

## ANÁLISE BIOMÉTRICA E ESTEREOLÓGICA DO CORAÇÃO DE PROLES SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA GESTACIONAL

### RESUMO

O objetivo foi quantificar com a estereologia, corações de ratos Wistar machos submetidos à restrição proteica gestacional, para determinar possíveis alterações morfológicas cardíacas. Estudo quantitativo, com ratos gerados de mães normais e restritas foram estudados em 0/90/180 dias pós-natais. A partir dos 90 dpn aferiu-se a pressão arterial sistólica, massa corporal e o comprimento naso-anal. As lâminas foram analisadas e estimou-se a densidade volumétrica do miocárdio. O grupo restrito apresentou baixo peso ao nascer e pressão arterial sistólica elevada na idade adulta. Em 180dpn, o grupo restrito apresentou alteração de densidade volumétrica dos miócitos quando comparado ao controle, porém estas diferenças não foram estatisticamente significativas. Conclui-se que a restrição proteica gestacional causa aumento da pressão arterial sistólica e diminuição da massa corporal e do comprimento naso-anal ao nascimento em ratos machos. Assim como, diferenças quantitativas do miocárdio, mesmo que não significativas, sugerem risco de doença cardiovascular em idades mais elevadas.

**Descritores:** Ratos; Miocárdio; Coração; Hipertensão.

### BIOMETRIC AND STEREOLOGIC ANALYSIS OF HEARTS OF OFFSPRING SUBJECTED TO MATERNAL PROTEIN RESTRICTION DURING GESTATION

### ABSTRACT

*This work have a objective, quantify with the stereology, male Wistar rats hearts subjected to gestational protein restriction, for determinate something modify in heart. Rat offspring from dam's normal mother protein or low protein, were studied in 0/90/180 postnatal days. Starting on postnatal day 90, the systolic blood pressure, body mass and anal-rostrum length were measured. The slides were analyzed and the volumetric density of the myocardium could be estimated. Members of the restricted group were born underweight and had elevated systolic blood pressure at adult age. Postnatal day 180, the restricted group presented a greater alteration of the myocytes density compared to the normal, but this differences were not significant statistical. In conclusion, the restriction caused blood pressure elevation, reduction of mass and anal-rostrum length in male rats at birth. As structural differences on restricted rats myocardium suggest increase the risk of cardiovascular disease on older animals.*

**Descriptors:** Rats; Myocardium; Heart; Hypertension.

### BIOMETRÍA Y RATAS CORAZÓN ESTEREOLÓGÍA SUJETO A GESTACIONAL RESTRINGIDA EN PROTEÍNAS

### RESUMEN

*El objetivo de este estudio fue cuantificar con estereología, corazones de ratas Wistar machos sometidos a la restricción de proteínas gestacional, para determinar posibles alteraciones morfológicas cardíacas. Los ratones generados a partir de las madres normales y restringidos fueron estudiados en 0/90/180 días después del parto. De PND 90 calibrada a la presión arterial sistólica, el peso corporal y la longitud hocico-anal. Los cortes histológicos se analizaron y se estima la densidad de volumen del miocardio. El grupo restringido tenía bajo peso al nacer y la alta presión sanguínea sistólica en la edad adulta, comparándolo con normal. 180dpn en el grupo restringido tenido densidad anormal de los miocitos en comparación con los controles, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. La conclusión - a continuación, que la restricción provoca un aumento en la presión arterial sistólica y la disminución de peso corporal y la longitud hocico-anal en el nacimiento en ratas. Las diferencias cuantitativas de miocardio sugieren que hay un riesgo significativo de enfermedad cardiovascular en edades más avanzadas.*

**Descritores:** Ratones; Miocardio; Corazón; Hipertensión.

**Paula Santiago<sup>1</sup>, Ananda Justa Pereira<sup>1</sup>, Jussara Giannini<sup>1</sup>, Jennifer Almeida<sup>1</sup>, Samuel Alencar de Brito<sup>1</sup>, Veronica Clemente Villar Martini<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Acadêmica do décimo segundo período do Curso de Medicina da Universidade Estácio de Sá. Rio de Janeiro/RJ/Brasil.

<sup>2</sup> Biomédica. Doutora em Morfologia pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro. Professora titular de Histologia e Embriologia nos Cursos de Medicina e Medicina Veterinária da Universidade Estácio de Sá. Rio de Janeiro/RJ/Brasil.

## INTRODUÇÃO

A prevalência da desnutrição vem decrescendo no país, visto que há uma constante melhora nos padrões socioeconômico dos brasileiros<sup>(1)</sup>.

Um estado nutricional inadequado como a desnutrição ou restrição proteica, podem ser reproduzidos experimentalmente por alterações dos componentes da dieta ou diminuição da quantidade da mesma<sup>(2)</sup>.

Estudos que associam a restrição proteica perinatal com doenças metabólicas na idade adulta explicam que vias metabólicas estabelecidas no início do desenvolvimento podem manter-se alteradas no transcorrer de toda a vida, determinando respostas fisiológicas diferentes da normalidade no indivíduo adulto.

Desta forma, a interação precoce com o meio ambiente tem efeitos que se instauram em longo prazo, sendo estes fenômenos conceituados como programação metabólica.

O resultado da restrição não é o mesmo em todos os tecidos e órgãos. Isso se deve a certa “seletividade” e “esperteza”,

privilegiando os órgãos mais essenciais à sobrevivência, apesar das alterações serem encontradas em todo o corpo<sup>(3-4)</sup>.

Dependendo do período de exposição e do grau de restrição, severas consequências podem ocorrer durante o desenvolvimento do organismo e também na vida adulta, predispondo ao desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas.

Entretanto, o efeito sobre os órgãos, inclusive no coração não é totalmente esclarecido, sendo as principais alterações conhecidas: redução do número de células funcionais em alguns órgãos, modificação de seu metabolismo e/ou estrutura, afetando sua função pelo desenvolvimento inadequado. Além disso, no miocárdio vemos o enfraquecimento progressivo, diminuição da demanda circulatória, conduzindo então a uma situação de risco e sobrevida<sup>(5)</sup>.

Crianças com baixo peso ao nascer devido à restrição gestacional têm o risco duas vezes maior de desenvolver doença coronariana.

Experimentalmente estudos recentes continuam demonstrando a

forte relação entre a restrição nos estágios críticos do desenvolvimento e na infância com importantes efeitos na homeostase do sistema cardiovascular, evidenciado pela perda de peso do coração, do corpo e da massa ventricular, além de uma remodelação excêntrica, visualizada pela desproporção entre a redução da massa quando comparada ao volume.

Além da evidente diferença entre a relação peso cardíaco/peso corporal maior nos restritos em comparação ao grupo controle<sup>(5)</sup>.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi quantificar utilizando a estereologia corações de proles de ratos *Wistar* machos, submetidas à restrição proteica gestacional, a fim de determinar as possíveis alterações morfológicas cardíacas.

## METODOLOGIA

Neste estudo, foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* machos gerados por mães normais (dieta materna com 19% de proteína) e restritas (dieta com 5%

de proteína), divididos em grupos de acordo com a idade gestacional (0 dia, 90 dias e 180 dias pós-natais).

Os animais foram criados no biotério do Laboratório de Morfologia e Morfometria Cardiovascular (LMMC) da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, onde a temperatura e a umidade foram controladas ( $21 \pm 1$  °C e  $60 \pm 10\%$ , respectivamente, média  $\pm$  DP). Sendo mantidos em ciclo de luz dia/noite de 12 h (luz fria artificial de 7 às 19hs) e ciclo de exaustão de ar de 15 min/h.

Após o acasalamento as fêmeas foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a dois tipos de dieta.

As fêmeas do grupo **controle (NP)** receberam dieta com a quantidade recomendada de proteínas (19%) e as do grupo **restrito (HP)** que receberam dieta com quantidade reduzida de proteínas (5%), ambas as dietas foram isocalóricas e a diferença energética entre as mesmas foi corrigida com a adição de carboidratos. Tabela 1

**Tabela 1** - Composição das dietas pré-natais.

Nutrientes (g/100g)	Dieta pré-natal	
	NP	HP
<b>Carboidrato</b>		
Amido de milho	33,5	47,65
Sacarose	20,0	20,0
Caseína	19,0	5,0
Cistina	0,3	0,15
Colina	0,2	0,2
Gordura (óleo de soja)	16,0	16,0
Fibra (celulose)	5,0	5,0
Mix de mineral AIN-93G	1,0	1,0
Vitamina AIN-93G	5,0	5,0
<b>Energia (Kj/100g de dieta)</b>	<b>1.900</b>	<b>1.900</b>

**Composição:** Mix de vitaminas e minerais foi formulado de acordo com recomendações para roedores da American Institute of Nutrition AIN 93G; NP - dieta normoproteica, HP - dieta hipoproteica.

Com o nascimento, o gênero foi determinado pela distância anogenital. Também foram analisados o tamanho da ninhada, o comprimento naso-anal (NAL) e a massa corporal (BM) dos animais. A ninhada dos grupos 90 e 180 dias de idade tiveram a pressão sanguínea (BP) da artéria da cauda aferida semanalmente por pletismografia (*Letica* LE 5100, *Panlab*®, Barcelona, *Spain*).

Nos dias estipulados para a eutanásia, os animais foram avaliados biometricamente e anestesiados profundamente com *Thiopental* (15 mg/Kg-1 intraperitonealmente). Após a anestesia profunda o coração foi exposto para coleta de sangue através de punção do átrio direito.

Em seguida o ventrículo esquerdo foi cateterizado para a perfusão dos tecidos com solução salina a 0,9%. Depois de perfundidos os corações foram retirados e os seus volumes foram determinados por deslocamento de líquido <sup>(6)</sup>.

Para a análise quantitativa, os materiais foram fixados em formol 10% e posteriormente processados para inclusão em parafina (*Proquímios*, Rio de Janeiro/RJ). Em seguida os blocos foram seccionados com 3 µm de espessura para a confecção das lâminas, para isso foi utilizado xilol (*Proquímios*, Rio de Janeiro/RJ) e álcool (*Proquímios*, Rio de Janeiro/RJ) e corados por hematoxilina (*Vetec*, Rio de Janeiro/RJ) e eosina (*Vetec*, Rio de

Janeiro/RJ) no Laboratório de Histologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estácio de Sá do Rio de Janeiro.

Depois de coradas as lâminas foram fotomicrografadas, em um microscópio *Nikon Eclipse 50i (Nikon Corporation, JAPAN)* acoplado a uma câmera fotográfica moticam 2000 2.0m pixel usb 2.0. De cada lâmina foram escolhidos aleatoriamente dez campos, os quais foram analisados estereologicamente. Com o objetivo de estimar a densidade volumétrica dos componentes miocárdicos, foi quantificado o número de pontos-teste que tocavam os miócitos, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo.

Para tal utilizou-se o sistema teste M42 sobreposto à imagem histológica. Esse sistema apresenta 42 pontos-teste e 21 segmentos de reta, medindo a linha-teste 21d e a área-teste 36.36d<sup>2</sup>. As características básicas do sistema-teste são Ap (área do ponto teste), Pt (número de pontos-teste) e d (a menor distância entre pontos-teste). A área teste pode ser conhecida multiplicando-se o número de

pontos teste pela área de um ponto-teste<sup>(6)</sup>.

Após a obtenção dos resultados a estatística descritiva foi calculada. Os dados são apresentados como média e erro padrão da média (EPM). As diferenças nos parâmetros biométricos e estereológicos foram testadas por análise de variância *one-way* e pós-teste de *Tukey*. Em todos os casos foi usado o índice de significância  $\alpha = 0,05$ .

Utilizou-se, na apresentação dos resultados, a sigla **d** para quantificar o número de dias dos ratos da linhagem *Wistar* machos utilizados na pesquisa.

O protocolo de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética para uso de Animais da Fundação Dom André Arcoverde, sendo aprovado com o protocolo número CEUA/08/2012.

## RESULTADOS

A massa corporal no 0d foi menor na prole HP do que na NP. Nas idades 90d e 180d a massa corporal não diferiu entre os grupos HP e NP. Em relação ao comprimento naso-anal, os animais de 0d foram menores no grupo HP

do que no grupo NP. Comparando o comprimento naso-anal entre os grupos nas idades de 90d e 180d, as diferenças não foram significativas. Tabela 2

**Tabela 2 - Dados biométricos (média ± EPM).**

Grupos	Gênero	BM (g)	NAL (cm)	MC (g)	M VESQ(g)
<b>Dia 0</b>					
NP	M	8,0±0,4	5,7±0,1		
HP	M	5,0±0,5	4,9±0,4*		
<b>Dia 90</b>					
NP	M	331,8±37,0	22,8±1,3	1,234±0,16	0,738±0,07
HP	M	332,8±31,3	21,4±1,1	1,148±0,08	0,742±0,05
<b>Dia 180</b>					
NP	M	416,4±56,0	23,5±1,0	1,327±0,26	0,822±0,28
HP	M	451,2±30,4	22,8±0,7	1,314±0,23	0,823±0,17

**Legenda:** BM - massa corporal, M - macho, NAL - comprimento naso-anal, MC - massa do coração, MVESQ - massa do ventrículo esquerdo, HP - grupo hipoprotéico, NP - grupo normoprotéico; \*P<0.05 quando comparados com o grupo NP.

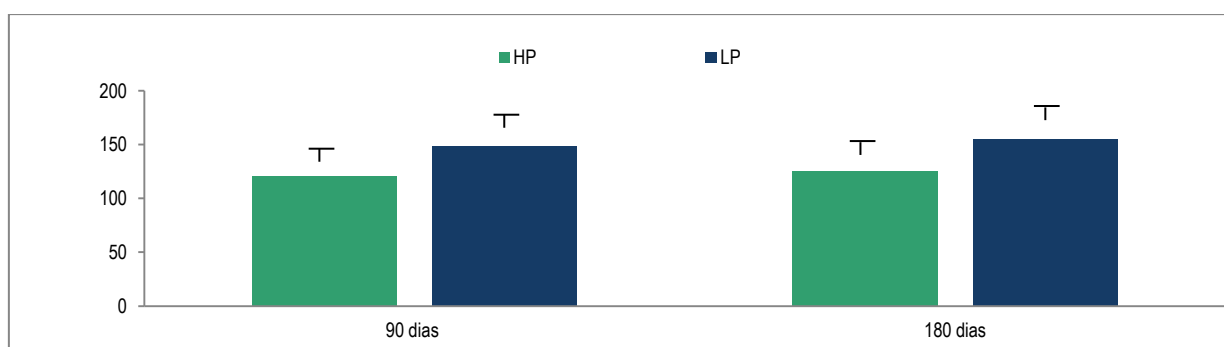
A figura 1 mostra os resultados da aferição da pressão arterial sistólica (PA) dos grupos HP e NP nas idades de 90d e 180d. Onde aos 90d a PA foi de 120 mmHg nos animais NP e 150 mmHg nos animais HP. Já nos animais de 180d, a PA do grupo HP foi de 155 mmHg e 125 mmHg no grupo NP.

As diferenças entre os grupos

não foram estatisticamente significativas. Não se encontrou alterações significativas na densidade volumétrica dos componentes do miocárdio.

Embora as diferenças encontradas não sejam significativas, observa-se que em 90d a densidade volumétrica de miócitos é menor no grupo HP.

**Figura 1- Aferição da PA dos grupos HP e NP nas idades de 90d e 180d.**

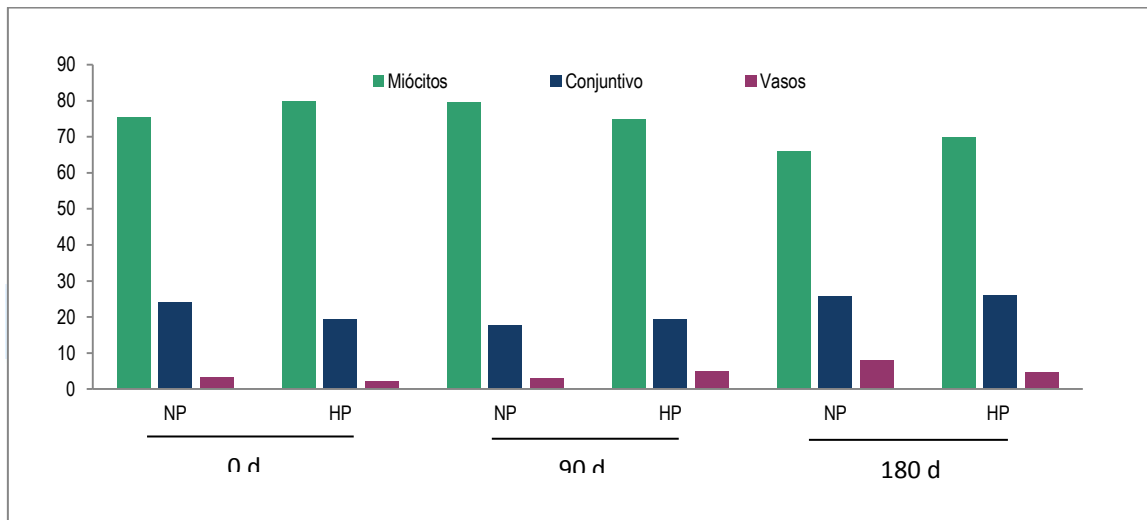


**Fonte:** PA em proles com 90 dias de idade (90d) e 180 dias de idade (180d) (n=5 para cada grupo). Quando os grupos foram comparados (mesmo símbolos sobre as barras), P < 0,05.

Já aos 180d percebe-se tendência de aumento da densidade volumétrica de miócitos no grupo HP, quando comparado ao grupo NP. Neste mesmo grupo também

foi observado um aumento do conjuntivo e vasos quando comparamos com os grupos NP e HP nas outras idades estudadas. Figura 2

**Figura 2** - Densidade volumétrica dos componentes do miocárdio nas idades de 0d, 90d e 180d.



**Legenda:** Densidade volumétrica dos componentes do miocárdio (Vv%) miócitos, conjuntivo e vasos sanguíneos, nos grupos normoproteicos (NP) e hipoproteicos (HP), nas idades de 0d, 90d e 180d.

## DISCUSSÃO

A restrição proteica gestacional está relacionada diretamente ao comprimento naso-anal, massa corporal e cardíaca. O presente estudo mostrou que essa restrição causou diminuição da massa corporal e do comprimento naso-anal da prole ao nascimento. O que já era esperado, pois se sabe que a desnutrição traz

consequências severas durante o desenvolvimento embrionário<sup>(5)</sup>.

Barker<sup>(7)</sup> observou que existe uma relação inversa entre peso ao nascer e doenças coronarianas, concluindo que o período intra-uterino é um componente na etiologia das doenças cardiovasculares. Sua hipótese defende que determinadas doenças na idade adulta desenvolvem-se como resposta ao desequilíbrio

entre as demandas do feto e a disponibilidade de nutrientes na gestação. Esse desequilíbrio nutricional leva a alterações moleculares e fisiológicas que permitem a sobrevivência da prole, porém seus efeitos promovem alterações na estrutura cardiovascular, renal, respiratória, endócrina e nos componentes do sistema nervoso central<sup>(8-9)</sup>.

No entanto, neste estudo, ao analisar os parâmetros cardíacos no nascimento e os componentes cardíacos nas idades de 0d, 90d e 180d, não foram encontradas alterações significativas. O que está de acordo com a literatura, uma vez que várias pesquisas mostram que o impacto da desnutrição não ocorre da mesma maneira em todos os órgãos e tecidos, isso porque existe uma seletividade, privilegiando órgãos nobres<sup>(9-10)</sup>.

Sabe-se, por exemplo, que a restrição alimentar gestacional retarda o crescimento do feto humano devido a respostas adaptativas que o organismo sofre durante a gestação com o intuito de preservar órgãos vitais, como o encéfalo. Estudos em modelos animais mostram que a

concentração de proteínas transportadoras de glicose no músculo esquelético, em fetos submetidos à restrição proteica intra-uterina, é reduzida, o que não ocorre com encéfalo onde a concentração permanece normal<sup>(11)</sup>.

O coração, assim como os outros tecidos e órgãos, sofre com a carência nutricional em seu desenvolvimento, porém parecem existir mecanismos cardio protetores, já que se trata de um órgão vital. As estruturas fundamentais para a sobrevivência são priorizadas na distribuição de nutrientes no organismo, o que pode poupar o metabolismo dos miócitos em situação de estresse nutricional.

A situação de desnutrição altera a inter-relação entre parênquima e vascularização no coração. Isto leva a uma diminuição da distância de difusão para os metabólitos. Essa facilitação da difusão melhora o fornecimento de energia celular e oferece uma proteção relativa do metabolismo no miócito desnutrido<sup>(5)</sup>.

Assim como em outros estudos, onde a prole de ratas alimentadas com dieta hipoprotéica



apresenta PA elevada ao longo da vida<sup>(11-12)</sup>, este estudo também mostrou que a restrição proteica gestacional causa aumento da PA em ratos Wistar machos, nas idades de 90d e 180d. Confirmando que a restrição proteica durante a gestação resulta em proles programadas para o desenvolvimento de doenças crônicas na idade adulta, como a hipertensão<sup>(13)</sup>.

Múltiplos fatores podem ser responsáveis por este processo. A hipertensão arterial pode ser programada no período pré-natal pela manipulação da dieta materna e exposição fetal a glicocorticoides<sup>(13-14)</sup>.

A disfunção periférica vascular pode ser um dos mecanismos envolvidos e geralmente antecede o desenvolvimento da hipertensão<sup>(15)</sup>. Isso porque alterações nas respostas vasculares e endoteliais e na função do músculo liso prejudicam a regulação homeostática da pressão arterial<sup>(16)</sup>.

Além disso, também pode ser resultado de alterações renais durante o desenvolvimento. Sabe-se que o número de glomérulos ao

desmame em roedores pode ser considerado o número total de glomérulos do animal quando adulto, já que não há mais formação de novos glomérulos após este momento. A redução de glomérulos é um fato importante que pode contribuir para o aparecimento da hipertensão arterial, causando limitações na habilidade de excreção de sódio e originando a hipertensão sal-sensível<sup>(17-18)</sup>.

As alterações cardíacas podem ser evidentes em idades mais avançadas. Ao analisar a densidade volumétrica dos miócitos na idade de 180 dias, o grupo restrito apresentou aumento neste parâmetro quando comparado com o grupo controle da mesma idade, porém assim como as alterações observadas no tecido conjuntivo e vasos, o aumento da densidade volumétrica dos miócitos não foi estatisticamente significativa. A literatura relata que embora haja uma reorganização do miocárdio devido à sobrecarga imposta por uma pressão arterial alterada, estas só serão estatisticamente significativas a partir do 15 meses de idade, concordando com os resultados deste trabalho<sup>(19)</sup>.

Na hipertrofia cardíaca ocorre crescimento de miócitos pela síntese de novos componentes, com aumento de espessura, número e comprimento das miofibrilas e modificações nas proporções de actina e miosina produzidas<sup>(20-21)</sup>. A deposição de tecido conjuntivo hipertrofia e remodelamento cardíaco são respostas compensatórias do miocárdio ao trabalho aumentado, o que acontece, por exemplo, quando há sobrecarga de pressão.

Essa hipertrofia cardíaca aumenta os riscos de eventos cardiovasculares, pois aumenta a demanda de oxigênio do tecido miocárdico hipertrófico, aumenta a prevalência e severidade de arritmias ventriculares, leva a alterações na contratilidade do miocárdio e prejuízo na função diastólica<sup>(20)</sup>.

Alterações como a hipertrofia de ventrículo esquerdo e diminuição do calibre de vasos, provavelmente são resultados da hipertensão arterial sistêmica. Confirmando que a desnutrição traz prejuízos não só no desenvolvimento, mas também na idade adulta, predispondo indivíduos a doenças crônicas e

degenerativas, como a hipertensão, favorecendo a instalação de doenças cardíacas<sup>(5)</sup>.

Trabalhos como este ganham importância quando analisamos a alta prevalência de hipertensão arterial atual, que tem como principais desdobramentos a insuficiência renal crônica e as doenças cardiovasculares, e confirmamos que a carência nutricional é um fator importante na sua etiologia. Estudos indicam que condições sociais precárias, incluindo quadros de desnutrição ou restrição nutricional, atuam no organismo de forma desfavorável durante o desenvolvimento, infância e adolescência, aumentando o risco de doenças cardiovasculares<sup>(21)</sup>.

## CONCLUSÃO

A restrição proteica gestacional causa aumento da PA em ratos *Wistar* machos e diminuição da massa corporal e do comprimento naso-anal ao nascimento.

Não foram encontradas alterações significativas nos parâmetros cardíacos e na densidade volumétrica dos componentes do miocárdio. No

entanto, foi observada tendência a hipertrofia cardíaca na idade 180 dpn com aumento do Vv de miócitos. Essa diferença estrutural no miocárdio de ratos restritos pode aumentar o risco de doença cardiovascular em animais mais velhos.

## REFERÊNCIAS

- 1- Nunes MMA, Figueiroa JN, Alves JGB. Excesso de peso, atividade física e hábitos alimentares entre adolescentes de diferentes classes econômicas em Campina Grande (PB). Rev. Assoc. Med. Bras. 2007;53(2):130-4.
- 2- Cury JCS. Estudo histomorfológico dos cardiomiócitos ventriculares de ratos submetidos à desnutrição proteica pré e pós-natal. [dissertação]. São Paulo (SP): Universidade São Judas Tadeu; 2006.
- 3- Drott C, Lundholm K. Cardiac effects of caloric restriction – mechanisms and potential hazards. Int. J. Obes. Relat. Meta. Disord. 1992;16(7):481-6.
- 4- Corrêa CL, Santiago BA, Cortez DM. Educação em saúde: programação metabólica com mulheres em área de vulnerabilidade social. [Internet]. Revista Eletrônica Estácio Saúde. 2016[citado 20 mai 2017];5(1):34-47.
- 5- Penitente AR. Efeitos da restrição proteica experimental sobre a morfologia do miocárdio e as propriedades mecânicas dos miócitos cardíacos isolados em ratos *fisher* após o desmame. [tese]. Minas Gerais (MG): Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa; 2012.
- 6- Mandarim – Lacerda CA. Stereological tool in biomedical research. Academia Brasileira de Ciências. 2003;75:469-86.
- 7- Barker DJ. In utero programming of chronic disease. ClinSci. 1998;95(2):115-28.
- 8- Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. Eur J Clin Invest. 1995;25(7):457-63.
- 9- Hanson M - Birth weight and the fetal origins of adult disease. Pediatric Res. 2002;52:473-84.
- 10- Gluckman PD, Hanson MA - The developmental origins of the metabolic syndrome. Trends Endocrinol Metab. 2004;15:183-7.
- 11- Cianfarani S, Germani D, Branca F. Low birth weight and adult insulin resistance: the "catch-up growth" hypothesis. Arch Dis Child Fetal Neonatal. 1999;81:71-3.
- 12- Langley-Evans SC, Philips G, Benediktsson R, Gardner D, Edwards CRW, Jackson AA, Seckl JR. Maternal dietary protein restriction, placental glucocorticoid metabolism and the program of hypertension. Placenta. 1996; 17:169-72.
- 13- Langley-Evans SC. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. Life Sci. 1997; 60:1213-21.
- 14- Langley-Evans SC. Critical differences between two lowprotein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. Int J Food Sci Nutr. 2000; 51:11-17.
- 15- Brawley L, Itoh S, Torrens C, Barker AC, Bertram C, Poston L, Hanson MA. Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. Pediatr Res. 2003; 54:83-90
- 16- Watkins AJ, Fleming TP - Blastocyst environment and its influence on offspring cardiovascular health: the heart of the matter. Journal of Anatomy. 2009; 215:52-59.
- 17- Pires KMP, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. Life Sci. 2006; 79:2128-34.
- 18- Villar-Martini VC, Carvalho JJ, Neves MF, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. Journal of Hypertension. 2009;27:47-51.
- 19- Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Apfel MIR. Estereologia do Miocárdio de Ratos Jovens e Idosos. ArqBrasCardiol. 1998; 70 (2):105-9.
- 20- Silva GJJ, Krieger, JE. Hipertrofia ventricular esquerda na hipertensão arterial. Hipertensão. 2000;3:156-60.
- 21- Forsdahl A. Observations throwing light on the high mortality in the county of Finnmark. Is the high mortality today a late effect of very poor living conditions in childhood and adolescence? Int J Epidemiol. 2002; 31:302-08.