



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

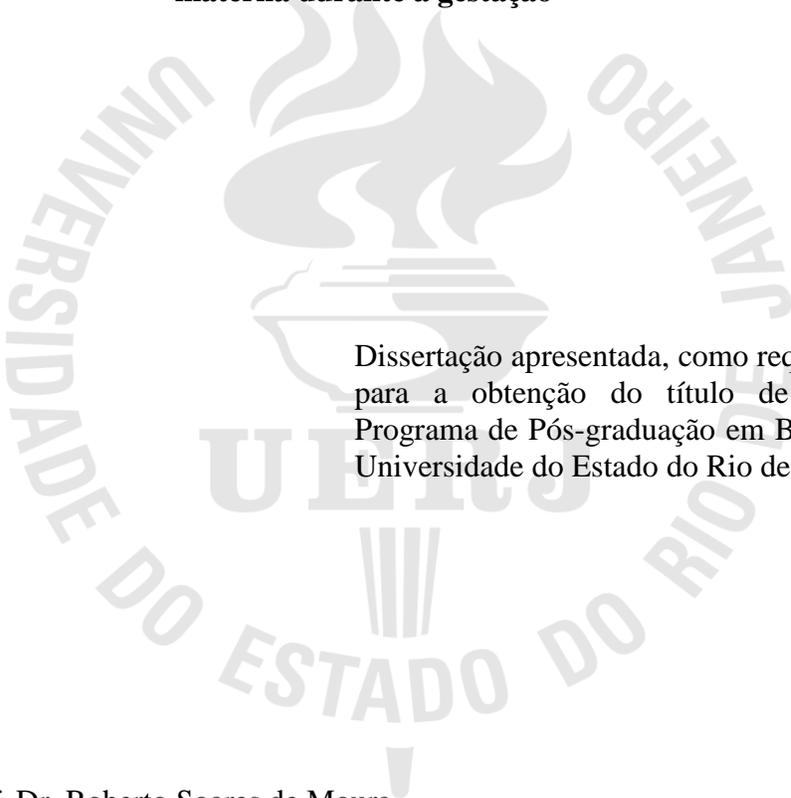
Graziele Freitas de Bem

**Efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* Mart.
(Açaí) nas alterações renais, cardiovasculares e metabólicas induzidas
pela restrição protéica materna durante a gestação**

Rio de Janeiro
2012

Graziele Freitas de Bem

Efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) nas alterações renais, cardiovasculares e metabólicas induzidas pela restrição protéica materna durante a gestação



Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares de Moura
Coorientadora: Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende

Rio de Janeiro
2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B455 Bem, Grazielle Freitas de.

Efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *Euterpe Oleracea* Mart.(Açaí) nas alterações renais, cardiovasculares e metabólicas induzidas pela restrição protéica materna durante a gestação / Grazielle Freitas de Bem. – 2012.
98 f.

Orientador: Roberto Soares de Moura.

Coorientadora: Ângela de Castro Resende.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-graduação em Biociências.

1. Dieta com restrição de proteínas. 2. Açaí – Uso terapêutico – Teses. 3. Hipertensão – Teses. 4. Insuficiência renal – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Moura, Roberto Soares de. II. Resende, Ângela de Castro. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 615.711

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Graziele Freitas de Bem

Efeito protetor do extrato hidroalcoólico de *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) nas alterações renais, cardiovasculares e metabólicas induzidas pela restrição protéica materna durante a gestação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 13 de fevereiro de 2012.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Roberto Takashi Sudo
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Antonio Cláudio Mendes-Ribeiro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

À minha irmãzinha, Shirlei Freitas de Bem, minha força, equilíbrio, porto seguro em todos os momentos de minha vida. Sem você, seus sábios conselhos e amizade eu não chegaria aqui. Mesmo com a distância sempre se fez presente, pois me guarda no coração. Te amo muitão, do tamanho do universo!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, por me fazer sua imagem e semelhança, amor infinito e perfeito. Alegro-me e espero em ti Senhor, Aquele que sabe de todas as coisas e deu sua vida por mim.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Roberto Soares de Moura pela orientação, amizade, por seu entusiasmo contagiante que nos faz querer investigar cada vez mais, por todo apoio e aprendizado que me proporcionou durante o mestrado. Muito obrigada por possibilitar a realização desse sonho.

Agradeço à Professora Dr^a. Ângela de Castro Resende pela orientação, amizade, por todo apoio, incansável, sempre pronta a nos ouvir. Muito obrigada pelo aprendizado que me proporcionou durante o mestrado.

Ao meu pai Ariovaldo Lacerda de Bem, um exemplo de vida, forte, determinado, meu tesouro, colocando meus sonhos sempre em primeiro lugar, não medindo esforços para realizá-los, essa conquista só foi possível, pois você acreditou em mim e não me deixou desistir. Muito obrigada por todos os sacrifícios, dedicação, amor. Não posso colocar em palavras a admiração e a gratidão que tenho. Devo minha vida, meus passos a você. Gordinho mais lindo do universo te amo!!!

À minha mãe Maria de Fátima Freitas de Bem, ninguém me amou mais que ela, me deu a vida. Aquela que com amor e carinho me acalentou em seu colo seguro, aconselhando-me, sempre ao meu lado, me educou, ensinou meus valores, protegeu, compartilhou minhas vitórias e chorou comigo quando eu caí. Mãezinha querida eu te amo e admiro pela grande mulher que és.

Agradeço à minha irmãzinha querida Shirlei Freitas de Bem, sempre ao meu lado, me compreende como ninguém, um olhar vale mais que mil palavras entre nós. Mesmo que distante participa de todos os momentos de minha vida. Muito mais do que uma irmã maravilhosa e dedicada, minha segunda mamãe. Te amo muito e essa vitória também é sua!!!!

Agradeço ao meu cunhado Luíz Francisco de Vasconcelos Duboc (Dudu), por fazer parte de nossa família, pelo carinho, dedicação, preocupação dizendo sempre que preciso descansar mais, meu segundo papai, te amo!!!

Agradeço à Madalena Lacerda, pelo carinho, amizade, por toda ajuda ao longo do meu mestrado, você é parte integrante dessa família.

Agradeço à Professora Dr^a. Tatiana Brunini pelo carinho, palavras amigas e pela colaboração para a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos e companheiros de laboratório Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, Lúcia Alves, Andréa Fernandes Emiliano da Silva, Paola Raquel Braz de Oliveira, Dayane Teixeira Ognibene, Cristiane Aguiar da Costa, Michelle Teixeira Teixeira, Taline Anne da Silva Amaral, Viviane da Silva Cristino Cordeiro, Ana Paula Machado da Rocha, Marcelo Augusto Vieira de Souza, Carlos Lopes, Pedro Bello, Rafael Grossi, Livia Cuesta, Ana Elisa Araújo e Amanda Bastos pela amizade, pela colaboração e pelo apoio durante o mestrado.

Um agradecimento mais que especial as amigas Lenize Costa dos Reis Marins de Carvalho, parte integrante para a realização desse trabalho, sempre ao meu lado, mãezona. Lúcia Alves, o que seria de mim sem o seu carinho, comidinhas deliciosas, dedicação. Cristiane Aguiar da Costa, muito mais que uma companheira de laboratório e colaboradora fantástica, uma amiga para todas as horas, muito obrigada por sua imprescindível contribuição para essa realização. Paola Raquel Braz de Oliveira, muito mais que uma amiga, minha irmãzinha, Pretinha é maravilhoso receber você lá em casa todas as terças-feiras, amiga querida com a qual posso contar sempre e Viviane Cristino quem acompanhou todo esse ano complicado e difícil, mas de grandes realizações. Muito obrigada pela amizade, por toda ajuda, pelos conselhos, pela paciência e pelo apoio durante o mestrado. Amigas queridas vocês arrasam!!!

Agradeço à amiga Andreza Maia Vieira por suas palavras, sempre preocupada comigo e me incentivando a continuar.

Agradeço à amiga Taline Anne da Silva Amaral, por dividir as angústias e pela companhia em momentos muito difíceis.

Agradeço aos amigos Mariana Alves de Sá Siqueira, Monique Moss, Cristiane Matsuura, Natália Rodrigues Pereira, Marcela Anjos Martins, Ive Machareth Sab, Márcia Ferraz, Wanda Vianna Mury, Daniel Medeiros, Iara Karise Mendes e ao Professor Antonio Cláudio Mendes Ribeiro, pela amizade e por todo apoio durante o mestrado.

Agradeço de forma especial à Marcela Anjos Martins por sua amizade, uma pessoa muito especial com a qual eu tive o prazer de conviver.

Agradeço aos amigos bioteristas Nelcir Rodrigues, Mariana Magalhães e Cristiane Machado, que contribuíram muito para o bom andamento desse trabalho.

Às minhas “gatonas” Jaqueline Lopes, Ana Carolina Bastos (Carol Gatona), Paula Fontoura (Paulinha), Natália Ardente (Naty), Alyne Félix (Banana) e Laís Bessa por estarem sempre ao meu lado! Minhas companheiras! Amo vocês!

Um agradecimento especial à amiga Paula Fontoura, por tudo, toda ajuda ao longo do mestrado e de minha vida, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Te amo!!!

Agradeço à amiga Laís Bessa por sua tranquilidade, companheirismo, preocupação com meu bem estar e felicidade, você é uma amiga muito especial, te amo!!!

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia por me proporcionarem conhecimento, pela colaboração e apoio em minha formação.

Agradeço aos órgãos responsáveis pelo financiamento e concessão de bolsa para a realização desse projeto de pesquisa FAPERJ, CAPES e CNPQ.

A TODOS, o meu **MUITO OBRIGADO**, vocês foram essenciais para que eu pudesse alcançar mais uma etapa importante de minha vida.

Buscai em primeiro lugar a Deus e a sua justiça, e Deus dará em acréscimo, todas as coisas. Portanto, não vos preocupeis com o dia de amanhã, pois o dia de amanhã terá suas preocupações. Basta a cada dia a própria dificuldade.

(Mateus 6:33,34)

RESUMO

BEM, Grazielle Freitas de. *Efeito protetor do extrato hidroalcoólico de Euterpe oleracea Mart. (Açaí) nas alterações renais, cardiovasculares e metabólicas induzidas pela restrição proteica materna durante a gestação*. 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Alguns trabalhos demonstraram que a planta, *Euterpe oleracea* Mart. (açai) é rica em polifenóis e que uma dieta rica em polifenóis pode estar envolvida na proteção contra o risco cardiovascular. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico do caroço do açai (ASE) (200mg/Kg/dia), sobre as alterações renais, cardiovasculares, metabólicas, morfológicas e o estresse oxidativo na prole adulta com dezesseis semanas, cujas mães foram submetidas a uma dieta hipoprotéica durante a gestação. Quatro grupos de ratas foram alimentados com dietas experimentais: controle (20% de proteínas); controle + ASE (20% de proteína + ASE); hipoprotéica (6% de proteína); hipoprotéica + ASE (6% de proteína + ASE) durante a gestação. Após o desmame, todos os filhotes passaram a ser alimentados com uma dieta controle e foram sacrificados com 4 meses de idade. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida por pletismografia de cauda e o efeito vasodilatador da acetilcolina (ACh) e nitroglicerina (NG) foi avaliado em leito arterial mesentérico (LAM) perfundido. Foram determinados o peso corporal, níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, lipoproteína de alta densidade (HDL), albumina, uréia, creatinina, glicose, insulina, resistência à insulina (índice de Homa IR), sódio, potássio e a renina plasmática. Foi avaliada a depuração de creatinina, volume de urina, excreção fracionada de sódio (EFNa) e o número de glomérulos renais. O dano oxidativo, níveis de nitrito e a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase foram dosados no plasma e homogenato de rim. O peso corporal foi menor no grupo hipoprotéico e recuperado com ASE. A PAS foi aumentada no grupo hipoprotéico e revertida pelo tratamento com ASE. Os níveis de renina plasmática foram aumentados no grupo hipoprotéico e reduzidos com ASE. A resposta vasodilatadora à ACh em LAM estava reduzida no grupo hipoprotéico com ASE houve uma melhora dessa resposta. O efeito vasodilatador da NG não foi diferente entre os grupos. No grupo hipoprotéico também foi observado o aumento dos níveis de triglicerídeos, colesterol total, uréia, creatinina, glicose e insulina, os mesmos foram reduzidos pelo ASE. Não houve diferença nos níveis de HDL, sódio, potássio, depuração de creatinina e volume urinário nos grupos estudados. Os níveis de malondialdeído e carbonilação de proteínas estavam aumentados e os níveis de nitrito reduzidos no grupo hipoprotéico e foram revertidos pelo ASE. As atividades das enzimas antioxidantes no plasma e no rim foram reduzidas no grupo hipoprotéico e aumentadas pelo ASE, com exceção da catalase que não apresentou diferença entre os grupos. Os animais hipoprotéicos apresentaram redução no número de glomérulos renais e aumento da EFNa e o tratamento com ASE preveniu as alterações renais encontradas neste modelo. Em conclusão, o ASE parece proteger a prole, cujas mães foram expostas a uma dieta com pouca proteína durante a gestação, através do efeito anti-hipertensivo, vasodilatador e antioxidante observado neste trabalho.

Palavras-chave: Restrição proteica. *Euterpe oleracea* Mart. Hipertensão. Insuficiência renal.

ABSTRACT

BEM, Grazielle Freitas de. *Protective effect of a hydroalcoholic extract of Euterpe oleracea Mart. on renal, cardiovascular and metabolic changes induce by maternal protein restriction during pregnancy.* 2012. 98f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Some studies show that the plant *Euterpe oleracea* Mart., açai, (ASE) is rich in polyphenols and other evidence suggests that a diet rich in polyphenols may be involved in protection against cardiovascular. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of treatment with extract ASE (200mg/Kg/day), on the renal, cardiovascular, metabolic, morphological and oxidative stress in adult offspring with sixteen weeks, whose mothers were fed a low protein diet (LP) during pregnancy. Four groups of rats were fed experimental diets: control (20% protein); control + ASE (20% protein + ASE); LP (6% protein); LP + ASE (6% protein + ASE) during pregnancy. After weaning, all pups have become fed a control diet and were sacrificed at four months of age. Systolic blood pressure (SBP) was measured by plethysmography and vasodilator effect of acetylcholine (Ach) and nitroglycerin (NG) were studied in perfused mesenteric arterial bed (LAM). We determined the body weight, serum levels total cholesterol, triglycerides, high-density lipoprotein (HDL), albumin, urea, creatinine, glucose, insulin, insulin resistance was calculated by HOMA IR, sodium, potassium, creatinine clearance, urine volume, fractional excretion of sodium, plasma renin levels and renal glomeruli number. Oxidative damage, nitrite levels and antioxidant enzyme activity: superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were measured in plasma and homogenate of kidney. The body weight was decreased in LP group and recovered with ASE. The SBP was higher in LP animals than other groups and reversed by treatment with ASE. The plasma renin levels were increased in the LP group with ASE decreased these levels. The vasodilator response to Ach was reduced in LP group with ASE increased this response. The vasodilator effect of NG was not different between groups. The LP group was also observed increased levels of total cholesterol, triglycerides, urea, creatinine, potassium, glucose, insulin, fractional excretion of sodium; the same were reduced with ASE. There was no difference in HDL, sodium, creatinine clearance, urine volume levels in both groups. The levels of malondialdehyde and protein carbonyls were increased and nitrite levels were decreased in the LP group were reversed by ASE. The activities of antioxidant enzymes in plasma and kidney were lower in LP animal than other group and increased by the treatment with ASE, except for catalase which showed no significant difference between groups. Animals LP showed an reduction in the number of renal glomeruli and treatment with ASE prevent renal changes found in this model. In conclusion, ASE appears to protect the offsprings whose mother exposed to a low protein diet during pregnancy, through the anti-hypertensive, vasodilator and antioxidant activity observed in this study.

Keywords: Low protein. *Euterpe oleracea* Mart. Hypertension. Renal failure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Resposta renal à diminuição relativa no número de néfrons.....	26
Figura 2 -	Possível interação entre estresse oxidativo, disfunção endotelial e a pressão arterial.....	33
Figura 3 -	Representação esquemática das espécies reativas e a ação das enzimas antioxidantes SOD, Catalase e Glutathione Peroxidase.....	35
Figura 4 -	Foto do fruto da <i>Euterpe oleracea</i> Mart (açai).....	39
Figura 5 -	Foto do Esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.....	39
Figura 6 -	Parâmetros maternos dos animais estudados.....	47
Figura 7 -	Efeito do tratamento com ASE sobre o peso corporal dos animais estudados.....	56
Figura 8 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a pressão arterial dos animais estudados.....	57
Figura 9 -	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de renina plasmática dos animais estudados.....	58
Figura 10 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico dos animais estudados.....	59
Figura 11 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em leito arterial mesentérico dos animais estudados.....	60
Figura 12 -	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de MDA em homogenato de rim e no plasma dos animais estudados.....	61
Figura 13 -	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de carbonilação de proteínas em homogenato de rim e no plasma dos animais estudados.....	62
Figura 14 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade da SOD em homogenato de rim e no plasma dos animais estudados.....	63
Figura 15 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade da catalase em homogenato de rim e no plasma dos animais estudados.....	64
Figura 16 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a atividade da GPx em homogenato de rim e no plasma dos animais estudados.....	65

Figura 17 -	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de nitrito em homogenato de rim e no plasma dos animais estudados.....	65
Figura 18 -	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis glicêmicos, insulinêmicos e a resistência à insulina dos animais estudados.....	67
Figura 19 -	Efeito do tratamento com ASE sobre o perfil lipídico dos animais estudados.....	69
Figura 20 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a proteinúria nos animais estudados.....	70
Figura 21 -	Efeito do tratamento com ASE sobre a EFNa nos animais estudados.....	71
Figura 22 -	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis séricos de albumina, creatinina e uréia.....	73
Figura 23 -	Efeito do tratamento com ASE sobre o número de glomérulos renais nos animais estudados.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das dietas padrão e hipoprotéica.....	44
Tabela 2 -	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis séricos de sódio (Na^+) e potássio (k^+), depuração de creatinina (Clcr) e sobre o volume urinário.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh –	Acetilcolina
ACTH –	Hormônio Adrenocorticotrófico
Ang II –	Angiotensina II
ASE –	Extrato hidroalcolico do caroço do açai (Açai Stone Extract)
AVC –	Acidente Vascular Cerebral
BH4 –	Tetrahydrobiopterina
C –	Controle
C + ASE –	Controle Tratado com o Extrato hidroalcolico do caroço do açai
Clcr –	Depuração de Creatinina
CYP 450 –	Citocromo P450
DAC –	Doença Arterial Coronariana
DAHL –	Ratos Alimentados com Dieta Rica em Sódio
DM –	Diabetes Mellitus
DM2 –	Diabetes Mellitus Tipo 2
DRC –	Doença Renal Crônica
ECA –	Enzima Conversora de Angiotensina
EDHF –	Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio
EFNa –	Excreção Fracionada de Sódio
EGF –	Fator de Crescimento Epidermal
EGIR –	European Group for the Study of Insulin Resistance
eNOS –	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EROS –	Espécies Reativas de Oxigênio
FG –	Filtração Glomerular

GMPc –	Monofosfato Cíclico de Guanosina
GPx –	Glutathione Peroxidase
GR –	Glutathione Redutase
GSH –	Glutathione
GTP –	Guanosina Trifosfato
H –	Hipoprotéico
H + ASE –	Hipoprotéico Tratado com o Extrato hidro-alcóolico do caroço do açaí
H ₂ O ₂ –	Peróxido de Hidrogênio
HAS –	Hipertensão Arterial Sistêmica
11-β HSD –	11-Beta Hidroesteróide Desidrogenase
HDL –	Lipoproteína de Alta Densidade
HPA –	Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
IGF-1 –	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
IL-1 –	Interleucina 1
INPI –	Instituto Nacional de Propriedade Industrial
IRA –	Insuficiência Renal Aguda
IRC –	Insuficiência Renal Crônica
LAM –	Leito Arterial Mesentérico
MDA –	Malondialdeído
NE –	Norepinefrina
NED –	N-naftil etilenodiamina
NG –	Nitroglicerina
NO –	Óxido Nítrico

NO ₂ –	Nitrito
NOS –	Óxido Nítrico Sintase
·O ₂ ⁻ –	Ânion Superóxido
OH· –	Radical Hidroxil
ONOO ⁻ –	Peroxinitrito
PA –	Pressão arterial
PAD –	Pressão Arterial Diastólica
PBS –	Tampão Fosfato de Sódio
PCT –	Patent Cooperative Treaty
PDGF –	Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PGC –	Pressão Capilar Glomerular
PAS –	Pressão Arterial Sistólica
RCIU –	Retardo do Crescimento Intra-uterino
RI –	Resistência a insulina
ROOH –	Hidroperóxidos Orgânicos
ROS –	Espécies Reativas de Oxigênio
SHR –	Ratos Espontaneamente Hipertensos
*SNGFR –	Taxa de Filtração Glomerular de Um Néfron
SOD –	Superóxido Dismutase
SOD 1 –	Superóxido Dismutase Cobre-Zinco
SOD 2 –	Superóxido Dismutase Manganês
SOD 3 –	Superóxido Dismutase Extracelular
SRA –	Sistema Renina Angiotensina
TBA –	Ácido Tiobarbitúrico

TCA – Ácido Tricloro Acético
TNF α – Fator de Necrose Tumoral α
VSMC – Célula do Músculo Liso Vascular

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	21
1	OBJETIVO	39
1.1	Objetivo geral	39
1.2	Objetivos específicos	39
2	MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1	Preparo do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí (ASE)	41
2.2	Animais utilizados e dieta experimental	41
2.3	Medida da pressão arterial sistólica	43
2.4	Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de rato	44
2.5	Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas	44
2.6	Níveis de renina plasmática	46
2.7	Dosagens séricas	46
2.7.1	<u>Perfil lipídico</u>	46
2.7.2	<u>Uréia, creatinina e albumina</u>	46
2.7.3	<u>Insulina</u>	47
2.7.4	<u>Análise da sensibilidade à insulina</u>	47
2.8	Dosagens urinárias	47
2.8.1	<u>Coleta da urina</u>	47
2.8.2	<u>Concentração de sódio e potássio</u>	47
2.8.3	<u>Depuração de creatinina</u>	48
2.8.4	<u>Fração excretada de sódio</u>	48
2.9	Atividade das enzimas antioxidantes	48
2.9.1	<u>Medida da superóxido dismutase</u>	48
2.9.2	<u>Medida da catalase</u>	49
2.9.3	<u>Medida da glutathione peroxidase</u>	49
2.10	Ensaio pró-oxidantes	50
2.10.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs)</u>	50
2.10.2	<u>Carbonilação de Proteínas</u>	51
2.11	Medida de nitrito	51

2.12	Dosagem de proteínas (Bradford)	52
2.13	Microscopia óptica e estereologia	52
3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
4	RESULTADOS	54
4.1	Parâmetros maternos durante a gestação	54
4.2	Efeito do tratamento com ASE sobre o peso corporal da prole (machos) de animais submetidos à dieta hipoprotéica durante a gestação	55
4.3	Efeito do tratamento com ASE sobre a pressão arterial sistólica	56
4.4	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de renina plasmática	57
4.5	Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM	58
4.6	Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em LAM	59
4.7	Efeito do Tratamento com ASE sobre os ensaios pró-oxidantes	60
4.7.1	<u>Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</u>	60
4.7.2	<u>Carbonilação de proteínas</u>	61
4.8	Efeito do tratamento com ASE sobre as enzimas antioxidantes	62
4.8.1	<u>Superóxido dismutase (SOD)</u>	62
4.8.2	<u>Catalase</u>	63
4.8.3	<u>Glutaciona peroxidase (GPx)</u>	64
4.9	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de nitrito	65
4.10	Efeito do tratamento com ASE sobre a glicemia e a resistência à insulina	66
4.11	Efeito do tratamento com ASE sobre o perfil lipídico	68
4.12	Efeito do tratamento com ASE sobre a proteinúria	70
4.13	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis séricos de potássio, sódio, a excreção fracionada de sódio, depuração de creatinina e volume urinário	71
4.14	Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de albumina, creatinina e uréia	72

4.15	Efeito do tratamento com ASE sobre a morfologia renal.....	74
5	DISCUSSÃO.....	76
6	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	ANEXO – Comitê de Ética.....	97

INTRODUÇÃO

Restrição alimentar materna e programação metabólica

A programação metabólica pode ser definida como um evento uterino, que tem efeitos permanentes sobre a fisiologia, estrutura e metabolismo do indivíduo (Godfrey & Barker, 2000). Entretanto, o ambiente nutricional durante o período de desenvolvimento na vida pós-natal também pode programar distúrbios funcionais. Dessa forma, o termo *programação do desenvolvimento* é preferencialmente utilizado (Armitage *et al.*, 2004).

O processo de programação é caracterizado por uma limitada susceptibilidade a períodos ontogênicos do desenvolvimento, efeitos persistentes até a vida adulta e que podem ser medidos ou especificados variando de indivíduo para indivíduo e a relação resposta-dose ou limiar entre uma exposição específica e efeitos futuros (Lucas, 2000; Langley-Evans & MacMullen, 2010).

Estas adaptações preparam o feto para a vida extra-uterina, onde fatores estressores adicionais podem ser encontrados. É preciso reconhecer, no entanto, que ao longo da vida, a evolução e a vantagem da plasticidade vão sendo perdidas, neste momento a resposta ao ambiente torna-se patológica ou restrita aos desafios (Calkins & DevasKar, 2011).

Estudos desenvolvidos por diversos grupos têm mostrado que, alterações hormonais, nutricionais e ambientais no início da vida repercutem no desenvolvimento e no surgimento de doenças na vida adulta (Moura *et al.*, 2008), uma vez que o crescimento alterado, excessivo ou prejudicado, durante períodos de plasticidade, no ambiente perinatal e mesmo após o nascimento, pode levar a programação permanente dos sistemas fisiológicos (Cotrell & Ozanne, 2008).

Neste contexto, dados epidemiológicos e estudos experimentais têm demonstrado que, fatores ambientais adversos levam, ao retardo do crescimento intra-uterino (RCIU) e a redução do peso corporal ao nascer. Podendo também predispor a prole, ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta como: diabetes mellitus tipo 2 (DM2), obesidade e doença arterial coronariana (DAC) (Barker *et al.*, 2002; McMillen & Robinson, 2005; Gluckman *et al.*, 2005). Isto indica que o ambiente pré-natal e pós-natal no início do desenvolvimento, pode promover alterações morfológicas e fisiológicas permanentes, tendo a subnutrição materna um papel chave sobre essa programação (Woods *et al.*, 2004).

A restrição alimentar durante o desenvolvimento gestacional, afeta permanentemente a estrutura e o metabolismo dos fetos humanos e de outros mamíferos, estas alterações são frutos de adaptações, a fim de obter a sobrevivência neste ambiente adverso (Barker, 1998; Barker, 1999; Stocker *et al.*, 2005). Este *imprinting* conduz a uma série de doenças na vida adulta, incluindo a DAC, acidente vascular cerebral (AVC) e hipertensão arterial sistêmica (HAS), por meio das alterações ocasionadas em órgãos-alvo, como o coração e o rim (Langley-Evans *et al.*, 1998; Langley-Evans *et al.*, 2003). Desta forma, a nutrição materna deve influenciar a gravidez e determinar a saúde do feto (McArdle *et al.*, 2006b).

Porém, é importante salientar, que os fatores que programam o indivíduo não estão restritos a desnutrição materna. Outras injúrias ocorridas no período fetal como: infecções, inflamações, glicocorticóides, hipóxia, toxinas, estresse, também desempenham um papel vital na formação do fenótipo do adulto (Calkins & DevasKar, 2011). No entanto, a restrição alimentar mostrou-se um fator importante para o estudo da programação metabólica, uma vez que é uma ferramenta útil ao desenvolvimento de modelos experimentais, visando ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos na patologia de diversas doenças, tendo sua etiologia devida a alterações nutricionais durante a gestação e a lactação.

Restrição protéica materna e modelo experimental

Limites nutricionais maternos em ratos, dependendo da quantidade, da qualidade e do prazo da restrição, são fundamentais na programação de algumas doenças durante a vida. Vários modelos de restrição protéica materna foram descritos para mimetizar a desnutrição sofrida por países em desenvolvimento. A partir do valor de referência das proteínas na dieta de roedores (de 20 a 23 %), têm sido realizados três tipos de desenho experimental: restrições brandas (de 18 à 15 % de proteínas na dieta); moderadas (de 12 à 8 % de proteínas na dieta) e intensas (de 5 à 0 % de proteínas na dieta) (Langley-Evans *et al.*, 1998).

A restrição de proteínas na dieta materna, durante a gravidez leva ao desenvolvimento, nos recém nascidos, de baixo peso ao nascer, redução das células β -pancreáticas e do conteúdo de insulina, aumento de apetite, resistência à insulina, supressão do sistema Renina-Angiotensina (SRA), seguidos de uma diminuição no número de glomérulos, na função renal e aumento da PA

na idade adulta, sugerindo que o ambiente perinatal poderia programar o indivíduo para um maior risco cardiovascular na vida adulta (Woods *et. al.*, 2001; Bagby, 2007; Woods & Weeks, 2004; Barker, 2004).

Com uma dieta hipoprotéica a mãe tem mudanças nos níveis de glicose, insulina, prolactina, progesterona, estradiol e leptina, que são potencialmente importantes durante o desenvolvimento do feto. Esses marcadores biológicos poderiam funcionar como indicadores da programação para a tolerância à glicose, resistência à insulina (RI) e a síndrome metabólica, podendo esses fatores agir independentemente ou em conjunto (Fernandez-Twinn *et. al.*, 2003).

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar como a restrição protéica materna pode afetar a PA dos descendentes, dentre eles: o aumento da sensibilidade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), a diminuição placentária da atividade da enzima 11- β hidroxisteróide desidrogenase (11- β HSD) e o desenvolvimento renal alterado. O estresse gerado pela restrição alimentar pode promover a atividade alterada do sistema neuroendócrino, gerando também um aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças metabólicas (Vieau *et al.*, 2007; Cottrell & Seckl, 2009).

Os glicocorticóides são agentes programadores do desenvolvimento fetal, atuando sobre a diferenciação e a maturação dos tecidos (Thakore & Dinan, 1994), podendo influenciar o aumento da PA no adulto, através da estimulação dos receptores hipotalâmicos (Van Den Berg *et al.*, 1990), do aumento da absorção de sódio e cálcio pelo músculo liso vascular (Kornel, 1993) e a potencialização das ações da Ang II (Provencher *et al.*, 1995). No feto o excesso de glicocorticóides maternos pode suprimir o desenvolvimento das glândulas supra-renais, por promover a inibição da secreção do Hormônio Adrenocorticotrófico (ACTH), reduzindo desta forma o crescimento e a esteroidogênese da adrenal, ocasionando em períodos tardios do desenvolvimento a supressão do eixo HPA.

A dieta hipoprotéica durante a gestação em ratos demonstrou um aumento da exposição aos glicocorticóides, pois a enzima 11- β HSD do tipo 2 que converte corticosterona em 11-dehidrocorticosterona (rato) e protege o feto desses níveis, tem sua atividade placentária reduzida nesse modelo experimental, desempenhando dessa forma um papel chave no desenvolvimento da doença cardiovascular na idade adulta (Benediktsson *et al.*, 1993; Stewart *et al.*, 1995; Langley-Evans *et al.*, 1996).

Estudos demonstraram que o rim é essencial para a regulação da pressão arterial, e que a programação metabólica realizada pela restrição protéica materna altera a nefrogênese, promovendo uma diminuição no número de néfrons, contribuindo para uma redução da área de contato da superfície de filtração e aumentando a reabsorção de sódio que culmina no aumento da pressão glomerular capilar e elevação da PA (Woods *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2010).

A redução do número de néfrons tem sido associada à supressão do SRA, durante o período de desenvolvimento intra-uterino. Woods e colaboradores (2001) demonstraram que o *intra-RNA* mensageiro, a concentração e a imuno-marcação de renina, uma enzima liberada pelas células justaglomerulares renais responsável pela conversão do angiotensinogênio em Angiotensina, estavam reduzidos durante o período de desenvolvimento do néfron, sendo este período iniciado no rato aproximadamente no décimo dia da gestação e terminado aproximadamente no décimo dia após o nascimento (Larsson *et al.*, 1980). A redução dos níveis de renina promove uma diminuição nos níveis da (ANG II). É muito provável que o RAS desempenhe duas funções essenciais distintas, uma durante o período de desenvolvimento e um segundo durante a vida adulta na regulação da PA (Bagby, 2007; Woods *et al.*, 2001). (Figura 1).

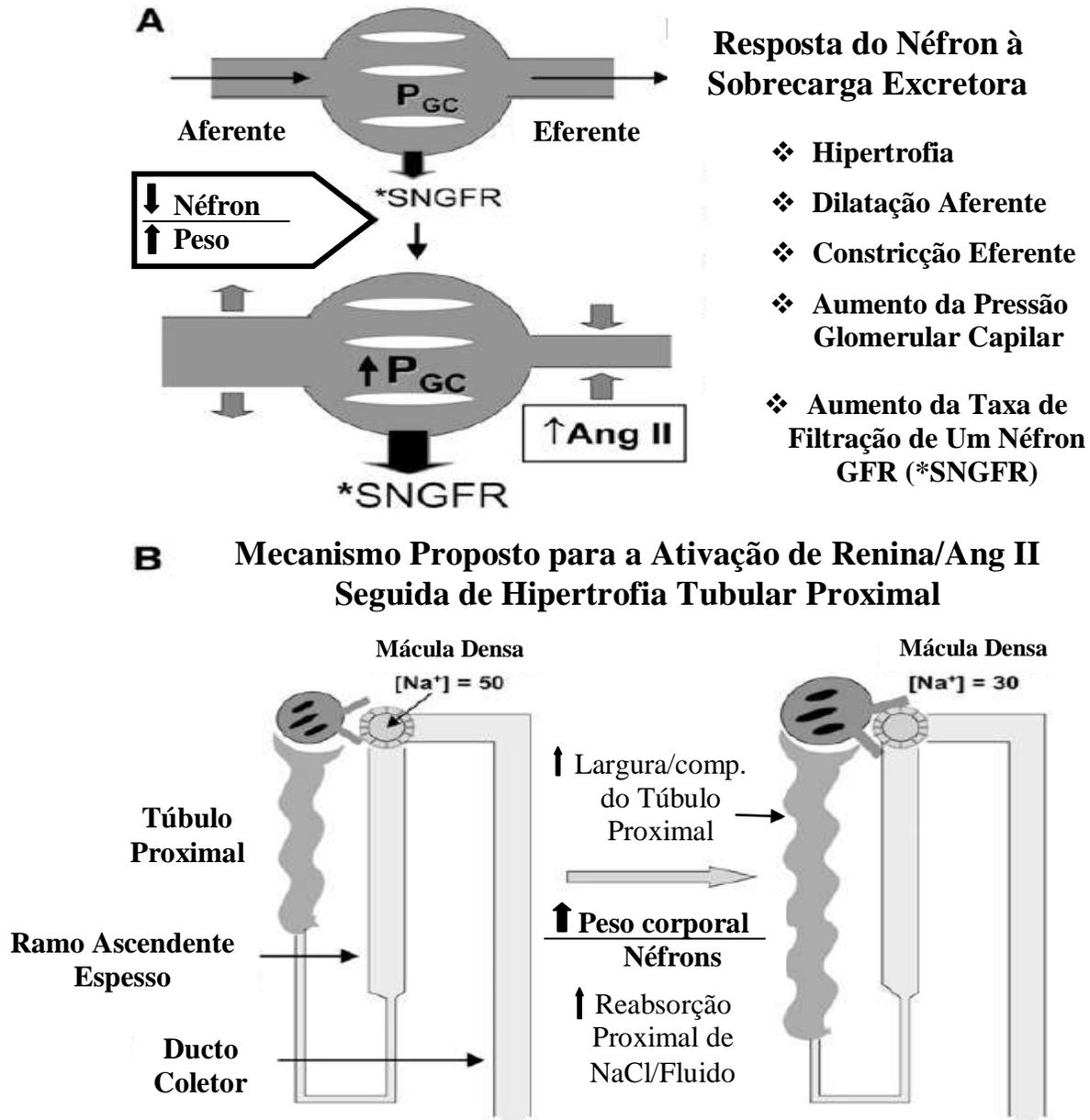


Figura 1: Resposta renal à diminuição relativa no número de néfrons. A redução do número de néfrons diminui a capacidade excretora e com o aumento da massa corporal ocorre elevação da carga excretora, induzindo uma resposta estereotipada do seu funcionamento. A hipertrofia glomerular aumenta o volume e o número capilar (A); o alargamento dos túbulos renais, predominantemente o túbulo proximal ocorre pelo aumento da espessura das paredes e do comprimento dos mesmos, associado ao aumento da reabsorção de sódio, potencialmente induzido pela ativação da Ang II secundariamente pela ação da renina através de sinais da mácula densa (B). Ang II – Angiotensina II, Comp. – Comprimento, [Na⁺] – Concentração de Íon Sódio, NaCl – Cloreto de Sódio, PGC – Pressão Capilar Glomerular e *SNGFR – Taxa de Filtração Glomerular de Um Néfron. Fonte: Adaptado de Bagby, 2007. Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming.

Os componentes do SRA são elementos fundamentais dos sistemas de controle da pressão arterial, pois a Ang II, um potente agente vasoconstrictor, promove o aumento da resistência vascular periférica. No interior do rim esse processo permite a elevação da pressão de perfusão nos glomérulos, a fim de manter a taxa de filtração glomerular e a função hemodinâmica (Figura 1). Ratos adultos expostos à dieta hipoprotéica no útero tendem a ter potencializadas as funções da Ang II, apesar de seus níveis não serem significativamente diferentes, mesmo tendo sido demonstrado que ocorre um aumento significativo dos níveis da enzima conversora de angiotensina (ECA). Alguns estudos justificam esse potencial devido ao aumento da expressão e da concentração de seus receptores em tecidos chaves (Langley-Evans, 2001).

Hipertensão

A HAS é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (PA), sistólica e/ou diastólica (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). Associa-se frequentemente a alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, encéfalo, rins e vasos sanguíneos) e a alterações metabólicas, com conseqüente aumento do risco de eventos cardiovasculares fatais e não-fatais (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2006; Williams, 2010).

A HAS pode ser produzida pelo aumento do débito cardíaco ou principalmente pelo aumento da resistência vascular periférica, constituindo-se em uma das doenças cardiovasculares mais comuns e relevantes (Ganong, 1995). Esta doença ocorre quando a pressão arterial sistólica (PS) é igual ou maior que 140 mmHg e a pressão arterial diastólica (PAD) encontra-se igual ou superior a 90 mmHg. Pesquisas epidemiológicas realizadas em algumas cidades apontam uma alta prevalência de HAS no Brasil e as taxas de prevalência na população urbana adulta brasileira variam de 22,3 % a 43,9 % (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010), sendo acima de 25%, na maioria das cidades estudadas, predominando no sexo masculino e com fatores de risco associados semelhantes aos de outros países (Lessa, 2001). A HAS tem alta prevalência e baixas taxas de controle, é considerada um dos principais fatores de risco modificáveis e um dos mais importantes problemas de saúde pública, tem sido mostrado um aumento de indivíduos hipertensos e uma alta incidência de morte causada por essa doença e suas complicações (Sur *et*

al., 2011). A HAS é um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares como, por exemplo: a DAC, AVC, doença arterial periférica e insuficiência cardíaca (Stukena *et al.*, 2011).

Um estilo de vida sedentário, sobrepeso e obesidade, idade, gênero, ingestão de sal e álcool, bem como fatores socioeconômicos e genéticos contribuem para a gênese e desenvolvimento da hipertensão, sendo, portanto, classificada como uma doença poligênica e multifatorial, relacionada a mudanças morfológicas e funcionais no sistema cardiovascular e no controle autonômico (Irigoyen *et al.*, 2005). Hábitos saudáveis devem ser adotados desde a infância e adolescência representando as principais recomendações não medicamentosas para a prevenção primária da HAS (VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão, 2010). A PA é determinada pelo débito cardíaco e pela resistência vascular periférica, que, por sua vez, são determinados por volume sistólico e frequência cardíaca, e pelo tônus vascular, respectivamente, de tal forma que seu controle envolve mecanismos neurais e neuro-humorais que, em curto e longo prazo, modulam não só a atividade do sistema nervoso autônomo para o coração e para os vasos, como também o volume sanguíneo e a secreção de vários hormônios como renina, vasopressina, peptídeo natriurético atrial, entre outros (Consolim-Colombo & Fiorino, 2005; Irigoyen *et al.*, 2005).

A PA elevada provoca alterações nos vasos sanguíneos e hipertrofia do ventrículo esquerdo, bem como anormalidades no músculo liso vascular e no endotélio associadas ao comprometimento da função destas estruturas (Verdecchia *et al.*, 1997). Entre estas disfunções, podemos considerar o aumento da vasoconstrição e redução da vasodilatação, tanto dependente como independente do endotélio. O desequilíbrio entre o relaxamento e a contração é frequentemente citado como uma das causas do aumento do tônus vascular na hipertensão (Cohuet & Struijker-Boudier, 2006).

Devido à grande ocorrência de casos de hipertensão na população e suas complicações, foram desenvolvidos uma série de modelos experimentais para o seu estudo. Esses podem envolver a manipulação dos rins, do sistema nervoso ou das supra-renais, além da inibição da síntese do óxido nítrico (NO). Existem também várias cepas de ratos que desenvolvem hipertensão espontaneamente (ratos espontaneamente hipertensos – SHR), ou quando alimentados com dieta rica em sódio (ratos DAHL) (Ribeiro *et al.*, 1992; Jover *et al.*, 1993; Ganong, 1995; Rocha *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009). No modelo de programação metabólica

que utiliza a restrição de proteínas na dieta materna durante a gestação e ou a lactação, foi demonstrado que a prole possui baixo peso ao nascer e que este parâmetro está intimamente associado ao desenvolvimento da HAS na idade adulta (Mesquita *et al.*, 2010), sendo mais uma ferramenta para o estudo dessa doença e de grande interesse por ser uma condição comum na população, devido às alterações e deficiências no padrão alimentar.

Gennser e colaboradores realizaram um estudo no final dos anos 80, revelando que o risco de aumento da PA era significativamente alto em um grupo de homens alistados para o exército que tinham sido pequenos para a idade gestacional. Através dessa análise concluíram que ser pequeno para a idade gestacional poderia ser um indicativo para a elevada PA na vida adulta (Gennser *et al.*, 1988) e, portanto, um agravante para o risco cardiovascular. Em outro estudo, foi demonstrado que a associação entre baixo peso ao nascer e elevação da PA é mais intensa em bebês que são pequenos para a idade gestacional do que para bebês que nasceram prematuros (Leon *et al.*, 1996) e este efeito hipertensivo da má nutrição materna parece não ser dependente da mudança na PA da gestante, já que esse tipo de alteração não está presente neste modelo (Langley & Jackson, 1994).

Outras evidências experimentais demonstraram que, assim como a hipertensão, a dieta materna com restrição de proteínas também produz disfunção endotelial na prole adulta, mediada por uma redução no relaxamento dependente do endotélio, em artérias mesentéricas e em anéis de aorta torácica (Torrens *et al.*, 2009; Sathishkumar *et al.*, 2009). A redução da biodisponibilidade do NO pode estar associada à disfunção endotelial e pode explicar em parte a elevação da PA neste modelo (Franco *et al.*, 2002). O estudo de animais hipertensos é uma ferramenta útil para elucidar alguns mecanismos na hipertensão, facilitando o controle clínico desta e melhorando a qualidade de vida de pacientes com esta Doença.

Endotélio e disfunção vascular

O endotélio é uma camada única e contínua de células organizadas em forma de fuso que separa o sangue da parede vascular e do interstício. O fluxo sanguíneo com a sua força de cisalhamento *shear stress*, atua sobre as células endoteliais através de uma cascata de eventos que

conduzem a produção de NO, pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (Bahia *et al.*, 2006).

Acreditou-se durante anos que o endotélio era apenas uma barreira mecânica entre o meio circulante e os demais componentes da parede vascular, porém hoje já se sabe que ele apresenta diversas atividades metabólicas. A importância do endotélio no processo de vasodilatação foi descrita por Furchgott e Zawadzki (1980), que demonstraram que a remoção mecânica ou química do endotélio impedia a vasodilatação induzida pela acetilcolina (ACh) em artérias isoladas de coelho, concluindo que o endotélio produzia uma substância vasodilatadora, denominada de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Estudos posteriores, realizados com o objetivo de identificar a natureza química do EDRF (Ignarro *et al.*, 1987) constataram que tal fator se tratava do NO.

O NO é produzido pelo endotélio pela ação da eNOS que converte o aminoácido L-arginina a NO + L-citrulina, catalisando a oxidação de cinco elétrons com a participação de NAD(P)H/NADP⁺ e do complexo cálcio/calmodulina (Malinski, 2005). O relaxamento da musculatura lisa vascular induzido pelo NO é mediado principalmente pela ativação da enzima guanilato ciclase solúvel muscular, que por sua vez, transforma guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento dos níveis de GMPc no interior das células musculares lisas, estimula o recrutamento de Cálcio (Ca²⁺) citosólico para os estoques intracelulares, causando assim, redução da concentração de Ca²⁺ e conseqüente relaxamento vascular (Rapoport & Murad, 1983).

Sua função é regular o tônus vascular pela ação vasodilatadora sobre as células musculares lisas e de inibição da atividade plaquetária, agregação de leucócitos e proliferação das células musculares lisas da parede vascular (Ramachandran *et al.*, 2002) sendo fundamental na modulação da PA (Flammer & Lüscher, 2010).

Além do NO, o endotélio produz outras substâncias vasodilatadoras, como a prostaglandina e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio, assim como substâncias vasoconstritoras, como a Ang II e endotelina. Quando a função do endotélio é normal, há um equilíbrio entre a produção destas substâncias com uma tendência a vasodilatação (Bahia *et al.*, 2006; Flammer & Lüscher, 2010).

Vários estudos demonstram que a remoção do endotélio aumenta a resposta a uma variedade de agentes vasoconstritores, tanto em preparações vasculares de animais normotensos

como hipertensos, indicando que estas células exercem um papel inibitório sobre a função contrátil do músculo liso vascular (Callera *et al.*, 2004).

Em condições fisiológicas, o endotélio é responsável pela manutenção do tônus vascular e da homeostase intravascular. Atua conservando o fluxo sanguíneo laminar, preservando a fluidez da membrana plasmática, criando mecanismos anticoagulantes, inibindo a proliferação e migração celulares e controlando a resposta inflamatória (Bahia *et al.*, 2006).

Em contra partida, evidências crescentes atribuem à disfunção endotelial caracterizada por um impedimento do relaxamento vascular dependente do endotélio um papel importante na fisiopatologia da hipertensão (Suzuki *et al.*, 1995; Taddei *et al.*, 1996; Félétou *et al.*, 2010), já que contribui para elevada resistência periférica, favorecendo a ocorrência de complicações cardiovasculares (Sotomayor *et al.*, 1999; Félétou *et al.*, 2010). Dentre os principais fatores que contribuem para a etiologia da disfunção endotelial, grande destaque tem sido dado ao estresse oxidativo (Dai & Dai, 2010; Touyz & Briones, 2011).

Estresse oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio são produzidas de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. Em condições patológicas, o estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a formação e remoção destas espécies, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou ainda do aumento da geração de espécies oxidantes (Touyz, 2004; Duracková, 2010).

O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a geração e a remoção de espécies reativas no meio celular, super produção de agentes oxidantes que sobrecarregam a capacidade antioxidante (Grossman, 2008). Promove a oxidação de macromoléculas biológicas como lipídeos, proteínas, DNA, carboidratos, ocorrendo quando a concentração de substâncias oxidantes supera a concentração de antioxidantes (Cai & Harrison, 2000).

As EROS são derivadas do metabolismo do oxigênio, que pela sua configuração eletrônica, tende a receber um elétron de cada vez, formando compostos intermediários altamente reativos encontrados no ambiente e em todos os sistemas biológicos (Touyz & Shiffrin, 1999; Loukides *et al.*, 2011). No sistema cardiovascular, as EROS exercem um papel fisiológico

essencial, mantendo a integridade cardíaca e vascular. No entanto, as EROS também possuem um papel fisiopatológico na disfunção cardiovascular associado a condições como aterosclerose, hipertensão e DM2 (Landmesser & Harrison, 2001; Zalba *et al.*, 2001; Duracková, 2010). As principais EROS nestes processos são: o ânion superóxido ($\cdot O_2^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxil ($OH\cdot$) e a espécie reativa de nitrogênio peroxinitrito ($ONOO^-$).

Em concentrações fisiológicas as EROS funcionam como moléculas de sinalização regulando a contração-relaxamento da célula do músculo liso vascular (VSMC) (Rao & Berk, 1992; Consentino *et al.*, 1994; Zafari *et al.*, 1998; Touyz, 2005) sendo indispensáveis em muitos processos bioquímicos, incluindo a sinalização intracelular, diferenciação celular, apoptose e defesa contra microorganismos (Duracková, 2010).

Em condições patológicas, ocorre um aumento da produção de EROS e ou uma redução da capacidade dos agentes antioxidantes, caracterizando um estado de estresse oxidativo, levando à disfunção endotelial, contratilidade aumentada, crescimento da VSMC, apoptose, migração de monócitos, peroxidação lipídica, inflamação, deposição aumentada de proteínas da matriz extracelular, oxidação de proteínas e danos ao DNA, contribuindo para o dano vascular na doença cardiovascular (Rao & Berk, 1992; Harrison, 1997; Landmesser & Harrison, 2001; Zalba *et al.*, 2001; Touyz & Briones, 2011).

Segundo estudos a hipertensão pode estar associada como o aumento do estresse oxidativo vascular, no entanto, ainda há um certo grau de controvérsia se o estresse oxidativo é causa ou consequência da hipertensão (Grossman, 2008). O estresse oxidativo pode contribuir para a geração ou manutenção da hipertensão através de inúmeros mecanismos como: a geração de lipídeos vasoconstritores produtos da peroxidação como F2-isoprostanos (Cracowski *et al.*, 2002), esgotamento da tetrahydrobiopterina (BH_4), um importante co-fator da eNOS (Vaziri *et al.*, 2000), o seqüestro do NO pela ação das EROs, como o ânion superóxido (Ceriello, 2008), bem como por meio de alterações estruturais e funcionais dentro da vasculatura (Zalba *et al.*, 2001).

Vários tipos celulares, como fibroblastos, macrófagos residentes, células do músculo liso e células endoteliais produzem EROS. Dentro da célula endotelial as fontes produtoras dessas espécies são: a NAD(P)H oxidase, NOS, ciclooxigenases, lipoxigenases e xantina oxidase. Presentes também na vasculatura as enzimas do citocromo P450, são fontes significativas de estresse oxidativo (Figura 2). Entretanto, a contribuição dessas enzimas para a geração de EROS é relativamente menor quando comparadas com a NAD(P)H oxidase (Touyz, 2004). A NAD(P)H

oxidase é regulada por agentes vasoativos (Ang II, endotelina-1, trombina, serotonina), por citocinas (interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF α)), fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), fator de crescimento epidermal (EGF)) e por forças mecânicas. Dos fatores vasoativos que estimulam a NAD(P)H oxidase, a Ang II parece ser um dos mais importantes (Touyz & Briones, 2011) (Figura 2).

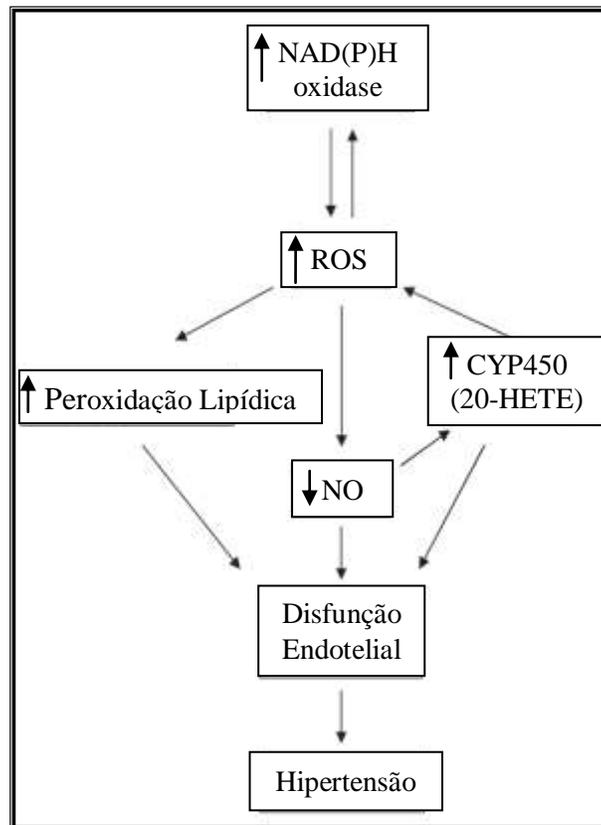


Figura 2: Possível interação entre estresse oxidativo, disfunção endotelial e a pressão arterial. CYP450 – Citocromo P450; 20-HETE – ácido 20-hidroxicicosatetranoico, NO – Óxido Nítrico e ROS – Espécies Reativas de Oxigênio. Fonte: Adaptado de Ward & Croft, 2006. Hypertension and oxidative stress.

O estresse oxidativo tem sido proposto como um dos agentes causadores das desordens relacionadas à gravidez, desempenhando um papel fundamental sobre as alterações placentárias, contribuindo com a fisiopatologia da pré-eclâmpsia e para o RCIU, características essas que podem ser observadas quando ocorre restrição de proteínas no período gestacional (Gupta *et al.*, 2007; 2004b). Estudos têm demonstrado que a pré-eclâmpsia, uma doença grave desenvolvida

durante o período gestacional, está associada com a redução das concentrações de vitaminas e glutatona, uma das enzimas do sistema de defesa antioxidante, e com o aumento de biomarcadores do estresse oxidativo como: concentrações placentárias de $\cdot O_2^-$ (Sikkema *et al.*, 2001) e de malondialdeído (Madazli *et al.*, 2002), níveis plasmáticos de carbonilação de proteínas e de H_2O_2 (Tsukimori *et al.*, 2008) entre outros.

Existem evidências que o estresse oxidativo está intimamente relacionado como o desenvolvimento do RCIU, promovendo na descendência, durante a idade adulta em aumento da prevalência de síndrome metabólica, obesidade, hipertensão, DM2 e doença cardiovascular (Valsamakis *et al.*, 2006).

Sistema de defesa antioxidante

Para se proteger e evitar os danos causados pelas EROs, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de antioxidantes. Os antioxidantes podem ser classificados em não enzimáticos e enzimáticos conforme sua estrutura. A maior parte dos antioxidantes não enzimáticos é exógena. Os principais são vitaminas lipossolúveis (Vitamina A, E e betacarotenos); hidrossolúveis (Vitamina C e Vitaminas do complexo B) e os oligoelementos (zinco, cobre, selênio, magnésio, entre outras). O sistema enzimático é composto por diversas enzimas, destacando-se a superóxido-dismutase (SOD), catalase e glutatona peroxidase (GPx) é o primeiro sistema a agir, evitando o acúmulo de $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 . Os agentes antioxidantes encontram-se no meio intracelular, com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana (Kojo, 2004; Valko *et al.*, 2007)

A SOD é a primeira linha de defesa da célula vascular. Em mamíferos existem três isoformas: a SOD-cobre-zinco (SOD 1) presente principalmente no citosol, SOD-manganês (Mn-SOD, SOD2) localizada primariamente na mitocôndria e a SOD-extracelular (ecSOD, SOD3) (Paravicini & Touyz, 2008). A SOD desempenha seu papel antioxidante, catalisando a dismutação do ânion O_2^- em H_2O_2 e O_2 (Ross & Moldeus, 1991; Acharya *et al.*, 1991) (Figura 3).

A GPx tem ação fundamentalmente citosólica e catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos através da utilização da glutatona (GSH), que atua como co-substrato da glutatona

peroxidase, com propriedades de doador de elétrons, a qual poderá ser regenerada através da glutatona redutase (GR) com a transferência do hidrogênio do NADPH (Marsella *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007; Paravicini & Touyz, 2008) (Figura 3).

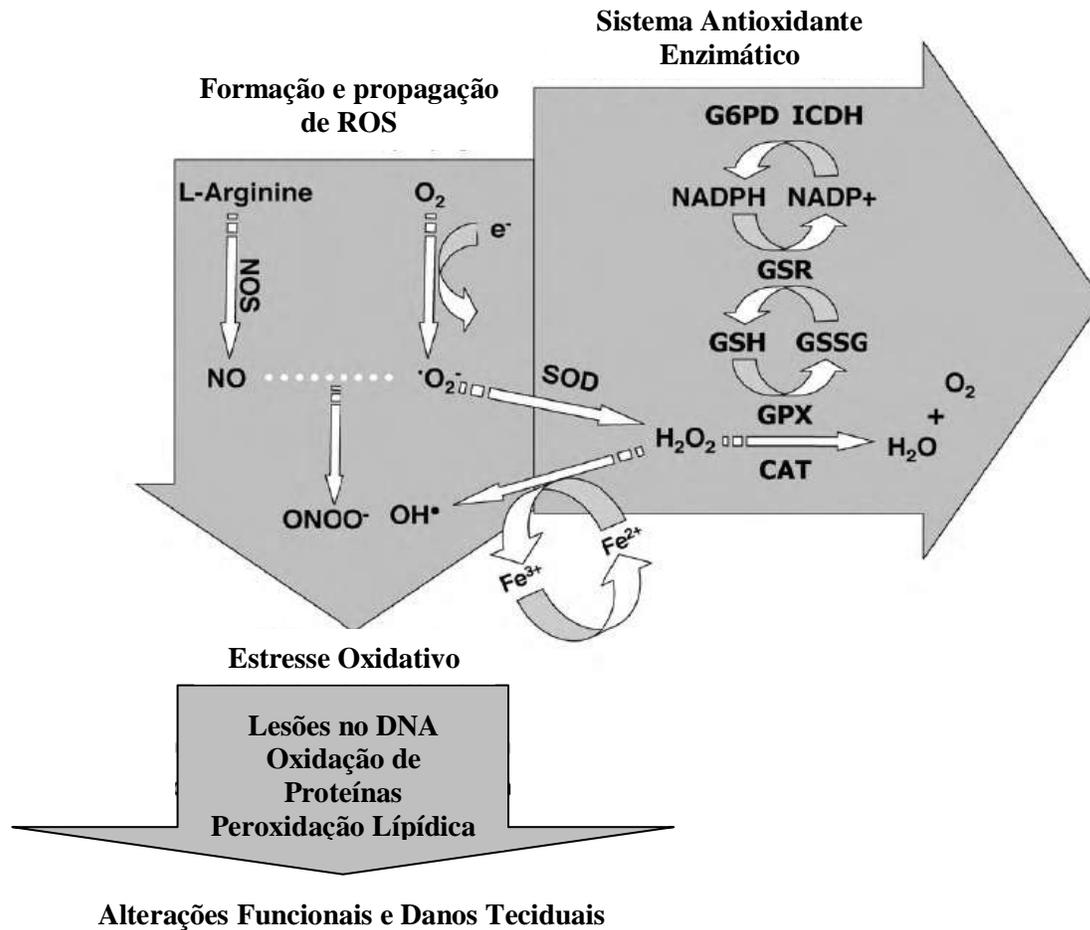


Figura 3: Representação esquemática das espécies reativas e a ação das enzimas antioxidantes SOD – Superóxido Desmutase, CAT – Catalase, GPX – Glutationa Peroxidase, GSR – Glutationa Redutase, GSH – Glutationa, GSSG – Glutationa Dissulfeto, G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase, $\cdot O_2^-$ – Ânion Superóxido, H_2O_2 – Peróxido de Hidrogênio, OH^\cdot – Radical Hidroxil, $ONOO^-$ – Peroxinitrito, NO – Óxido Nítrico, NOS – Óxido Nítrico Sintase, ROS – Espécies Reativas de Oxigênio, H_2O – Água e O_2 - Oxigênio Fonte: Adaptado de Al-Gubory *et al.*, 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes.

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática, localizada nos peroxissomas e também no citosol, que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (Figura 3). A catalase é efetiva em altos níveis de estresse oxidativo e protege as células da produção de H_2O_2 , sendo que a suplementação com catalase exógena previne a oxidação da GSH (Ferreira & Matsubara, 1997; Heck *et al.*, 2010).

Insulina e resistência à insulina

A insulina é um hormônio polipeptídico anabólico produzido pelas células β do pâncreas, cuja síntese é ativada pelo aumento dos níveis circulantes de glicose e aminoácidos. Após as refeições, a insulina age em vários tecidos periféricos, tais como o fígado, o músculo, o coração e o tecido adiposo, promovendo aumento da captação de glicose sanguínea e da síntese protéica, além de diminuir a produção hepática de glicose, via diminuição da gliconeogênese e glicogenólise, e reduzir a lipólise e a proteólise (Saltiel e Kahn, 2001).

A RI é definida como uma resposta diminuída às ações biológicas da insulina e isso significa uma menor ação da insulina não apenas no metabolismo dos carboidratos, como também seu papel no metabolismo dos lipídeos, sendo um mecanismo compensatório da RI a hiperinsulinemia (Meerarani *et al.*, 2006; Nigro *et al.*, 2006). Além disso, com a diminuição na ação da insulina, quadro freqüentemente encontrado em obesos, poderia haver também a ativação de fatores pró-inflamatórios, aumento da produção das EROs, redução da disponibilidade de NO e baixa regulação de vias de sinalização intra-celulares (Cubbon *et al.*, 2009).

Evidências crescentes sugerem que a progressão da RI para o DM2 é paralela à progressão da disfunção endotelial para a aterosclerose, estando também intimamente associada à adiposidade visceral, sendo essa associação atribuída aos ácidos graxos livres (Boden & Shulman, 2002). A hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres promovem fosforilação oxidativa mitocondrial, podendo levar a geração de intermediários reativos como o ânion superóxido, que acelera a degradação do NO (Brownlee, 2001; Rask-Madsen & King, 2007).

A composição da dieta materna é essencial durante a gestação e a lactação podendo predispor o feto ao desenvolvimento de alterações no metabolismo glicídico e em órgãos-alvo de forma irreversível. Modificações dietéticas com ingesta excessiva ou restrita de nutrientes podem predispor anormalidades metabólicas em modelos de roedores (Alvarez *et al.*, 1997, Garofano *et al.*, 1997). A administração de uma dieta hipoprotéica durante gestação e a lactação resultou em RCIU e no desenvolvimento alterado do pâncreas e dos tecidos sensíveis à insulina (Reusens *et al.*, 1995; Hales & Ozanne 2003; Guan *et al.*, 2005). Alguns estudos têm demonstrado que o modelo de restrição protéica materna pode ocasionar o desenvolvimento de diversas doenças, dentre elas o DM2, através da redução do número de células beta-pancreáticas, do conteúdo de

insulina e do aumento da tolerância à glicose descritos neste desenho experimental (Petric *et al.*, 1999; Chamson-Reig *et al.*, 2006).

Insuficiência renal

A insuficiência renal é uma síndrome clínica caracterizada por um declínio da função renal com acúmulo de metabólitos e eletrólitos e aumento nos níveis de uréia e creatinina, podendo ser dividida em insuficiência renal aguda (IRA) e insuficiência renal crônica (IRC) de acordo com o tempo de desenvolvimento. Uma queda na taxa de filtração glomerular (FG) precede o aparecimento dos sintomas de falência renal em todas as formas de doença renal progressiva. Portanto, ao se monitorar mudanças na FG estima-se o ritmo de perda da função renal (Sociedade Brasileira de Clínica Médica, 2007). Independente da causa, a doença renal crônica (DRC) é uma condição que acarreta grandes alterações físicas e psicológicas e mesmo com todos os avanços, a mortalidade permanece elevada nesta população. As doenças cardiovasculares são as maiores causas de morte em pacientes com esta síndrome (Joki *et al.*, 2006).

A IRC é a forma mais comum de afecção renal, sendo definida como uma insuficiência renal primária irreversível, em estágios terminais da doença ocorre acumulação de toxinas, líquidos, e eletrólitos normalmente excretados pelos rins levando à síndrome urêmica, a qual provoca a morte, a menos que as toxinas sejam eliminadas pelo tratamento de substituição renal por diálise ou transplante de rim (Fauci *et al.*, 2008). A IRC pode ter origem congênita, familiar ou adquirida. Qualquer processo patológico que lesione os glomérulos, túbulos, interstício e ou vascularização renal, podendo resultar em insuficiência renal adquirida (Rubin, 1997).

Na DRC as respostas à redução da quantidade de néfrons são mediadas por hormônios, citocinas e fatores de crescimento vasoativos. Essas adaptações a curto prazo (hiperfiltração e hipertrofia) tornam-se deletérias na medida em que as elevações da pressão e do fluxo sanguíneo predisõem à esclerose e destruição dos néfrons remanescentes. A hiperatividade intra-renal do SRA parece contribuir com a hiperfiltração adaptativa inicial, bem como a hipertrofia e esclerose inadaptativas subseqüentes (Fauci *et al.*, 2008).

Existem também índices derivados da excreção de sódio, a excreção fracionada de sódio (EFNa) e o índice de insuficiência renal. Esses índices têm sido utilizados para diferenciar a insuficiência pré-renal (quando a imediata correção da perfusão sistêmica restaura a função) da doença renal intrínseca (nesta, a lesão tubular é presumivelmente responsável pelo sódio urinário elevado, e do mesmo modo, a função renal não será imediatamente restaurada pela melhora da perfusão sistêmica) (Vianna, 2005).

A utilização de dietas hipoprotéicas ou hipoenergéticas tem um efeito impactante sobre o desenvolvimento renal. Além da redução do número de glomérulos (Pires *et al.*, 2006; Mesquita *et al.*, 2010), outros trabalhos descreveram o aumento do diâmetro glomerular, glomerulosclerose, depuração de creatinina, EFNa, relatando o aumento das concentrações plasmáticas de sódio, corroborando com a hipótese de comprometimento da função renal (Almeida & Mandarim-de-Lacerda, 2005; Mesquita *et al.*, 2010).

Extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE)

A planta *Euterpe oleracea* Mart. também conhecida pelo nome popular açaí (Figura 4), é amplamente encontrada na região Amazônica principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá. A casca do fruto do açaí é comumente usada para fazer suco, sorvete, doces e é muito consumido no Brasil. Aproximadamente 10.000 toneladas de extrato aquoso gelado são consumidas no Brasil e 1.000 toneladas são exportadas para muitos países como Japão, Estados Unidos e Itália (Embrapa, 2004).



Figura 4: Foto do fruto da *Euterpe oleracea* Mart (açai)

Estudos químicos têm mostrado que o açai é rico em polifenóis como epicatequina, catequina e antocianinas (cianidina 3-glucosídeo, cianidina 3-arabinosídeo e cianidina 3-rutinosídeo), entre outros (Bobbio *et al.*, 2000; Pozo-Isfran *et al.*, 2004; Gallori *et al.*, 2004). Crescentes evidências sugerem que uma dieta rica em polifenóis pode estar envolvida na proteção contra o risco cardiovascular (Stoclet *et al.*, 2004), pois estudos epidemiológicos mostram que a ingestão de polifenóis é inversamente correlacionada com a incidência de doenças cardiovasculares (Manach *et al.*, 2005). Este efeito benéfico dos polifenóis pode ser devido a diferentes ações como antioxidante (Frankel *et al.*, 1993) que aumenta a biodisponibilidade do NO, vasodilatação (Fitzpatrick *et al.*, 2000) e/ou propriedades anti-hipertensivas (Soares de Moura *et al.*, 2002; 2004 a,b).

Estudos realizados pelo nosso grupo mostraram que o extrato hidro-alcóolico do caroço do açai (ASE), cujo processo de obtenção e indicações terapêuticas já foram depositadas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), assim como, no Patent Cooperative Treaty (PCT), induz um efeito vasodilatador dependente do endotélio (Rocha e *et al.*, 2007) e efeito anti-hipertensivo (Rocha *et al.*, 2008) e anti-hiperglicêmico (Oliveira *et al.*, 2010). Demonstramos ainda que o ASE reduz o dano oxidativo, em modelo experimental de enfizema pulmonar e em modelo experimental de síndrome metabólica (Rocha, *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2011, Oliveira *et al.*, 2010). Estes achados demonstram um efeito benéfico do extrato ASE, como uma planta medicinal, apresentando uma importância clínica no tratamento de doenças cardiovasculares.

1 OBJETIVO

1.1 Objetivo geral

Com o objetivo de ampliar nosso conhecimento sobre os mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do tratamento com o extrato do caroço do açaí, avaliamos neste estudo as alterações cardiovasculares, renais e metabólicas na prole adulta (machos) de ratas submetidas à restrição protéica durante a gestação e avaliamos os efeitos do tratamento com o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí durante o período gestacional, sobre as alterações observadas na prole adulta.

1.2 Objetivos específicos

1. Avaliar se o tratamento com ASE modifica o peso corporal na prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação.
2. Investigar se o tratamento com ASE modifica os níveis de pressão arterial, renina plasmática e as alterações da resposta vascular em leito arterial mesentérico isolado na prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação.
3. Avaliar o efeito do tratamento com ASE sobre a peroxidação lipídica (MDA), a carbonilação de proteínas e a atividade das enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase, utilizando homogenato de rim direito e plasma na prole de ratas submetidas a dieta hipoprotéica durante a gestação.
4. Analisar se o tratamento com ASE modifica a produção de NO, determinada pela medida do conteúdo total de nitrito, utilizando homogenato de rim direito e plasma na prole de ratas submetidas a dieta hipoprotéica durante a gestação.
5. Investigar se o tratamento com ASE modifica os níveis séricos de triglicédeos, colesterol total e HDL na prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação.
6. Avaliar se o tratamento com ASE modifica os níveis glicêmicos, insulinêmicos e a RI na prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação.

7. Analisar se o tratamento com ASE modifica os níveis séricos de creatinina, uréia, albumina, potássio e sódio na prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação.
8. Avaliar se o tratamento com ASE modifica os níveis urinários de creatinina, proteína, potássio e sódio na prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação.
9. Investigar se o tratamento com ASE modifica o número de glomérulos renais na prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo do extrato hidroalcoólico do caroço de açaí (ASE)

Frutos da planta *Euterpe oleracea* Mart. (açaí) foram obtidos da Universidade Federal do Pará. Após a lavagem dos frutos, aproximadamente 200g de caroço foram separados, triturados, embebidos em 400 ml de água destilada e então fervidos por 5 minutos. Imediatamente após a fervura acrescentou-se 400 mL de etanol. O extrato hidro-alcoólico foi guardado em geladeira e agitado periodicamente por 2 a 4 horas ao longo de 10 dias. Ao final deste período, o extrato foi filtrado em papel de filtro tipo xarope e posteriormente em papel de filtro tipo Whatman número 1. Posteriormente, todo o etanol foi evaporado à baixa pressão na temperatura de 50° a 60° C. O resíduo foi liofilizado e mantido a -20° C até o uso (Rocha *et al.*, 2007).

2.2 Animais utilizados e dieta experimental

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experiências Animais da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (N° CEA/021/2010).

Para este estudo foram utilizadas ratas Wistar normotensas, primíparas, pesando entre 200 – 250 g. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia e Psicobiologia/ IBRAG/ UERJ, em temperatura média de 23° C e com ciclo de sono-vigília de 12 horas, com presença de luz a partir das 6:00 h da manhã. Os animais tiveram acesso à ração industrializada específica para ratos (NUVILAB[®]). Posteriormente ao acasalamento, realizado na proporção de três fêmeas para um macho (da mesma espécie), a gravidez foi detectada por meio de esfregaço vaginal (Marcondes *et al.*, 2002). Após a confirmação da cópula, as fêmeas foram separadas em quatro grupos:

- a) Grupo Controle: recebeu dieta padrão para ratos AIN-93G, com 20% de caseína/kg durante todo período de gestação;
- b) Grupo Hipoprotéico: recebeu dieta experimental isocalórica e hipoprotéica para ratos AIN-93G, contendo apenas 6% de caseína/kg durante todo período gestacional;

- c) Grupo Controle + ASE: recebeu a dieta padrão com 20% de caseína/kg e concomitante uso de 200 mg/kg/dia do extrato do caroço do açaí (ASE), por gavagem intragástrica durante a gestação;
- d) Grupo Hipoprotéico + ASE: recebeu a dieta hipoprotéica com 6% de caseína/kg e concomitante uso de 200 mg/kg/dia do extrato do caroço do açaí (ASE), por gavagem intragástrica durante todo período gestacional.

As ratas foram alimentadas com livre acesso à ração (Tabela 1) e água durante todo período experimental. Ambas as dietas foram balanceadas pela Rhoster baseadas na AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993).

O consumo de ração e a ingestão de líquido das matrizes foram acompanhados durante o período gestacional, sendo o consumo diário calculado fazendo-se a diferença da oferta pela sobra, dividido pelo número de dias. Outros parâmetros também avaliados: peso das matrizes, número de total de filhotes e número de filhotes vivos e mortos por matriz, assim como a duração da gestação.

Tabela 1: Composição das dietas padrão e hipoprotéica.

<i>Nutrientes</i>	<i>Dietas</i>	
	<i>Padrão</i>	<i>Hipoprotéica</i>
Carboidratos	54%	68%
Proteínas	20%	6,0%
Extrato Etéreo	7,2%	7,0%
Matéria Fibrosa	4,1%	5,0%
Matéria Mineral	2,8%	2,8%
Cálcio	0,56%	0,5%
Fósforo	0,26%	0,3%

Ao nascimento, a ração experimental foi retirada e substituída pela ração industrializada específica para ratos. No dia 1 de vida o número de filhotes por matrizes foi corrigido para seis filhotes machos, a fim de prevenir uma variação no crescimento neonatal através da disponibilidade de ingestão de leite durante a amamentação. O estudo foi realizado com as ninhadas de machos, divididas em quatro grupos (n=6 por grupo) formados ao desmame (21 dias) e mantidos com dieta normal até a idade de dezesseis semanas:

- a) Grupo Controle (C): adultos machos provenientes de matrizes que receberam dieta padrão;
- b) Grupo Hipoprotéico (H): adultos machos provenientes de matrizes que receberam dieta hipoprotéica;
- c) Grupo Controle + ASE (C + ASE): adultos machos provenientes de matrizes que receberam dieta padrão e 200 mg/kg/dia de ASE por gavagem intragástrica;
- d) Grupo Hipoprotéico + ASE (H + ASE): adultos machos provenientes de matrizes que receberam dieta hipoprotéica e 200 mg/kg/dia de ASE por gavagem intragástrica.

O comprimento rostro-anal e a massa corporal da prole foram aferidos semanalmente, até a décima sexta semana de vida. Já a medida da glicemia de jejum foi realizada a cada 4 semanas, sendo realizada com o auxílio de um medidor automático (ACCU CHEC-Active, Roche[®]), baseado na reação glicose-glicose oxidase.

2.3 Medida da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida por método não invasivo de pletismografia de cauda (Letica LE 5000) na prole de todos os grupos experimentais, a partir dos quarenta e cinco dias de vida. Os animais foram treinados durante duas semanas, a fim de adaptar o animal ao procedimento e conseqüentemente minimizar o estresse durante a manipulação.

As medidas foram realizadas em ratos acordados uma vez por semana, durante cinco semanas, sendo iniciada a medida com dois meses e meio e finalizada com quatro meses de vida por meio de um garrote e de um sensor de pulso posicionados em torno da cauda do animal. Estes foram conectados ao registrador, o qual insufla e desinsufla automaticamente o garrote,

detectando o desaparecimento e o aparecimento da onda de pulso na artéria caudal, determinando assim a PAS.

Os animais foram treinados por 2 semanas, antes do período experimental, para minimizar o estresse durante a medida da pressão arterial.

2.4 Isolamento do leito arterial mesentérico (LAM) de rato

Após o registro da PAS, os ratos foram anestesiados com tiopental (50 mg/kg) sendo sua administração por via intraperitoneal, para a coleta de sangue arterial através da aorta abdominal, e em seguida submetidos a laparotomia. O LAM foi estendido para o exterior da cavidade abdominal e envolto em gaze umedecida com solução nutriente de Krebs modificada (g/L), NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MgSO_4 , NaHCO_3 , KH_2PO_4 , $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Resende *et al.*, 1997). Os ramos pancreático-duodenal, íleo-cólico e cólico direito da artéria mesentérica superior foram ligados e seccionados. O intestino delgado foi ligado e seccionado à altura do jejuno proximal e do íleo distal. A artéria mesentérica superior foi isolada na sua origem, à altura da artéria aorta abdominal e canulada com um tubo de polietileno (PE 50; Clay-Adams), de aproximadamente 4 cm de comprimento, preenchida com solução de Krebs heparinizada. Em seguida, o intestino delgado foi separado do leito vascular, cortando-se rente à borda intestinal, e a preparação lavada com solução de Krebs modificada.

2.5 Medida da reatividade do LAM às substâncias vasoativas

Após o isolamento, a preparação vascular foi colocada em uma cuba (volume de 10 mL) e constantemente perfundida por meio da cânula inserida na artéria mesentérica superior que foi conectada a uma bomba peristáltica (Model MINIPULS 3, Gilson®). A solução de Krebs, mantida à 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2) foi infundida à velocidade constante de 4mL/min e a pressão de perfusão registrada continuamente em um computador através do programa Labchart 7 reader, por meio de um transdutor de pressão (PowerLab 4/30) (Figura 5).

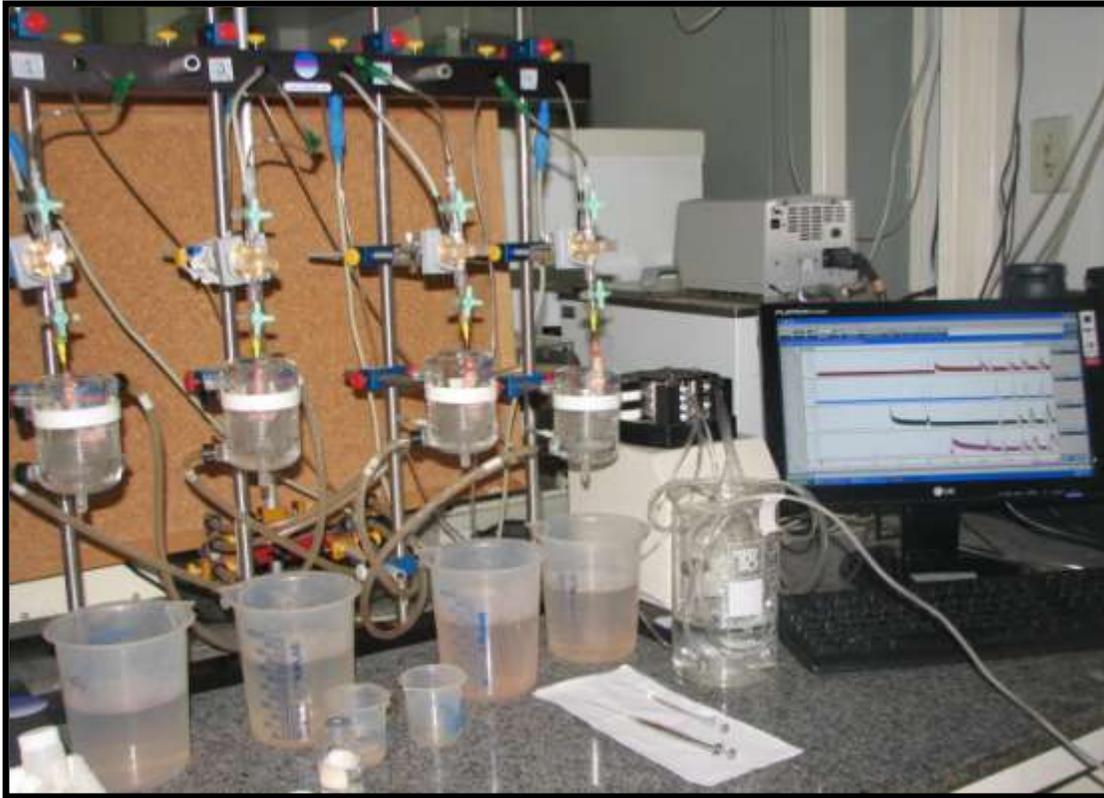


Figura 5: Foto do Esquema de perfusão do leito arterial mesentérico.

Os experimentos foram precedidos de um período de 30 minutos de estabilização da preparação, durante o qual a pressão de perfusão basal foi mantida entre 20 e 40 mmHg (Resende *et al.*, 1997) e então foram administradas injeções de 120 μmol de KCl de 10 em 10 minutos até obter uma resposta consistente. Em seguida, iniciou-se o período de sensibilização vascular, no qual a norepinefrina (NE) foi adicionada à solução de perfusão, em concentração suficiente (30 μM) para que a pressão de perfusão se mantivesse estável em torno de 80-100 mmHg. Logo após a obtenção de uma resposta pressora induzida pela NE, testamos a capacidade do endotélio vascular de liberar NO, com a injeção de Ach (1-100 pmol), a qual produz um efeito vasodilatador que é dependente da liberação de NO pelas células endoteliais. Avaliamos também a capacidade dilatadora direta do músculo liso vascular, com a injeção de NG (1-100 nmol), substância que atua diretamente no músculo liso vascular sendo seu efeito independente do endotélio. A resposta vasodilatadora foi expressa em termos de % de queda da resposta pressora

induzida pela NE. As injeções “in bolus” das substâncias utilizadas nos experimentos foram realizadas por meio de um injetor acoplado ao sistema de perfusão, por meio de micro-seringas de 10 e 100 µl (Hamilton). O intervalo entre as injeções foi de aproximadamente 5 minutos, permitindo sempre o retorno e estabilização da pressão de perfusão aos níveis anteriores e as injeções foram administradas em volumes que variam de 5 a 50 µl.

2.6 Níveis de renina plasmática

Os níveis de renina plasmática foram mensurados através do kit ACTIVE RENIN IRMA (Beckman Coulter – Ref DSL25100) por radioimunoensaio.

2.7 Dosagens séricas

2.7.1 Perfil lipídico

Os triglicerídeos, o colesterol total e a lipoproteína de alta densidade (HDL), foram determinados através de kit comercial (Analisa®, Brasil) que se baseiam em métodos não-enzimáticos colorimétricos. As concentrações séricas foram expressas em mg/dL.

2.7.2 Uréia, creatinina e albumina

A uréia, creatinina e a albumina foram determinadas através de kit comercial (Analisa®, Brasil) que se baseia em método não-enzimático colorimétrico. As concentrações séricas foram expressas em mg/dL.

2.7.3 Insulina

A dosagem de insulina foi realizada no soro de animais com 120 dias, através de kit de quimioluminescência (Cobas Elecsys 1010 phase-out, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Os valores foram expressos em $\mu\text{UI/mL}$.

2.7.4 Análise da sensibilidade à insulina

O indicador de sensibilidade à insulina foi obtido através do índice de HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment) calculado pela fórmula: insulina de jejum ($\mu\text{UI/mL}$) X glicose de jejum (mmol/L)/22.5 (Oliveira *et al.*, 2010).

2.8 **Dosagens urinárias**

2.8.1 Coleta da urina

A coleta da urina de 24 horas foi realizada através da utilização da gaiola metabólica, um dia antes do sacrifício dos animais, sendo feita a medida do volume excretado para análises posteriores.

2.8.2 Concentração de sódio e potássio

O sódio e o potássio urinário foram determinados através de um ensaio por fotometria de chama, no laboratório de análises clínicas veterinárias LABORLIFE.

2.8.3 Depuração de creatinina

A análise da depuração renal de creatinina foi realizada utilizando-se o volume urinário e os valores da creatinina sérica e urinária como descrito na fórmula:

$$\text{Clcr} = \frac{\text{creatinina urinária (mg/dL)} \times \text{fluxo urinário (mL/min)}}{\text{creatinina plasmática (mg/dL)}}$$

2.8.4 Fração excretada de sódio

A análise da fração urinária excretada de sódio foi realizada utilizando-se o volume urinário e os valores da creatinina sérica e urinária como descrito na fórmula:

$$\text{EFNa} = \frac{\text{Na urinário} \times \text{creatinina sérica} \times 100}{\text{Na sérico} \times \text{creatinina urinária}}$$

2.9 **Atividade das enzimas antioxidantes**

A medida da atividade das enzimas anti-oxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) foi realizada em amostras de plasma, e em homogenato de rim e fígado preparados com tampão fosfato.

2.9.1 Medida da superóxido dismutase

A enzima SOD catalisa a dismutação do $\cdot\text{O}_2^-$ em O_2 e H_2O_2 . A determinação da atividade da enzima baseou-se na medida da concentração de adenocromo, resultante da oxidação da

noradrenalina pelo $\cdot\text{O}_2^-$. Este ensaio foi realizado utilizando a técnica descrita por Bannister & Calabrese (1982) para a medida no plasma, e adaptando-a para o tecido vascular, rim e coração.

Foram utilizados 20, 40 e 60 μl de cada amostra (rim, fígado e plasma) em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 970 μl tampão glicina (3,75 mg/mL de água destilada) e noradrenalina (19 mg/mL de água destilada). Também foram adicionados 20 μl da enzima catalase (1.2 mg/ml de água destilada) ao meio para retirar o H_2O_2 formado pela reação catalisada pela SOD. A concentração de adenocromo foi medida espectrofotometricamente (480 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de 180 segundos.

2.9.2 Medida da catalase

A catalase é uma hemoproteína que catalisa a degradação do H_2O_2 , formando oxigênio molecular e H_2O . A atividade da enzima foi avaliada através do consumo de H_2O_2 pela reação.

Foram utilizados 200 μl de homogenato de fígado, rim e 20 μl de amostra de plasma em cubetas separadas (quartzo). As amostras foram incubadas com 2 mL de tampão fosfato (PBS) e H_2O_2 (0.16%). A concentração de H_2O_2 foi avaliada durante 60 segundos por espectrofotometria (240 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) em um intervalo de 60 segundos (Aebi, 1984).

2.9.3 Medida da glutathiona peroxidase

A GPx é uma enzima selênio-dependente que catalisa a redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos (ROOH) para H_2O e álcool, usando a glutathiona (GSH) como doador de elétrons. Ela está localizada tanto no citosol quanto na matriz mitocondrial. A determinação da atividade da GPX foi realizada a partir da taxa de decaimento da NADPH, determinada por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 340 nm.

Foram utilizados 200 μl de homogenato de fígado, rim e plasma em cubetas separadas. As amostras foram incubadas com 1800 μl de tampão fosfato (PBS), glutathiona reduzida (2 mM),

glutathione redutase (0.11 mg/mL) e azida sódica (0.065 mg/mL) durante 10 minutos. Após o tempo de incubação, NADPH (10 mM) foi adicionado ao meio e foram realizadas leituras em um intervalo de 180 segundos. Posteriormente, H₂O₂ (3%) foi adicionado e uma nova leitura foi realizada por 240 segundos. O decaimento da NADPH foi determinado por espectrofotometria (340 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Flohé & Gunzler (1984) e adaptada para os tecidos estudados.

2.10 Ensaio pró-oxidantes

2.10.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Este método é utilizado para a avaliação do estado de oxidação dos ácidos graxos em sistemas biológicos. O dano em lipídeos de membrana é determinado pela formação de subprodutos da peroxidação lipídica (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico formadas durante a peroxidação em sistemas de membranas e microsomas. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532 nm). Esta padronização foi realizada utilizando a técnica descrita por Draper & Hadley (1990) e adaptada para medida em plasma.

Foram utilizados 200 µl de homogenato de rim e fígado para 400 µl de ácido tricloroacético (TCA). Para o plasma, foram utilizados 200 µl de amostra, diluídos em 600µl de TCA. As amostras foram centrifugadas por 10 min em 1000 rpm à 4°C. Separou-se 500µl do sobrenadante em um tubo de ensaio com tampa e adicionou 500µl de TBA (0,67%). Os tubos foram colocados em um banho seco (100°C) por 30 minutos. Deixou-se esfriar por 5 minutos e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (532 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

2.10.2 Carbonilação de Proteínas

Este método é utilizado para dosagem de oxidação de proteínas e se baseia no princípio de que vários radicais livres atacam resíduos de proteínas como aminoácidos (histidina, arginina, lisina e prolina) para produzir produtos com o grupo carbonil, o qual pode ser medido através da reação com 2,4- dinitrofenilhidrazina. O conteúdo de carbonil é determinado espectrofotometricamente em 370 nm usando um coeficiente 22.0000 Molar⁻¹ em nmol/mg de proteínas, como descrito por Levine *et al.* (1990).

Foi utilizado 100µl de homogenato de rim, fígado e plasma em duplicata. Foram realizadas lavagens com solução de HCL-Acetona, TCA 10%, TCA 20%, TCA 30%, e etanol-Acetato de Etila. Em cada lavagem as amostras foram centrifugadas por 3 min a 600g, e descartado o sobrenadante. Uma parte das amostras foi incubada com 2,4-dinitrophenylhydrazine e outra parte incubada com HCL 2M por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Todas as amostras foram incubadas com guanidina 6 M a 60°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas e foi realizada a leitura da absorbância do sobrenadante por espectrofotômetro (370 nm; Ultrospec 2100 Pro — Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

2.11 **Medida de nitrito**

Como o NO possui um tempo de meia vida muito curto, a determinação da produção deste radical é mensurado pela formação do nitrito (NO₂), um produto de degradação estável e não volátil. A dosagem de nitrito pode ser realizada pelo método de Griess, no qual o princípio de reação é baseado na formação de um azo composto. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED), formando um composto azo estável de coloração púrpura, lido no comprimento de onda de 540 nm (Green *et al.*, 1982; Sun *et al.*, 2003).

Solução 1: sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico 2,5%.

Solução 2: N-naftil-etilenodiamina 0,1% em solução de ácido fosfórico a 2,5%.

Para a reação, foram adicionados 100 μ l da amostra em 50 μ l da solução 1. Após um tempo de 10 minutos foram adicionados 50 μ l da solução 2. Após a homogeneização, a leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro ou leitor de ELISA. O resultado foi dado em μ M (ou mMol)/ mg proteína.

2.12 Dosagem de proteínas (Bradford)

As proteínas totais das amostras estudadas foram quantificadas através do método de Bradford em placa de ELISA (Jamef®), utilizando a albumina bovina (SIGMA®) (Bradford, 1976).

2.13 Microscopia óptica e estereologia

O rim esquerdo foi dividido longitudinalmente em duas metades, que foram incorporadas com a face para baixo em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, EUA), em seguida, foram seccionados em micrótomo (Easy Path Ep-31-20091, manual, São Paulo, Brasil) espessura de 5 μ m, sendo colocados em lâminas e corados com hematoxilina-eosina. o método utilizado foi fracionar para estimar o número de glomérulos em uma fatia (um número aleatório para cada 10 seções), analisadas em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TS 100, Japão) na objetiva de 10X com a utilização do sistema teste M42 e do programa infinity capture. O número total de glomérulos por rim (N[glom]) foi estimado considerando-se a fração analisada do rim corrigida para o órgão inteiro (Bertram *et al.*, 1992; Mandarim-de-Lacerda, 2003).

3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram analisados por meio de “One-way analysis of variance” (ANOVA) utilizada para comparar diferenças entre os diversos grupos experimentais, com posterior uso do pós-teste Tukey e Bonferroni.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros maternos durante a gestação

A ingestão de ração, líquido, o peso materno e o número de filhotes por nascimento foram avaliados durante o período gestacional e nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais para os diferentes parâmetros (Figura 6).

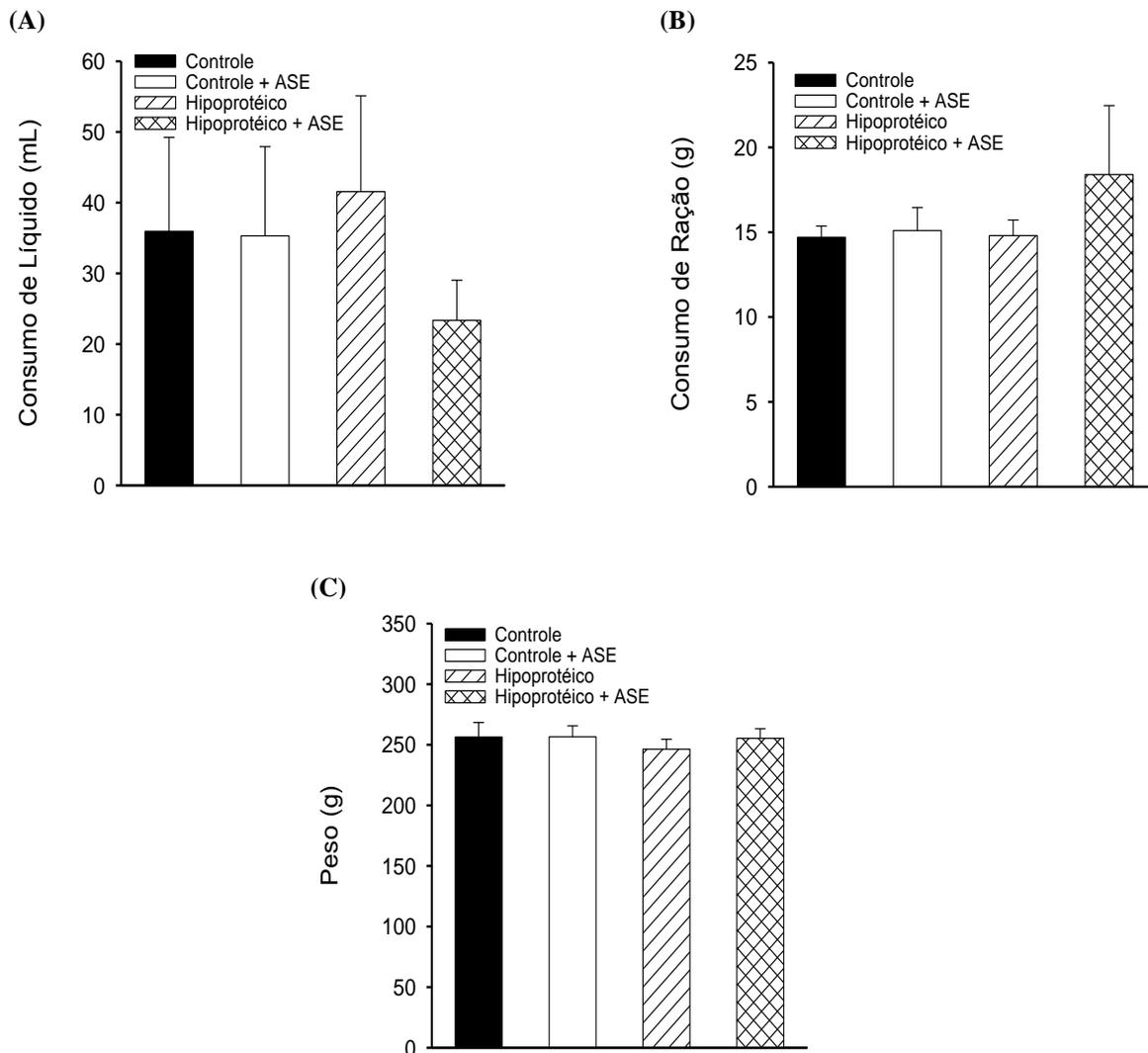


Figura 6: Consumo materno de líquido (A), de ração (B) e o peso materno (C). Os valores estão expressos em média \pm erro padrão (Controle n= 6; Controle + ASE n= 5; Hipoprotéico n= 10; Hipoprotéico + ASE n= 7).

4.2 Efeito do tratamento com ASE sobre o peso corporal da prole (machos) de animais submetidos à dieta hipoprotéica durante a gestação.

O peso foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo hipoprotéico em relação ao grupo controle nas primeiras semanas de vida (até o décimo quinto dia). Posteriormente não houve diferença significativa no peso dos animais até o final do estudo, no centésimo décimo segundo dia de vida. O tratamento com ASE promoveu o aumento significativo ($p < 0,05$) no peso desses animais (Figura 7).

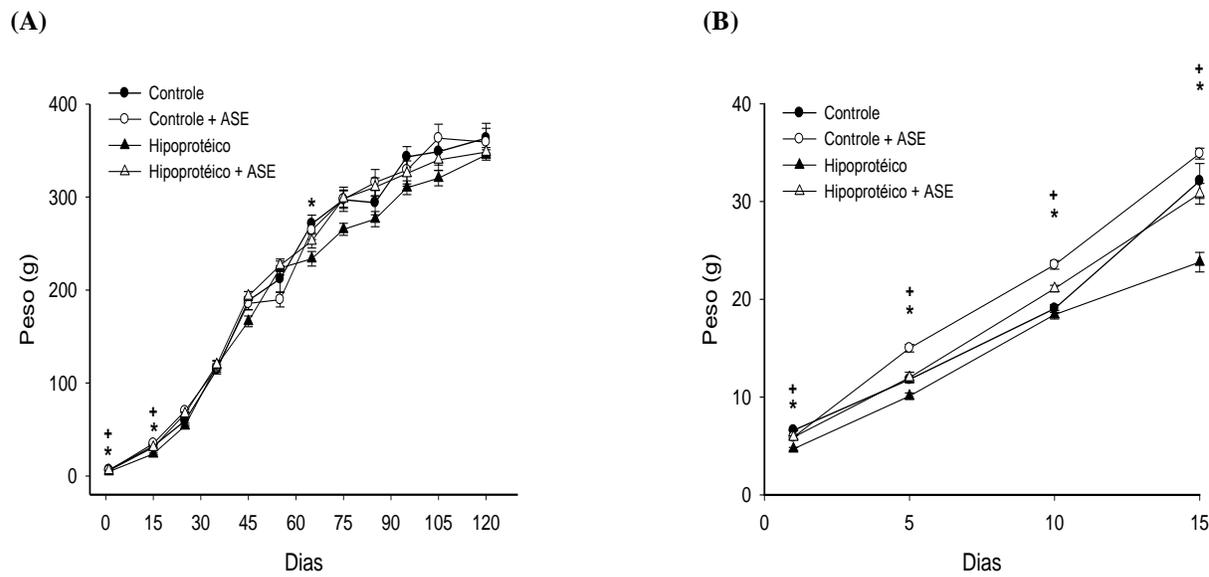


Figura 7: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre a evolução do peso durante 4 meses dos machos da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação (A) e em (B) amplificação do gráfico de peso nas primeiras semanas de vida, dos grupos controle, controle + ASE, hipoprotéico e hipoprotéico + ASE. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=6$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.3 Efeito do tratamento com ASE sobre a pressão arterial sistólica

A PAS estava mais elevada nos animais do grupo hipoprotéico, com dezesseis semanas de vida quando comparado com os controles ($p < 0,05$). O tratamento com ASE impediu o desenvolvimento da hipertensão no grupo hipoprotéico + ASE ($p < 0,05$). A PAS aumentou com a idade, não havendo diferença nas primeiras semanas de vida (Figura 8).

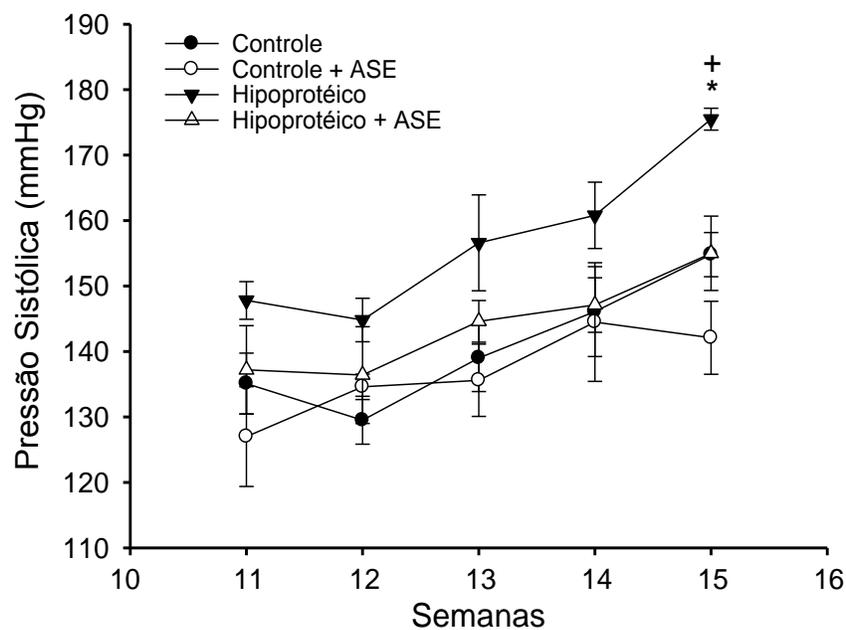


Figura 8: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre a Pressão arterial sistólica (mmHg) durante 4 meses dos machos da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação, dos grupos controle, controle + ASE, hipoprotéico e hipoprotéico + ASE. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=6$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.4 Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de renina plasmática

Os níveis de renina plasmática foram significativamente ($p < 0,05$) maiores no plasma dos animais hipoprotéicos, quando comparados ao controle. O tratamento com ASE possibilitou a manutenção desses níveis em valores normais ($p < 0,05$) nos animais hipoprotéicos (Figura 9).

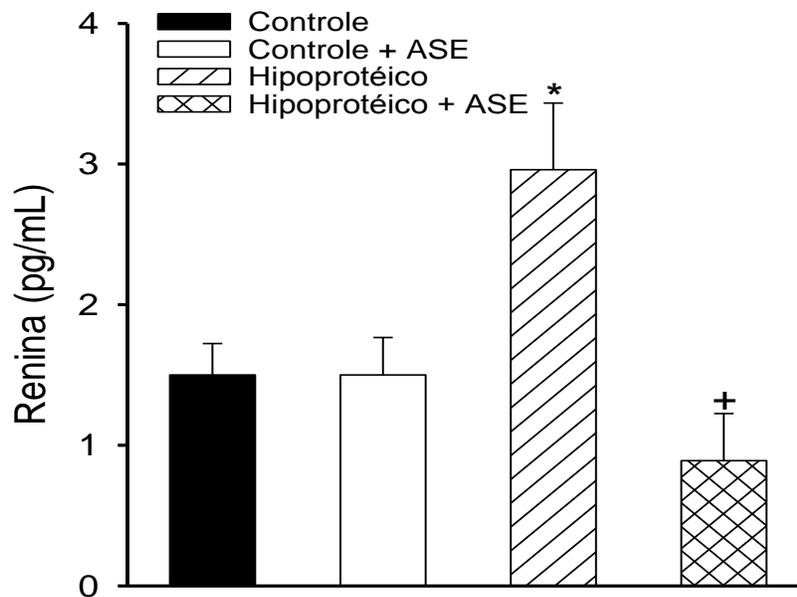


Figura 9: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre os níveis de renina plasmática, em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=6$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.5 Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em LAM

A acetilcolina produziu uma resposta vasodilatadora dose-dependente que foi significativamente ($p < 0,05$) menor em LAM isolado de animais hipoprotéicos, quando comparada ao controle. O tratamento com ASE aumentou significativamente ($p < 0,05$) a resposta vasodilatadora da acetilcolina em animais hipoprotéicos (Figura 10).

Doses	Controle	Controle + ASE	Hipoprotéico	Hipoprotéico + ASE
1 pmol	13 ± 0,8	15 ± 1,9	9 ± 1,0	13 ± 0,8
10 pmol	31 ± 1,4	40 ± 4,1	20 ± 2,8	38 ± 3,6
100 pmol	55 ± 2,5	60 ± 3,5	44 ± 4,5	60 ± 3,2
1000 pmol	72 ± 2,2	74 ± 2,0	55 ± 6,0	71 ± 4,1

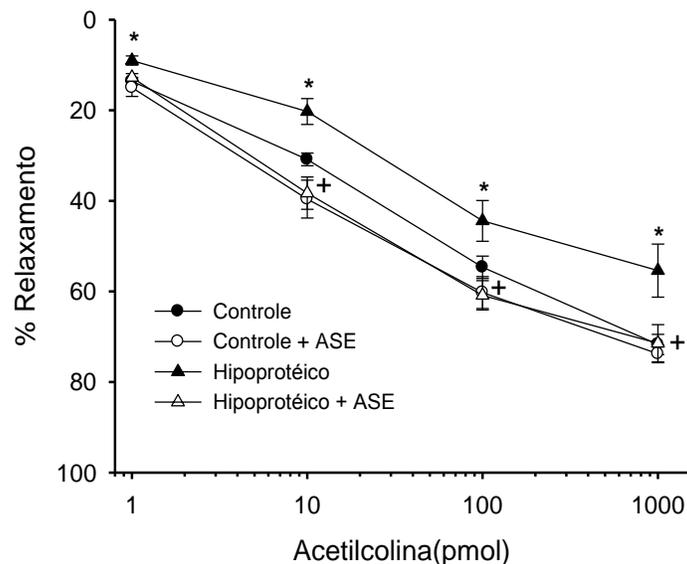


Figura 10: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre a resposta vasodilatadora da acetilcolina em leito arterial mesentérico, em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média ± erro padrão; n=8 para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.6 Efeito do tratamento com ASE sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em LAM

Não houve alteração na resposta vasodilatadora induzida pela NG em LAM dos animais dos diferentes grupos estudados (Figura 11).

Doses	Controle	Controle + ASE	Hipoprotéico	Hipoprotéico + ASE
1 pmol	18 ± 3,0	15 ± 3,0	10 ± 0,8	17 ± 1,8
10 pmol	25 ± 2,8	27 ± 1,7	18 ± 1,0	26 ± 2,9
100 pmol	44 ± 2,7	45 ± 2,6	36 ± 3,1	38 ± 3,3
1000 pmol	71 ± 1,5	68 ± 2,0	65 ± 3,0	67 ± 3,1

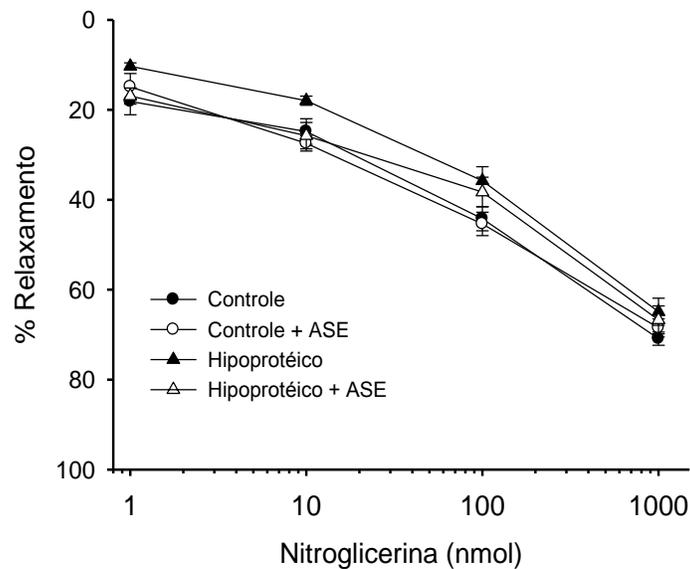


Figura 11: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre a resposta vasodilatadora da nitroglicerina em leito arterial mesentérico, em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média ± erro padrão; n=8 para todos os grupos. * p<0,05 em relação ao grupo controle e + p<0,05 em relação ao grupo hipoprotéico.

4.7 Efeito do Tratamento com ASE sobre os ensaios pró-oxidantes

4.7.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na formação de subprodutos (malondialdeído-MDA) da peroxidação lipídica em amostras de plasma e tecido renal de animais hipoprotéicos com dezesseis semanas de vida, prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação, quando comparado com os animais controles (Figura 12). O tratamento com ASE diminuiu significativamente ($p < 0,05$) os níveis plasmáticos de MDA nos animais hipoprotéicos (**Plasma:** controle: $1,3 \pm 0,1$ nmol TBA/mg ptn; controle + ASE: $1,0 \pm 0,1$ nmol TBA/mg ptn; hipoprotéico: $7,1 \pm 1,1$ nmol TBA/mg ptn; hipoprotéico + ASE: $1,9 \pm 0,7$ nmol TBA/mg ptn; **Rim direito:** controle: $0,4 \pm 0,1$ nmol TBA/mg ptn; controle + ASE: $0,2 \pm 0,1$ nmol TBA/mg ptn; hipoprotéico: $1,7 \pm 0,3$ nmol TBA/mg ptn; hipoprotéico + ASE: $0,9 \pm 0,2$ nmol TBA/mg ptn).

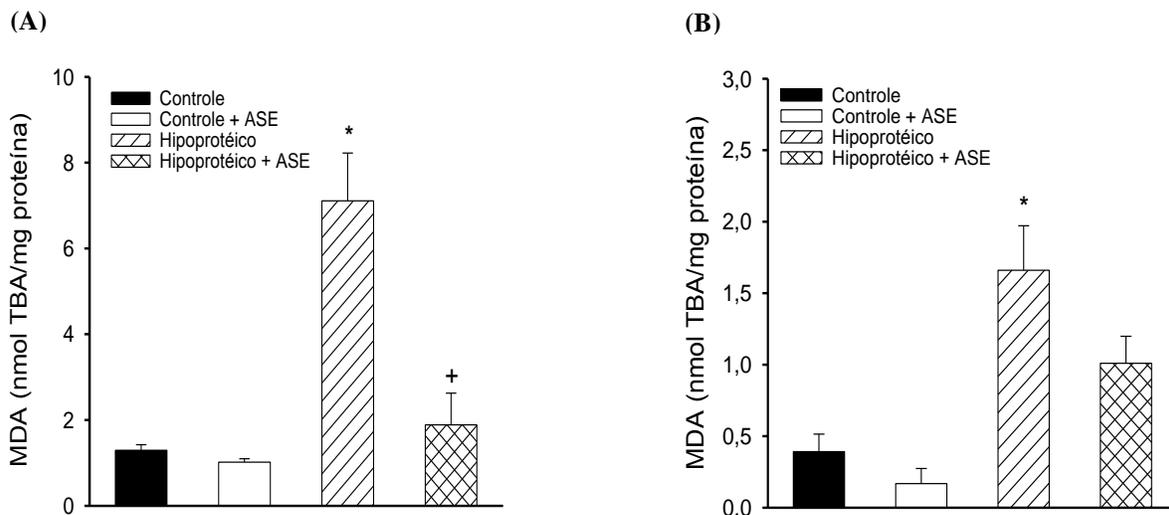


Figura 12: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre os níveis de TBARS em amostras de plasma (A) e rim direito (B), em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=8$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.7.2 Carbonilação de proteínas

Foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na carbonilação de proteínas em amostras de plasma e tecido renal de animais hipoprotéicos quando comparados com os animais controles (Figura 13). O tratamento com ASE diminuiu significativamente ($p < 0,05$) a carbonilação de proteínas nos animais hipoprotéicos (**Plasma:** controle: $0,001 \pm 0,0001$ nmol Carbonil/mg ptn; controle + ASE: $0,001 \pm 0,0002$ nmol Carbonil/mg ptn; hipoprotéico: $0,003 \pm 0,0006$ nmol Carbonil/mg ptn; hipoprotéico + ASE: $0,002 \pm 0,0002$ nmol Carbonil/mg ptn; **Rim direito:** controle: $0,001 \pm 0,0001$ nmol Carbonil/mg ptn; controle + ASE: $0,0018 \pm 0,0002$ nmol Carbonil/mg ptn; hipoprotéico: $0,004 \pm 0,0003$ nmol Carbonil/mg ptn; hipoprotéico + ASE: $0,0022 \pm 0,0004$ nmol Carbonil/mg ptn).

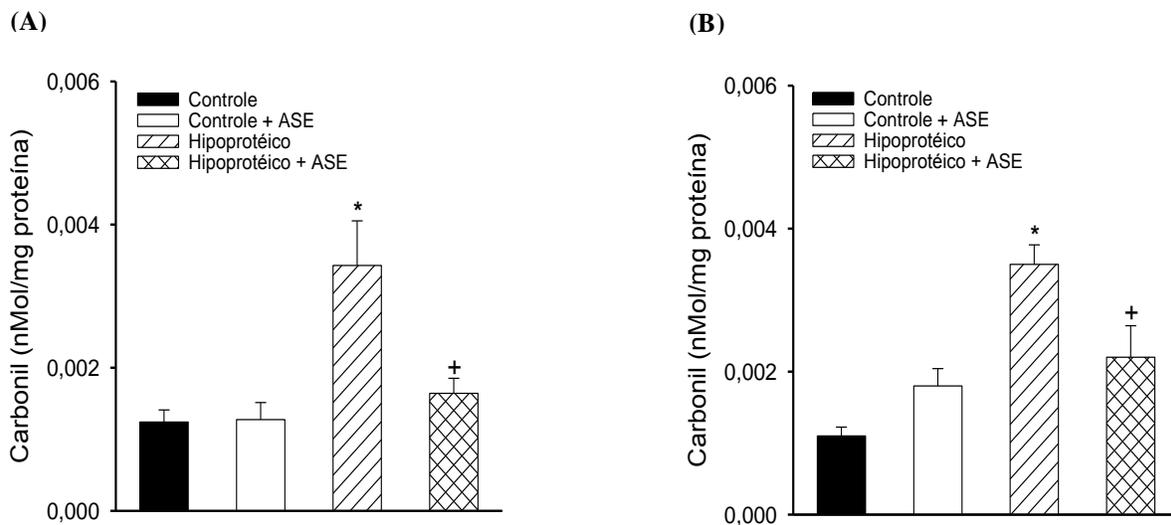


Figura 13: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre a carbonilação de proteínas em amostras de plasma (A) e rim direito (B), em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=8$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e † $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.8 Efeito do tratamento com ASE sobre as enzimas antioxidantes

4.8.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi significativamente ($p < 0,05$) menor em amostras de plasma e tecido renal dos animais hipoprotéicos, quando comparados aos controles (Figura 14). O tratamento com ASE aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade desta enzima na amostra de plasma dos animais hipoprotéicos. Entretanto a atividade da SOD no tecido renal não apresentou diferença significativa entre o hipoprotéico e o hipoprotéico tratado. (**Plasma:** controle: $71 \pm 3,0$ U/mg ptn; controle + ASE: $76 \pm 0,5$ U/mg ptn; hipoprotéico: $49 \pm 7,0$ U/mg ptn; hipoprotéico + ASE: $69 \pm 0,8$ U/mg ptn; **Rim direito:** controle: 42 ± 4 U/mg ptn; controle + ASE: 79 ± 6 U/mg ptn; hipoprotéico: $10 \pm 1,8$ U/mg ptn; hipoprotéico + ASE: $24 \pm 6,3$ U/mg ptn).

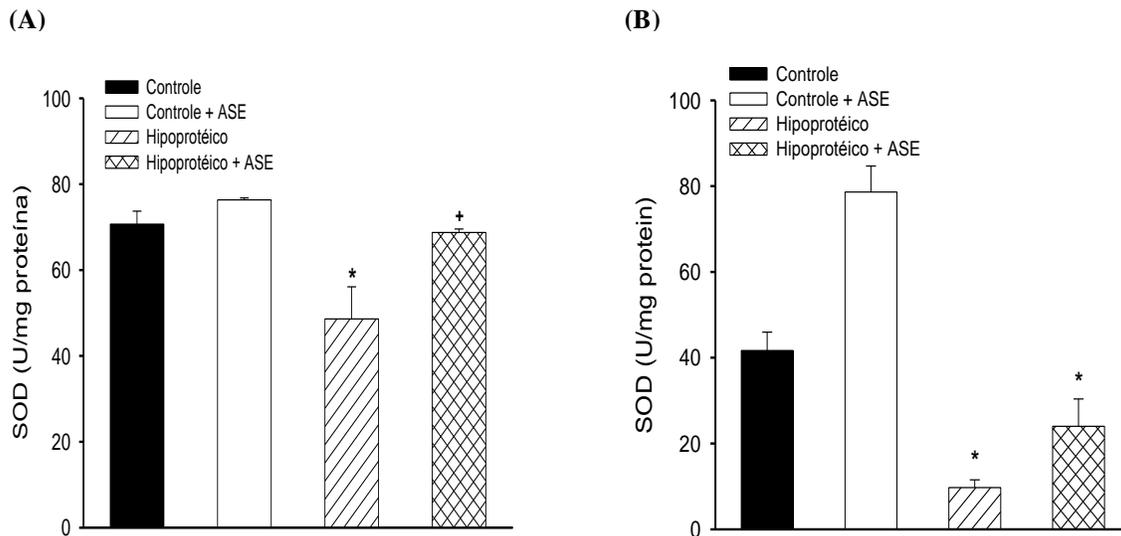


Figura 14: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre a atividade da enzima SOD em amostras de plasma (A) e rim direito (B), em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=8$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.8.2 Catalase

Não houve alteração na atividade da catalase nas amostras de plasma e de tecido renal (Figura 15). (**Plasma:** controle: $0,1 \pm 0,03 \mu\text{mol/mg ptn}$; controle + ASE: $0,1 \pm 0,01 \mu\text{mol/mg ptn}$; hipoprotéico: $0,07 \pm 0,007 \mu\text{mol/mg ptn}$; hipoprotéico + ASE: $0,1 \pm 0,02 \mu\text{mol/mg ptn}$; **Rim direito:** controle: $1,3 \pm 0,08 \mu\text{mol/mg ptn}$; controle + ASE: $1,3 \pm 0,08 \mu\text{mol/mg ptn}$, hipoprotéico: $1,5 \pm 0,08 \mu\text{mol/mg ptn}$; hipoprotéico + ASE: $1,5 \pm 0,14 \mu\text{mol/mg ptn}$).

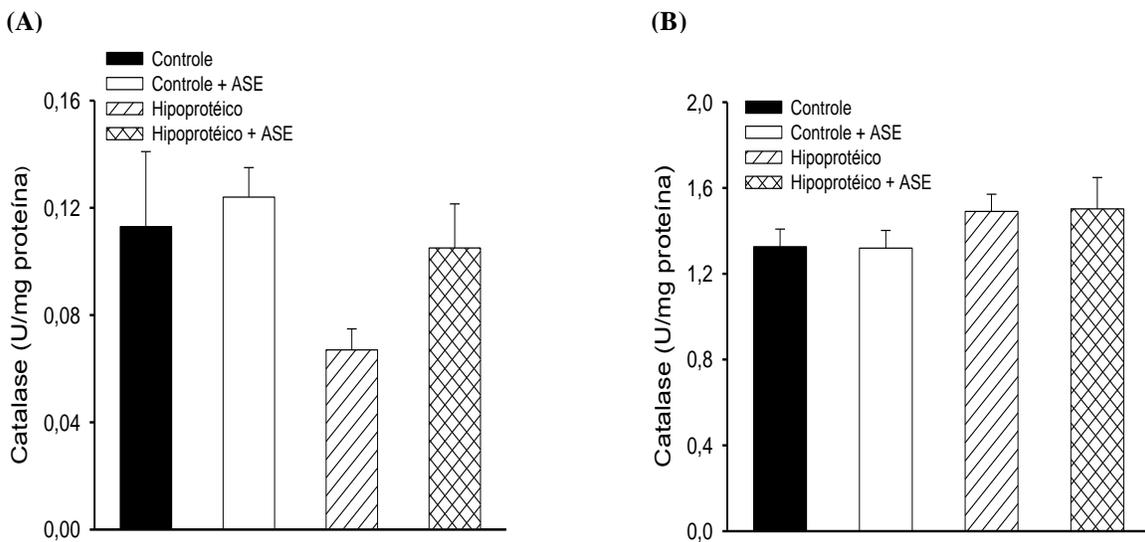


Figura 15: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre a atividade da enzima catalase em amostras de plasma (A) e rim direito (B), em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; n=8 para todos os grupos.

4.8.3 Glutationa peroxidase (GPx)

A atividade da enzima GPx foi significativamente ($p < 0,05$) menor em amostras de plasma dos animais hipoprotéicos, quando comparados com as de animais controles (Figura 16). O tratamento com ASE aumentou significativamente ($p < 0,05$) a atividade dessa enzima no plasma dos animais hipoprotéicos. Não houve alteração da atividade da GPx no tecido renal (**Plasma:** controle: $0,017 \pm 0,002$ U/mg ptn; controle + ASE: $0,018 \pm 0,002$ U/mg ptn; hipoprotéico: $0,014 \pm 0,001$ U/mg ptn; hipoprotéico + ASE: $0,017 \pm 0,002$ U/mg ptn; **Rim direito:** controle: $0,031 \pm 0,002$ U/mg ptn; controle + ASE: $0,034 \pm 0,004$ U/mg ptn; hipoprotéica: $0,026 \pm 0,004$; hipoprotéica + ASE: $0,035 \pm 0,001$ U/mg ptn).

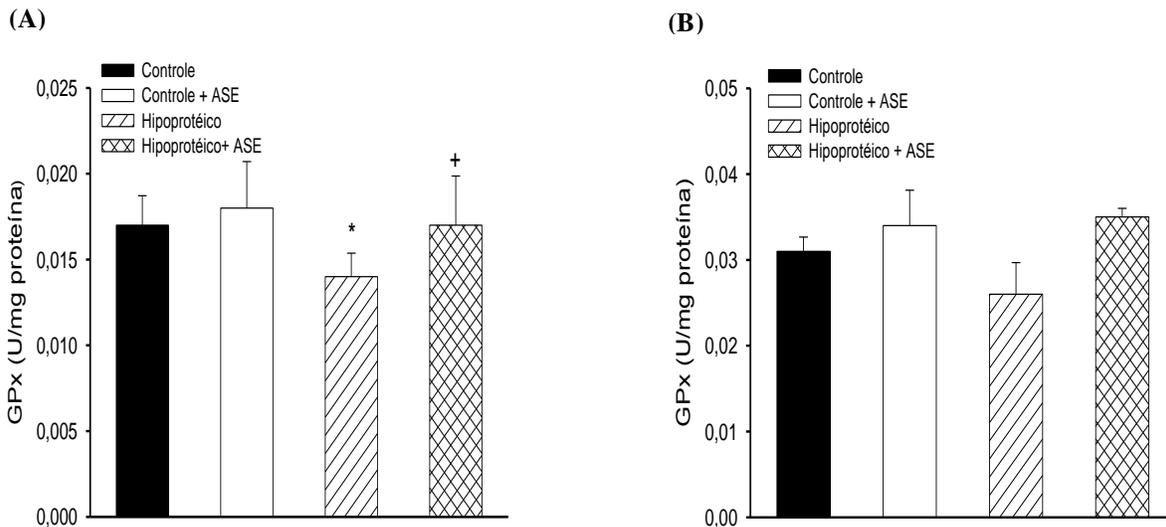


Figura 16: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre a atividade da enzima GPx em amostras de plasma (A) e rim direito (B), em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=8$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.9 Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de nitrito

Os níveis de nitrito foram significativamente ($p < 0,05$) reduzidos no plasma e no tecido renal dos animais do grupo hipoprotéico, quando comparado com o controle e o tratamento com ASE aumentou significativamente ($p < 0,05$) esses níveis no tecido renal (Figura 17). (**Plasma:** controle: $9,55 \pm 0,36 \mu\text{mol/mg ptn}$; controle + ASE: $11,8 \pm 1,18 \mu\text{mol/mg ptn}$; hipoprotéico: $6,81 \pm 0,39 \mu\text{mol/mg ptn}$; hipoprotéico + ASE: $8,24 \pm 0,84 \mu\text{mol/mg ptn}$; **Rim direito:** controle: $333,3 \pm 51,3 \mu\text{mol/mg ptn}$; controle + ASE: $292,1 \pm 19,4 \mu\text{mol/mg ptn}$; hipoprotéico: $209 \pm 10,2 \mu\text{mol/mg ptn}$; hipoprotéico + ASE: $379,4 \pm 23,1 \mu\text{mol/mg ptn}$).

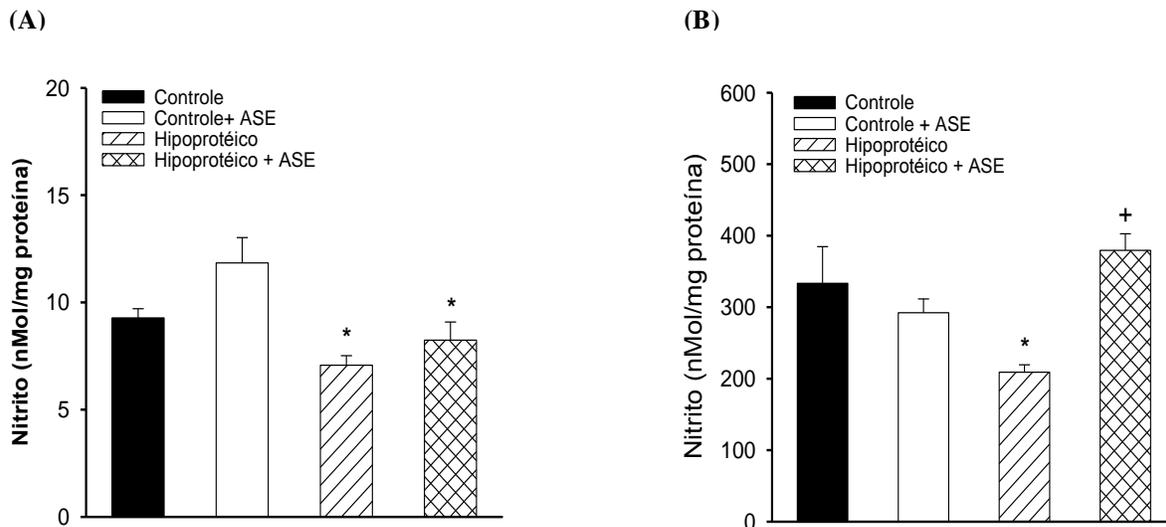


Figura 17: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre o conteúdo total de nitrito em amostras de plasma (A) e rim direito (B), em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=8$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.10 Efeito do tratamento com ASE sobre a glicemia e a resistência à insulina

Os níveis plasmáticos de glicose foram significativamente ($p < 0,05$) maiores no grupo hipoprotéico, em relação aos demais grupos. O tratamento com ASE promoveu a manutenção da glicemia ($p < 0,05$) nos animais hipoprotéicos (Figura 18A); (Controle: $84,6 \pm 1,33$ mg/dL; controle + ASE: $80,6 \pm 2,0$ mg/dL; hipoprotéico: $98,7 \pm 2,9$ mg/dL; hipoprotéico + ASE: $88,6 \pm 2,8$ mg/dL).

Os níveis de insulina encontram-se aumentados ($p < 0,05$) no grupo hipoprotéico, quando comparado com os controles. O tratamento com ASE reduziu ($p < 0,05$) o aumento da liberação de insulina no grupo hipoprotéico (Controle: $0,38 \pm 0,02$ μ U/mL; Controle+ASE: $0,12 \pm 0,02$ μ U/mL; Hipoprotéico: $0,48 \pm 0,08$ μ U/mL; Hipoprotéico + ASE: $0,22 \pm 0,03$ μ U/mL) (Figura 18B).

A RI determinada pelo índice de HOMA foi observada no grupo hipoprotéico, quando comparado aos controles ($p < 0,05$) e o tratamento normalizou a resposta ($p < 0,05$) (Controle: $0,078 \pm 0,018$; Controle + ASE: $0,12 \pm 0,022$; Hipoprotéico: $0,48 \pm 0,08$; Hipoprotéico + ASE: $0,22 \pm 0,03$) (Figura 18C).

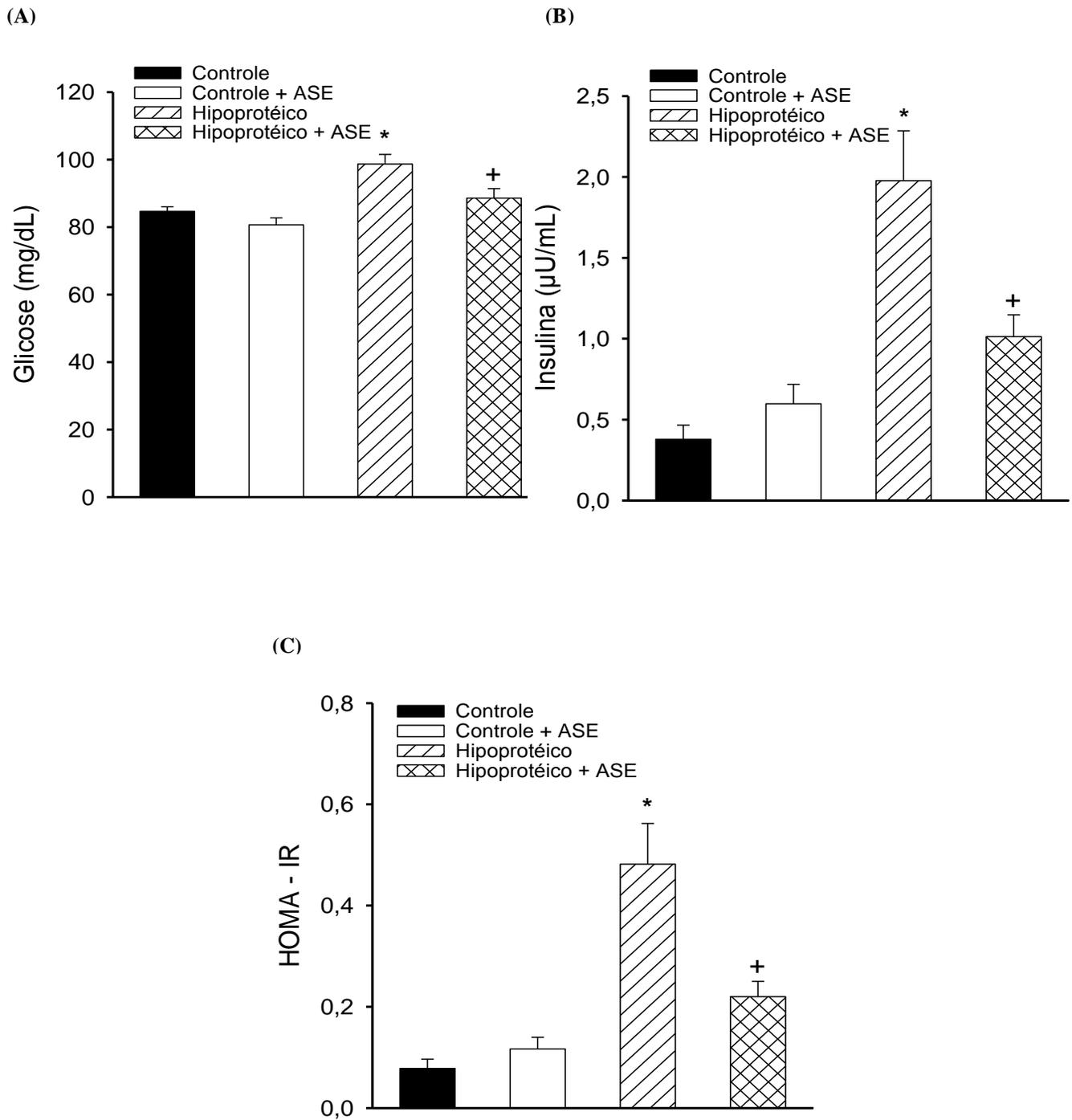


Figura 18: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre os níveis glicêmicos (A), insulina (B) e resistência à insulina (C) em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; n=6 para todos os grupos. * p<0,05 em relação ao grupo controle e + p<0,05 em relação ao grupo hipoprotéico.

4.11 Efeito do tratamento com ASE sobre o perfil lipídico

Os níveis séricos de triglicerídeos foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos animais hipoprotéicos quando comparados com os controles e o tratamento com ASE reduziu significativamente ($p < 0,05$) esses níveis no grupo hipoprotéico (Controle: $20,8 \pm 7,8$ mg/dL; Controle + ASE: $37,3 \pm 4,0$ mg/dL; Hipoprotéico: $64,5 \pm 5,5$ mg/dL; Hipoprotéico + ASE: $22,2 \pm 5,5$ mg/dL) (Figura 19A).

Os níveis séricos de colesterol total foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos animais hipoprotéicos quando comparados com os controles e o tratamento com ASE reduziu significativamente ($p < 0,05$) esses níveis no grupo hipoprotéico (Controle: $57,0 \pm 2,0$ mg/dL; Controle + ASE: $54,8 \pm 3,6$ mg/dL; Hipoprotéico: $74,3 \pm 2,9$ mg/dL; Hipoprotéico + ASE: $49,5 \pm 3,3$ mg/dL) (Figura 19B).

Os níveis séricos de colesterol de alta densidade (HDL) não foram diferentes nos animais estudados (Controle: $7,1 \pm 0,4$ mg/dL; Controle + ASE: $6,7 \pm 0,3$ mg/dL; Hipoprotéico: $6,4 \pm 0,3$ mg/dL; Hipoprotéico + ASE: $7,9 \pm 0,4$ mg/dL) (Figura 19C).

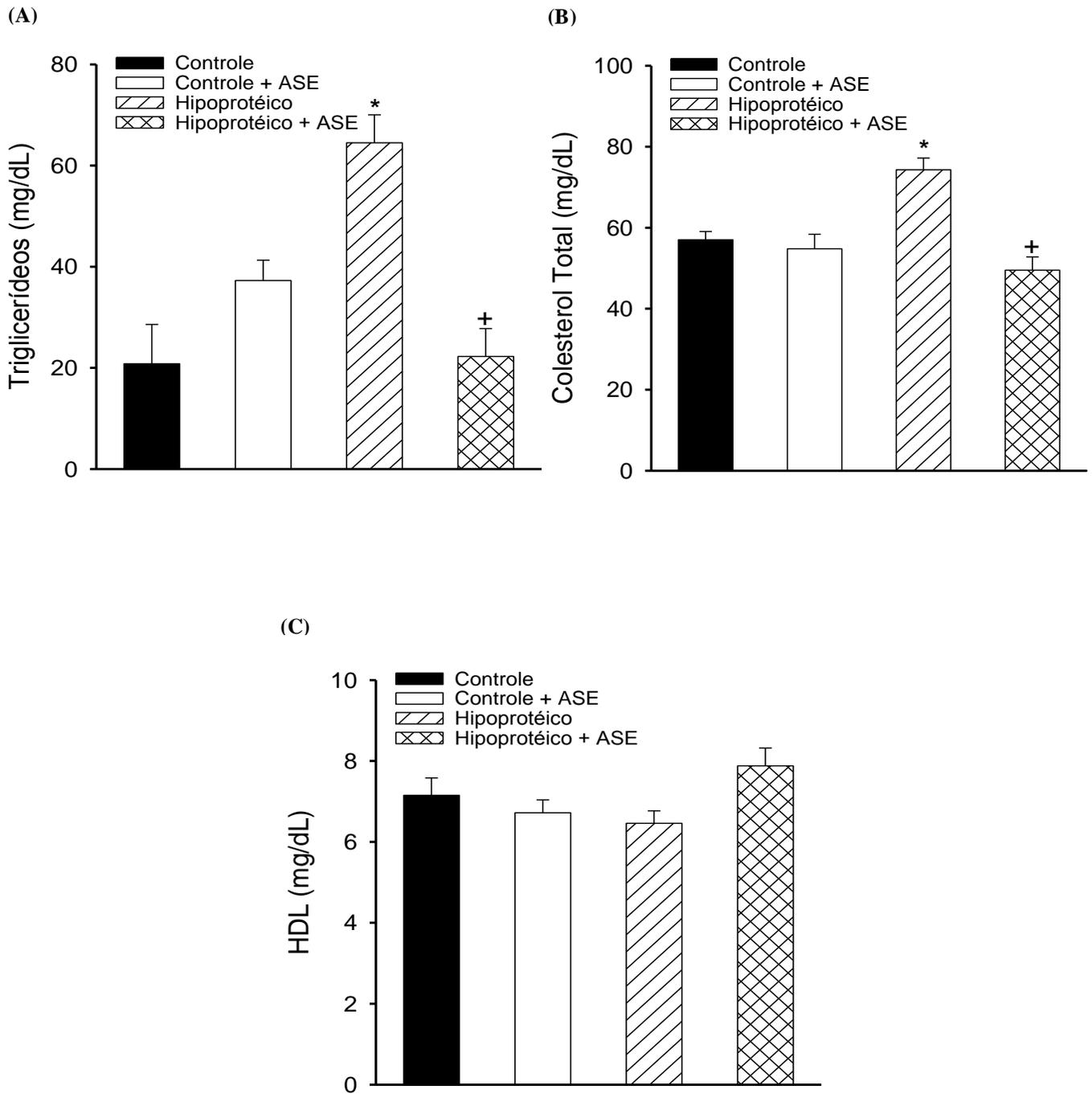


Figura 19: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre os níveis de triglicerídeos (A), colesterol total (B) e HDL (C) em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=8$ para todos os grupos. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle e † $p<0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.12 Efeito do tratamento com ASE sobre a proteinúria

Os níveis de proteína excretada na urina foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos animais hipoprotéicos, quando comparados com os controles e o tratamento com ASE não alterou significativamente este parâmetro (Controle: $0,01 \pm 0,006$ mg; Controle + ASE: $0,008 \pm 0,005$ mg; Hipoprotéico: $0,046 \pm 0,02$ mg; Hipoprotéico + ASE: $0,017 \pm 0,002$ mg) (Figura 20).

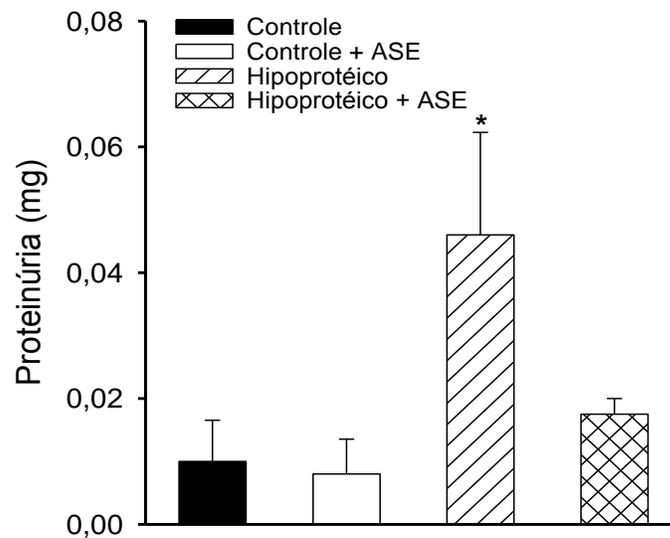


Figura 20: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre os níveis de proteínas excretadas na urina em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=5$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.13 Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis séricos de potássio, sódio, a excreção fracionada de sódio, depuração de creatinina e volume urinário

Não foram observadas diferenças significativas nos níveis séricos de sódio, na depuração de creatinina e no volume médio urinário (Tabela 2). Os níveis séricos de potássio foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos animais hipoprotéicos quando comparado ao grupo controle tratado (Tabela 2). O percentual de excreção fracionada de sódio foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos animais hipoprotéicos, quando comparados aos controles e o tratamento com reduziu significativamente ($p < 0,05$) esses níveis (Figura 21).

Tabela 2: Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis séricos de sódio (Na^+) e potássio (K^+), depuração de creatinina (Clcr) e sobre o volume urinário.

Grupos	Na^+ (mM)	K^+ (mM)	Clcr/100g (mL/min)	Vol. Urinário (mL)
Controle	$129,6 \pm 4,1$	$3,6 \pm 0,18$	$0,115 \pm 0,03$	$13,06 \pm 3,9$
Controle+ASE	$121,8 \pm 1,4$	$3,3 \pm 0,05$	$0,184 \pm 0,84$	$16,64 \pm 5,9$
Hipoprotéico	$127 \pm 6,9$	$4,1 \pm 0,24^*$	$0,034 \pm 0,005$	$8,12 \pm 0,85$
Hipo + ASE	$137,6 \pm 3,6$	$3,6 \pm 0,09$	$0,09 \pm 0,033$	$10,67 \pm 1,7$

Valores estão expressos em média \pm erro padrão $n=5$ animais para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle + ASE.

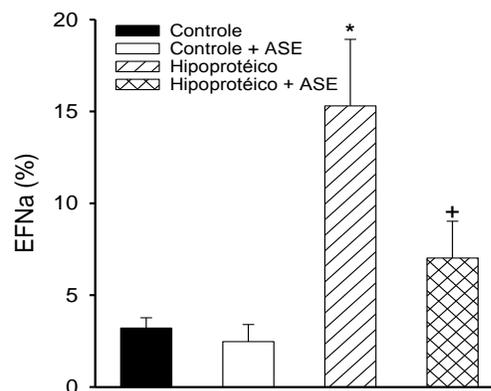


Figura 21: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre os níveis EFNa em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=5$ para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.14 Efeito do tratamento com ASE sobre os níveis de albumina, creatinina e uréia.

Os níveis séricos de albumina foram significativamente reduzidos ($p < 0,05$) no grupo hipoprotéico, quando comparado aos controles e o tratamento com ASE aumentou significativamente ($p < 0,05$) esses níveis (Controle: $3,03 \pm 0,05$ mg/dL; Controle + ASE: $3,09 \pm 0,005$ mg/dL; Hipoprotéico: $2,37 \pm 0,04$ mg/dL; Hipoprotéico + ASE: $3,11 \pm 0,043$ mg/dL) (Figura 22A).

Os níveis séricos de creatinina foram significativamente aumentados ($p < 0,05$) no grupo hipoprotéico, quando comparado aos controles e o tratamento com ASE reduziu significativamente ($p < 0,05$) esses níveis (Controle: $0,66 \pm 0,08$ mg/dL; Controle + ASE: $0,91 \pm 0,05$ mg/dL; Hipoprotéico: $1,42 \pm 0,05$ mg/dL; Hipoprotéico + ASE: $0,85 \pm 0,1$ mg/dL) (Figura 22B).

Os níveis séricos de uréia foram significativamente aumentados ($p < 0,05$) no grupo hipoprotéico, quando comparado aos controles e o tratamento com ASE reduziu significativamente ($p < 0,05$) esses níveis (Controle: $7,16 \pm 1,8$ mg/dL; Controle + ASE: $4,27 \pm 1,1$ mg/dL; Hipoprotéico: $26,2 \pm 6,9$ mg/dL; Hipoprotéico + ASE: $7,21 \pm 2,7$ mg/dL) (Figura 22C).

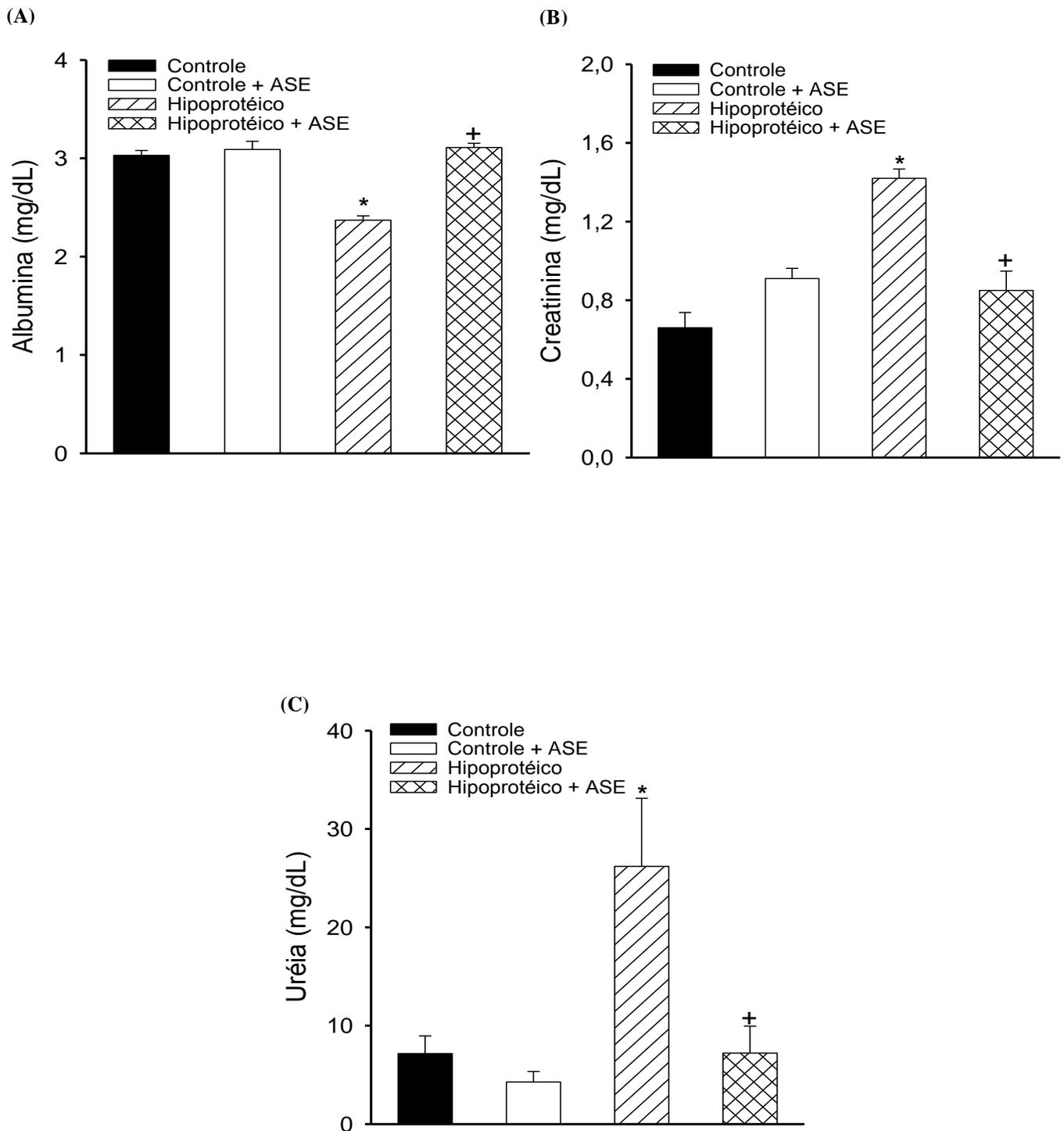


Figura 22: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/kg/dia) sobre os níveis de albumina (A), creatinina (B) e uréia (C) em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Valores estão expressos em média \pm erro padrão; $n=8$ para todos os grupos. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle e † $p<0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

4.15 Efeito do tratamento com ASE sobre a morfologia renal

O número dos glomérulos renais foi significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo hipoprotéico, quando comparado aos controles e o tratamento com ASE aumentou significativamente ($p < 0,05$) o número de glomérulos (**Número de Glomérulos:** Controle: $5,86 \pm 0,27$; Controle + ASE: $5,64 \pm 0,26$; Hipoprotéico: $3,25 \pm 0,12$; Hipoprotéico + ASE: $4,65 \pm 0,12$) (Figura 23).

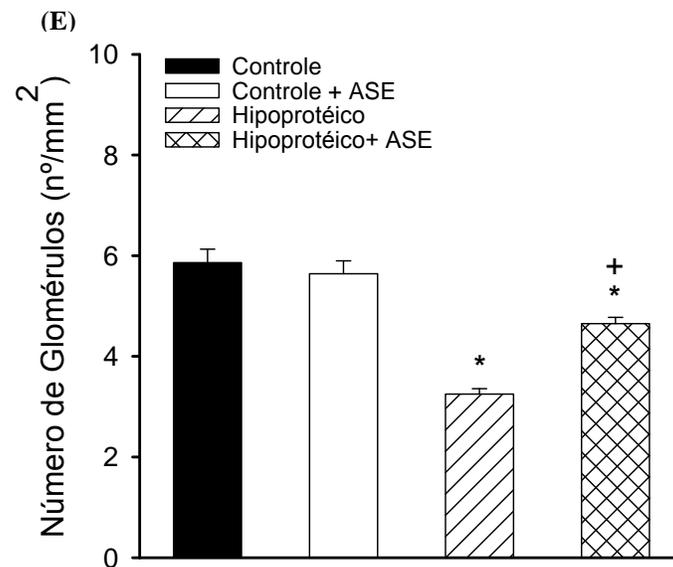
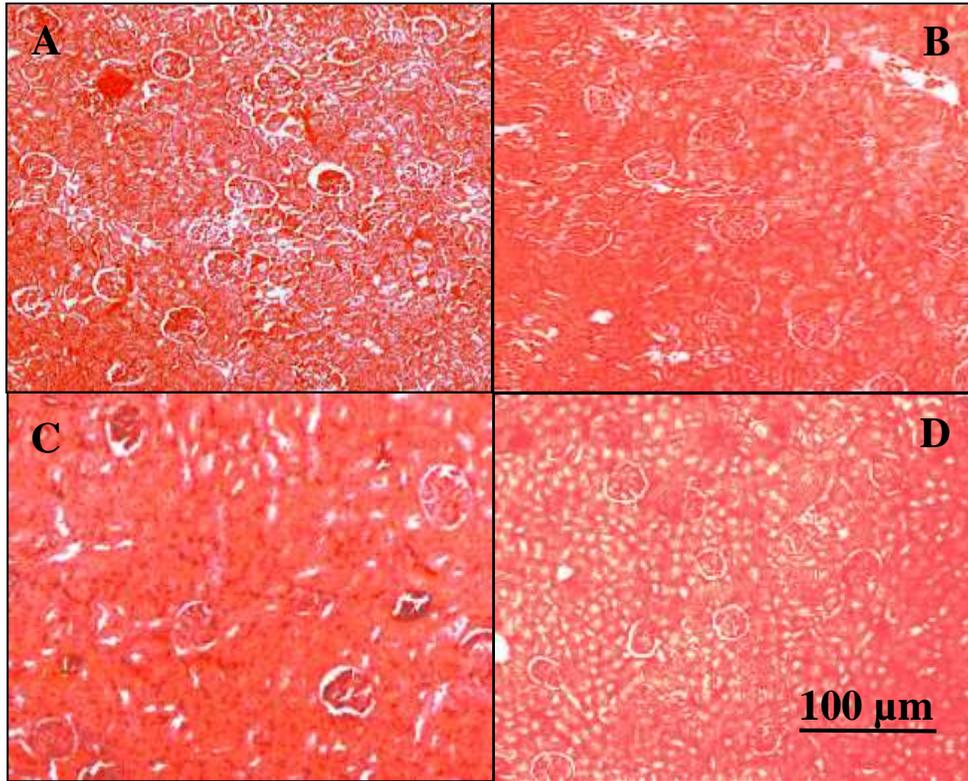


Figura 23: Efeito do tratamento (gestação-21 dias) com ASE (200 mg/Kg/dia) sobre o número de glomérulos renais em animais machos com 4 meses da prole de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação. Controle (A); Controle + ASE (B); Hipoprotéico (C); Hipoprotéico + ASE (D) e o Número de Glomérulos (E). Valores estão expressos em média \pm erro padrão; n=6 para todos os grupos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e + $p < 0,05$ em relação ao grupo hipoprotéico.

5 DISCUSSÃO

A hipótese da origem fetal propõe que alterações nutricionais e endócrinas no período fetal, resultam em adaptações permanentes da estrutura, fisiologia e metabolismo, predispondo os indivíduos a um maior risco de desenvolverem doenças cardiovasculares, metabólicas e endócrinas na idade adulta (Barker, 1995; Godfrey & Barker, 2000; Calkins & Devaskar, 2011). Este estudo avaliou o papel do período gestacional e o efeito do tratamento com o extrato hidroalcoólico do caroço do açaí (ASE) nas alterações cardiovasculares, metabólicas, morfológicas e do estresse oxidativo em um modelo animal de programação metabólica empregando alimentação com déficit de proteínas durante a gestação.

No presente estudo foi observado que uma dieta com restrição de proteínas durante a gestação imprime alterações funcionais na prole adulta como: a hipertensão arterial, disfunção endotelial, o estresse oxidativo, RI, proteinúria, aumento dos níveis de colesterol, triglicerídeos, creatinina, uréia EFNa; redução da albumina, do NO, do número de glomérulos renais e do peso e comprimento corporal nas primeiras semanas de vida. Pela primeira vez, mostramos os benefícios do tratamento com ASE, sobre esse modelo de programação. O ASE preveniu a hipertensão e a disfunção endotelial, protegeu contra o estresse oxidativo e promoveu alterações benéficas nos parâmetros metabólicos e morfológicos estudados.

No modelo experimental estudado foi evidenciada uma redução do peso corporal nos animais do grupo hipoprotéico nas primeiras semanas de vida, como encontrado por estudos de outros grupos (Mesquita *et al.*, 2010; Pires *et al.*, 2006; Swali *et al.*, 2010). O tratamento com ASE promoveu um aumento significativo no peso dos animais. Resultados semelhantes foram encontrados para o comprimento rostro-anal nos grupos experimentais. Alguns trabalhos demonstram que o baixo índice ponderal ao nascer (peso e comprimento) pode estar relacionado a tolerância à glicose na infância, ao desenvolvimento do DM2 na idade adulta (Langley-Evans & McMullen, 2010) e ao aumento da PA na idade adulta (Barker, 1998).

A exposição à dieta com restrição de proteínas durante a gestação levou ao aumento da PAS na prole adulta, com dezesseis semanas de vida (Mesquita *et al.*, 2010; Langley-Evans *et al.*, 1994). O transporte de glicocorticóides maternos através da placenta parece ser um fator importante na determinação da PA (Van Den Berg *et al.*, 1990), o excesso dos mesmos pode suprimir o desenvolvimento das glândulas supra-renais fetais, por inibir a secreção do ACTH, reduzindo dessa forma o crescimento e a esteroidogênese adrenal, ocasionando a supressão do

eixo HPA na fase adulta (Benediktsson *et al.*, 1993). Outras hipóteses seriam o desenvolvimento renal alterado com redução no número de glomérulos (Pires *et al.*, 2006) e a alteração no sistema renina angiotensina (Mesquita *et al.*, 2010) evidenciadas pelo aumento da atividade de renina e da enzima conversora de angiotensina (ECA) (Sherman & Langley-Evans, 1998).

O efeito anti-hipertensivo do ASE, extrato rico em polifenóis deve ser provavelmente induzido pela vasodilatação dependente do endotélio, efeito este mediado pelo NO e pelo EDHF (Rocha *et al.*, 2007). O efeito anti-hipertensivo observado neste estudo corrobora com resultados previamente publicados pelo nosso grupo em outro modelo de hipertensão (Rocha *et al.*, 2008), mas o resultado do presente estudo sugere, pela primeira vez, que o consumo de ASE durante a gestação confere proteção contra a programação da hipertensão, neste modelo animal.

No modelo de restrição protéica materna o estabelecimento e a manutenção da hipertensão tem sido associados à intensificação da atividade do sistema renina-angiotensina. Sendo demonstrado através da administração de doses de captopril (inibidor da ECA), em ratos jovens oriundos de mães que consumiram dieta hipoprotéica durante a gestação, contribuindo para a redução da PA (Sherman & Langley-Evans, 1998) e com o uso de nifedipina (antagonista de canais de cálcio) não foram observadas alterações nesse parâmetro (Sherman & Langley-Evans, 2000), sugerindo que a hipertensão neste modelo pode estar sendo mediada pelo sistema renina-angiotensina. Também foi evidenciado um aumento da expressão de receptores AT₁ e redução da expressão dos receptores AT₂ em ratos jovens; assim como um aumento da sensibilidade glomerular à angiotensina II, fatores esses que contribuem para o aumento da PAS (Sahajpal & Ashton, 2003). Nossos resultados mostram um aumento nos níveis de renina plasmática nos animais hipoprotéicos com dezesseis semanas de vida, este parâmetro é dependente do tempo de vida e do percentual de restrição utilizado. Alguns estudos têm demonstrado que nas primeiras semanas de vida ocorre um aumento da expressão gênica de renina (Woods *et al.*, 2001) e outros observaram que a atividade da renina está discretamente aumentada em tecido renal de animais hipoprotéicos com quatro semanas (Sahajpal & Ashton, 2005). O presente estudo possibilitou a observação de que machos com dezesseis semanas de vida da prole de ratas submetidas a dieta hipoprotéica (6% de proteínas), possuem aumento dos níveis renina plasmática, demonstrando que possivelmente uma restrição protéica mais severa e o envelhecimento estão associados ao aumento desses níveis. O tratamento crônico com ASE reduziu significativamente os níveis de renina plasmática nos animais hipoprotéicos.

Alguns estudos experimentais demonstraram que a hipertensão e a disfunção vascular induzidas por uma dieta materna com pouca proteína, são mais pronunciadas nos machos do que nas fêmeas (Franco *et al.*, 2002; Ozaki *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 2005). A disfunção endotelial caracteriza-se pela redução da vasodilatação e tem sido relatada em pequenas artérias mesentéricas e em anéis de aorta torácica da prole de ratas submetidas a dieta hipoprotéica (Torrens *et al.*, 2009; Sathishkumar *et al.*, 2009). Nossos resultados mostraram que o efeito vasodilatador dependente do endotélio promovido pela ACh foi significativamente menor no grupo hipoprotéico. O tratamento com ASE aumentou significativamente este efeito no grupo H+ASE. No entanto, não observamos alterações significativas na vasodilatação independente do endotélio promovida pela nitroglicerina nos animais estudados. Resultado semelhante ao encontrado em outros modelos experimentais desenvolvidos por nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2007). Desta forma, podemos sugerir que a liberação de NO pelas células endoteliais induzida pelo ASE, como foi demonstrado em cultura de células endoteliais (Rocha *et al.*, 2008), assim como seu efeito antioxidante observado em estudos experimentais do nosso grupo (Moura *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2008) e neste trabalho, podem contribuir para a melhora da função endotelial, provavelmente por aumentar a biodisponibilidade do NO. Além disso, existem evidências de que os polifenóis são capazes de modular a produção de NO do endotélio vascular, contribuindo para a prevenção da disfunção endotelial (Curin & Andriantsitohaina, 2005).

Dados que reforçam esta hipótese são os níveis de nitrito plasmáticos e renais, ambos reduzidos no grupo hipoprotéico deste modelo experimental. Indicando diminuição da biodisponibilidade do NO, contribuindo para o desenvolvimento da disfunção endotelial e o aumento da pressão arterial. A recuperação dos níveis de nitrito pelo tratamento com ASE demonstra a participação dos polifenóis presentes neste extrato, sobre a disponibilidade de NO. Dados publicados pelo nosso grupo sugerem que os polifenóis presentes no açaí apresentam propriedades vasodilatadora (Rocha *et al.*, 2007), anti-hipertensiva (Rocha *et al.*, 2008) e antioxidante (Moura *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2010, Rocha *et al.*, 2008), o que poderia estar contribuindo para o efeito benéfico do ASE.

Existem evidências de que proles de ratas submetidas à dieta hipoprotéica durante a gestação possuem atividade e expressão da eNOS alteradas, gerando diminuição da produção de NO (Franco *et al.*, 2002). A tetrahidrobiopterina é um importante co-fator para a atividade da

eNOS e possui atividade antioxidante, através da remoção de EROs (Thöny *et al.*, 2000; katusic, 2001; Sathishkumar *et al.*, 2009). A produção de NO mediada pela eNOS pode estar reduzida, quando ocorre deficiência desse co-fator da enzima ou do seu substrato a L-arginina (Vasquez-Vivar *et al.*, 1998). A oxidação da tetrahidrobiopterina pelo peroxinitrito, pode levar ao desacoplamento da eNOS, isso ocorre quando há um aumento de ânion superóxido (Michel. & Vanhoutte, 2010).

O estresse oxidativo representa um desequilíbrio entre a geração e a remoção de espécies reativas no meio celular, super produção de agentes oxidantes que sobrecarregam a capacidade antioxidante (Grossman, 2008). Este processo favorece a ocorrência de ataques dessas espécies reativas a componentes celulares, principalmente os lipídeos. Desta forma, a peroxidação lipídica provoca dano tecidual, que está relacionado com a patogênese de várias doenças, entre elas a hipertensão (Costa *et al.*, 2009).

Uma dieta inadequada com deficiência de micronutrientes, vitaminas, minerais e proteínas pode prejudicar a capacidade antioxidante celular. Tendo as proteínas um papel de destaque por fornecerem os aminoácidos necessários para a síntese das enzimas antioxidantes (Luo *et al.*, 2006; Al-Gubory *et al.*, 2010). Alguns estudos indicam que a restrição protéica materna durante a gestação e a lactação induz dano oxidativo na prole, pelo aumento da peroxidação dos lipídeos de membrana e por alterações no sistema de defesa antioxidante (Huang & Fwu, 1993; Fetoui *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2010).

Nossos resultados demonstram um aumento significativo nos níveis de malondialdeído em amostras de plasma e rim direito dos animais hipoprotéicos, caracterizando um aumento da peroxidação lipídica neste modelo de programação. O tratamento com ASE reduziu os níveis de malondialdeído nestas amostras nos animais hipoprotéicos. Este resultado sugere um efeito antioxidante do ASE, que já foi demonstrado por Rocha *et al.* (2008) em lavado bronquealveolar de camundongos expostos a fumaça de cigarro e por Oliveira *et al.* (2010) em plasma de camundongos submetidos à dieta hiperlipídica.

As proteínas também sofrem reações oxidativas iniciadas pelas espécies reativas que levam a alterações nas suas estruturas e nos seus estados conformacionais. Processos como fragmentação, agregação, além de maior susceptibilidade a proteases, exemplificam algumas das ações dessas espécies sobre as proteínas (Yu, 1994).

Nossos resultados mostram um aumento significativo na carbonilação de proteínas em amostras de plasma e rim direito dos animais hipoprotéicos, caracterizando um aumento na oxidação de proteínas neste modelo de programação. Estes resultados corroboram com estudos previamente publicados por Langley-Evans *et al.* (2006) em ratas que receberam dieta hipoprotéica durante a gestação. O tratamento com ASE diminuiu significativamente o dano oxidativo às proteínas nestas amostras nos animais hipoprotéicos. Souza *et al.* (2009) também observaram uma redução da carbonilação de proteínas em ratas submetidas à dieta suplementada com polpa de açaí, confirmando um importante papel antioxidante do açaí.

As enzimas antioxidantes constituem a principal barreira de defesa contra o dano oxidativo, sendo importantes as enzimas SOD, Catalase e a Glutathione Peroxidase (GPx). Segundo Prada *et al.* (2003) uma dieta deficiente em proteínas promoveu o estresse oxidativo, modulando negativamente a atividade das enzimas antioxidantes. Observamos em nosso estudo uma redução da atividade da SOD e da GPx no plasma e no tecido renal no grupo hipoprotéico. Outros estudos desenvolvidos em modelos experimentais de programação com restrição protéica materna evidenciaram a redução da SOD, Catalase e GPx (Huang & Fwu, 1993; Rana *et al.*, 1996; Tarry-Adkins *et al.*, 2007). Não houve diferença significativa na atividade da catalase entre os grupos estudados. O tratamento crônico com ASE aumentou a atividade da SOD e da GPx no plasma, possivelmente não foram observadas alterações na atividade renal com o tratamento, nos animais hipoprotéicos, devido ao comprometimento renal observado neste modelo experimental. Podemos sugerir que o efeito antioxidante do ASE deve-se em grande parte ao aumento da defesa antioxidante, contribuindo para a redução das espécies reativas e o aumento da biodisponibilidade de NO.

O estresse oxidativo é um fator importante no processo de disfunção das células beta-pancreáticas descrito no DM, pois a hiperglicemia e níveis elevados de ácidos graxos livres promovem um aumento da fosforilação oxidativa mitocondrial, gerando intermediários reativos (Brownlee, 2001; Theys *et al.*, 2009). As alterações mitocondriais têm sido sugeridas como um elo entre a desnutrição fetal e a RI na idade adulta (Lee *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que a dieta hipoprotéica durante a gestação e a lactação ocasiona uma redução da massa de ilhotas pancreáticas, hiperglicemia, hiperinsulinemia e RI na prole masculina adulta (Chamson-Reig *et al.*, 2006; Peixoto-Silva *et al.*, 2011). Nosso estudo mostrou um aumento dos níveis glicêmicos, da insulina e da RI no grupo hipoprotéico, prole de machos com dezesseis semanas de vida. O

tratamento com ASE diminuiu significativamente os níveis de glicose e de insulina, sugerindo um efeito anti-hiperglicêmico e anti-hiperinsulinêmico. Este efeito é mediado provavelmente por polifenóis como as catequinas e epicatequinas, encontrados no açaí, como foi demonstrado por nosso grupo em modelo de síndrome metabólica (Oliveira *et al.*, 2010). Evidências têm sugerido que os polifenóis têm um potencial significativo de aumentar a sensibilidade à insulina, demonstrando seu efeito hipoglicemiante (Nizamutdinova *et al.*, 2009).

A exposição de ratas grávidas à dieta hipoprotéica, ocasiona na prole resistência à insulina, esteatose hepática e elevação dos níveis séricos de colesterol e de triglicerídeos (Erhuma *et al.*, 2007). No presente estudo, os níveis de triglicerídeos e colesterol total encontram-se elevados no grupo hipoprotéico, e o tratamento com ASE promove diminuição desses níveis, como observado por Oliveira (2010). Estudos anteriores identificaram que ocorre programação na expressão de fatores de transcrição que possuem um papel chave na regulação do metabolismo lipídico. Fatores esses que se encontram desordenados no modelo de restrição protéica materna em ratos (Erhuma *et al.*, 2005).

Outras alterações metabólicas e renais foram encontradas neste modelo experimental como proteinúria, hipoalbumemia e hiperlipidemia. A perda urinária de proteínas especialmente a albumina, ocasiona a redução dos níveis séricos dessa proteína, provocando diminuição da pressão oncótica plasmática e hipovolemia relativa, resultando na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e do sistema nervoso simpático. A ativação desses sistemas pode desencadear retenção de sódio e água nos rins, com subsequente formação de edema (Rondon-Berrios, 2011; Kodner, 2009). A hipoalbumemia pode se desenvolver quando a taxa de perda urinária de proteínas é superior a formação de nova albumina hepática. Alguns estudos apontam que a hipercolesterolemia pode se desenvolver secundariamente à hipoalbumemia, como um mecanismo compensatório para a baixa pressão oncótica plasmática e também pelas mudanças na viscosidade plasmática (Klosterman & Pressler, 2011). O tratamento com ASE aumentou significativamente os níveis de albumina sérica no modelo experimental estudado.

Assim como a hipoalbumemia, proteinúria e a hipertensão, os níveis séricos aumentados de uréia, creatinina, o percentual da excreção fracionada de sódio (EFNa), e a observação da presença de hematúria em alguns dos animais do grupo hipoprotéico, também são marcadores de disfunção renal. Resultados esses que corroboram com a redução do número dos glomérulos renais, na prole de machos com dezesseis semanas, filhos de mães submetidas à dieta

hipoprotéica durante a gestação. Em humanos o período de desenvolvimento intra-uterino e o baixo peso ao nascer têm uma influência reguladora na formação do néfron e da função renal, representando fatores de risco para o desenvolvimento da hipertensão (Johansson *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005). O fenótipo hipertensivo em modelos animais de desnutrição materna está ligado não só a capacidade de resposta diminuída a moléculas vasoativas, como o óxido nítrico (Franco *et al.*, 2002), mas também a disfunção renal causada pela redução do número de néfrons ao atingir a idade adulta (Langley-Evans *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2004). O mecanismo exato da redução do número de néfrons, devido à restrição protéica materna ainda não está claro, porém alguns estudos têm sugerido que a supressão do SRA no neonato poderia inibir a nefrogênese, reduzindo o número de néfrons levando a uma queda na taxa total de filtração glomerular (TFG), o que poderia estar contribuindo para a doença renal e a hipertensão (Sahajpal & Ashton, 2005). O tratamento com ASE demonstrou um efeito protetor sobre a nefrogênese e o desenvolvimento da disfunção renal, uma vez que favoreceu o aumento no número dos glomérulos renais e reduziu significativamente os níveis séricos de creatinina, uréia e da EFNa. Índices urinários podem ser utilizados para diferenciar as distinções entre causas pré-renais e intrínsecas. A EFNa, uma medida de quanto o rim está ativamente reabsorvendo de sódio, é tipicamente menor em pacientes com condição pré-renal e maior se a doença é intrínseca, quando há lesão do parênquima ou insuficiência renal aguda (Sociedade Brasileira de Clínica Médica, 2007).

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo demonstrou que o consumo de dieta hipoprotéica durante a gestação desempenha um papel fundamental na programação, de alterações como o estresse oxidativo, alterações metabólicas, renais e o desenvolvimento da hipertensão em períodos tardios da vida. Estes dados enfatizam a importância de uma dieta balanceada durante a gravidez e as consequências de uma dieta deficiente nesse período sobre a incidência de futuras doenças crônicas. Nós demonstramos que a administração de ASE protege os machos com dezesseis semanas de vida, da prole de ratas alimentadas com dieta hipoprotéica durante o período gestacional, prevenindo o desenvolvimento da disfunção endotelial, hipertensão, baixo peso ao nascer, hiperglicemia, hiperinsulinemia, IR, proteinúria, hipoalbumemia; o aumento dos níveis de creatinina, uréia, colesterol total, triglicérides, renina, EFNa e a redução do número dos glomérulos. A síntese de NO, a ação antioxidante e o aumento da sensibilidade à insulina induzidos pelo ASE podem contribuir para estes efeitos benéficos do extrato. A administração do ASE pode oferecer uma nova e promissora ferramenta auxiliar para o tratamento e prevenção das mudanças ocasionadas pela restrição protéica materna.

REFERÊNCIAS

- Achyara J, Punchard NA, Taylor JA, Thompson RPH, Pearson TC. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *Eur J Haematol.* 1991; 47:287-91.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-126.
- Algandaby MM, Alghamdi HA, Ashour OM, Abdel-Naim AB, Ghareib SA, Abdel-Sattar EA, Hajar AS. Mechanisms of the antihyperglycemic activity of *Retama raetam* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48(8-9):2448-53.
- Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(10):1634-50.
- Almeida JR, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal gestational protein-calorie restriction decreases the number of glomeruli and causes glomerular hypertrophy in adult hypertensive rats. *Am J Obstet Gynecol.* 2005 Mar;192(3):945-51.
- Alvarez C, Martin MA, Goya L, Bertin E, Portha B & Pascual-Leone AM. Contrasted impact of maternal rat food restriction on fetal endocrine pancreas. *Endocrinology.* 1997; 138 2267–2273.
- Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol.* 2004; (PT 2): 355-377.
- Bagby SP. Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming. *J Nutr.* 2007; 4: 1066-1072.
- Bahia L, de Aguiar LG, Villela NR, Bottino D, Bouskela E. The endothelium in the metabolic syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006; 50(2):291-303.
- Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal.* 1982; 32:131-138.
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol.* 2002; 6: 1235-1239.
- Barker DJ. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med.* 1999; 1: 3-6.
- _____. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ.* 1995; 311(6998): 171-174.
- _____. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond).* 1998; 2: 115-128.
- _____. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl.* 2004; 446: 26-33.
- Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. *Lancet.* 1993; 341(8841):339-341.

- Bertram JF, Soosaipillai MC, Ricardo SD, Ryan GB. Total numbers of glomeruli and individual glomerular cell types in the normal rat kidney. *Cell & Tissue Research*. 1992; 270: 37 - 45.
- Bobbio F.O, Druzian J.L, Abrão P.A, Bobbio P.A, Fadelli S. Identificação e quantificação das antocianinas do fruto do açázeiro (*Euterp oleracea* Mart). *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2000; 20: 388-390.
- Boden G, Shulman GI. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2002; 3:14-23.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976; 72:248-254.
- Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865): 813-820.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases – The role of oxidative stress. *Circ Res*. 2000; 87:840.
- Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2011; 41(6):158-176.
- Callera GE, Yeh E, Tostes RC, Caperuto LC, Carvalho CR, Bendhack LM. Changes in the vascular beta-adrenoceptor-activated signalling pathway in 2Kidney-1Clip hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 2004; 141(7):1151-8.
- Ceriello A. Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S181-184. Review.
- Chamson-Reig A, Thyssen SM, Arany E, Hill DJ. Altered pancreatic morphology in the offspring of pregnant rats given reduced dietary protein is time and gender specific. *J Endocrinol*. 2006; 191(1): 83-92.
- Chen J, Xu H, Shen Q, Guo W, Sun L. Effect of postnatal high-protein diet on kidney function of rats exposed to intrauterine protein restriction. *Pediatr Res*. 2010; 68(2):100-104.
- Cohuet G, Struijker-Boudier H. Mechanisms of target organ damage caused by hypertension: therapeutic potential. *Pharmacol Ther*. 2006. 111:81-98.
- Consolim-Colombo FM, Fiorino P. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial sistêmica – aspectos clínicos. *Rev Bras de Hipertensão*. 2005; 12:251-5.
- Cosentino F, Sill JC, Katusic ZS. Role of superoxide anions in the mediation of endothelium-dependent contractions. *Hypertension*. 1994; 23:229-235.

- Costa CA, Amaral TA, Carvalho LC, Ognibene DT, da Silva AF, Moss MB, Valença SS, de Moura RS, Resende AC. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2009; 22(12):1242-1249.
- Cotrell EC, Ozanne SE. Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiol Behav*. 2008; 1: 17-28.
- Cottrell EC, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci*. 2009; 3:1-9.
- Cracowski J, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: Physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol. Sci*. 2002; 23: 360.
- Cubbon RM, Kahn MB, Wheatcroft SB. Effects of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair. *Clin Sci*. 2009; 117:173–190.
- Curin Y, Andriantsitohaina R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacol Rep*. 2005; 57:97-107.
- Dai DZ., Dai Y. Role of endothelin receptor A and NADPH oxidase in vascular abnormalities. *Vasc Health Risk Manag*. 2010; 6: 787-794.
- Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol*. 1990; 186: 421-431.
- Duracková Z. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*. 2010; 59(4):459-69.
- Embrapa. Acesso em 2 abr 2012. Disponível em: www.embrapa.br/noticias/banco_de_noticias/2004/outubro/bn.2004-11-25.4697036548/mostra_noticia.
- Erhuma A, Sculley DV, Plant R, Salter AM, Langley-Evans SC, Bennett A. Exposure to a maternal low protein diet in pregnancy programmes altered expression of sterol response element binding protein 1c and carbohydrate response element binding protein in the offspring. *Proc Nutr Soc*. 2005; 64: 81A.
- Erhuma A, Salter AM, Sculley DV, Langley-Evans SC, Bennett AJ. Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007; 292(6):E1702-1714.
- Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson LJ, Loscalzo J. *Harrison Medicina Interna*. McGraw-Hill Interamericana do Brasil. 2008; 17ª ed., Vol 2: 1761-1764.
- Félétou M, Köhler R, Vanhoutte PM. Endothelium-derived vasoactive factors and hypertension: possible roles in pathogenesis and as treatment targets. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12(4):267-75.
- Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE, Ekizoglou S, Doherty C, James L, Gusterson B, Hales CN. The maternal endocrine environment in the low-protein model of intra-uterine growth restriction. *Br J Nutr*. 2003;90(4):815-822.

- Ferreira, AL; Matsubara, LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Rev. Méd. Brasil. 1997; 43(1): 61-68.
- Fetoui H, Garoui M, Zeghal N. Protein restriction in pregnant- and lactating rats-induced oxidative stress and hypohomocysteinaemia in their offspring. J Anim Physiol Anim Nutr. 2009; 93(2):263-270.
- Fitzpatrick DF, Fleming RC, Bing B, Maggi DA, O'Malley RM. Isolation and characterization of endothelium-dependent vasorelaxing compounds from grape seeds. J Agric Food Chem. 2000; 48(12): 6384-90.
- Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. Swiss Med Wkly. 2010; E1-E12.
- Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 1984; 105: 114-121.
- Franco JG, de Moura EG, Koury JC, Trotta PA, Cordeiro A, Souza LL, Almeida NA, Lima Nda S, Pazos-Moura CC, Lisboa PC, Passos MC. Resveratrol reduces lipid peroxidation and increases sirtuin 1 expression in adult animals programed by neonatal protein restriction. J Endocrinol. 2010; 207(3): 319-328.
- Franco M do C, Arruda RM, Dantas AP, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, Carvalho MH, Tostes RC, Nigro D. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. Cardiovasc Res. 2002; 56(1):145-153.
- Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. Lancet. 1993; 341(8843): 454-7.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980; 288(5789):373-6.
- Gallori S, Bilia AR, Bergonzi MC, Barbosa WLR, Vincieri FF. Polyphenolic constituents of fruit pulp of *Euterp oleracea Mart.* (Açaí palm). Cromatografia. 2004; 59: 739-743.
- Ganong WF. Fisiologia médica. 17^a ed. Rio de Janeiro: editora Prentice-Hall do Brasil LTDA, 1995.
- Garofano A, Czernichow P, Breant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. Diabetologia. 1997; 40 1231–1234.
- Gennser G, Rymark P, Isberg PE. Low birth weight and risk of high blood pressure in adulthood. Br Med J (Clin Res Ed). 1988; 296: 1498-1500.
- Gluckman PD, Hanson MA, Pinal C. The developmental origins of adult disease. Matern Child Nutr. 2005; 3:130-41.
- Godfrey KM, Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. Am J Clin Nutr. 2000; 71: 1344-1352.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum S. Analyses of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry. 1982; 126:131-138.

Grossman E. Does Increased Oxidative Stress Cause Hypertension? *Diabetes Care*. 2008; 31 2:S185-189.

Guan H, Arany E, van Beek JP, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill DJ & Yang K Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in the offspring of maternal protein restricted rats. *American Journal of Physiology–Endocrinology and Metabolism*. 2005; 288: E663–E673.

Gupta P, Narang M, Banerjee BD, Basu S. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 2004; 4:14–23.

Gupta S, Agarwal A, Banerjee J, Alvarez J. The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstet Gynecol Survey* 2007;62:335–47.

Hales CN & Ozanne SE For debate: fetal and early post-natal growth restriction lead to diabetes, the metabolic syndrome and renal failure. *Diabetologia*. 2003; 46 1013–1019.

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*. 1997; 2153-2157.

Heck DE, Shakarjian M, Kim HD, Laskin JD, Vetrano AM. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1203:120-125.

Huang CJ, Fwu ML. Degree of Protein Deficiency Affects the Extent of the Depression of the Antioxidative Enzyme Activities and the Enhancement of Tissue Lipid Peroxidation in Rats. *J Nutr*. 1993; 123(5):803-810.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(24):9265-9269.

Irigoyen MC, Fiorino P, De Angelis K, Krieger EM. Sistema nervoso simpático e hipertensão arterial: reflexos cardiocirculatórios. *Rev Bras de Hipertensão*. 2005;12:229-33.

Johansson, S., Iliadou, A., Bergvall, N., Tuvemo, T., Norman, M., Cnattingius, S. Risk of high blood pressure among young men increases with the degree of immaturity at birth. *Circulation*. 2005; 112, 3430–3436.

Joki N, Hase H, Tanaka Y, et al: Relationship between serum albumin level before initiating haemodialysis and angiographic severity of coronary atherosclerosis in end-stage renal disease patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; (21):1633-1639.

Jover B, Herizi A, Ventre F, Dupont M, Mimram A. Sodium and Angiotensin in hypertension induced by long term nitric oxide blockade. *Hypertension*. 1993; 21:944-948.

Katusic ZS. Vascular endothelial dysfunction: does tetrahydrobiopterin play a role? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001; 281(3):H981-986.

Klosterman ES, Pressler BM. Nephrotic Syndrome in Dogs: Clinical Features and Evidence-Based Treatment Considerations. *Top Companion Anim Med*. 2011; 26(3):135-142.

Kodner C. Nephrotic Syndrome in Adults: Diagnosis and Management. *Am Fam Physician*. 2009; 80(10):1129-34.

Kojo S. Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem*. 2004;11(8):1041-64.

Kornel L. The role of vascular steroid receptors in the control of vascular contractility and peripheral vascular resistance. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 1993; 45: 195-203

Landmesser U, Harrison DG. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis*. 2001; 12:455-461.

Langley SC, Jackson AA. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein diets. *Clin Sci (Lond)*. 1994 ; 86(2):217-22.

Langley-Evans SC, Gardner DS, Welham SJ. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition*. 1998; 1: 39-47.

Langley-Evans SC, Langley-Evans AJ, Marchand MC. Nutritional programming of blood pressure and renal morphology. *Arch Physiol Biochem*. 2003; 1: 8-16.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CRW, Jackson AA & Seckl JR Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta*. 1996; 17: 169-172.

Langley-Evans SC, Lilley C, McMullen S. Maternal protein restriction and fetal growth: lack of evidence of a role for homocysteine in fetal programming. *Br J Nutr*. 2006; 96(3):578-586.

Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental Origins of Adult Disease. *Med Princ Pract*. 2010; 19(2):87-98.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Jackson AA. In utero exposure to maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of maternal blood pressure changes. *Clin Nutr*. 1994; 13(5):319-324.

Langley-Evans SC. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc*. 2001; 60(4): 505-13. Review.

Larsson L, Maunsbach AB. The ultrastructural development of the glomerular filtration barrier in the rat kidney: a morphometric analysis. *J Ultrastruct Res*. 1980; 72(3):392-406.

- Lee YY, Lee HJ, Lee SS, Koh JS, Jin CJ, Park SH, Yi KH, Park KS, Lee HK. Taurine supplementation restored the changes in pancreatic islet mitochondria in the fetal protein-malnourished rat. *Br J Nutr.* 2011; 106(8):1198-1206.
- Leon DA., Koupilova I, Lithell HO, Berglund L, Mohsen R, Vagero D, Lithell UB, McKeigue PM. Failure to realise growth potential in utero and adult obesity in relation to blood pressure in 50 year old Swedish men. *BMJ.* 1996; 312(7028):401-6.
- Lessa I. Epidemiologia da hipertensão arterial sistêmica e da insuficiência cardíaca no Brasil. *Rev Bras de Hipertensão.* 2001; 8(4):383-92.
- Levine RI, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol.* 1990; 186: 464-478.
- Loukides S, Bakakos P, Kostikas K. Oxidative stress in patients with COPD. *Curr Drug Targets.* 2011; 12(4): 469-477.
- Lucas A. Programming not metabolic imprinting. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(2):602.
- Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, Walker M. Tracing the origins of “fetal origins” of adult diseases: Programming by oxidative stress? *Med Hypotheses.* 2006; 66(1):38-44.
- Madazli R, Benian A, Aydin S, Uzun H, Tolun N. The plasma and placental levels of malondialdehyde, glutathione and superoxide dismutase in pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol* 2002; 22:477–480.
- Malinski T. Understanding nitric oxide physiology in the heart: a nanomedical approach. *Am J Cardiol.* 2005; 96 (Suppl 1):13-24.
- Manach C, Mazur A, Scalbert A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol.* 2005;16(1):77-84.
- Mandarim-de-Lacerda CA. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2003; 75: 469-486.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phase of rats some helpful -614 considerations. *Braz. J. Biol.* 2002; 62(4A): 609.
- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005; 16(10):577-586.
- MC Gregor DD. The effect of sympathetic nerve stimulation on vasoconstrictor response in perfused mesenteric blood vessels of the rat. *J. Physiol.* 1965; 177:21-30.
- Mcardle HJ, Andersen HS, Jones H, Gambling L. Placenta. 2006; (13) A: S56-60.

McMillem IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* 2005; 85: 571-633.

Meerarani P, Badimon JJ, Zias E, Fuster V, Moreno PR. Metabolic syndrome and diabetic atherothrombosis: implications in vascular complications. *Curr Mol Med* 2006; 6(5):501–514.

Mesquita FF, Gontijo JAR, Boer PA. Expression of renin–angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25: 380–388.

Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production. *Pflugers Arch.* 2010; 459(6):807-816.

Moura EG, Lisboa PC, Passos MCF. Neonatal Programming of Neuroimmunomodulation – Role of Adipocytokines and Neuropeptides. *Neuroimmunomodulation.* 2008; 15: 176-188.

Moura RS, Pires KM, Santos Ferreira T, Lopes AA, Nesi RT, Resende AC, Sousa PJ, da Silva AJ, Porto LC, Valenca SS. Addition of açai (Euterpe oleracea) to cigarettes has a protective effect against emphysema in mice. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49(4):855-863.

Nigro J, Osman N, Dart AM, Little PJ. Insulin resistance and atherosclerosis. *Endocr Rev.* 2006; 27:242–259.

Nizamutdinova IT, Jin YC, Chung JI, Shin SC, Lee SJ, Seo HG, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. The anti-diabetic effect of anthocyanins in streptozotocin-induced diabetic rats through glucose transporter 4 regulation and prevention of insulin resistance and pancreatic apoptosis *Mol Nutr Food Res.* 2009; 53(11):1419-1429.

Oliveira PR, da Costa CA, de Bem GF, de Cavalho LC, de Souza MA, de Lemos Neto M, da Cunha Sousa PJ, de Moura RS, Resende AC. Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe oleracea Mart. in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010; 56(6): 619-626.

Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, Poston L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol.* 2001; 530(Pt 1):141-152.

Paravicini T, Touyz R. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care.* 2008; 31:S170-80.

Peixoto-Silva N, Frantz ED, Mandarin-de-Lacerda CA, Pinheiro-Mulder A. Maternal protein restriction in mice causes adverse metabolic and hypothalamic effects in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr.* 2011; 106(9):1364-1373.

Petrik J, Reusens B, Arany E, Remacle C, Hoet JJ & Hill DJ. A low protein diet alters the balance of islet cell replication and apoptosis in the fetal and neonatal rat, and is associated with a reduced pancreatic expression of insulin-like growth factor II. *Endocrinology* 1999; 140: 4861–4873.

- Pires KM, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Early renal structure alteration in rat offspring from dams fed low protein diet. *Life Sci.* 2006; 79(22):2128-34.
- Pozo-Insfran DD, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of Açai (*Euterpe oleracea* Mart.). *J Agric Food Chem.* 2004; 52(6): 1539-45.
- Prada FJ, Macedo DV, Mello MA. Evaluation of a protein deficient diet in rats through blood oxidative stress biomarkers. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2003;113-114:213-28.
- Provencher PH, Saltis J & Funder JW. Glucocorticoids but not mineralocorticoids modulate endothelin-1 and angiotensin II binding in SHR vascular smooth muscle cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*,1995; 52: 219-225
- Ramachandran A, Levonen AL, Brookes PS, Ceaser E, Shiva S, Barone MC, Darley-Usmar V. Mitochondria, nitric oxide, and cardiovascular dysfunction. *Free Rad Biol Med.* 2002; 33(11):1465-34.
- Rana S, Sodhi CP, Mehta S, Vaiphei K, Katyal R, Thakur S, Mehta SK. Protein-energy malnutrition and oxidative injury in growing rats. *Hum Exp Toxicol.* 1996; 15(10):810-814.
- Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 1992; 70: 593-599.
- Rapoport RM, Murad F. Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: role of cyclic GMP. *J Cyclic Nucleotide Protein Phosphor Res.* 1983; 9(4-5):281-296.
- Rasch R, Skriver E, Woods LL. The role of the RAS in programming of adult hypertension. *Acta Physiol Scand.* 2004; 4: 537-542.
- Rask-Madsen C, King GL. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007; 3(1): 46-56.
- Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition and hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993; 123: 1939-1951.
- Resende AC, Ballejo G, Leite R, Salgado COM. Role of NO-dependent mechanisms in bradykinin-induced vasodilation in the rat mesenteric bed. *Pharmacol. Rev. Commun.* 1997; 9: 269-78.
- Reusens B, Dahri S, Snoeck A, Bennis-Taleb N, Remacle C & Hoett JJ. Long-term consequences of diabetes and its complications may have a fetal origin: experimental and epidemiological evidence. *Diabetes.* 1995; 35 187–198.
- Ribeiro MO, Antunes E, De Nucci G, Lovisolo SM, Zatz R. Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: A new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 1992; 20:298-303.

- Rocha AP, Resende AC, Sousa MVA, Carvalho LCRM, Sousa PJC, Tano T, Criddle DN, Porto LC, Valença SS, Soares de Moura R. Antihypertensive effects and antioxidant action of a hydro-alcoholic extract obtained from fruits of *Euterpe Oleracea Mart.* (Açaí). *J Pharmacol Toxicol.* 2008; 3(6): 435-448.
- Rocha APM, Carvalho LCRM, Sousa MVA, Madeira SVF, Sousa PJC, Tano T, Schini-Kerth VB, Resende AC, Soares de Moura R. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea Mart.* (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of the rat. *Vascul Pharmacol.* 2007; 46: 97-104.
- Rondon-Berrios H. New insights into the pathophysiology of oedema in nephrotic syndrome. *Nefrologia.* 2011; 31(2):148-54.
- Ross D, Moldeus P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In Vigo-Pelfrey C (ed): *Membrane lipid oxidation.* 1th ed. Boca Raton, CRC Press. 1991;151-70.
- Rubin, SI. Chronic renal failure and its management and nephrolithiasis. In: *Veterinary Clinics of North America: small animal practice.* 1997; 27: 1331-1354.
- Sahajpal V., Ashton N. Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. *J Physiol.* 2005; 563(Pt 1):193-201.
- Sahajpal V., Ashton N. Renal function and angiotensin AT1 receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. *Clin Sci (Lond).* 2003; 104(6): 607-614.
- Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 13:799-806.
- Sathishkumar K, Elkins R, Yallampalli U, Yallampalli C. Protein restriction during pregnancy induces hypertension and impairs endothelium-dependent vascular function in adult female offspring. *J Vasc Res.* 2009; 46(3): 229-239.
- Schmidt, I.M., Chellakooty, M., Boisen, K.A., Damgaard, I.N., Mau Kai, C., Olgaard, K., Main, K.M., Impaired kidney growth in low-birth-weight children: distinct effects of maturity and weight for gestational age. *Kidney International.* 2005; 68, 731–740.
- Sherman RC, Langley-Evans SC. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin Sci (Lond).* 2000; 98(3): 269-275.
- Sherman RC, Langley-Evans SC. Early administration of angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril, prevents the development of hypertension programmed by intrauterine exposure to a maternal low-protein diet in the rat. *Clin Sci (Lond).* 1998; 94(4):373-81.
- Sikkema JM, van Rijn BB, Franx A, Bruinse HW, de Roos R, Stroes ES, et al. Placental superoxide is increased in pre-eclampsia. *Placenta* 2001; 22: 304–308.
- Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol.* 2002; 54(11): 1515-20.

- Soares de Moura R, Miranda DZ, Pinto ACA, Sicca RF, Souza MAV, Rubenich LMS, Carvalho LCRM, Rangel BM, Tano T, Madeira SVF, Resende AC. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilation and antihypertensive effect of brazilian red wine. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44: 302-309 (b).
- Soares de Moura R, Resende AC, Emiliano AF, Tano T, Mendes-Ribeiro AC, Correia ML, de Carvalho LC. The role of bradykinin, AT2 and angiotensin 1-7 receptors in the EDRF-dependent vasodilator effect of angiotensin II on the isolated mesenteric vascular bed of the rat. *Br J Pharmacol.* 2004; 141 (5): 860-866 (a).
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. *Arq Bras Cardiol* 2006 Fev: 1–48.
- Sociedade Brasileira de Clínica Médica. Diagnóstico e tratamento. Copyright. 2007; vol 3, pág. 849-860.
- Sotomayor, M.A., Perez-Guerrero, C., Herrera, M.D., Marhuenda, E. Effects of chronic treatment with simvastatin on endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 1999; 17:769-779.
- Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira RP, Pedrosa ML. Diet supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition.* 2009; 26:804-810.
- Stewart PM, Whorwood CB & Mason JI. Type 2 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 1995; 55: 465-471.
- Stocker CJ, Arch JR, Cawthorne MA. Fetal origins of insulin resistance and obesity. *Proc Nutr Soc.* 2005; 2: 143-151.
- Stoclet JC, Chataigneau T, Ndiaye M, Oak MH, El Bedoui J, Chataigneau M, Schini-Kerth VB. Vascular protection by dietary polyphenols. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500 (1-3): 299-313.
- Stukena I, Apanavičienė DA, Bahs G, Kalvelis A, Dzerve V, Ansmite B, Kalejs O, Lejnieks A. Blood pressure control in treated hypertensive patients in daily practice of latvian family physicians. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47(10):586-592.
- Sun J, Zhang X, Broderick M, Fein H. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors.* 2003; 3:276-284.
- Sur G, Sur M, Kudor-Szabadi L, Sur L. Difficulties in achieving arterial hypertension control. *Maedica (Buchar).* 2011; 6(2):114-119.
- Suzuki H, Zweifach W, Schmid-Schonbein GW. Vasodilator response of mesenteric arterioles to histamine in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1995; 26:397-400.
- Swali A, McMullen S, Langley-Evans SC. Prenatal protein restriction leads to a disparity between aortic and peripheral blood pressure in Wistar male offspring. *J Physiol.* 2010; 588(19): 3809-3818.

- Taddei S, Viedis AA, Mattei P, Ghiadoni L, Sudano I, Salvetti A. Deffective L-arginine-nitric oxide pathway in offspring of essential hypertensive patients. *Circulation*. 1996; 84:1298-1303.
- Tarry-Adkins JL, Joles JA, Chen JH, Martin-Gronert MS, van der Giezen DM, Goldschmeding R, Hales CN, Ozanne SE. Protein restriction in lactation confers associated with increased antioxidant expression nephroprotective effects in the male rat and is associated with increased antioxidant expression. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007; 293(3):R1259-1266.
- Tatli MM, Vural H, Koc A, Kosecik M, Atas A. Altered anti-oxidant status and increased lipid peroxidation in marasmic children. *Pediatr Int*. 2000; 42(3):289-292.
- Thakore JH, Dinan TG. Growth hormone secretion: the role of glucocorticoids. *Life Sci*. 1994; 55(14): 1083-1099. Review.
- Theys N, Clippe A, Bouckennooghe T, Reusens B, Remacle C. Early Low Protein Diet Aggravates Unbalance between Antioxidant Enzymes Leading to Islet Dysfunction. *PLoS One*. 2009; 4(7):e6110.
- Thöny B, Auerbach G, Blau N. Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem J*. 2000; 347 (1): 1-16.
- Torrens C, Kelsall CJ, Hopkins LA, Anthony FW, Curzen NP, Hanson MA. Atorvastatin restores endothelial function in offspring of protein-restricted rats in a cholesterol-independent manner. *Hypertension*. 2009; 53(4):661-667.
- Touyz R, Briones AM. Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertension Res*. 2011; 34:5-14.
- Touyz RM, Schiffrin EL. AngII-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. 1999; 34:976-982.
- Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(9-10):1302-14.
- Touyz, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: Whats is the clinical significance? *Hypertension*. 2004; 44: 248-52.
- Tsukimori K, Yoshitomi T, Morokuma S, Fukushima K, Wake N. Serum uric acid levels correlate with plasma hydrogen peroxide and protein carbonyl levels in preeclampsia. *Am J Hypertens* 2008;21:1343–1346.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39:44-84.
- Valsamakis G, Kanaka-Gantenbein C, Malamitsi-Puchner A, Mastorakos G. Causes of intrauterine growth restriction and the postnatal development of the metabolic syndrome. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1092:138–147.

- Van Den Berg DT, de Kloet ER, Van Dijken HH, de Jong W. Differential central effects of mineralocorticoid and glucocorticoid agonists and antagonists on blood pressure. *Endocrinology*. 1990; 126(1):118-124.
- Vasquez-Vitar J, Kalyanaramara B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pitchard KA Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 1998; 95:9220-9225.
- Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Trnavsky-Hobbs DL. Effect of antioxidant therapy on blood pressure and NO synthase expression in hypertensive rats. *Hypertension* 2000; 36: 957–964.
- Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, Reboldi G, Porcellati C. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation*. 1997. 97:48-54.
- VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. Sociedade Brasileira de Cardiologia. 2010; 95 (1): 1-51.
- Vianna, PTG. Avaliação da função e proteção renal. In: Cavalcanti IL - Medicina Perioperatória. Sociedade Brasileira de Anestesiologia/SBA. Rio de Janeiro, 2005; 155-173.
- Vieau D, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Molendi-Coste O, Laborie C, Breton C, Deloof S, Lesage J. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. *Psychoneuroendocrinology*. 2007; 32: 16-20.
- Ward NC, Croft KD. Hypertension and oxidative stress. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006; 33(9):872-876.
- Williams B. The year in hypertension. *JACC*. 2010; 55(1): 66–73.
- Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res*. 2001; 4: 460-467.
- Woods LL, Ingelfinger JR, Rash R. Modest maternal protein restriction fails to program adult hypertension in female rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 289(4):R1131-1136.
- Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: role of nephrogenesis. *Kidney Int*. 2004; 4: 1339-1348.
- Woods LL, Weeks DA. Naturally occurring intrauterine growth retardation and adult blood pressure in rats. *Pediatr Res*. 2004; 56(5): 763-767.
- Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*. 1994; 74(1): 139-162.
- Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Griendling K. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension*. 1998; 32:488-495.
- Zalba G, San Jose G, Moreno MU *et al*. Oxidative stress in arterial hypertension: Role of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* 2001; 38: 1395–1399.

ANEXO – Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

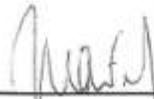
Certificamos que o Protocolo nº CEA/021/2010 sobre "Efeito do extrato de *Euterpe oleracea* Mart. (açai) nas alterações cardiovasculares da hipertensão induzida pela restrição protéica materna durante a gestação", sob a responsabilidade de **Roberto Soares de Moura**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 13/04/2010. Este certificado expira em 13/04/2014.

Rio de Janeiro, 13 de Abril de 2010.



Prof. Patricia Cristina Lisboa
CEA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8



Prof. Israel Felzenszwalb
CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb
Diretor
IBRAG - UERJ
Mat. 2587-8

/s/s