiratory modulation of sympathetic discharge, heart rate and the baroreceptor reflex in the in situ rat preparation. **Exp Physiol**, v.93, n.7, p.803-816, 2008.

Baekey, D. M., et al.; Effect of baroreceptor stimulation on the respiratory pattern: insights into respiratory-sympathetic interactions. **Respir Physiol Neurobiol**, v.174, n.1-2, p.135-145, 2010.

Barker, D. J. P.; Osmond, C.; Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, v.10, n.8489, p.1077-1081, 1986.

Bavis, R. W.; MacFarlane, P. M.; Developmental plasticity in the neural control of breathing. **Exp Neurol**, v.287, n.Pt2, p.176-191, 2017.

Benjamin, E. J. et al.; Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report from the American Heart Association. **Circulation**, v.139, n.10, p.e56-e528, 2019.

Bielemann, R. M. et al. Consumo de alimentos ultraprocessados e impacto na dieta de adultos jovens. **Rev Saúde Públ**, v.49, n.28, p.1-10, 2015.

Breetha, R.; ramaprasad, Tr.; Dietary n-3 but not n-6 fatty acids down-regulate maternal dyslipidemia induced inflammation: A three-generation study in rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v.135, p.83-91, 2018.

Cantravas, G. N.; Anker, H. S.; On the restoration of fatty acid biosynthesis after fasting. **J Biol Chem**, v.232, n.2, p.669-680, 1958.

Cavalcanti, C. O. et al.; Inhibition of PDE5 restores depressed baroreflex sensitivity in renovascular hypertensive rats. **Front Physiol**, v.7, n.15, 2016.

Chan, J. C.; Renal and endocrine hypertension. A review. **Intel J Pediatr Nephrol**, v.4, n.3, p.187-196, 1983.

Chan, S. H.; Chan, J. Y.; Brain stem oxidative stress and its associated signaling in the regulation of sympathetic vasomotor tone; **J Appl Physiol**, v.113, n.12, p.1921-1928, 2012.

Cheng, Z.; Zheng, L.; Almeida, F. A.; Epigenetic reprogramming in metabolic disorders: nutritional factors and beyond. **J Nutr Biochem**, v.54, p.1-10, 2018.

Conde, S. V. et al.; Insulin resistance: a new consequence of altered carotid body chemoreflex?. **J Physiol**, v.595, p.31-41, 2017.

Cooke, C-L. M. et al.; Increased susceptibility to cardiovascular disease in offspring born from dams of advanced maternal age. **J Physiol**, v.596, n.23, p.5807-5821, 2018.

Costa, K. M. et al.; Evolution and physiology of neuronal oxygen sensing. **Front Physiol**, v.5, p.302, 2014.

Dampney, R. A.; Brain stem mechanisms in the control of arterial pressure. **Clin Exp Hypertension**, v.3, n.3, p.379-391, 1981.

Davis, G. K. et al.; Androgen receptor blockade differentially regulates blood pressure in growth-restricted versus ovarian deficient rats. **Hypertension**, v.74, n.4, p.975-982, 2019.

Davis, G. K. et al.; chronic estrogen supplementation prevents the increase in blood pressure in female intrauterine growth-restricted offspring at 12 months of age. **Hypertension**, v.73, n.5, p.1128-1136, 2019.

De Araujo, E. V. et al.; Maternal dyslipidemia during pregnancy and lactation increases blood pressure and disrupts cardiorespiratory and glucose hemostasis in female rat offspring. **Appl Physiol Nutr Metab**, v.44, n.9, p.925-936, 2019.

De Assis, S. M.; Seguro, A. C.; Helou, C. M. Effects of maternal hypercholesterolemia on pregnancy and development of offspring. **Pediatr Nephrol**, v.18, n.4, p.328-334, 2003.

De Brito Alves, J. L. et al.; Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. **Brit J Nutr**, v.111, n.4, p.606-615, 2014.

De Brito Alves, J. L. et al.; Maternal protein restriction increases respiratory and sympathetic activities and sensitizes peripheral chemoreflex in male rat offspring. **J Nutr**, v.145, n.5, p.907-914, 2015.

De Brito Alves, J. L. et al.; Maternal protein restriction induced-hypertension in associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.43, n.12, p.1177-1184, 2016.

Dempsey, J. A. et al.; Respiratory influences on sympathetic vasomotor outflow in humans. **Respir Physiol Neurobiol**, v.130, n.1, p. 3-20, 2002.

DiFrancesco, D.; The role of the funny current in pacemaker activity. **Circ Res**, v.106, n.3, p.434-446, 2010.

Dimora, L. G. et al.; Milk cholesterol concentration in mice is not affected by high cholesterol diet- or genetically-induced hypercholesterolaemia. **Sci Rep**, v.8, n.1, 2018.

Dolinoy, D. C. et al.; Metastable epialleles, imprinting, and the fetal origins of adult diseases. **Pediatr Res**, v.61, n.5 2° part., p.30R – 37R, 2007.

Draycott, S. A. V. et al.; Maternal dietary ratio of linoleic acid to alpha-linolenic acid during pregnancy has sex-specific effects on placental and fetal weights in the rat. **Nutr Metab (Lond)**, v.16, n.1-12, 2019.

Dunder, L. et al.; Low-dose developmental bisphenol A exposure alters fatty acid metabolism in Fischer 344 rat offspring. **Environ Res**, v.166, p.117-129, 2018.

Duttaroy, A. K.; Transport of fatty acids across the human placenta: A review. **Progress Lipid Res**. v.48, p.52-61, 2009.

Entringer, S. et al.; The fetal programming of telomere biology hypothesis: an update. **Philos Trans Royal Soc B Biol Sci**, v.373, n.1741, 2018.

Ezure, K.; Manabe, M.; Yamada, H.; Distribution of medullary respiratory neurons in the rat. **Brain Res**, v.455, n.2, p.262-270, 1988.

Faludi, A. A. et al. Atualização da diretriz Brasileira de dislipidemias e prevenção da aterosclerose – 2017. **Soc Bras Cardiol**, v.109, n.2, Supl.1, p.1-76 2017.

Fazzi, C. et al.; Sedentary behaviours during pregnancy: a systematic review. **Int J Behav Nutr Phys Act**, v.14, n.1, 2017.

Feitosa, A. et al.; Impact of the use of different diagnostic criteria in the prevalence of dyslipidemia in pregnant women. **Arq Brasil Cardiol**. v.109, n.1, p.30-38, 2017.

Forouzanfar, M. H. et al.; Global burden of hypertension and systolic blood pressure of at least 110 to 115 mm Hg, 1990-2015. **JAMA**, v.317, n.2, p.165-182, 2017.

Fortepiani, L. A.; Reckelhoff, J. F.; Role of oxidative stress in the sex differences in blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, v.23, n.4, p.801-805, 2005.

Franchini, K. G.; Krieger, E. M.; Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J Auton Nerv Syst**, v.42, n.1, p.63-69, 1993.

Frantz, I. D., Jr.; Schneider, H. S.; Hinkelman, B. T.; Suppression of hepatic cholesterol synthesis in the rat by cholesterol feeding. **J Biol Chem**, v.206, n.1, p.465-469, 1954.

Fry, D. L.; Hyatt, R. E.; Pulmonary mechanics. A unified analysis of the relationship between pressure, volume and gas flow in the lungs of normal and diseased human subjects. **Am J Med**, v.29, p.672-689, 1960.

Fuenzalida, B. et al.; Maternal supraphysiological hypercholesterolemia associates with endothelial dysfunction of the placental microvasculature. **Sci Rep**, v.8, n.7690, 2018.

Gisclard, V.; Miller, V. M.; Vanhoutte, P. M.; Effect of 17-beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. **J Pharmacol Exp Ther**, v.244, n.1, p.19-22, 1988.

Gluckman, P. D.; Hanson, M. A.; Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, v.305, n.5691, p.1733-1736, 2004.

Gohir, W. et al.; High-fat diet intake modulates maternal intestinal adaptations to pregnancy and results in placental hypoxia, as well as altered fetal gut barrier proteins and immune markers. **J Physiol**, v.597, n.12, p.3029-3051, 2019.

Gourine, A. V. et al.; Cardiac vagal preganglionic neurons: An update. **Auton Neurosci: Bas Clin**, v.199, p.24-28, 2016.

Guimarães, K. S. L. et al.; Effect of maternal dyslipidaemia on the cardiorespiratory physiology and biochemical parameters in male rat offspring. **Br J Nutr**, v.118, n.11, p.930-941, 2017.

Guyenet, P. G.; Bayliss, D. A.; Neural control of breathing and CO₂ homeostasis. **Neuron**, v.87, n.5, p.946-961, 2015.

Guyenet, P. G. et al.; Central CO₂ chemoreception and integrated neural mechanisms of cardiovascular and respiratory control. **J Appl Physiol**, v.108, n.4, p.995-1002, 2010.

Hanna, B. D.; Liou, F.; Polosa, C.; Role of carotid and central chemoreceptors in the CO₂ response of sympathetic preganglionic neurons. **J Auton Nerv Syst**, v.3, n.2-4, p.421-435, 1981.

Hanson, M. et al.; Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: Theoretical considerations and epigenetic mechanisms. **Prog Biophys Mol Biol**, v.106, n.1, p.272-280, 2011.

Herrera, E.; Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. **Endocrine**, v.19, n.1, p.43-55, 2002.

Higgins, J. A.; Grenn, C.; The uptake of lipids by rat liver cells. **Biochem J**, v.99, n.3, p.631-639, 1966.

Intapad, S. et al.; Renal denervation abolishes the age-dependent increase in blood pressure in female intrauterine growth-restricted rats at 12 months of age. **Hypertension**, v.61, n.4, p.828-834, 2013.

Jackson, K. G.; Poppitt, S. D.; Minihane, A. M.; Postprandial lipemia and cardiovascular disease risk: Interrelationships between dietary, physiological and genetic determinants, **Atherosclerosis**, v.220, n.1, p.22-33, 2012.

Jiang, S. et al.; Maternal dyslipidemia during pregnancy may increase the risk of preterm birth: A meta-analysis. **Taiwan J Obstet Gynecol**, v.56, n.1, p.9-15, 2017.

Jimenez-Chillaron, J. C. et al.; The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. **Biochimie**, v.94, n.11, p.2242-2263, 2012.

Kornmueller, K.; Vidakovic, I.; Prassl, R.; Artificial High Density Lipoprotein Nanoparticles in Cardiolascular Research. **Molecules**, v.24, n.15, 2019.

Lain, K. Y.; Catalano, P. M.; Metabolic changes in pregnancy. **Clin Obstet Gynecol**, v. 50, n.4, p.938-948, 2007.

Liguori, A. et al.; Effect of gestational hypercholesterolaemia on omental vasoreactivity, placental enzyme activity and transplacental passage of normal and oxidised fatty acids. **BJOG**. v.114, n.12, 2007.

Lim, S. S. et al.; A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**. v.380, n.9859, p. 2224-2260, 2012.

Linazaroso, J. M. et al.; Regulation of cholesterol synthesis in the liver: the influence of dietary fats. **J Exp Med**, v.107, n.6, p.813-820, 1958.

Lioy, F.; Trzebski, A.; Pressor effect of CO₂ in the rat: different thresholds of the central cardiovascular and respiratory responses to CO₂. **J Auton Nerv Syst**, v.10, n.1, p.43-54, 1984.

Loche, E. et al.; Maternal diet-induced obesity programmes cardiac dysfunction in male mice independently of post-weaning diet. **Cardiovasc Res**, v. 114, n. 10, p. 1372-1384, 2018.

Lopez-Barneo, J. et al.; Carotid body oxygen sensing. **Eur Respir J**, v.32m n.5, p.1386-1398, 2008.

Louwagie, E. J. et al.; Placental lipid processing in response to a maternal high-fat diet and diabetes in rats. **Pediatr Res**, V.83, n.3, p.712-722, 2018.

Machado, B. H.; Zoccal, D. B.; Moraes, D. J. A. Neurogenic hypertension and the secrets of respiration. **Am J Physiol Regul, Integr Comp Physiol**, v.312, n.6, p. R864-R872, 2017.

Malachias, M. V. B. et al.; 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 13 – Resistant Arterial Hypertension. **Arq Bras Cardiol**, v.107, n.3 suppl 3, p.75-78, 2016.

Malan, A.; Ventilation measured by body plethysmography in hibernating mammals and in poikilotherms. **Respir Physiol**, v.17, n.1, p.32-44, 1973.

Marques, D. A. et al.; Ventilatory, metabolic, and thermal responses to hypercapnia in female rats: effects of estrous cycle, ovariectomy, and hormonal replacement. **J Appl Physiol**, v.119, n.1, p.61-68, 2015.

Marques, D. A. et al.; Influence of estrous cycle hormonal fluctuations and gonadal hormones on the ventilatory response to hypoxia in female rats. **Pflugers Arch**, v.469, n.10, p.1277-1286, 2017.

MCTIC. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. **Publicada Procedimentos – “Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica” do Guia Brasileiro de Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica**. Resolução Normativa CONCEA nº 33, de 18.11.2016. Disponível em: https://www.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_33_de_18112016.html. Acessado em 05 de janeiro de 2020.

McMullen, S.; Langley-Evans, S. C.; Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.288, n.1, p.R85-R90, 2005.

Meguro, Y. et al. A sympathetic component of baroreflex function in patients with essential hypertension. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.15, Suppl.15, p.93-95, 1989.

Mendonça, R. D. et al.; Ultraprocessed food consumption and risk of overweight and obesity: the University of Navarra Follow-Up (SUN) cohort study. **Am J Clin Nutr**, v.104, n.5, p.1433-1440, 2016.

Molkov, Y. I. et al.; Computational models of the neural control of breathing. **Wiley Interdisc Rev. Systems Biol Med**, v.9, n.2, 2017.

Molkov, Y. I. et al.; Intermittent hypoxia-induced sensitization of central chemoreceptors contributes to sympathetic nerve activity during late expiration in rats. **J Neurophysiol**, v.105, n.6, p.3080-3091, 2011.

Moraes, D. J.; Machado, B. H.; Zoccal, D. B.; Coupling of respiratory and sympathetic activities in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. **Prog Brain Res**, v.212, p.25-38, 2014.

Morgan, B. J. et al.; Oxidative stress augments chemoreflex sensitivity in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Respir Physiol Neurobiol**, v.234, p.47-59, 2016.

Nattie, E. E.; Gdovin, M.; Li, A.; Retrotrapezoid nucleus glutamate receptors: control of CO₂-sensitive phrenic and sympathetic output. **J Appl Physiol**, v.74, n.6, p.2958-2968, 1993.

Ockner, R. K.; Pittman, J. P.; Yager, J. L.; Differences in the intestinal absorption of saturated and unsaturated long chain fatty acids. **Gastroenterology**, v.62, n.5, p.981-992, 1972.

Oliveira, G. M. M. et al.; Diretrizes de 2017 para manejo da hipertensão arterial em cuidados primários nos países de língua portuguesa. **Portug J Cardiol**, v.36, n.11, p.789-798, 2017.

Pav, J.; Wenkeova, J.; Significance of adipose tissue lipoprotein lipase. **Nature**, v.185, p.926-927, 1960.

Pinheiro, R. O. et al.; Maternal dyslipidaemic diet induces sex-specific alterations in intestinal function and lipid metabolism in rat offspring. **Br J Nutr**, v.121, n.7, p.721-734, 2019.

Polettini, J. et al.; Aging of intrauterine tissues in spontaneous preterm birth and preterm premature rupture of the membranes: A systematic review of the literature. **Placenta**, v.36, n.9, p.969-973, 2015.

Radding, C. M.; Bragdon, J. H.; Steinberg, D.; The synthesis of low- and high-density lipoproteins by rat liver in vitro. **Biochim Biophys Acta**, v.30, n.2, p.443-444, 1958.

Ramaiyan, B.; Bettadahalli, S.; Talahalli, R. R.; Dietary omega-3 but not omega-6 fatty acids down-regulate maternal dyslipidemia induced oxidative stress: A three generation study in rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 477, n.4, p.887-894, 2016.

Raven, P. B.; Chapleau, M. W.; Blood pressure regulation XI: overview and future research directions. **Eur J Appl Physiol**, v.114, n.3, p.579-586, 2014.

Reardon, M. F.; Fidge, N. H.; Nestel, P. J.; Catabolism of very low density lipoprotein B apoprotein in man. **J Clin Invest**, v.61, n.3, p.850-860, 1978.

Reckelhoff, J. F.; Fortepiani, L. A.; Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. **Hypertension**, v.43, n.5, p.918-923, 2004.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, G. C. Jr.; 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**, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.

Regensteiner, J. G. et al.; Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women. **J Appl Physiol**, v.66, n.2, p.808-813, 1989.

Richmond, R. C. et al.; DNA methylation as a marker for prenatal smoke exposure in adults. **Intl J Epidemiol**, v.47, n.4, p.1120-1130, 2018.

Rosenfeld, C. S.; Sex-Specific Placental Responses in Fetal Development. **Endocrinology**, v.156, n.10, p.3422-3434, 2015.

Saad, A. F. et al.; High-fructose diet in pregnancy leads to fetal programming of hypertension, insulin resistance, and obesity in adult offspring. **Am J Obstet Gynecol**, v.215, n.3, 2016.

Sarnoff, S. J.; Whittenberger, J. L.; Hardenbergh, E.; Electrophrenic respiration; mechanism of the inhibition of spontaneous respiration. **Am J Physiol**, v.155, n.2, p.203-207, 1948.

Shrestha, D.; Workalemahu, T.; Tekola-Ayele, F.; Maternal dyslipidemia during early pregnancy and epigenetic ageing of the placenta. **Epigenetics**, v.14, n.10, p.1030-1039, 2019.

Smith, J. C. et al.; Spatial and functional architecture of the mammalian brain stem respiratory network: a hierarchy of three oscillatory mechanisms. **J Neurophysiol**, v. 98, n.6, p.3370-3387, 2007.

Somers, V. K. et al.; Contrasting effects of hypoxia and hypercapnia on ventilation and sympathetic activity in humans. **J Appl Physiol**, v.67, n.5, p.2101-2106, 1989.

Souza, G. M. et al.; Cardiovascular and respiratory responses to chronic intermittent hypoxia in adult female rats. **Exp Physiol**, v.100, n.3, p.249-258, 2015.

Souza, G. M. et al.; Inspiratory modulation of sympathetic activity is increased in female rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Exp Physiol**, v.101, n.11, p.1345-1358, 2016.

Spyer, K. M.; Gourine, A. V.; Chemosensory pathways in the brainstem controlling cardiorespiratory activity. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.364, n.1529, p.2603-2610, 2009.

Surgi, B. S.; Targ, M. E.; Robinson, D. S.; The degradation of very low density lipoprotein by the extrahepatic tissues of the rat. **Biochim Biophys Acta**, v.529, n.2, p.331-341, 1978.

Tada, H. et al.; Remnant lipoproteins and atherosclerotic cardiovascular disease. **Clin Chim Acta**, v.490, p.1-5, 2019.

Tain, Y. L. et al.; High fat diets sex-specifically affect the renal transcriptome and program obesity, kidney injury, and hypertension in the offspring. **Nutrients**, v.9, n.4, 2017.

Tall, A.; Plasma lipid transfer proteins. **Annu Rev Biochem**, v.64, p.235-257, 1995.

Thornburg, K. L.; O'Tierney, P. F.; Louey, S.; Review: The placenta is a programming agent for cardiovascular disease. **Placenta**, v.31, p.S54-S59, 2010.

Thorp, A. A.; Schlaich, M. P.; Relevance of sympathetic nervous system activation in obesity and metabolic syndrome. **J Diabetes Res**, v.2015, 2015.

Tikhonoff, V. et al.; The uncertain effect of menopause on blood pressure. **J Hum Hypertens**, v.33, n.6, p.421-428, 2019.

Toledo, C. et al.; Cardiac diastolic and autonomic dysfunction are aggravated by central chemoreflex activation in heart failure with preserved ejection fraction rats. **J Physiol**, v.595, n.8, p.2479-2495, 2017.

Toral, M. et al.; Critical Role of the Interaction Gut Microbiota – Sympathetic Nervous System in the Regulation of Blood pressure. **Front Physiol**, v.10, p.231, 2019.

Van Kleef, M.; Bates, M. C.; Spiering, W.; Endovascular Baroreflex Amplification for Resistant Hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v.20, n.5, 2018.

Van Meer, G. et al.; Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.2, p.112-124, 2008.

Vedder, H. et al.; Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. **J Neurochem**, v.72, n.6, p.2531-2538, 1999.

Wadhwa, P. D. et al.; Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. **Sem Reprod Med**, v.27, n.5, p.358-368, 2009.

Walton, S. L. et al.; Prolonged prenatal hypoxia selectively disrupts collecting duct patterning and postnatal function in male mouse offspring. **J Physiol**, v.596, n.23, p.5873-5889, 2018.

Wehrwein, E. A.; Orer, H. S.; Barman, S. M.; Overview of the anatomy, physiology, and pharmacology of the autonomic nervous system. **Compr Physiol**, v.6, n.3, p.1239-1278, 2016.

West-Eberhard, M. J.; Phenotypic plasticity and the origins of diversity. **Annu Rev Ecol Syst**, v.20, n.1, p.249-278, 1989.

Wild, R.; Weeding, E. A.; Wilson, D.; Dyslipidemia in pregnancy. **Cardiol Clin**, v.33, n.2, p.209-215, 2015.

Windmueller, H. G.; Spaeth, A. E.; Fat transport and lymph and plasma lipoprotein biosynthesis by isolated intestine. **J Lipid Res**, v.13, n.1, p.92-105, 1972.

Wolf, M. et al.; Hypertension: history and development of established and novel treatments. **Clin Res Cardiol**, v.107, n.2, p.16-29, 2018.

Wong-Riley, M. T. T.; Liu, Q.; Gao, X.; Mechanisms underlying a critical period of respiratory development in the rat. **Respir Physiol Neurobiol**, v.264, p.40-50, 2019.

Zhang, R. et al.; Modulation of cholesterol transport by maternal hypercholesterolemia in human full-term placenta. **PLoS One**, v.12, n.2, 2017.

Zoccal, D. B. et al.; Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. **J Physiol**, v.586, n.13, p.3253-3265, 2008.

ANEXOS

Anexo A - Artigo publicado na revista Applied Physiology Nutrition and Metabolism (Fator de Impacto: 2,518)



925

ARTICLE

Maternal dyslipidemia during pregnancy and lactation increases blood pressure and disrupts cardiorespiratory and glucose hemostasis in female rat offspring

Emmanuel Veríssimo de Araújo, Keyth Sulamitta de Lima Guimarães, Marciane Magnani, Josiane Campos Cruz, Hubert Vidal, Valdir de Andrade Braga, and José Luiz de Brito Alves

Abstract: Hypertension and metabolic disorders evidenced in adults who have been exposed to nutritional insults during early life may be sex-dependent. We evaluated if blood pressure (BP), cardiorespiratory control, and metabolic parameters are affected in female offspring (FO) from dams fed a dyslipidaemic diet during pregnancy and lactation. FO was obtained from dams who received control (CTL) or dyslipidaemic diets during pregnancy and lactation. The effects of a maternal dyslipidaemic diet on BP, cardiorespiratory control, and biochemical parameters were assessed at 30 and 90 days of age. The experimental protocol based on a dyslipidaemic diet intervention was effective in developing maternal dyslipidemia. At 30 days of age, the FO from dyslipidaemic dams displayed disordered respiratory pattern, enhanced ventilatory response to hypercapnia ($P < 0.05$), and increased serum levels of total cholesterol and triglycerides ($P < 0.05$) when compared with CTL female offspring. At 90 days of age, FO from dyslipidaemic dams had augmented BP ($P < 0.05$), exacerbated cardiorespiratory responses to hypercapnia ($P < 0.05$), enhanced pressor responses to peripheral chemoreflex activation ($P < 0.05$), impaired baroreflex ($P < 0.05$), and larger delta variations in arterial pressure after ganglionic blockade ($P < 0.05$). Furthermore, during oral glucose and insulin tolerance tests, FO from dyslipidaemic dams exhibited altered glucose tolerance and insulin sensitivity ($P < 0.05$) when compared with FO from CTL dams. Altered breathing linked to enhanced central and peripheral chemosensitivity, impaired baroreflex, and augmented sympathetic tone may be predisposing factors for increased BP and metabolic disorders in female offspring from dyslipidaemic dams.

Key words: maternal dyslipidemia, breathing, chemosensitivity, baroreflex, hypertension, insulin resistance.

Résumé : L'hypertension et les troubles métaboliques chez les adultes exposés à une alimentation malsaine au début de leur vie peuvent être associés au sexe. Nous évaluons si la pression artérielle (« BP »), le contrôle cardiorespiratoire et les paramètres métaboliques sont affectés chez la progéniture (« FO ») de mères soumises à un régime dyslipidémique pendant la grossesse et l'allaitement. La FO provient de mères soumises à un régime de contrôle (« CTL ») ou à un régime dyslipidémique pendant la grossesse et l'allaitement. Les effets du régime dyslipidémique de la mère sur la pression artérielle, le contrôle cardiorespiratoire et les paramètres biochimiques sont évalués à l'âge de 30 et 90 jours. Le protocole expérimental basé sur une intervention de régime dyslipidémique est efficace dans le développement de la dyslipidémie maternelle. À l'âge de 30 jours, la FO des mères aux prises avec la dyslipidémie présente des troubles respiratoires, une plus grande réponse ventilatoire à l'hypercapnie ($P < 0,05$), des taux sériques augmentés de cholestérol total et de triglycérides ($P < 0,05$) par rapport à la progéniture femelle des mères CTL. Au 90^e jour, la FO des mères aux prises avec la dyslipidémie présente une BP augmentée ($P < 0,05$), une réponse cardiorespiratoire exacerbée à l'hypercapnie ($P < 0,05$), une réponse vasopressive accrue à une activation du chémoréflexe périphérique ($P < 0,05$), une altération du baroréflexe ($P < 0,05$) et de plus grandes variations delta de la pression artérielle après un blocage ganglionnaire ($P < 0,05$). De plus, lors des tests de tolérance au glucose par voie orale et de l'insuline, la FO des mères dyslipidémiques manifeste une altération de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline ($P < 0,05$) par rapport à la FO des mères CTL. La respiration altérée associée à l'accroissement de la chimiosensibilité centrale et périphérique, l'altération du baroréflexe et l'augmentation du tonus sympathique peuvent être des facteurs prédisposants de l'augmentation de la pression artérielle et des troubles métaboliques chez la progéniture de mères aux prises avec la dyslipidémie. [Traduit par la Rédaction]

Mots-clés : dyslipidémie maternelle, respiration, chimiosensibilité, baroréflexe, hypertension, insulinoresistance.

Received 30 October 2018. Accepted 7 January 2019.

E.V. de Araújo. Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil; Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil.

K.S.L. Guimarães and J.L. de Brito Alves. Department of Nutrition, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil.

M. Magnani. Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil.

J.C. Cruz and V.A. Braga. Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil.

H. Vidal. Univ-Lyon, CarMeN (Cardio, Metabolism, Diabetes and Nutrition) Laboratory, INSERM U1060, INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon 1, INSA Lyon, Oullins, France.

Corresponding author: José Luiz de Brito Alves (email: jose_luiz_61@hotmail.com).

Copyright remains with the author(s) or their institution(s). Permission for reuse (free in most cases) can be obtained from [RightsLink](https://www.nrcresearchpress.com/apnm).

Anexo B - Artigo publicado na revista Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology (Fator de Impacto: 2.372)

Received: 22 November 2018 | Revised: 28 August 2019 | Accepted: 5 September 2019

DOI: 10.1111/1440-1681.13174



ORIGINAL ARTICLE

Cardiovascular-Integrative

CEPP Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology

WILEY

Short- and long-term effects of maternal dyslipidaemia on blood pressure and baroreflex sensitivity in male rat offspring

Emmanuel Veríssimo de Araújo¹ | Lucas Alves Carneiro dos Santos¹ | Guilherme Fleury Fina Speretta² | Georgianna de Araújo Henriques Ferreira¹ | Micaelle Oliveira de Luna Freire¹ | David Filipe de Santana³ | Alynne Carvalho-Galvão⁴ | Josiane Campos Cruz⁴ | João Henrique da Costa-Silva³ | Valdir de Andrade Braga⁴ | José Luiz de Brito Alves^{1,4}

¹Department of Nutrition, Health Sciences Centre, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

²Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Centre, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

³Department of Physical Education and Sport Sciences, Federal University of Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil

⁴Biotechnology Department, Biotechnology Centre, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

Correspondence

José Luiz de Brito Alves, Federal University of Paraíba, Department of Nutrition, Campus I - Jd. Cidade Universitária, João Pessoa, PB, Brazil.
Email: jose_luiz_61@hotmail.com

Abstract

Maternal dyslipidaemia is a predisposing factor for arterial hypertension in male rat offspring at adulthood. This study was designed to investigate the short- and long-term effects of maternal dyslipidaemia on blood pressure (BP) and baroreflex control in male rat offspring. Animals were obtained from mothers who received a dyslipidaemic (DLP, $n = 7$) or control (CTL, $n = 7$) diet during pregnancy and lactation. At 30 and 90 days of age, arterial pressure (AP), heart rate (HR) and baroreflex function were evaluated. In addition, spectral analysis of the systolic AP, diastolic AP, mean AP, HR, and spontaneous baroreflex were assessed. Data were expressed as mean $\pm$ SEM and Student's *t*-test was used for comparison among groups, with statistical significance considered to be $P < .05$. At 30 days of age, male offspring had similar BP, HR and preserved baroreflex sensitivity. In addition, low frequency (LF) oscillation, high frequency (HF) oscillation and LF/HF ratio of AP and HR were similar in juvenile rats. At 90 days of age, male offspring from dyslipidaemic dams had augmented BP ($P < .05$) when compared to CTL group. Adult male rats from dyslipidaemic dams had a reduction in baroreflex control ($P < .05$) in comparison to CTL rats. The present study indicates that offspring from dams fed on a dyslipidaemic diet during pregnancy and lactation do not show alteration in blood pressure and baroreflex control in early life, but display a decline in baroreflex control and hypertension in adulthood.

KEYWORDS

arterial hypertension, baroreflex sensitivity, maternal dyslipidaemia

1 | INTRODUCTION

Nutritional insults during pregnancy and/or lactation phases increase the risk in offspring for future arterial hypertension.^{1–3} Maternal dyslipidaemia is a condition characterized by high levels of total cholesterol (TC), triacylglycerol (TAG), low-density lipoprotein (LDL) and decreased high-density lipoprotein (HDL).⁴ Although pregnancy

and/or lactation can be recognized as a period of life favourable to increased lipid profile in serum,⁵ the dyslipidaemia effects on the offspring are poorly understood.

We have developed a maternal diet-induced dyslipidaemic model in rats, characterized by increased serum levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, and triacylglycerol, reduced HDL-cholesterol and compromised glucose tolerance and insulin sensitivity in dams.

Anexo C - Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“Obesidade materna e o desenvolvimento de hipertensão arterial na prole de ratos: estudo dos mecanismos fisiológicos e moleculares”**, protocolo nº **014/2016** sob a responsabilidade da pesquisadora **Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2016 - 2018
Espécie/linhagem	<i>Rattus Novergicus</i>
Número de animais	64 ratos (54 fêmeas e 10 machos)
Idade/peso	90 dias – 200 g
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador CEUA-UFPB