

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Luciano Firmino Rodrigues

**Avaliação da função endotelial e dos parâmetros do estado redox como marcadores da
programação fetal mediada por dieta hipersódica em prole de ratos Wistar**

Diamantina
2018

Luciano Firmino Rodrigues

Avaliação da função endotelial e dos parâmetros do estado redox como marcadores da programação fetal mediada por dieta hipersódica em prole de ratos Wistar

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Daniel Campos Villela

**Diamantina
2018**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R696a Rodrigues, Luciano Firmino
Avaliação da função endotelial e dos parâmetros do estado redox como marcadores da programação fetal mediada por dieta hipersódica em prole de ratos Wistar / Luciano Firmino Rodrigues, 2018.
94 p. : il.

Orientador: Daniel Campos Villela

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2018.

1. Estresse oxidativo. 2. Função endotelial. 3. Hipertensão arterial. 4. Programação fetal. I. Villela, Daniel Campos. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 616.1

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa, CRB-6/3468

LUCIANO FIRMINO RODRIGUES

**Avaliação da função endotelial e dos parâmetros do estado redox
como marcadores da programação fetal mediada por dieta
hipersódica em prole de ratos Wistar**

Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS, nível de MESTRADO
como parte dos requisitos para
obtenção do título de MAGISTER
SCIENTIAE EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

Orientador (a): Prof. Dr. Daniel
Campos Villela

Data da aprovação : 12/11/2018



Prof.Dr. DANIEL CAMPOS VILLELA - UFVJM



Prof.Dr.^a ELIZABETHE ADRIANA ESTEVES - UFVJM



Prof.Dr.^a CRISTIANE ROCHA FAGUNDES MOURA - UFVJM

DIAMANTINA

*Dedico esta pesquisa à minha querida esposa,
Vanessa, pelo apoio incondicional na difícil
caminhada.*

*Aos meus adorados filhos: Rafael, Lara e Arthur,
meus maiores orgulhos.*

Aos meus pais e minha irmã, Letícia.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor Daniel Campos Villela, que acreditou na minha capacidade de trabalho e me proporcionou uma oportunidade ímpar de crescimento pessoal. Tenho uma gratidão eterna por você. Muito obrigado!

À minha esposa Vanessa, que no decorrer dessa árdua caminhada, sempre esteve ao meu lado. Reconheço as batalhas que teve de superar sozinha, principalmente durante minha ausência em casa. Sem seu entendimento, isto não seria possível. Quando começamos esta jornada juntos, éramos três, hoje somos quatro, te amo!

Lara e Arthur, meus anjinhos, hoje vocês são muito pequenos, mas um dia vão crescer e compreender o quanto isso significa para mim. Amo vocês, meus filhinhos!

Ao meu filho Rafael, apesar da distância física, ando contigo sempre em meu pensamento. Continue brilhando!

Agradeço aos meus pais, Gersey e Sandra pelo acolhimento e carinho recebido, durante minhas passagens em Belo Horizonte. Vocês são insubstituíveis !

À minha irmã Letícia, que mesmo distante, sempre se fez presente com uma palavra amiga.

Aos alunos de iniciação do professor Daniel, sem vocês, eu não teria conseguido. Matheus Moreira, muito obrigado por sua disponibilidade e destreza com que operou meus animais. Renan Augusto, muito obrigado pelo cuidado dado aos animais, principalmente, durante minhas viagens. Rodrigo Miranda e Bruna Faier, muito obrigado pela entrega e dedicação durante os ensaios, nunca me esquecerei daquele fim de semana com vocês.

Não tenho palavras para agradecer as amigas Karine Beatriz e a Bruna Caroline, nunca poderei recompensar o que vocês duas fizeram neste projeto! Muito obrigado!

Aos amigos de pós-graduação, Liliane e Bruno do LETFIS, obrigado pelo carinho que sempre tiveram comigo.

À professora Etel Vieira, pela parceria e utilização de seu laboratório (BIOEX). Ao professor Kinulpe pelos ensinamentos durante a preparação histológica. Assim como a professora Elizabethe Esteves pelas orientações dietéticas e a colega Lauane, pelos ensinamentos para manipular.

Aos colegas da FAMED, Bruno Bastos e Lincoln Rocha, sempre dispostos em me auxiliar no cuidado dos animais. A Cíntia Fidélis pela dedicação durante a preparação histológica. E ao Thyago, meu braço direito nas análises de laboratório. Muito obrigado! À Margarete, pela revisão do texto, pelo carinho de sempre.

Agradeço ao Centro Integrado de Pós-graduação e Pesquisa em Saúde (CIPq), que contribuiu com a estrutura, equipamentos e suporte técnico para a realização dos experimentos.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram na construção desse projeto, muito obrigado!

*“Tudo acontece na hora certa. Tudo acontece,
exatamente quando deve acontecer”.*

(Albert Einstein)

RESUMO

A hipertensão é um distúrbio multifatorial caracterizado pela interação de fatores genéticos e ambientais. Estudos epidemiológicos recentes sugerem que insultos ao feto, muitas das vezes ocasionados pela nutrição materna inadequada, favorecem alterações em sua programação fetal. Sendo assim, esse estudo avaliou, a função endotelial, biomarcadores teciduais do estado redox, assim como possíveis lesões em órgãos alvo, através da sobrecarga de sal em prole de ratos Wistar. Inicialmente, quatro machos e dez fêmeas (geração P) foram divididos igualmente em grupos controle (N) e tratado (H), este com ração suplementada com NaCl 4%, durante 16 semanas. Após esse período houve o acasalamento dos animais em cada um dos grupos, dando origem as crias (F-1). Após o desmame, as proles do grupo controle (N) foram divididas nos grupos (NN) recebendo dieta padrão e (NH) recebendo dieta com NaCl 4%. As do grupo tratado (H) foram divididas em (HN) recebendo dieta padrão e (HH) recebendo dieta com NaCl 4%, durante o mesmo período. Em seguida avaliamos a função endotelial em ratos acordados, biomarcadores (TBARS, FRAP, SOD, CAT E PC) e a urina de 24 horas. Percebemos uma redução da reatividade vascular dependente do endotélio na relação 200ng ACH/20 μ g NPS quando comparamos os grupos NH (1.00 \pm 0.09) e HH (0.70 \pm 0.21), mmhg, p<0,05. Na avaliação do estado redox do arco aórtico, verificamos que os grupos HN (0.14 \pm 0.03) e HH (0.18 \pm 0.06) reduziram o TBARS em relação ao grupo NH (0.37 \pm 0.08), nmol MDA/proteína mg, p<0.005. Percebemos também nesta amostra que os grupos NN (0.97 \pm 0.34) e NH (1.16 \pm 0.5) reduziram a SOD em relação ao grupo HH (1.93 \pm 0,5), U/proteína mg, p<0.05. Na adrenal os grupos NN (0,803 \pm 0,313), NH (0,722 \pm 0,297) e HH (0,695 \pm 0,186) reduziram o TBARS em relação ao HN (1,886 \pm 1,044), nmol MDA/proteína mg, p<0.05. Nos ventrículos cardíacos observamos que o grupo HN (0.77 \pm 0.16) reduziu o TBARS em relação ao HH (1.13 \pm 0.18), nmol MDA/proteína mg, p<0,05. Neste tecido o grupo HN (0.51 \pm 0.47) aumentou a SOD em relação ao grupo NH (0.47 \pm 0.45 U/proteína mg), p<0,05. Nos rins a microalbuminúria no grupo HH (0,011 \pm 0,006) foi maior que o grupo HN (0,005 \pm 0,002) mg/24hs, p<0,05. Em síntese, os principais achados do presente estudo foram a piora de função endotelial e o indício de lesão renal no grupo HH, assim como aparente proteção evidenciada no grupo HN ao dano oxidativo.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Função endotelial. Hipertensão arterial. Programação fetal.

ABSTRACT

Hypertension is a multifactorial disorder characterized by the interaction of genetic and environmental factors. Recent epidemiological studies suggest that insults to the fetus, often caused by inadequate maternal nutrition, favor changes in fetal programming. Thus, this study evaluated endothelial function, tissue biomarkers of the redox state, as well as possible lesions in target organs, through salt overload in offspring of Wistar rats. Initially, four males and ten females (P generation) were also divided into control (N) and treated (H) groups, with ration supplemented with 4% NaCl, for 16 weeks. After this period the animals were mated in each of the groups, giving rise to the offspring (F-1). After weaning, the offspring of the control group (N) were divided into groups (NN) receiving standard diet and (NH) receiving diet with 4% NaCl. Those of the treated group (H) were divided into (HN) receiving standard diet and (HH) receiving diet with 4% NaCl, during the same period. We then evaluated the endothelial function in agreed rats, biomarkers (TBARS, FRAP, SOD, CAT and PC) and urine for 24 hours. We observed a reduction in endothelium-dependent vascular reactivity in relation to 200ng ACH / 20 μ g SPL when we compared the NH groups (1.00 ± 0.09) and HH (0.70 ± 0.21), mmhg, $p < 0.05$. In the evaluation of the redox state of the aortic arch, we observed that the groups HN (0.14 ± 0.03) and HH (0.18 ± 0.06) reduced TBARS in relation to the NH group (0.37 ± 0.08), nmol MDA / protein mg, $p < 0.005$. We also found in this sample that NN (0.97 ± 0.34) and NH (1.16 ± 0.5) groups reduced SOD in relation to the HH group (1.93 ± 0.5), U / protein mg, $p < 0.05$. In adrenal NN (0.803 ± 0.313), NH (0.722 ± 0.297) and HH (0.695 ± 0.186) reduced TBARS relative to HN (1.886 ± 1.044), nmol MDA / protein mg, $p < 0.05$. In the cardiac ventricles we observed that the HN group (0.77 ± 0.16) reduced TBARS in relation to HH (1.13 ± 0.18), nmol MDA / protein mg, $p < 0.05$. In this tissue the HN group (0.51 ± 0.47) increased the SOD in relation to the NH group (0.47 ± 0.45 U / mg protein), $p < 0.05$. Increased microalbuminuria in the HH group (0.011 ± 0.006) in relation to the HN group (0.005 ± 0.002) mg / 24hs, $p < 0.05$. In summary, the main findings of the present study were worsening of endothelial function and the indication of renal injury in the HH group, as well as apparent protection evidenced in the HN group for oxidative damage.

Key words: Arterial hypertension. Endothelial function. Fetal programming. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da Arginina pela ativação da enzima óxido nítrico sintase, NOS	31
Figura 2 – Isoformas da NO-sintase	32
Figura 3 – Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção	34
Figura 4 – Desenho experimental do estudo	44
Figura 5 – Suporte de madeira utilizado no estudo para fixar os comedouros nas caixas	46
Figura 6 – Registro da pressão arterial de cauda e da frequência cardíaca derivada	47
Figura 7 – Exteriorização das cânulas no dorso do animal (pós-operatório)	48
Figura 8 – Registro do efeito vasodilatador mediado pelo musculo liso durante a administração de ACH.....	49
Figura 9 – Registro do efeito vasodilatador mediado pelo musculo liso durante a administração NPS.....	50
Figura 10 – Peso corporal da geração P durante as 16 semanas de dieta	59
Figura 11 – Pressão arterial de cauda e frequência cardíaca derivada da geração P ao final da 16ª de dieta.....	60
Figura 12 – Dosagens na urina de 24 horas (geração P)	61
Figura 13 – Proporção de animais que compuseram a geração F-1.....	62
Figura 14 – Peso corporal da geração F-1 durante as 16 semanas de dieta.....	62
Figura 15 – Pressão de cauda da geração F-1.....	63
Figura 16 – Pressão intra-arterial e frequência cardíaca da geração F-1.....	64
Figura 17 – Variação da pressão intra-arterial em diferentes dosagens de ACH da geração F-1	65
Figura 18 – Dosagens na urina de 24 horas (geração F-1).....	67
Figura 19 – Alterações das concentrações do <i>TBARS</i> , <i>FRAP</i> , <i>SOD</i> e <i>PC</i> no arco aórtico.....	68
Figura 20 - Alterações das concentrações do <i>TBARS</i> , <i>FRAP</i> , <i>SOD</i> , e <i>PC</i> na artéria torácica.	70
Figura 21 – Alterações das concentrações do <i>TBARS</i> , <i>FRAP</i> , <i>SOD</i> , <i>PC</i> e <i>CAT</i> nos ventrículos cardíacos	71
Figura 22 – Alterações das concentrações do <i>TBARS</i> , <i>FRAP</i> , <i>SOD</i> , <i>PC</i> e <i>CAT</i> na adrenal....	73
Figura 23 – Alterações das concentrações do <i>TBARS</i> , <i>FRAP</i> , <i>SOD</i> , <i>PC</i> e <i>CAT</i> no rim.....	74

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Δ PAM (ACH) / Δ PAM (NPS) entre os grupos da geração F-1.....	666
---	-----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP - Trifosfato de adenosina
ACH - acetilcolina
ADP - Difosfato adenosina
AMP - Monofosfato de adenosina
BH4 - Tetraidrobiopterina
BSA – Albumina sérica bovina
Ca²⁺ - Íon cálcio
CAT - Catalase
CEBIO - Centro de Bioterismo
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
cm - Centímetro
c-NOS - Óxido nítrico sintase constitutiva
Cu²⁺ - Íon Cobre (II)
DOHaD - Origem do Desenvolvimento de Saúde e Doenças
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DP - Desvio padrão
DNPH - Dinitrofenilhidrazina
Dr - Doutor
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EDRF- Fator relaxante derivado do endotélio
e-NOS - Óxido nítrico sintase endotelial
ERO - Espécies reativas de oxigênio
EUA - Estados Unidos da América
F-1 – Segunda geração
FC – Frequência cardíaca
FRAP – Poder antioxidante de redução do ferro
g - Força da gravidade
g - Gramas
GCs - guanilato ciclase solúvel
GMPc - monofosfato de guanosina cíclico
GPx - Glutathione Peroxidase
GSSG - Glutathione oxidada

GST - Glutathione S-transferase
GTP - trifosfato de guanosina
H- Grupo tratado
HH - Prole com dieta hipersódica com pais com dieta hipersódica
HN - Prole com dieta padrão com pais com dieta hipersódica
HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência
hs - Horas
H₂O - Água
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
IP₃ - inositol trifosfato
i-NOS - Óxido nítrico sintase induzível
K⁺ - Íon potássio
Kg - Quilogramas
L-Name - N-nitro-L-arginina-metil-éster
L-NA - N^G-nitro- L-arginina
L-NAA - N^G-amino-L-arginina
L-NIO - N-imino-etil-Lornitina
L-NMMA - N^G-monometil-L-arginina
LPfisar - laboratório de pesquisa em fisiologia e farmacologia
MDA - Malondialdeído
mg - Miligrama
miRNA- Micro ácido ribonucleico
mM - Milimolar
ml - Mililitro
µg - microgramas
N- Grupo controle
NaCl – Cloreto de sódio
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
Ng - Nanogramas
NN - Prole com dieta padrão com pais com dieta padrão
NH - Prole com dieta hipersódica com pais com dieta padrão
nmol - Nanomol
NPS - Nitroprussiato de sódio
NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

n-NOS - Óxido nítrico sintase neuronal

O₂ - Oxigênio

O₂^{•-} - Ânion superóxido

OONO⁻ - Peroxinitrito

HO[•] - Radical hidroxila

P – Geração parental

PAM – Pressão arterial Média

PAP – Pressão arterial pulsátil

PBS - Tampão fosfato salina

PGI₂ - Prostaciclina

PH – Potencial Hidrogênico

RNA- Ácido ribonucleico

PR – Estado do Paraná

SOD - Superóxido dismutase

TBA - Ácido tiobarbitúrico

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TPTZ - Férrico-tripiridiltriazina

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 Programação Fetal.....	27
2.2 Função Endotelial	30
2.3 Estado redox	35
2.4 Sobrecarga de sal e efeitos cardiovasculares	38
3 OBJETIVOS	41
3.1 Objetivo geral	41
3.2 Objetivo específico	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	433
4.1 Animais	433
4.2 Protocolo experimental.....	444
4.2.1 Dieta.....	455
4.2.2 Pressão de cauda	466
4.2.3 Função endotelial.....	477
4.2.4 Estado redox	50
4.2.4.1 Dissecção	50
4.2.4.2 Maceração: preparo da amostra.....	51
4.2.4.3 Peroxidação lipídica	51
4.2.4.4 Capacidade antioxidante não enzimática.....	52
4.2.4.5 Atividade da enzima CAT.....	522
4.2.4.6 Atividade da enzima SOD	533
4.2.4.7 Derivados carbonílicos em proteínas.....	533
4.2.5 Dosagens na urina de 24 horas	54
4.2.5.1 Proteinúria.....	544
4.2.5.2 Microalbuminúria	544
4.2.5.3 Creatinina urinária	555
4.7 Análise estatística	577

5 RESULTADOS	599
5.1 Peso corporal (geração P)	599
5.2 Pressão de cauda e frequência cardíaca (geração P).....	599
5.3 Dosagens na urina de 24 horas (geração P).....	60
5.4 Geração F-1	61
5.5 Peso corporal (geração F-1)	62
5.6 Pressão de cauda (geração F-1)	63
5.7 Pressão intra-arterial e frequência cardíaca (geração F-1)	63
5.8 Avaliação da função endotelial.....	64
5.9 Dosagens na urina 24 horas (geração F-1)	66
5.10 Biomarcadores do estado redox	67
6 DISCUSSÃO	75
7 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

A hipertensão é uma das principais causas de morte evitável nos países desenvolvidos, bem como de crescente prevalência naqueles em desenvolvimento. Seu descontrole aumenta consideravelmente o risco de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais (JUHASZ *et al.*, 2018). Embora se saiba muito sobre os mecanismos que controlam a pressão arterial, uma causa específica apenas pode ser determinada em uma pequena parte da população, portanto, na maioria dos casos, utilizamos o termo "hipertensão essencial" (IADECOLA; DAVISSON, 2008).

Acredita-se que a etiologia da hipertensão essencial humana seja multifatorial, haja vista que a hereditariedade pode explicar não mais do que 20 a 40% desta, por isso, fatores ambientais têm sido objeto de intenso estudo há décadas. A dieta, o tabagismo, a atividade física e obesidade, dentre outros, provavelmente desempenham um papel importante em seu desenvolvimento (VEHASKARI; AVILES; MANNING, 2001).

Um crescente corpo de evidências apoia o conceito de que as mudanças ocorridas no ambiente intra-uterino durante períodos "sensíveis" do desenvolvimento embrionário, ou na dieta infantil, após o nascimento afetariam o desenvolvimento do indivíduo, conseqüentemente, resultando em alterações na sua saúde no decorrer do envelhecimento. Esse fenômeno foi chamado então de "programação de desenvolvimento" ou "origens de desenvolvimento da saúde e da doença (DOHaD)" (BARKER, 2004, p. 28).

O crescimento e o desenvolvimento uterino são processos dinâmicos e complexos que requerem a orquestração de uma variedade de fatores maternos, paternos e fetais para um ótimo resultado. Essa complexa interação garante o adequado suprimento de nutrientes, oxigênio e sinais endócrinos, pois são elementos fundamentais para um normal desenvolvimento (REICHETZEDER *et al.*, 2016),

As respostas adaptativas embrionárias e fetais a um ambiente intrauterino inadequado, muitas das vezes ocasionado pela má nutrição materna, resultarão em conseqüências adversas permanentes para a saúde ao longo da vida (ZOHDY *et al.*, 2014). Embora essas adaptações fetais permitam sobrevivência, essas resultam também em conseqüências a longo prazo, como alterações fisiopatológicas nas estruturas cardiovasculares, renais, metabólicas, respiratórias, endócrinas e sistemas nervosos (OJEDA; GRIGORE; ALEXANDER, 2008).

Todos os tecidos e órgãos são essencialmente derivados de pequenas populações de linhagens celulares embrionárias, as quais se proliferam nos períodos embrionário e fetal,

pois se diferenciam em formas especializadas, à medida que os órgãos se amadurecem. A falta de nutrientes ou de sinais-chave durante esses estágios de desenvolvimento pode ocasionar consequências irreversíveis, as quais alteram o número e os tipos das células presentes, afetando não apenas as funções especializadas, mas também modificando o perfil dos genes expressos dentro de um tecido, já que, alteram o caminho da sinalização celular, modificando a produção de hormônios e a capacidade das células em responder a sinais hormonais (LANGLEY-EVANS, 2006).

Portanto, a hereditariedade ou o componente familiar pode ser responsável pela susceptibilidade às doenças crônicas não transmissíveis. Desta forma, fatores externos como a dieta podem atuar manifestando uma herança genética, determinando doenças na vida adulta através de gerações o que vem sendo denominado herança “Epigenética” (GLUCKMAN; HANSON; BEEDLE, 2007).

A definição do termo "epigenética" está em contínua evolução. Waddington cunhou o termo para descrever a premissa de que os genes podem responder a um ambiente dinâmico e, portanto, moldar fenótipos de modo que eles sejam perfeitamente vantajosos para o indivíduo (WADDINGTON, 1942). Uma definição operacional mais recente estreitou o uso para incluir a necessidade da herdabilidade, seja através de gerações ou células filhas, que envolvam o apagamento e a substituição subsequente de marcas epigenéticas (BERGER *et al.*, 2009).

Na última década, neurocientistas usaram o termo "modificações epigenéticas" para se referir às modificações funcionais da cromatina que altera a expressão gênica, entretanto, que não envolvam uma alteração na sequência do DNA (BALE, 2015).

As mudanças epigenéticas são observações sensíveis dos efeitos das exposições agudas e crônicas a fatores ambientais, por isso as respostas são geralmente não lineares e dependem de estágios da vida. Uma exposição aguda e de baixa dose a um fator ambiental, quando ocorrer durante a janela de susceptibilidade do desenvolvimento fetal, pode gerar efeitos muito maiores do que aquelas de alta dose no decorrer na exposição ao adulto (HO *et al.*, 2012).

Essas mudanças epigenéticas podem ser espontâneas, ou conduzidas por influências externas ou internas, sendo que a influência nutricional no desenvolvimento de alterações epigenéticas aponta para um aumento da incidência de doenças nas populações expostas a dietas desbalanceadas (PATTI, 2013). As dietas com altos teores de sal “dietas de cafeteria” ou “ocidentais”, têm sido associadas ao aumento da pressão arterial sistêmica, alterações cardiovasculares e injúria renal (BAYOL; FARRINGTON; STICKLAND, 2007).

A ingestão diária moderada de sal é essencial para a vida, à medida que mantém uma homeostase adequada de volume de líquido extracelular e pressão arterial. No entanto, seu consumo excessivo pode acarretar manifestações e agravamento da hipertensão arterial, além de provocar efeitos nocivos sobre o sistema cardiovascular, independente de ascensão da pressão sanguínea (KUSCHE-VIHROG; SCHMITZ; BRAND, 2015).

Um dos precursores responsáveis por levar ao desenvolvimento de patologias cardiovasculares é a disfunção endotelial, que pode ser definida como um estado patológico sistêmico do endotélio derivado de um desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras. Já as alterações vasculares, devido ao excessivo consumo de sal, estão relacionadas a uma alteração na síntese de óxido nítrico (NO), tendo como consequência um prejuízo na vasodilatação dependente do endotélio, comprometendo assim a capacidade de resposta das células endoteliais ao estresse de cisalhamento vascular (KAGOTA, 2002).

Entretanto, outro componente importante na fisiopatologia das doenças vasculares é desempenhado pelo estresse oxidativo, especialmente pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). O incremento da produção de ânions superóxido aumenta a inativação do NO, acarretando um acúmulo de peroxinitrito (OONO^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Logo, as ERO participam do crescimento, apoptose e migração das células musculares lisas vasculares na modulação da função endotelial, incluindo o relaxamento dependente do endotélio, na expressão do fenótipo pró-inflamatório e na modificação da matriz extracelular (FORTUÑO *et al.*, 2005).

Todos esses eventos desempenham papéis importantes nas doenças vasculares, principalmente na hipertensão, sugerindo que as fontes das ERO e as vias de sinalização que elas modificam, possam representar alvos terapêuticos importantes.

Portanto, no presente estudo avaliamos efeitos da sobrecarga de sal na função endotelial, em biomarcadores do estado redox e no comprometimento de órgãos-alvo como marcadores da programação fetal em prole de ratos wistar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Programação Fetal

Com base na premissa da “plasticidade do desenvolvimento”, quando um único genótipo influenciado por eventos intrauterinos específicos tem a capacidade de produzir diferentes fenótipos. Esta teoria baseia-se no fato de que existem períodos singulares do desenvolvimento no qual um organismo é “plástico” ou “sensível” ao seu ambiente (CALKINS; DEVASKAR, 2011). Dessa maneira, maximizando a diversidade para fornecer o melhor ajuste entre fenótipo e ambiente.

O ambiente fetal é considerado um fator essencial na etiologia das doenças cardiovasculares ao longo da vida adulta. A hipótese de que as experiências produzidas no início da vida poderiam exercer uma grande influência sobre o risco cardiovascular, foi apresentada pela primeira vez pelo Dr. Anders Forsdahl em 1973. Seus estudos evidenciaram que condições sociais precárias poderiam servir de estímulo adverso no decorrer de infância e da adolescência, possibilitando a manifestação de doenças cardiovasculares no decorrer da idade adulta (FORSDAHL, 1977). Em outras palavras, o modo de vida atual, com alto consumo de gorduras, tende a elevar o colesterol sérico mais nas pessoas que cresceram em famílias pobres do que àquelas que não vivenciaram a pobreza.

Posteriormente, o Dr. David Barker avançou esse conceito ao insinuar que essas repercussões se originavam na vida pré-natal, possibilitando em um aumento do risco cardiovascular. Ambas as observações originárias levaram-no a fazer uma forte correlação entre doença coronariana e mortalidade infantil (BARKER; OSMOND, 1986), sugerindo que uma má nutrição no início da vida aumentava a suscetibilidade aos efeitos de uma dieta afluyente. Em estudos epidemiológicos realizados na Inglaterra e no País de Gales, ao final da década de 1980.

Contudo, o Dr. Barker descreveu pela primeira vez a relação inversa entre peso ao nascer e o risco de doenças cardiovasculares em 1988 (BARKER *et al.*, 1989), idealizando o ambiente fetal como um novo componente na etiologia dessas enfermidades.

Então, baseado em suas observações, Barker considerou que a programação do desenvolvimento da doença em adultos ocorreria em resposta a um desequilíbrio no transcorrer da vida fetal, entre suas demandas e a oferta de nutrientes, resultando em uma desnutrição fetal. Resaltou que, prejuízos nesse progresso poderiam ser marcados pela restrição de crescimento intrauterino e baixo peso ao nascer, resultando em adaptações a um

ambiente fetal adverso. Esse princípio foi denominado então de "Hipótese de Barker", também chamado de "Hipótese de Programação Fetal" ou de teoria da "Origem do Desenvolvimento de Saúde e Doenças (DOHaD)" (BARKER, 2004, p. 28).

Embora essas adaptações fetais permitam a sobrevivência, elas também resultam em consequências em longo prazo, como alterações marcadas na estrutura e na fisiologia das doenças cardiovasculares, renais, metabólicas, respiratórias, endócrinas e sistemas nervosos (FOWDEN; GIUSSANI; FORHEAD, 2006).

A relação entre um deficitário ambiente intrauterino, o crescimento fetal restrito e o aumento do risco do surgimento de doenças na vida adulta ficaram bem evidenciados no "The Dutch famine study", "Estudo da fome holandesa". Neste estudo retrospectivo, as crianças nascidas durante a segunda guerra mundial foram atingidas pela escassez de alimentos, uma vez que a ingestão nutricional média diária de suas genitoras variavam entre 400 a 800 calorias (ROSEBOOM *et al.*, 2000).

Dessa maneira, os descendentes que foram expostos à fome no decorrer de seu primeiro trimestre de gestação exibiram um risco mais acentuado de manifestar doença coronariana na velhice, fato que não foi confirmado quando a exposição ocorreu durante fases posteriores da gestação. Pessoas que desenvolviam doença cardíaca coronária apresentavam um menor peso ao nascimento e um menor perímetro cefálico, todavia, o efeito da exposição à fome no início da gestação foi independente do peso ao nascer.

Entretanto, aqueles sucessores que vivenciaram a restrição a partir da metade, ou no terceiro trimestre de sua gestação se apresentavam mais leves ao nascer, e quando adultos, demonstraram redução da tolerância à glicose (ROSEBOOM *et al.*, 2000).

Curiosamente, foi demonstrado em outros estudos que a supernutrição materna resultava em um aumento de peso em sua prole (OESTREICH; MOLEY, 2017), acarretando efeitos semelhantes na saúde destes, como foi observado nos filhos com baixo peso ao nascer, derivados de um ambiente intruterino pobre em nutrientes. Logo, descendentes grandes para idade gestacional geralmente exibem uma massa adiposa aumentada, assim como um risco acentuado de apresentar doenças metabólicas quando já forem adultos (REICHETZEDER *et al.*, 2016).

A hipótese de crescimento "catch-up" ou "crescimento acelerado pós-natal", que foi proposta há aproximadamente vinte anos pelos pesquisadores Alan Lucas e Atul Singhal. Na qual, quando a taxa de crescimento pós-natal excedia o crescimento linear normal em uma prole, predisponha os mesmos a um elevado risco de desenvolver doenças metabólicas e

cardiovasculares (LUCAS, 1998). Portanto, estabelecendo o ganho de peso pós-natal como um importante marcador para a programação da doença em adultos.

No entanto, ao confrontar confrontado com a adversidade nutricional, o feto poderá sofrer remodelações, alterando dessa forma a estrutura e a função de vários órgãos, para preservar o neurodesenvolvimento e promover a sobrevivência. Essas adaptações preparam o feto para a vida extrauterina, na qual estressores adicionais podem ser encontrados. Por isso, devem se reconhecer que com o passar do tempo essa vantagem evolucionária da “plasticidade” é perdida, e as respostas aos desafios ambientais ou patológicos se tornam restritos (CALKINS; DEVASKAR, 2011).

Pesquisadores começaram a se concentrar na identificação dos mecanismos responsáveis pela associação entre exposições intrauterinas e desfechos de doenças em adultos, revelando os papéis para vários sistemas regulatórios, órgãos e tecidos em desenvolvimento na programação. Estes incluem os hormônios insulina e leptina (BRETON, 2013), o hipotalâmico-hipofisário eixo adrenal (CHEONG *et al.*, 2016), sinalização e metabolismo do tecido adiposo (FENG; ZHANG; XU, 2013), função mitocondrial (MCCONNELL, 2006), o sistema vascular e a função placentária (MYATT; ROBERTS, 2006).

Percebe-se que, os avanços nestes sistemas estão sendo feitos, uma vez que os fundamentos epigenéticos são identificados. Epigenética é definida como mudança hereditária na expressão gênica, a qual não envolve mudanças na sequência do ácido desoxirribonucleico (DNA), tendo em vista que uma mudança no fenótipo ocorre sem uma mudança no genótipo (PAL; TYLER, 2016). Logo, essa classe de mecanismos epigenéticos são as modificações da cromatina, como a metilação do DNA e histona metilação e acetilação (BALE, 2015). Na maioria das incidências, a metilação do DNA ou das histonas impede a transcrição de um fator de ligação e, assim, inibe a transcrição gênica.

Outros mecanismos epigenéticos incluem o ácido ribonucleico (RNA) não codificantes e micro-RNAs (GLUCKMAN *et al.*, 2008), mas o papel destes na DOHaD ainda não foi determinado. E, as atenções atuais nas pesquisas sobre a DOHaD são as definições dos mecanismos epigenéticos envolvidos na transmissão e no desenvolvimento programado de marcas para as gerações futuras.

2.2 Função endotelial

O endotélio vascular é uma camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, constituindo uma interface ativa, estrategicamente situada entre a circulação e o restante da parede vascular. Quando intacta controla a permeabilidade vascular, regulando o tráfego de moléculas e de células. Provendo uma interface não trombogênica entre os vasos e os componentes sanguíneos, mantendo a fluidez do sangue e modulando a vasomotricidade, ajustando o calibre dos vasos às constantes alterações hemodinâmicas, humorais e a própria estrutura vascular (BATLOUNI, 2001).

Local ativo de síntese, o endotélio pode ser considerado um verdadeiro sistema autócrino, parácrino e endócrino do organismo humano, que responde a vários estímulos, produzindo e secretando muitos compostos metabolicamente ativos, além de executar ou inibir os efeitos de substâncias circulantes (BRANDES; FLEMING; BUSSE, 2005).

Sendo assim, a importância do endotélio e seu efeito no tônus vascular foram reconhecidos pela primeira vez em 1980, quando Furchott e Zawadzki descobriram que o relaxamento da artéria aorta isolada de coelhos era provocada pela acetilcolina e dependia da presença de células endoteliais intactas em suas preparações (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980). Suas investigações mostraram que a acetilcolina interagia com os receptores muscarínicos das células endoteliais para estimular a liberação de uma ou mais substâncias que causavam o relaxamento do músculo liso subjacente, logo em seguida, a substância relaxante foi denominada fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF).

Entretanto, apenas em 1988 Furchott e Ignarro sugeriram, simultaneamente, que o EDRF e o óxido nítrico eram a mesma molécula (FURCHGOTT *et al.*, 1989;IGNARRO *et al.*, 1989).

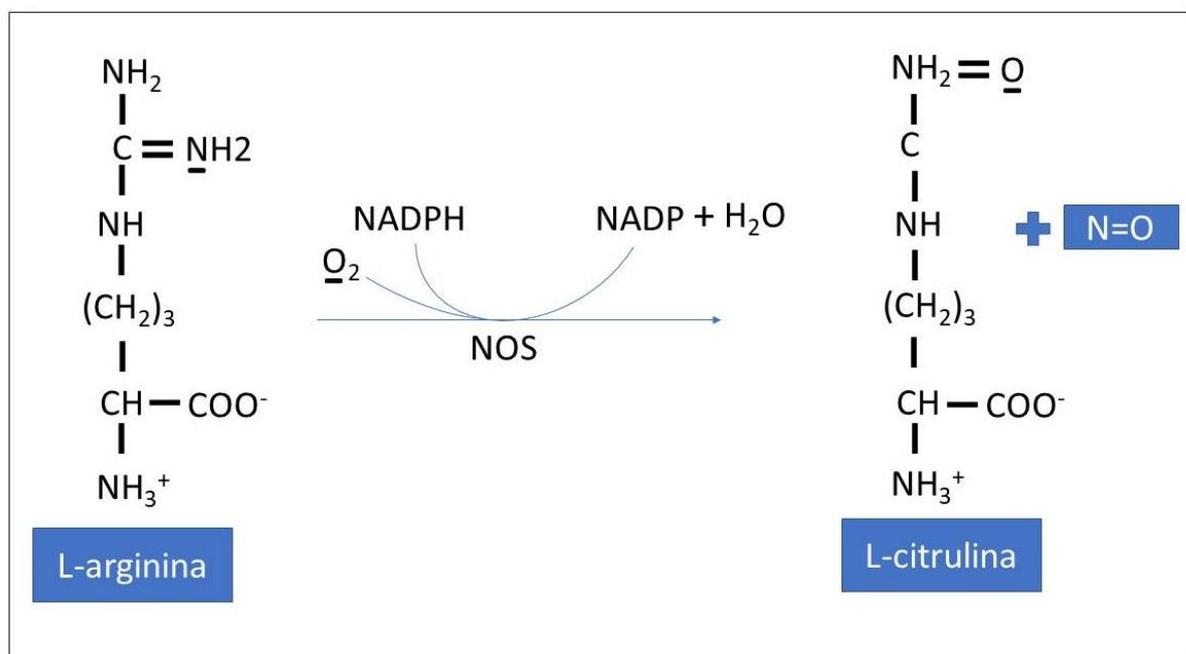
Isso posto, estudos na literatura apontam que as células endoteliais são capazes de sintetizar várias substâncias vasoativas, sendo classificadas em fatores relaxantes e contráteis. Os fatores relaxantes derivados do endotélio são: o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF); já osos fatores contráteis derivados do endotélio são a endotelina e o tromboxano (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007).

O NO constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas, é gasosa, inorgânica e incolor, possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (possui radicais livres), dessa forma tornando-o altamente reativo (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Até meados da década de 1980, o NO era considerado

apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais.

A biossíntese do NO compreende uma das funções mais importantes do metabolismo da L-arginina no organismo (FIG. 1). Sendo formado, a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina, sob a ação catalítica da enzima óxido nítrico sintase (NOS), gerando concentrações equimolares de L-citrulina, (EPSTEIN; MONCADA; HIGGS, 1993).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da formação do óxido nítrico a partir do metabolismo da Arginina pela ativação da enzima óxido nítrico sintase, NOS



Fonte: LEHNINGER, 2002. Adaptado.

Uma variedade de isoformas da NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos e muitas já tiveram seus genes clonados. Estudos bioquímicos e a análise sequencial de aminoácidos revelaram que estas isomorfias representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos (BUSSE; MÜLSCH, 1990).

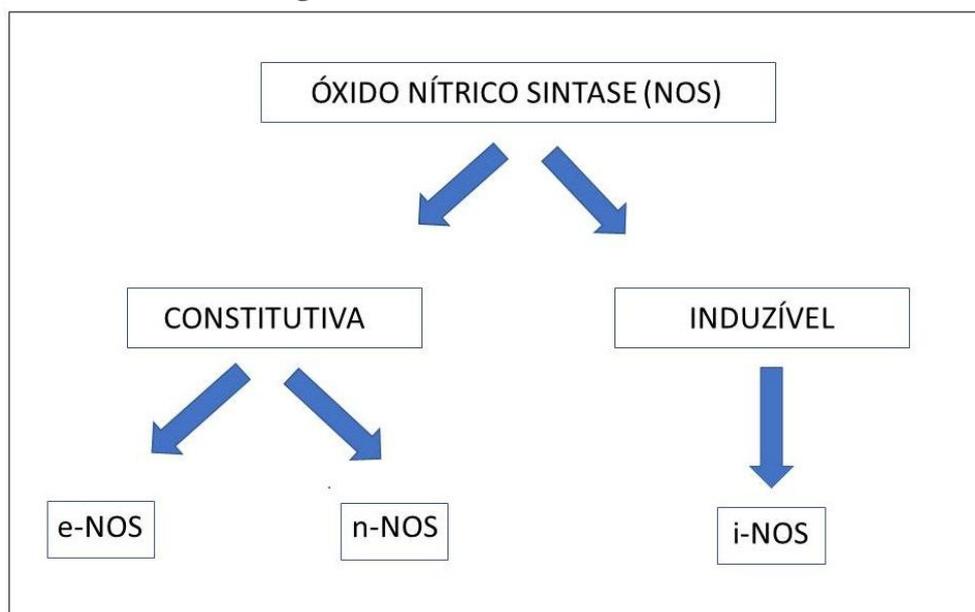
Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias: a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca²⁺) e de calmodulina que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS) produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (FIG. 2). A c-NOS e a i-NOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (LOSCALZO; WELCH, 1995), já foram caracterizadas, purificadas e tiveram os genes clonados (BREDT; SNYDER, 1990).

A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1990).

A c-NOS produz pequenas quantidades de NO, da ordem de nano ou picomols, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de Ca^{++} (BUSSE; MÜLSCH, 1990).

A i-NOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Essa isoforma requer algumas horas para ser expressa, entretanto, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a c-NOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os cofatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra morte celular (DUSTING; MACDONALD, 1995).

Figura 2 - Isoformas da NO-sintase



Fonte: DUSSE, 2003. Adaptado.

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos. Como a N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), N^G -amino-L-arginina (L-NAA), N^G -nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N-nitro-L-arginina-metil-éster (L-Name), (SIBAL *et al.*, 2010). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS.

A ativação da NOS e a consequente síntese de NO pelas células endoteliais ocorrem, a partir de estímulos que podem ser químicos ou físicos. Os estímulos químicos são originados da interação de agonistas endógeno/exógenos com receptores específicos presentes nas células endoteliais ativadores da acetilcolina, ATP e bradicinina. A interação agonista-receptor, na célula endotelial, promove a formação de inositol trifosfato (IP3) que, por sua vez, induz a liberação de íons Ca^{2+} do retículo endoplasmático, elevando os níveis de Ca^{2+} intracelular, formando o complexo cálcio-calmodulina, ativando a enzima NOS que irá atuar na L-arginina, gerando a formação do NO pelo endotélio (BUSSE; MÜLSCH, 1990).

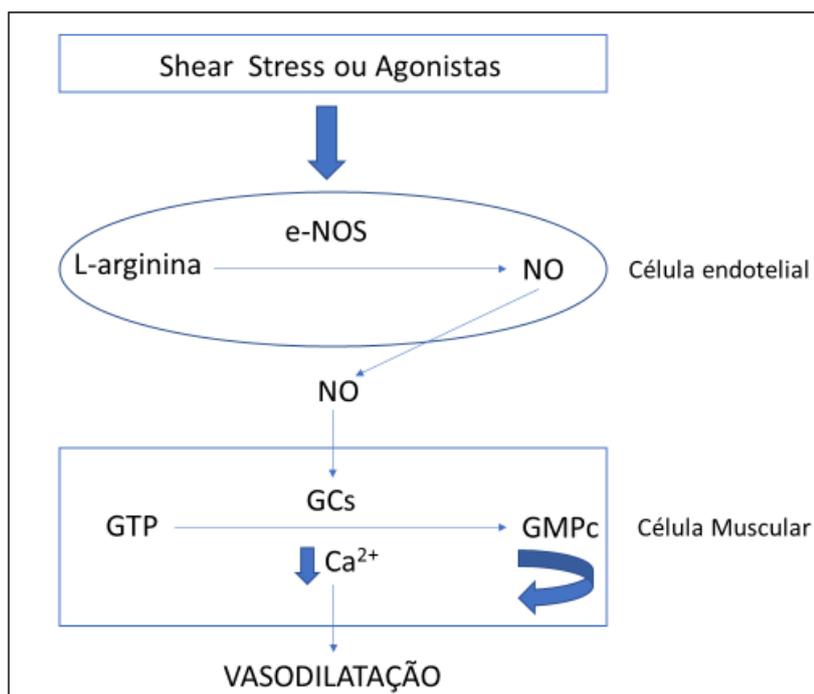
O estímulo físico é feito pela força que o sangue exerce sobre a parede das artérias, denominada força de cisalhamento, ou *shear stress* (ROSS, 1999), e o mecanismo pelo qual promove a formação de NO não está completamente esclarecido. Sabe-se que as células endoteliais possuem mecanorreceptores que podem ativar diretamente as proteínas G, os canais iônicos e as enzimas do grupo das proteínas quinases e fosfatases, que vão promover a formação de segundos mensageiros, desencadeando uma série de reações químicas que envolvem a participação dos íons cálcio, até a vasodilatação propriamente dita (ANDERSON, 1999).

Assim, as células endoteliais comportam-se de forma dinâmica e respondem às alterações tanto dos estímulos físicos (*shear stress*) quanto dos estímulos químicos, promovendo a síntese e liberação de substâncias vasoativas (FORSTERMANN, 2006).

Uma vez liberado, o NO difunde-se rapidamente da célula geradora para a célula-alvo ou, mais particularmente, das células endoteliais para a musculatura lisa do vaso sanguíneo. Na célula muscular lisa, o NO irá ativar uma enzima catalítica, a guanilato ciclase solúvel (GCs). Essa ativação é feita pelo acoplamento do NO com o grupamento heme desta enzima (sítio receptor) que por sua vez irá formar o monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), a partir da quebra do trifosfato de guanosina (GTP). A formação do GMPc promove a ativação da bomba de cálcio dentro da célula muscular lisa, diminuindo as concentrações de cálcio intracelular que promoverá a redução do tônus vascular (KAGOTA, 2002),(FIG. 3).

Outros mecanismos pelos quais a via NO/GMPc induz vasodilatação incluem inibição da geração de IP3 (na musculatura lisa), desfosforilação da cadeia leve de miosina, inibição do influxo de Ca^{2+} , ativação de proteínas quinases, estimulação da Ca^{2+} -ATPase de membrana e abertura de canais de K^+ (URAKAMI-HARASAWA *et al.*, 1997).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da síntese, liberação e ação do NO e o papel da eNOS na sua produção



Fonte: ZAGO e ZANESCO, 2006. Adaptado.

A disfunção endotelial é frequentemente referida como a piora no relaxamento dependente do endotélio, causada, entre outros aspectos, pela perda da biodisponibilidade do NO, uma vez que os fatores de contração derivados do endotélio se encontram aumentados. Este desequilíbrio acarreta em um comprometimento na vasodilatação dependente do endotélio, representando assim a característica funcional da disfunção endotelial (BONETTI; LERMAN; LERMAN, 2003). Algumas doenças, como hipertensão arterial, diabetes mellitus, insuficiência cardíaca e hipercolesterolemia, podem causar danos ao endotélio, gerando disfunção endotelial, que, muitas vezes, está relacionada à aterosclerose e aos eventos cardiovasculares (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

O NO desempenha um importante papel na fisiologia da parede vascular, fazendo uso da inibição da inflamação, proliferação celular e trombose. Uma mudança fundamental envolvida neste processo ocorre, a partir de uma mudança na sinalização, através do silenciamento celular, mediado pelo NO, em direção a uma ativação da sinalização redox. As espécies reativas de oxigênio (ERO), na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), pois levam à geração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que como NO, podem se difundir rapidamente por todas as células e reagir com os grupos cisteína das proteínas alterando sua função, como a fosforilação de fatores de transcrição, a indução da remodelação da cromatina

nuclear, assim como nos genes da transcrição e da ativação de protease (DEANFIELD; HALCOX; RABELINK, 2007).

Em algumas condições, o aminoácido L-arginina (substrato da enzima), na falta do cofator chave tetra-hidrobiopterina (BH₄), poderia, através da NOS, produzir superóxido em maior quantidade do que NO, em uma condição conhecida como desacoplamento da NOS. Nesse caso, óxido nítrico e superóxido (O₂^{•-}) juntos podem formar peroxinitrito (ONOO⁻) podendo levar à oxidação da tetra-hidrobiopterina, um cofator crítico para a eNOS, assim, perpetuando um ciclo vicioso de produção de ERO (VASQUEZ-VIVAR *et al.*, 1998). Dessa forma, a capacidade da eNOS de regular tanto o repouso quanto a disfunção endotelial, colocam esta enzima no centro da homeostase endotelial.

Embora não se possa implicar a disfunção endotelial como fator etiológico primário na hipertensão arterial, essa disfunção contribui com o desenvolvimento e o agravamento do quadro hipertensivo, inclusive aumentando a proliferação de células musculares lisas e induzindo hipertrofia/hiperplasia da parede vascular.

2.3 Estado redox

Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares, e no citoplasma. Tais mecanismos podem, especialmente, ser favorecidos pelos íons ferro e cobre (KOURY; DONANGELO, 2003). A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres (MURPHY, 1999).

Em condições fisiológicas, os organismos aeróbicos metabolizam cerca de 90% do oxigênio (O₂) consumido na mitocôndria através da cadeia transportadora de elétrons, o restante é utilizado por enzimas oxidases e oxigenases e por reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

O oxigênio sofre redução tetravalente, na mitocôndria, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (a enzima utilizada nesta reação é a citocromo oxidase). Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, a referida enzima oxida quatro moléculas de citocromo c removendo um elétron de cada uma delas. Esses elétrons são adicionados ao O₂ formando água. A ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, dando origem aos radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Tendo em vista a redução univalente do O₂ são gerados os radicais superóxido (O₂^{•-}), hidroxila (OH[•]) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O H₂O₂, a despeito de não ser um radical livre, por não ter um elétron desemparelhado na sua última camada eletrônica, possui alto potencial reativo. Diferente dos radicais livres, o H₂O₂ tem vida longa e é capaz de atravessar as membranas celulares apresentando-se potencialmente tóxico para as células (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Além da capacidade do O₂^{•-} em participar de reações de geração de OH[•] pode ainda, por meio da reação com o radical livre óxido nítrico (NO[•]), constituir a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO⁻) (MURPHY, 1999).

Outra importante fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina). Essas são proteínas transmembrana que têm a função de transferir elétrons através das membranas celulares. Geralmente, o acceptor de elétrons é o oxigênio e, dessa forma, em decorrência desse processo, gera-se o radical O₂^{•-}. Estas enzimas existem em pelo menos seis isoformas, diferindo quanto ao local de expressão e cofatores necessários para a sua ativação (GRIENGLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000).

A noção de “estresse oxidativo” foi originalmente definida por Sies em 1985, referindo-se ao desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, resultando em larga biodisponibilidade das espécies reativas de oxigênio (ERO), com dano tecidual (JONES; RADI, 2014).

Esta definição tradicional de estresse oxidativo foi modificada porque agora tal desequilíbrio pode ser localizado em compartimentos subcelulares, como a mitocôndria, o núcleo, ou localizado na membrana celular. Alterações na produção das ERO localizadas nas mitocôndrias podem afetar a homeostase energética, uma vez que a produção localizada no núcleo pode afetar eventos transcricionais e o controle epigenético. As ERO extracelulares podem participar da sinalização exterior e afetar a função celular (LOPERENA; HARRISON, 2017).

Danos oxidativos a proteínas, lipídios ou DNA podem ser seriamente deletérios e podem ser concomitantes. Entretanto, as proteínas são possivelmente o meio mais imediato para ocasionar danos oxidativos nas células. Os grupos carbonílicos são produzidos nas cadeias laterais da proteína quando oxidados. Estas porções são quimicamente estáveis, facilitando sua detecção e armazenamento (DALLE-DONE *et al.*, 2003). O teor de proteína carbonilada é, na verdade, o marcador comumente mais utilizado na oxidação de proteínas.

A produção endógena de superóxidos e peróxidos de hidrogênio podem iniciar a peroxidação lipídica em membranas biológicas expostas. Os radicais de ácidos graxos então formados podem reagir espontaneamente com o oxigênio, formando peroxiradical. Este por sua vez pode propagar a peroxidação de mais moléculas de ácidos graxos, pela retirada de átomos de hidrogênio, formando hidroperóxidos e novos radicais, levando a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O produto da peroxidação lipídica mais frequentemente utilizado como marcador de desequilíbrio redox é o Malondialdeído (MDA) que é formado pela cisão- β de ácidos graxos poliinsaturados peroxidados e é comumente medido por derivatização com ácido tiobarbitúrico (TBA), podendo ser mensurado espectrofotometricamente (AGARWAL; CHASE, 2002). O método para detecção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico é geralmente reconhecido como TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Sob estresse oxidativo, leve ou intermediário, os organismos geralmente bloqueiam programas gerais de seu ciclo de vida, como a reprodução ou biossíntese extensa, para desenvolver respostas para prevenir ou neutralizar os efeitos negativos da ERO. Contudo, sob estas condições alguns mecanismos que fornecem sobrevivência sob estresse oxidativo são ativados. Esses mecanismos são baseados principalmente com base na suprarregulação de enzimas antioxidantes e relacionadas. Os princípios de controle da realização desta reprogramação incluem detecção, transdução de sinais através de vias específicas e regulação crescente de genes alvo (LUSHCHAK, 2014).

Antioxidantes são moléculas que impedem a oxidação de outras moléculas, muitas vezes sendo oxidadas. Devido à nossa atmosfera rica em oxigênio, todos os organismos vivos, incluindo bactérias, plantas e animais, adaptaram e desenvolveram defesas enzimáticas e não enzimáticas contra o estresse oxidativo crônico (LOPERENA; HARRISON, 2017).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação de $O_2^{\bullet-}$ para H_2O_2 e O_2 molecular. Catalase e glutathiona peroxidase decompõem ainda mais H_2O_2 em H_2O e O_2 . A glutathiona peroxidase requer glutathiona como co-substrato, produzindo glutathiona oxidada (GSSG) na reação. Além do H_2O_2 glutathiona peroxidase também reduz hidroperóxidos lipídicos para seus respectivos álcoois e assim protegendo a membrana celular da peroxidação lipídica. Glutathiona peroxidase também é protetor contra ONOO⁻ reduzindo eficientemente a nitrito (HALLIWELL; CROSS, 1994).

O sistema de defesa não enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam as vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes (PRASAD *et al.*, 2007).

Os processos envolvendo ERO em organismos vivos estão sendo extensamente pesquisados ao longo dos últimos anos. Estudos com foco em seus efeitos negativos prevalecem até agora. Contudo, as descobertas no campo, relacionadas aos papéis das ERO no sistema imunológico, transdução de sinal e finalmente regulação de funções dos organismos abriram o horizonte para novas pesquisas.

2.4 Sobrecarga de sal e efeitos cardiovasculares

Os mecanismos subjacentes aos aumentos da pressão arterial induzidos pelo sódio não são completamente compreendidos, mas podem envolver alterações na função renal, volume de fluidos, hormônios reguladores de fluidos, vasculatura, função cardíaca e sistema nervoso autônomo. Dados pré-clínicos e clínicos recentes sustentam que, mesmo na ausência de um aumento na pressão arterial, o excesso de sódio na dieta pode afetar adversamente os órgãos-alvo, incluindo os vasos sanguíneos, coração, rins e cérebro (FARQUHAR *et al.*, 2014).

A evolução do consumo de alimentos por seres humanos ocorreu concomitantemente com mudanças na saúde cardiovascular. Da alimentação restrita devido a um ambiente desfavorável a uma dieta progressivamente rotineira de fast food nas regiões da cultura ocidental, a incorporação diária de certos componentes na dieta afetou diretamente a saúde dos seres humanos (JEW *et al.*, 2009). Atualmente, a ingestão de sódio na população em geral é cerca de dez vezes superior à consumida no passado; e pelo menos o dobro da recomendação atual (LOYD-JONES *et al.*, 2010).

A associação entre a quantidade de sal na dieta e a pressão arterial foi primeiramente sugerida em 1904 e amplamente reconhecida após Kempner, mostrando em 1948 que as dietas de arroz contendo menos de 0,5 g de sal melhoravam a pressão arterial, diminuíam o tamanho do coração, invertiam as ondas T no eletrocardiograma e melhoravam a retinopatia hipertensiva (KEMPNER, 1948). Desde então, a partir de estudos em animais, evidenciou uma relação causal entre o sódio dietético e hipertensão. Investigações em seres

humanos estabeleceram que a pressão arterial da população esteja relacionada diretamente com a ingestão média de sal.

Em recente meta-análise foi confirmada que a diminuição do consumo de sal para 5 g / dia por 4 semanas ou mais reduziu a pressão arterial sistólica e diastólica em 5 e 2,7 mmHg, respectivamente, em hipertensos e em cerca de metade desses valores em indivíduos normotensos. Através deste estudo concluiu que a restrição alimentar, se aplicada à população em geral, resultaria provavelmente em melhores desfechos cardiovasculares (HE; MECGRGOR, 2004).

Em 1963, Borst e Borst-de Geus postularam que “a hipertensão faz parte de uma deficiente reação homeostática na excreção de sódio renal”, um conceito que foi expandido e definido por Guyton et al em 1972 com a descrição do mecanismo pressão/natriurese. A característica central desse modelo está relacionada à ligação entre a pressão arterial e o equilíbrio de sódio, onde qualquer desequilíbrio entre a ingestão de sal e excreção levaria a uma alteração progressiva no preenchimento do sistema vascular e, portanto, mudanças na pressão arterial.

Isso, por sua vez, alteraria a excreção de sódio, uma característica definida como a relação pressão-natriurese (GAYTON *et al.*, 1972). Um aspecto chave neste conceito é o que coloca o rim no centro do controle da pressão arterial a longo prazo. Logo, qualquer alteração crônica da pressão arterial deve ter sido acompanhada por uma alteração na relação pressão-natriurese.

Uma elevação da pressão arterial é um fator de risco prevalente que tem sido associado a um aumento da ingestão de sal. O estudo INTERSALT que avaliou 52 diferentes populações com uma grande variedade no consumo de sal demonstrou uma significativa correlação entre a pressão arterial e a excreção de sódio na urina de 24 horas. Em modelos animais de lesão renal, uma alta ingestão de sal está associada a um aumento na pressão glomerular e na deteriorização da função renal (BERNARDI *et al.*, 2011).

Recentemente, Sanders descreveu a ligação fisiopatológica entre o alto consumo de sal, com a disfunção e rigidez do endotélio, assim como a lesão de órgãos-alvo induzida pelas alterações na estrutura e função vascular, acarretando modificações na produção de NO (SANDERS, 2009).

O NO, além de possuir propriedades vasodilatadoras, inibe a produção do fator endotelial de transformação do crescimento beta (TGF- β 1). Na disfunção endotelial, o TGF- β 1 não é suficientemente bloqueado, dessa forma, a fibrogênese mediada por TGF- β 1 contribui com o aumento da rigidez arterial e vasoconstrição. Seu efeito promove o

desenvolvimento de hipertensão, acarretando sintomas relevantes e dano vascular (KUSCHE-VIHRIG *et al.*, 2015).

Um aumento na expressão de TGF- β 1 foi observada em vários modelos de lesão renal progressiva e doença cardiovascular. Portanto, é provável que o TGF- β 1 desempenhe um papel na hipertrofia e fibrose de órgãos induzidos por dieta hipersódica (HENRY *et al.*, 1998).

Uma dieta rica em sal favorece a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), logo esse aumento no estado redox sistêmico pode contribuir para prejudicar a função endotelial, diminuindo a dilatação endotélio-dependente. Um mecanismo sugerido, neste caso, é que a sobrecarga de sal aumenta a produção do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ao interagir com NO, favorecendo a formação do peroxinitrito ($ONOO^-$), reduzindo a biodisponibilidade de NO (BRAGULAT *et al.*, 2001).

Portanto, uma maior produção de ERO ocasionada pela dieta hipersódica assim como uma atenuação no sistema de defesa antioxidante contribui para disfunção endotelial em doenças cardiovasculares.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do nosso estudo foi avaliar alterações na função endotelial em biomarcadores do estado redox e no comprometimento de órgãos alvo em prole de ratos Wistar como consequência da dieta hipersódica na programação fetal.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a pressão de cauda nas gerações P e F-1.
- Avaliar o comprometimento renal nas gerações P e F-1.
- Avaliar a função endotelial e biomarcadores teciduais do estado redox na geração F-1.

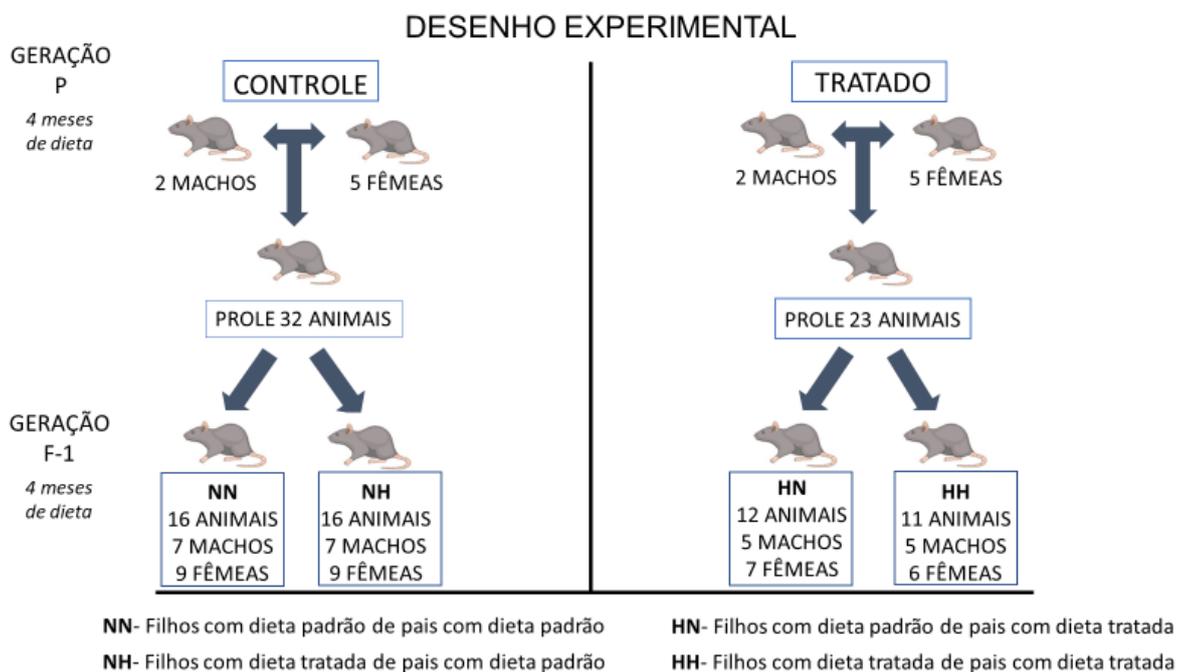
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados no estudo 69 ratos *Wistar*, sendo que na primeira fase do experimento (geração P) foram utilizados 14 animais: 10 fêmeas e 4 machos com cerca de 4 semanas de idade, todos fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. Durante a segunda fase da pesquisa (geração F-1), foram utilizados 55 animais, sendo 31 fêmeas e 24 machos.

Os animais foram mantidos no laboratório de pesquisa em fisiologia e farmacologia (LPfisfar sala 4) da UFVJM, em gaiolas climatizadas com temperatura controlada (22/ 23°), com sistema de exaustão e ciclos de luz de 12 horas, não invertido, tendo livre acesso à ração para roedores (Nuvilab CR1- NuvilabNutrients LTDA, Colombo, PR, Brasil) e água limpa.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA/UFVJM, protocolo nº 02/2017), conforme previsto pela Lei nº 11794 de 8 de outubro de 2008. O desenho experimental do estudo está ilustrado na Figura 4, cujo detalhamento é apresentado nas sessões que seguem.

Figura 4 - Desenho experimental do estudo

4.2 Protocolo experimental

Na primeira fase do experimento foram utilizados, 14 ratos *Wistar* com cerca de 4 semanas de vida (geração P). Os animais foram então divididos em 2 grupos iguais, grupo controle (N) e grupo tratado (H), total 7, sendo 2 machos e 5 fêmeas. Estes animais receberam ração para roedores farelada (Nuvilab CR1- NuvilabNutrients LTDA, Colombo, PR, Brasil), sendo que o grupo tratado (H) recebeu a ração suplementada com NaCl a 4% (sal de cozinha não iodado), e o grupo controle (N) recebeu a ração sem a suplementação de NaCl.

Os machos ficaram separados das fêmeas durante 16 semanas, até o acasalamento, que ocorreu entre os animais de cada grupo (controle e tratado). Durante a gestação e no período de amamentação das crias (geração F-1), as fêmeas da geração P continuaram recebendo as dietas específicas para cada grupo.

Após o desmame das crias de P, com de cerca de 21 dias, essas foram divididas em 4 grupos. As crias do grupo controle (N) foram divididas nos grupos (NN) com 16 animais, recebendo dieta padrão e (NH) com 16 animais, recebendo dieta suplementada com NaCl 4%. A prole do grupo tratado (H), foi dividida nos grupos (HN) com 12 animais,

recebendo a dieta padrão e (HH) com 11 animais, recebendo a dieta suplementada com NaCl 4%.

No grupo tratado duas das cinco fêmeas do grupo não procriaram, por isso os grupos HN e HH apresentaram menos animais quando comparamos ao número de animais dos grupos NN e NH, uma vez que as cinco fêmeas do grupo controle deram procriaram. Os quatro grupos da geração F-1 consumiram essas dietas durante 16 semanas, após este período os experimentos foram realizados.

A massa corporal foi monitorada durante todo o período experimental, tanto para a geração P, quanto para a geração F-1.

4.2.1 Dieta

A ração para roedores (Nuvilab CR1- NuvilabNutrients LTDA, Colombo, PR, Brasil) foi adquirida de fábrica farelada na sua forma, assim seria viável proceder a suplementação com o sal de cozinha.

Para a suplementação com NaCl, a cada 960 g de ração farelada, foram adicionados 40 g de NaCl. Em seguida o material foi homogeneizado, inicialmente por meio de passagem em peneira de menor mesh por duas vezes. Em seguida, o procedimento foi repetido em peneira de maior mesh para a completa homogeneização da ração suplementada. As dietas foram oferecidas em comedouros de aço inoxidável, em condição de livre acesso durante todo o período experimental.

Como medida de proteção para que os comedouros não fossem derrubados pelos animais nas caixas e misturados a maravalha, foram colocados nas caixas, um suporte de madeira com dimensões de 30x5x2 cm, apresentando forma de meia lua em suas extremidades, aonde os comedouros eram afixados (FIG. 5).

Figura 5 - Suporte de madeira utilizado no estudo para fixar os comedouros nas caixas



4.2.2 Pressão de cauda

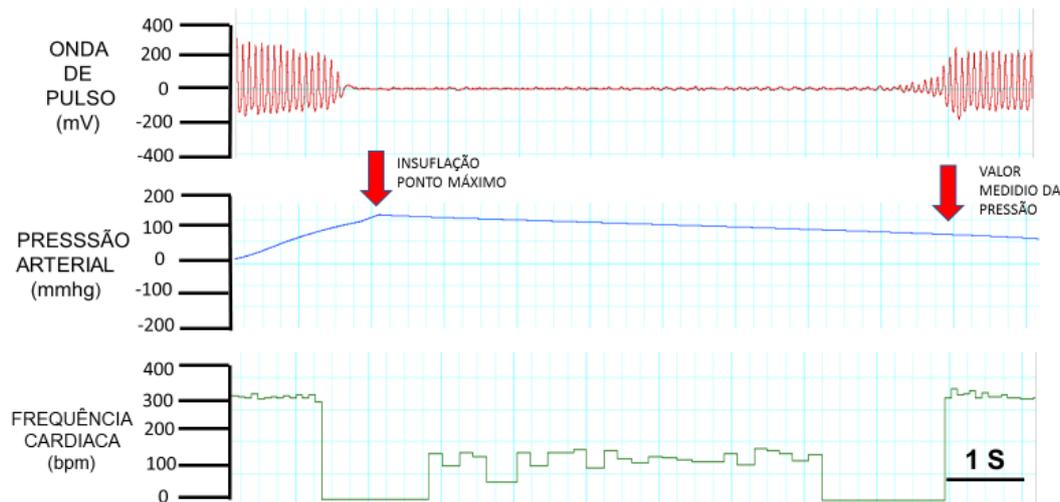
Ao final das 16^a semanas de intervenção, foi realizada uma aferição da pressão de cauda na geração P. Enquanto que na geração F-1, foram realizadas medidas com 4, 8, 12 e 16 semanas de tratamento.

Como em toda experimentação animal, foi necessário estabelecer um ambiente adequado, tranquilo, e adaptar os animais para o procedimento, de maneira a reduzir o estresse. Fato que poderia alterar os parâmetros de pressão dos mesmos.

Foi utilizado o método não invasivo e indireto de pletismografia da artéria caudal (MLT1020PPG IR Plethysmograph, PowerLab). Os animais foram submetidos a aquecimento moderado em caixa aquecedora (40° C, por 10 min) para provocar vasodilatação da artéria caudal e em seguida foram mantidos em cilindro de acrílico sob contenção de movimento. O procedimento de registro foi realizado através da inserção da cauda em um manguito de borracha, ligado ao esfigmomanômetro, na região proximal da cauda e, logo após um transdutor pneumático foi utilizado para detecção dos pulsos, permitindo o registro no sistema (ADInstruments Ltd, UK). Foram feitas três medidas da pressão de cauda e utilizou-se a média aritmética delas como resultado (NEVES *et al.*, 2016).

Através do registro de pulso foi determinado o valor da pressão arterial de cauda e da frequência cardíaca era mostrado em forma de gráfico (FIG. 6).

Figura 6 - Registro da pressão arterial de cauda e da frequência cardíaca derivada



4.2.3 Função endotelial

Para avaliar a função endotelial *in vivo*, aperfeiçoamos para ratos o método desenvolvido anteriormente por Xu e colaboradores (XU, *et al.*, 2008) para camundongos.

A função endotelial foi avaliada ao final da 16ª de dieta, através das variações medidas na pressão intra-arterial média (PAM), em resposta à administração, em bolus (0,1 ml), de acetilcolina (Sigma Aldrich), nas doses de 25, 50, 100, 200 ng/kg e (0,1 ml) de nitroprussiato de sódio na dose de 20 µg/Kg via artéria aorta descendente (FIG. 8 e 9).

As substâncias foram administradas com intervalos regulares, de 5 minutos, entre uma dose e outra. Para avaliar a função da musculatura lisa vascular, como também, corrigir as diferenças na reatividade do músculo liso vascular, a resposta à ACH foi normalizada pela resposta ao NPS de acordo com a fórmula, $\Delta PAM (ACH) / \Delta PAM (NPS)$.

Inicialmente, os animais foram anestesiados de forma intraperitoneal com ketamina (100 mg / kg) e xilazina (10 mg/kg) utilizando-se seringas de 1 ml. Foi necessário monitorar constantemente o animal anestesiado verificando visualmente sua frequência respiratória. Após a perda dos reflexos e a completa analgesia do animal era iniciada a cirurgia para a introdução da cânula. Sendo feita a retirada dos pelos da região cervical, da região anterior do pescoço e da coxa na mesa operatória assim como a desinfecção da pele com álcool 70 % e betadine.

Foi realizada uma incisão na região do pescoço para a implantação da cânula na artéria carótida em direção ao arco aórtico e aorta descendente (torácica). A artéria carótida foi então isolada separando-a do músculo paratraqueal, necessitando também proceder cuidadosamente à separação desta do nervo vago, de forma a realizar uma sutura nas extremidades da artéria a ser canulada, obstruindo o fluxo sanguíneo.

Para prevenir hemorragia, enquanto o cateter era introduzido, foi feita uma terceira sutura entre a sutura proximal e distal. Neste momento era realizada uma pequena incisão para inserção da cânula, colocando um grampo com o avançado da cânula até a internalização da mesma na região do arco aórtico. Com vários nós, foi fixada a cânula e então infundida solução salina-heparinizada. Após realizar a canulação da artéria carótida, fizemos o mesmo procedimento na artéria femoral (JESPERSEN *et al.*, 2014).

Uma vez implantadas, com auxílio de um trocáter, as cânulas foram dirigidas subcutaneamente para a cintura escapular, sendo exteriorizadas no dorso do animal, na região cervical e fixadas com linha de sutura (FIG. 7).

Figura 7 - Exteriorização das cânulas no dorso do animal (pós-operatório)

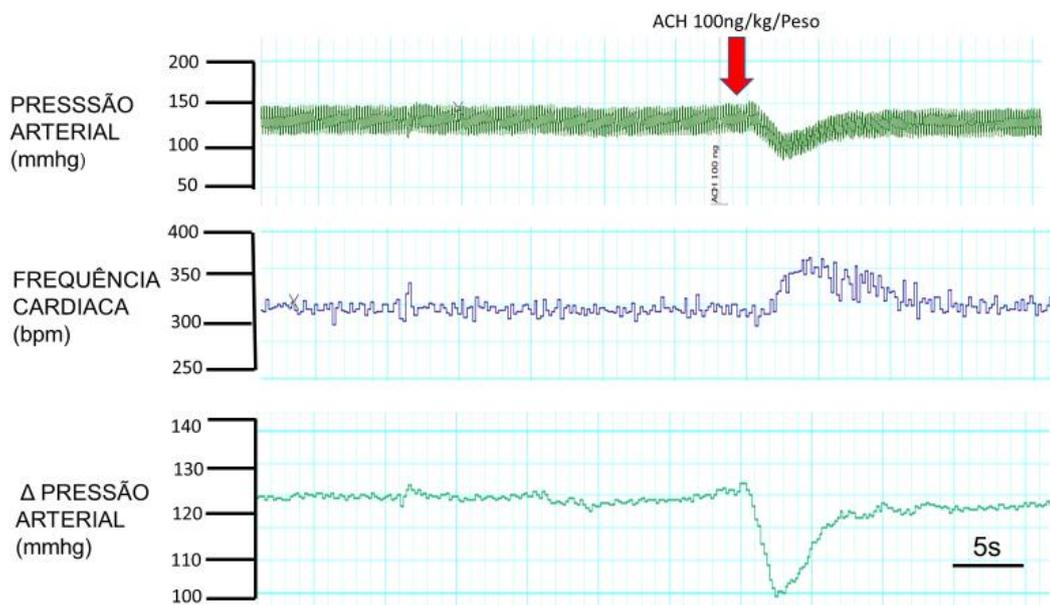


Os registros da pressão arterial e da frequência cardíaca foram realizados no dia seguinte (aproximadamente 12 hs), ao da cirurgia de canulação, com os animais não-anestesiados e com livre movimentação. A cânula arterial, previamente heparinizada, foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados analógico-digital. Para isso utilizamos um programa de computador, com prévia calibração do

equipamento, PowerLab (ADInstruments), para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

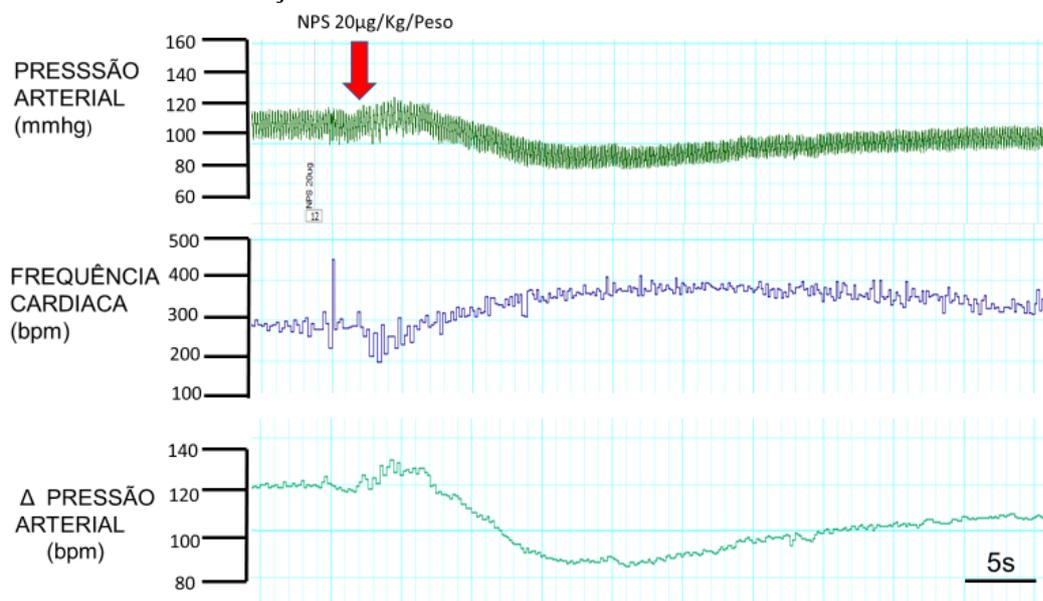
As cânulas foram lavadas com solução salina heparinizada para garantir a sua permeabilidade. A cânula da artéria carótida foi utilizada para administração das drogas (acetilcolina e nitroprussiato de sódio), enquanto a cânula inserida na artéria femoral foi utilizada para registro direto da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Figura 8—Registro do efeito vasodilatador mediado pelo musculo liso durante a administração de ACH



Nota: ACH 100ng/Kg, frequência cardíaca e pressão intra-arterial.

Figura 9 – Registro do efeito vasodilatador mediado pelo musculo liso durante a administração NPS



Nota: ACH 20ug/Kg, frequência cardíaca e pressão intra-arterial.

4.2.4 Estado redox

4.2.4.1 Dissecação

As dissecações para a coleta e preparo dos tecidos foram realizadas ao final das 16^a semanas de dieta, em dois dias consecutivos (dois grupos em cada dia) com intervalo de 24 horas. Foram retirados o arco aórtico, a artéria torácica, os ventrículos cardíacos, a adrenal esquerda e o rim esquerdo. Após sua retirada do animal as amostras ficaram congeladas em nitrogênio líquido e suas análises foram feitas no 3^a e 4^a dia após a última dissecação. No primeiro dia realizamos os ensaios TBARS, FRAP, SOD, CAT E PC das amostras do arco aórtico, artéria torácica e ventrículos. No dia seguinte, os mesmos ensaios foram realizados na glândula adrenal esquerda e rim esquerdo. Imediatamente após serem eutanasiados, os animais tiveram seus tecidos rapidamente dissecados como descrito a seguir.

Para dissecação dos ventrículos, arco aórtico e artéria torácica realizamos uma esternotomia mediana longitudinal. Após dissecação, retiramos da caixa torácica o coração junto com a artéria aorta. Já o pericárdio foi removido assim como o tecido conjuntivo da

artéria aorta, dissecando então o arco aórtico e a artéria torácica do coração, nesse, foi realizado um corte transversal com bisturi, para separar os átrios dos ventrículos. Para a dissecação do rim esquerdo e da glândula adrenal esquerda realizamos uma laparotomia mediana. As vísceras do abdômen foram rebatidas, ficando exposto o rim, daí realizamos então a dissecação do mesmo, em conjunto da adrenal esquerda, enquanto que o tecido gorduroso e o tecido conjuntivo foram removidos. Todos os fragmentos foram lavados em PBS (0,15M pH 7,34) e congelados em nitrogênio líquido. O procedimento foi realizado em aproximadamente 4 minutos.

4.2.4.2 Maceração: preparo da amostra

As amostras foram maceradas em um macerador de tecidos Potter-Elvehjem (Corning) mantido no gelo, em PBS (0,15M, pH 7,34) gelado. O homogenato foi dividido em duas alíquotas. A primeira alíquota centrifugada (Thermo Electron. Led GMBH D37520, Alemanha) a 5000 g, por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante destinado à mensuração TBARS e à capacidade antioxidante não enzimática. O sedimento foi utilizado para a mensuração do conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas. A segunda alíquota centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante utilizado para a medida da atividade das enzimas SOD e CAT, como parâmetro da capacidade antioxidante enzimática. As alíquotas para cada ensaio foram mantidas no gelo enquanto aguardavam dosagem.

4.2.4.3 Peroxidação lipídica

A reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica, foi utilizada para determinar a concentração de TBARS. Alíquotas do homogenato (0,230 mL) foram adicionadas a 0,250 mL de ácido acético (2,5 M, pH 3,4), 0,1 mL de duadecil sulfato de sódio (8,1%) e 0,25 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida a 95 °C durante 90 minutos. Decorrido esse período, as amostras foram resfriadas e centrifugadas durante 5 minutos, a 5000 g (Thermo Electron. Led GMBH D37520, Alemanha) e 0,25 mL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços de fundo chato. Na sequência, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 532 nm em leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA). A concentração de TBARS nas amostras foi determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas

de MDA (1,1,3,3 – tetrametoxipropano - Sigma, EUA) e expressa em nmol MDA/mg proteína. As medidas foram realizadas em duplicata (OHKAWA ET AL., 1979). Realizamos as medidas em duplicata.

4.2.4.4 Capacidade antioxidante não enzimática

A capacidade antioxidante não enzimática das amostras foi determinada pelo método FRAP. A capacidade de redução do complexo da forma Fe^{3+} -TPTZ (ferri-tripiridiltriazina) para a forma Fe^{2+} -TPTZ (ferrosotripiridiltriazina) pelos antioxidantes não enzimáticos do homogenato, em pH ácido, que determinou o poder antioxidante da amostra. Para a confecção do reagente FRAP, 25 ml de tampão acetato de sódio (0,3 M, pH 3,6) foram acrescentados a 2,5 ml de TPTZ (10 mM, Sigma-Aldrich®, EUA) e depois misturados a 2,5 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (20 mM). A uma alíquota de 528 μL do reagente FRAP adicionou-se 72 μL do homogenato. Essa mistura foi homogeneizada e incubada no escuro, a 37 °C, por 30 minutos. Depois centrifugamos as amostras a 300g por 5 min, e o sobrenadante foi analisado espectrofotometricamente, em duplicata, em leitor de microplacas, a 593 nm. A capacidade antioxidante total das amostras foi expressa em equivalentes de Fe^{2+} , determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de FeSO_4 e normalizada pela quantidade de proteína na amostra. Os resultados foram expressos como μM FeSO_4 /mg de proteína (BENZIE; STRAIN, 1996). Realizamos as medidas em duplicata.

4.2.4.5 Atividade da enzima CAT

Atividade determinada pelo decaimento da absorbância do peróxido de hidrogênio a 240nm. As amostras foram adicionadas a uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,03 M (Sigma, EUA). A reação de decomposição do peróxido de hidrogênio foi acompanhada durante 1 minuto, a 25°C, espectrofotometricamente, a 240 nm (Double beam spectrophotometer visible UV, CE-Libra S22, Faotuo) em cubetas de quartzo. A atividade da catalase foi expressa em milimolar de H_2O_2 decomposto por minuto por miligrama de proteína ($\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$ prot.), (BARRETO *et al.*, 2012). Realizamos as medidas em duplicata.

4.2.4.6 *Atividade da enzima SOD*

Atividade determinada pela inibição da autooxidação do pirogalol, de acordo com Maklund e Maklund (1974). As amostras de cada tecido foram adicionadas a tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 8.2, 37 °C) contendo 1 mM de ácido dietilenotriaminopenta-acético (Sigma, EUA) e a reação se iniciou por adição de pirogalol (1,2,3-benzenotriol, Sigma, EUA) a 0,2 mM. A reação foi determinada espectrofotometricamente em leitor de microplacas a 420 nm, 37°C, durante 4 minutos. A atividade da SOD foi expressa em U/mg proteína, onde uma unidade de enzima é a quantidade que causa inibição da autooxidação do pirogalol em 50% (BARRETO *et al.*, 2012). Realizamos as medidas em duplicata.

4.2.4.7 *Derivados carbonílicos em proteínas*

O sedimento do homogenato de cada um dos tecidos foi suspenso em 1 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,7, contendo 1 mM de ácido etilenodiamino-tetraacético (EDTA). Em seguida, cada amostra homogeneizada é dividida em branco e teste, adicionando ácido tricloroacético 10% a todas as amostras que, então, foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se, ao sedimento do teste 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mM) (Sigma-Aldrich®, EUA) diluído em ácido clorídrico (HCL) 2mM. Ao branco foi adicionado apenas HCl 2 mM. As amostras ficaram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos e homogeneizadas com o vórtex a cada 15 minutos. Após esse período adicionou-se ácido tricloroacético 10% às amostras, que foram homogeneizadas e centrifugadas a 5000 g, por 10 min, a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante foi descartado e o sedimentado lavado em 1 ml de etanol e acetato de etila (1:1) e centrifugado a 5000 g, por 10 min e a 4 °C, por duas vezes. Por fim o sedimentado foi dissolvido em SDS 6% e centrifugado a 10000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi avaliado espectrofotometricamente a 370 nm, em placa de 96 poços, em leitor de microplacas (LEVINE *et al.*, 1994), em triplicata. A concentração de derivados carbonílicos em proteínas foi determinada utilizando a equação de Lambert Berr: $A=c.b.\epsilon$. Onde A é a diferença entre a absorvância do teste e do branco, c é a concentração, b é o caminho óptico e ϵ é o coeficiente de extinção molar. O coeficiente de extinção molar para o DNPH a 370 nm é 22000 M⁻¹cm⁻¹ e o caminho óptico nesse ensaio foi de 0,73 cm. O conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas expresso como nmol de derivados carbonílicos por mg de proteína (nmol/mg prot.).

4.3 Dosagens na urina de 24 horas

Foram realizadas dosagens na urina de 24 hs da creatinina, proteinúria e microalbuminúria. Os animais ficaram dois dias consecutivos nas gaiolas metabólicas para aclimação, com ração (específica para cada grupo) e água ad libitum. No terceiro dia, a ração e a água foram retiradas e os animais permaneceram em jejum durante 24hs, após este período, coletou-se a urina. Todas as amostras de urina foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática (Sorvall, Suwanee, EUA). Adicionando-as em ependorffs de 2,0ml e mantendo-as em -20°C até o momento de sua análise.

4.3.1 Proteinúria

Utilizamos o método colorimétrico (Vermelho de pirogalol), com o kit proteinúria da marca Analisa[®], o aparelho utilizado foi o analisador bioquímico automático (BT-3000 TARGA), o procedimento foi realizado no aparelho programado seguindo parâmetros do fabricante do kit. Cálculos (Urina de 24 hs): para determinação da Proteinúria em urina de 24 horas deve-se realizar a dosagem de Proteinúria na amostra seguindo a técnica original do kit, o resultado encontrado pela técnica é dado em mg/dL. Para a expressão do resultado em mg/24 horas deve-se utilizar a fórmula:

$$\text{Proteinúria (mg/24hs)} = \frac{\text{Proteinúria (mg/dL)} \times \text{Volume Urinário de 24 hs (ml)}}{100(1)}$$

4.3.2 Microalbuminúria

Utilizamos o método turbidimetria, com o kit microalbuminúria da marca Analisa[®], o aparelho utilizado foi o analisador bioquímico automático (BT-3000 TARGA), o procedimento foi realizado no aparelho programado seguindo parâmetros do fabricante do kit. Cálculos (Urina de 24 hs): para determinação da Microalbuminúria em urina de 24 horas deve-se realizar a dosagem de Microalbuminúria na amostra seguindo a técnica original do kit, o resultado encontrado pela técnica é dado em mg/L. Para a expressão do resultado em mg/24 hs deve-se utilizar a fórmula:

$$\frac{\text{Microalbuminúria (mg/24hs)}}{1000} = \frac{\text{Microalbuminúria (mg/L)} \times \text{Volume Urinário de 24 hs (L)}}{1000} \quad (2)$$

4.3.3 Creatinina urinária

Utilizou-se o método Cinético- Colorimétrico, com o creatinina da marca Analisa[®], o aparelho utilizado foi o analisador bioquímico automático (BT-3000 TARGA), o procedimento foi realizado no aparelho programado seguiu parâmetros do fabricante do kit. Para as dosagens de creatinina na urina, as amostras foram previamente centrifugadas e diluídas a 1:25 (0,1mL de urina + 2,4mL de água deionizada) conforme orientação do fabricante. O resultado obtido foi multiplicado pelo fator de diluição. Cálculos (Urina de 24 hs): para determinação da Creatinina em urina de 24 hs deve-se realizar a dosagem de Creatinina na amostra seguindo a técnica original do kit, o resultado encontrado pela técnica é dado em mg/L. Para a expressão do resultado em mg/24 hs deve-se utilizar a fórmula:

$$\frac{\text{Creatinina (mg/24hs)}}{\text{Peso Kg}} = \frac{\text{Creatinina (mg/L)} \times \text{Volume Urinário de 24 hs (L)}}{100} \quad (3)$$

4.4 Análise estatística

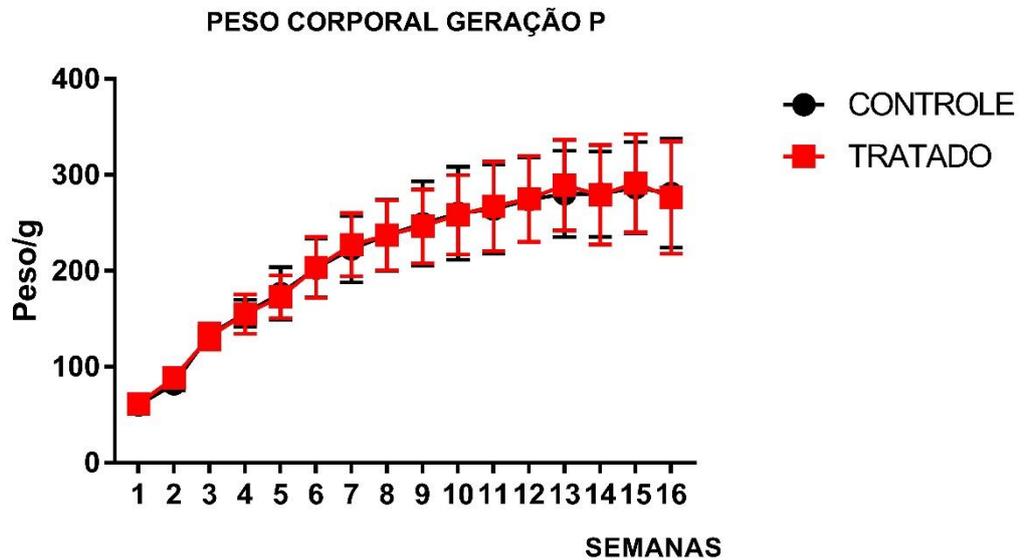
Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. Na geração P os dados foram analisados pelo *teste-t* não pareado. Os dados da geração F-1 foram analisados pelo teste ANOVA *Two Way* com medidas repetidas, seguida de *post-hoc* de Tuckey para avaliações intergrupo. Para estas análises utilizamos o *software* GraphPadPrism (versão 7.00, GraphPad *Software*, San Diego, Califórnia, USA, www.graphpad.com). Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Peso corporal (geração P)

Durante a primeira fase do nosso estudo os animais dos grupos controle e tratado apresentaram o seguinte peso corporal no decorrer das 16 semanas de intervenção (FIG. 10). Não houve variação significativa de peso corporal entre os grupos experimentais durante este período.

Figura 10 – Peso corporal da geração P durante as 16 semanas de dieta

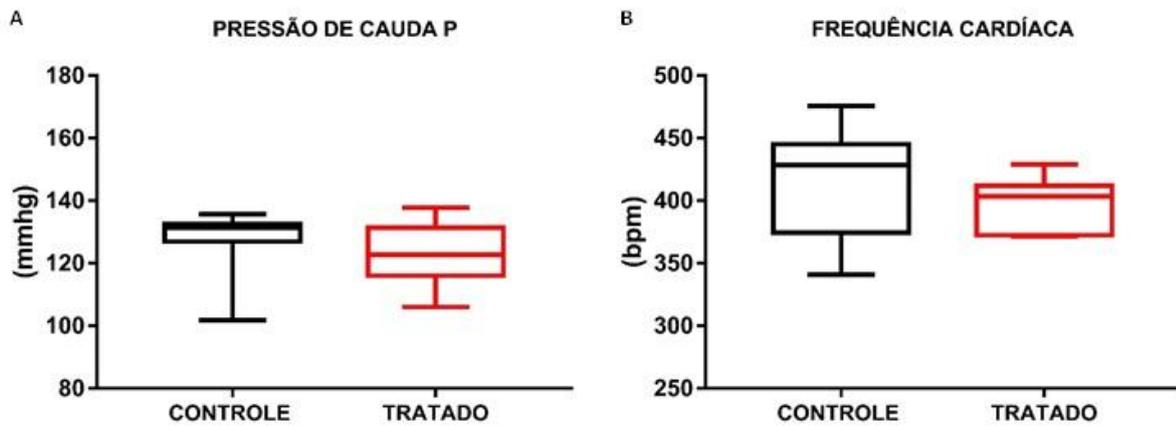


Notas: 1) Peso corporal da geração P. 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, *compost-hoc* de *Tukey*.
3) Valor de *p* não foi significativo.

5.2 Avaliação da pressão de cauda e da frequência cardíaca (geração P)

A figura 11 apresenta os valores médios para a pressão de cauda ($126,8 \pm 11,4$ controle vs $122,8 \pm 10,75$ tratado, mmhg) e frequência cardíaca derivada ($414,7 \pm 45,89$ controle vs $396,4 \pm 21,69$ tratado, bpm). Não houve diferença estatística para estas variáveis nos grupos experimentais

Figura 11 – Pressão arterial de cauda e frequência cardíaca derivada da geração P ao final da 16ª de dieta

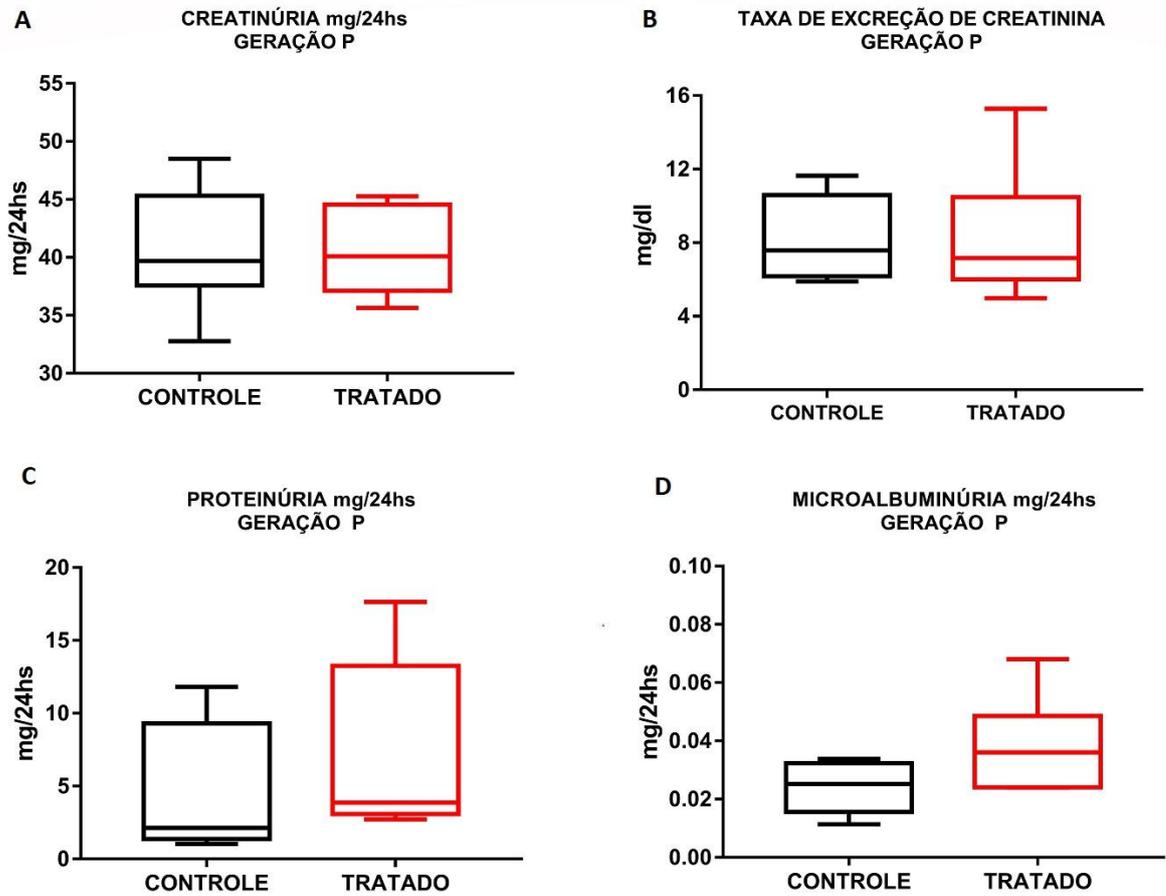


Nota: 1) Pressão de cauda (A) e frequência cardíaca derivada (B) geração P, entre os grupos controle (n=6) versus tratado (n=6). 2) Valor de P não foi significativo, *teste t não pareado*.

5.3 Dosagens na urina de 24 horas (geração P)

Na figura 12 podemos observar que não houve diferença estatística para as variáveis creatinúria ($40,68 \pm 5,313$ controle vs $40,5 \pm 4,017$ tratado, mg/24hs), taxa de excreção da creatinina ($8,202 \pm 2,285$ controle vs $8,297 \pm 3,653$ tratado, mg/dl), proteinúria ($4,514 \pm 4,515$ controle vs $7,192 \pm 6,132$ tratado, mg/24hs) e microalbuminúria ($0,0240 \pm 0,0086$ controle vs $0,0383 \pm 0,0163$ tratado, mg/24hs) entre os grupos experimentais.

Figura 12 – Dosagens na urina de 24 horas da geração P

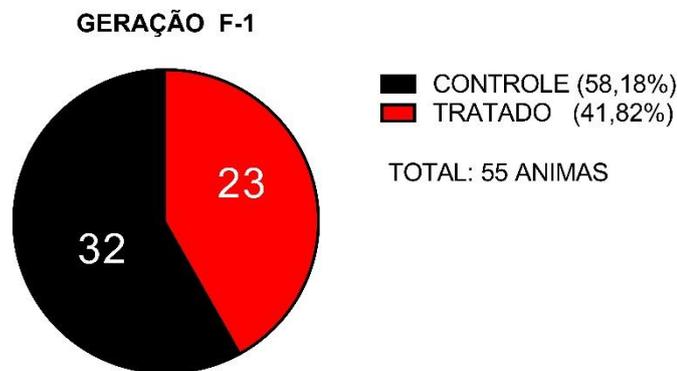


Notas: 1) Creatinúria (A), taxa de excreção de creatinina (B), proteinúria (C) e microalbuminúria (D), entre os grupos controle (n=6) versus tratado (n=6). Valor de *p* não foi significativo: teste *t* não pareado.

5.4 Geração F-1

Na segunda fase do nosso estudo, a geração F-1, foi composta por 55 animais, dos quais 32 animais advieram do grupo controle e 23 provieram do grupo tratado (FIG. 13).

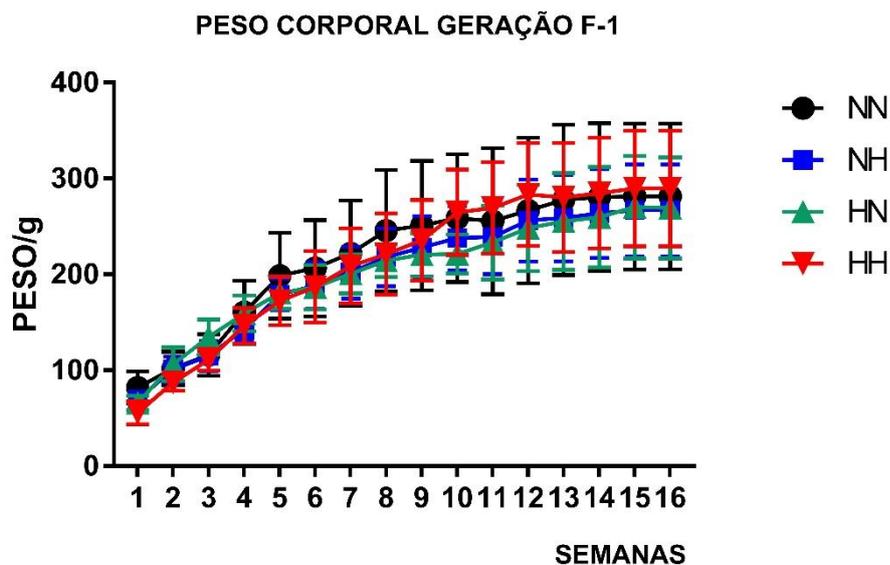
Figura 13 – Proporção de animais que compuseram a geração F-1



5.5 Avaliação do peso corporal (geração F-1)

Durante a segunda fase do nosso estudo os animais da geração F-1 apresentaram o seguinte peso corporal no decorrer das 16 semanas de intervenção (FIG. 14). Não houve variação significativa de peso corporal entre os grupos experimentais durante este período.

Figura 14 – Peso corporal da geração F-1 durante as 16 semanas de dieta

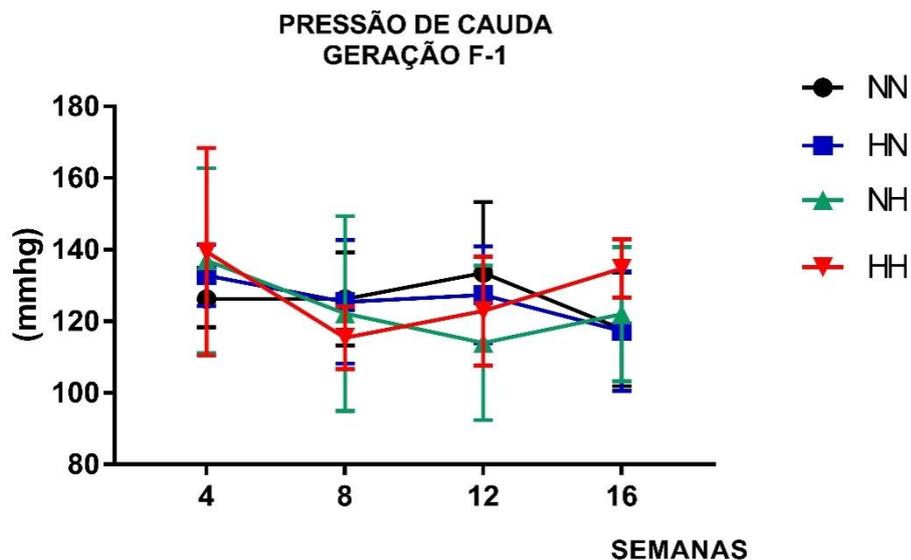


Notas: 1) Peso corporal da geração F-1. 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey.
 3) Valor de *p* não foi significativo.

5.6 Avaliação da pressão de cauda (geração F-1)

Na figura 15 podemos observar que não houve diferença estatística para pressão arterial de cauda com 4 semanas ($126,23 \pm 7,86$ NN vs $132,80 \pm 8,55$ HN vs $137,03 \pm 25,81$ NH vs $139,43 \pm 28,97$ HH, mmhg), com 8 semanas ($126,22 \pm 12,98$ NN vs $125,43 \pm 17,29$ HN vs $122,17 \pm 27,23$ NH vs $115,41 \pm 8,77$ HH, mmhg), com 12 semanas ($133,56 \pm 19,79$ NN vs $127,39 \pm 13,52$ HN vs $113,96 \pm 21,63$ NH vs $122,86 \pm 15,24$ HH, mmhg) e com 16 semanas ($117,82 \pm 15,90$ NN vs $117,259 \pm 16,68$ HN vs $122,015 \pm 18,73$ NH vs $134,78 \pm 8,09$ HH, mmhg) entre os grupos experimentais durante este período.

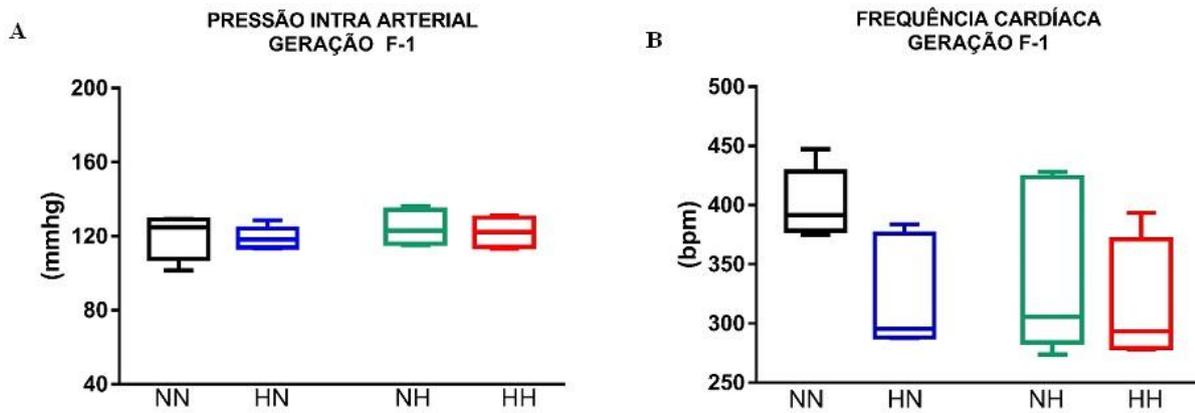
Figura 15 – Pressão de cauda da geração F-1



Notas: 1) Pressão de cauda com 4,8,12 e 16 semanas de dieta. 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de *Tukey*. 3) Valor de *p* não foi significativo.

5.7 Avaliação da pressão intra-arterial e da frequência cardíaca (geração F-1)

A figura 16 apresenta os valores médios para a pressão intra-arterial ($119,71 \pm 11,87$ NN vs $118,84 \pm 6,08$ HN vs $124,48 \pm 9,19$ NH vs $122,13 \pm 8,37$ HH, mmhg) e frequência cardíaca ($401,096 \pm 28,89$ NN vs $324,758 \pm 47,19$ HN vs $337,10 \pm 69,51$ NH vs $314,64 \pm 53,75$ HH, bpm). Não houve diferença estatística para estas variáveis nos grupos experimentais.

Figura 16 – Pressão intra-arterial e frequência cardíaca da geração F-1

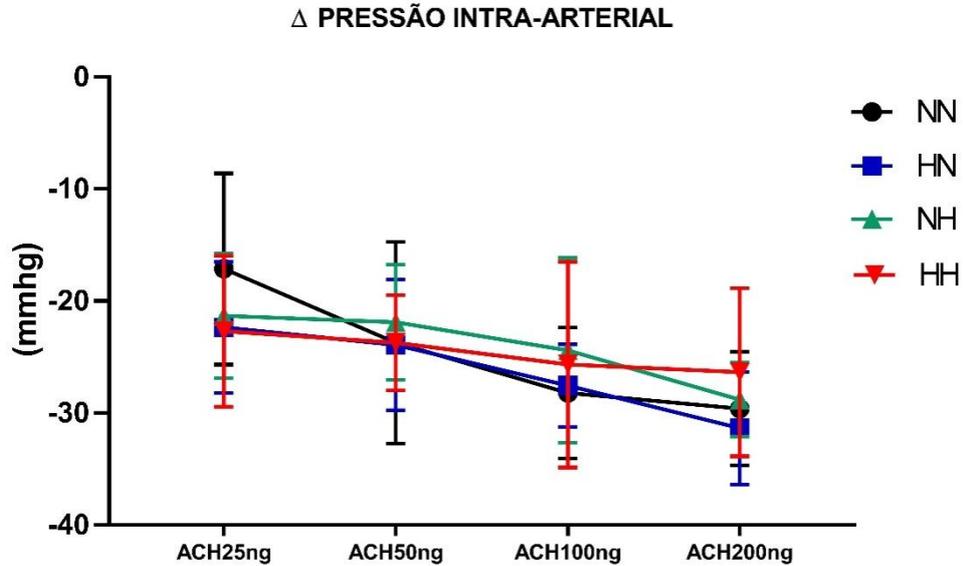
Notas: 1) Pressão intra-arterial (A) e frequência cardíaca (B), entre os grupos NN (n=5), NH (n=6), HN (n=5) e HH (n=4). 2) ANOVA two-way medidas repetidas, com *post-hoc de Tukey*. 3) Valor de *p* não foi significativo.

5.8 Avaliação da função endotelial

Avaliamos a função endotelial através das medidas das variações (delta Δ) da pressão intra-arterial média (PAM) em resposta à administração, em bolus (0,1 ml) de acetilcolina nas seguintes doses (25, 50, 100, 200 ng/kg). Com essas medidas obtivemos uma curva dose-resposta que nos apresentou uma maior variação da pressão intra-arterial na maior dosagem de ACH (200ng) enquanto uma menor variação da pressão intra-arterial ficou evidenciada na menor dosagem de ACH (25ng).

A figura 17 apresenta os valores médios da pressão intra-arterial para as dosagens de 25ng de ACH ($-17,138 \pm 8,522$ NN vs $-22,358 \pm 5,856$ HN vs $-21,342 \pm 5,567$ NH vs $-22,693 \pm 6,739$ HH, mmhg), 50ng de ACH ($-23,728 \pm 8,991$ NN vs $-23,932 \pm 5,834$ HN vs $-21,892 \pm 5,145$ NH vs $-23,730 \pm 4,250$ HH, mmhg), 100ng de ACH ($-28,216 \pm 5,858$ NN vs $-27,560 \pm 3,678$ HN vs $-24,417 \pm 8,253$ NH vs $-25,683 \pm 9,185$ HH, mmhg) e de 200ng de ACH ($-29,604 \pm 5,069$ NN vs $-31,348 \pm 5,028$ HN vs $-28,808 \pm 3,312$ NH vs $-26,363 \pm 7,495$ HH, mmhg). Entretanto, não houve diferença estatística para esta variável nos grupos experimentais.

Figura 17 – Variação da pressão intra-arterial em diferentes dosagens de ACH da geração F-1



Notas: 1) Variação da pressão intra-arterial. 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de *Tukey*.
3) Valor de *p* não foi significativo.

Para corrigir as diferenças na reatividade do músculo liso vascular, a resposta à ACH (25, 50, 100, 200 ng/kg) foi normalizada pela resposta ao NPS (20µg / kg) de acordo com a fórmula: $\Delta\text{MAP (ACH)} / \Delta\text{MAP (NPS)}$.

Na tabela 1 podemos observar que não houve diferença estatística na relação de 25ng ACH/ 20µg NPS ($0,515 \pm 0,202$ NN vs $0,618 \pm 0,239$ HN vs $0,714 \pm 0,151$ NH vs $0,599 \pm 0,164$ HH), de 50ng ACH/ 20µg NPS ($0,711 \pm 0,209$ NN vs $0,610 \pm 0,122$ HN vs $0,779 \pm 0,235$ NH vs $0,663 \pm 0,235$ HH) e de 100ng ACH/ 20µg NPS ($0,870 \pm 0,166$ NN vs $0,686 \pm 0,230$ HN vs $0,900 \pm 0,198$ NH vs $0,672 \pm 0,222$ HH).

A relação 200ng ACH/ 20µg NPS foi maior no grupo HN em comparação ao grupo HH ($1,00 \pm 0,088$ HN vs $0,700 \pm 0,206$ HH, * $p < 0,05$).

Tabela 1 - Δ PAM (ACH) / Δ PAM (NPS) entre os grupos da geração F-1

Δ MAP (ACH) / Δ MAP (SNP)	NN(n=5)	NH(n=5)	HN(n=6)	HH(n=4)
25ng/20μg	0,515 \pm 0,202	0,618 \pm 0,239	0,714 \pm 0,151	0,599 \pm 0,164
50ng/20μg	0,711 \pm 0,209	0,610 \pm 0,122	0,779 \pm 0,235	0,663 \pm 0,235
100ng/20μg	0,870 \pm 0,166	0,686 \pm 0,230	0,900 \pm 0,198	0,672 \pm 0,222
200ng/20μg	0,909 \pm 0,078	0,821 \pm 0,182	1,00 \pm 0,088 ^a	0,700 \pm 0,206 ^b

Notas: 1) Correções das diferenças na reatividade da musculatura lisa vascular. 2) Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas $p < 0,05$ quando comparado os grupos HN(n=5) versus HH(n=4) na relação de 200ng ACH/20 μ gNPS. 3) ANOVA two-way medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey.

5.9 Dosagens na urina 24 horas (geração F-1)

Foram dosadas na urina de 24 horas dos animais da geração F-1, após 16 semanas de intervenção, a creatinúria, a taxa de excreção de creatinina, a proteinúria e a microalbuminúria (FIG. 18). Os valores estão expressos em média \pm DP.

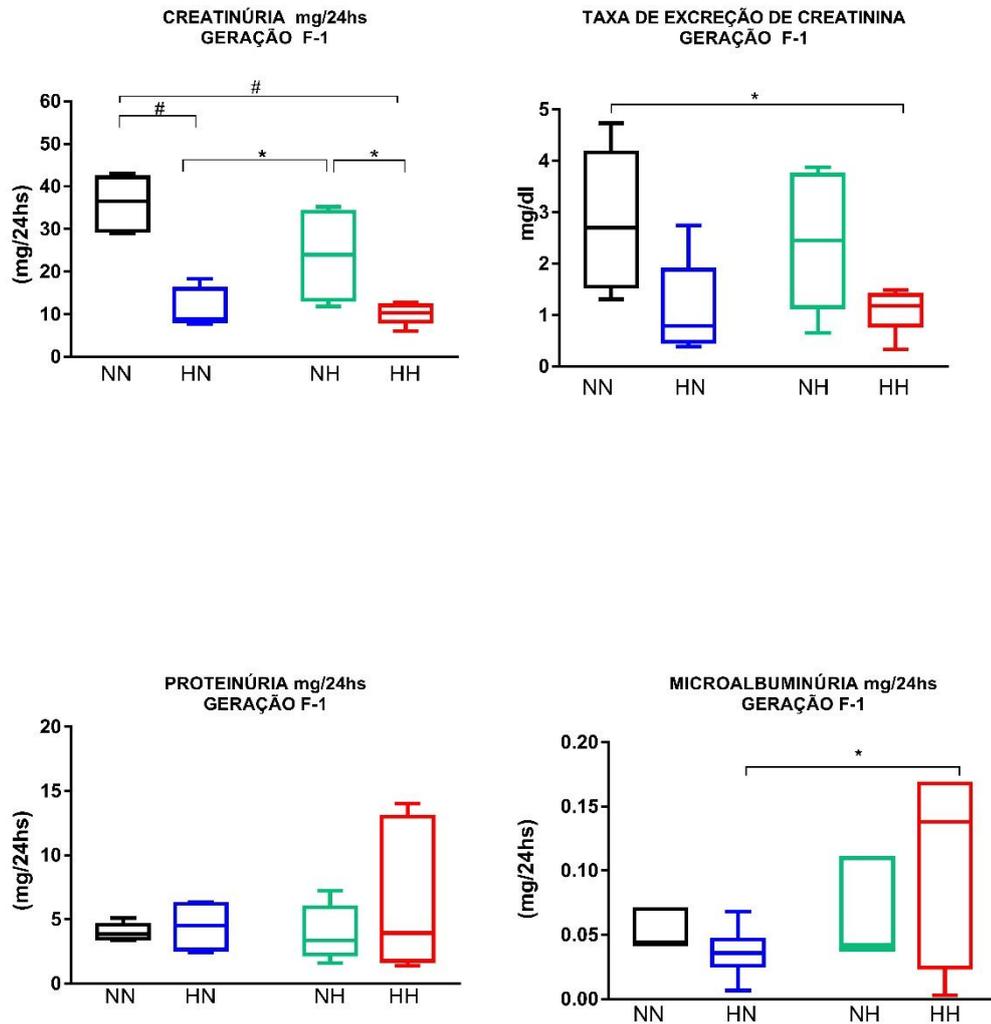
A dosagem da creatinúria foi maior no grupo NN em comparação aos grupos HN (36,12 \pm 5,95 NN vs 11,25 \pm 4,40HN, # $p < 0,005$, mg24/hs) e HH (36,12 \pm 5,95 NN vs 10,03 \pm 2,35HH, # $p < 0,005$, mg24/hs). A dosagem da creatinúria foi maior também no grupo NH em comparação aos grupos HN (23,74 \pm 9,90 NH vs 11,25 \pm 4,40 HN, * $p < 0,05$, mg/24hs) e HH (23,74 \pm 9,90 NH vs 10,03 \pm 2,35HH, * $p < 0,05$, mg/24hs).

A taxa de excreção de creatinina foi maior no grupo NN em comparação HH (2,84 \pm 1,41 NN vs 1,08 \pm 0,42 HH, * $p < 0,05$, mg/dl).

A dosagem de proteinúria não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH (4,02 \pm 0,64 NN vs 4,44 \pm 1,65 HN vs 3,92 \pm 2,08 NH vs 6,30 \pm 5,62 HH, mg/24hs).

No entanto, a dosagem de microalbuminúria foi maior no grupo HH, quando comparamos ao grupo HN (0,011 \pm 0,006 HH vs 0,005 \pm 0,002 HN, * $p < 0,05$, mg/24hs).

Figura 18 – Dosagens na urina de 24 horas da geração F-1



Notas: 1) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey, # $p < 0,005$ e * $p < 0,05$. 2) Creatinúria (A), taxa de excreção de creatinina (B), proteinúria (C) e microalbuminúria (D), geração F-1, entre os grupos NN (n=6), HN (n=6), NH (n=6) e HH (n=6).

5.10 Biomarcadores do estado redox

No arco aórtico (FIG. 19) a concentração do TBARS foi maior no grupo NH em comparação ao grupo NN ($0,372 \pm 0,083$ NH vs $0,218 \pm 0,110$ NN, * $p < 0,05$, nmol MDA/proteína mg). Igualmente no grupo NH em comparação ao grupo HN ($0,372 \pm 0,083$ NH vs $0,149 \pm 0,032$ HN, # $p < 0,005$, nmol MDA/proteína mg). E no grupo NH em

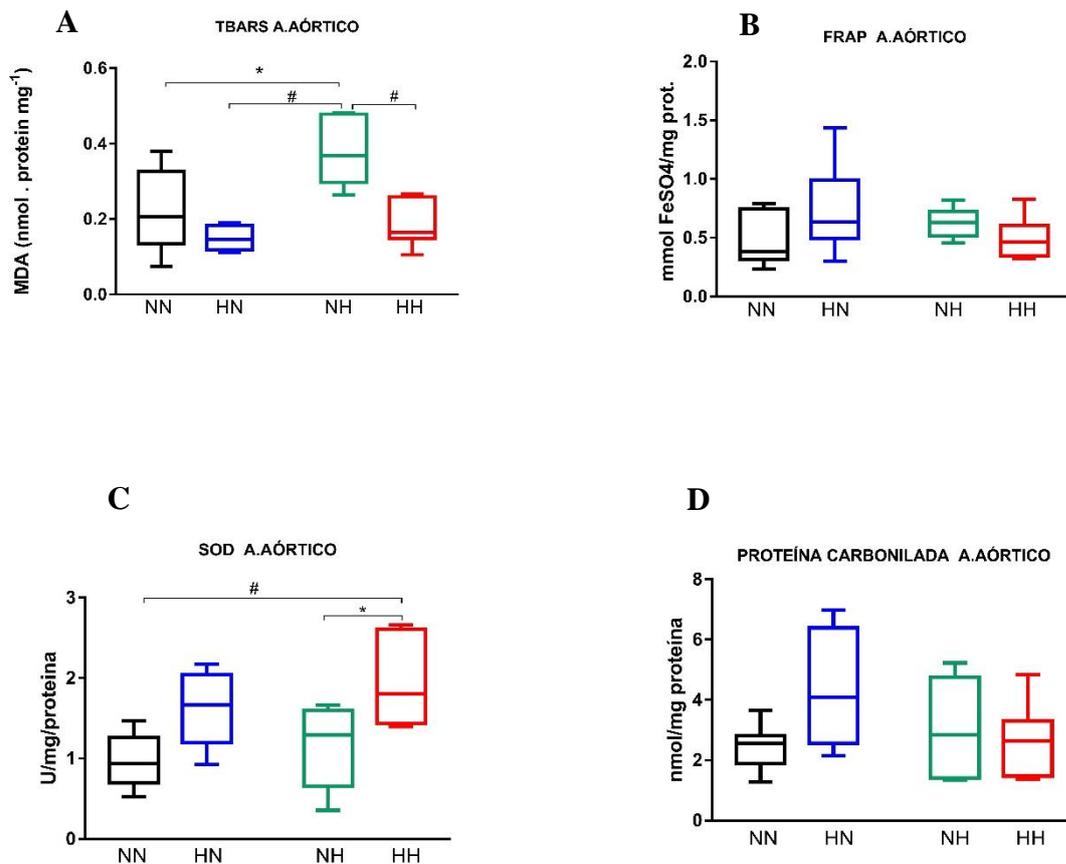
comparação ao grupo HH ($0,372 \pm 0,083$ NH vs $0,185 \pm 0,059$ HH, # $p < 0,005$, nmol MDA/proteína mg).

A capacidade antioxidante total, medida pelo método FRAP no arco aórtico não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($0,459 \pm 0,218$ NN vs $0,733 \pm 0,386$ HN vs $0,627 \pm 0,127$ NH vs $0,493 \pm 0,184$ HH mmol FeSO₄/mg proteína).

A atividade da SOD no arco aórtico foi maior no grupo HH em comparação ao grupo NN ($1,931 \pm 0,547$ HH vs $0,968 \pm 0,337$ NN, # $p < 0,005$, U/proteína mg). Da mesma forma foi maior no grupo HH em comparação ao grupo NH ($1,931 \pm 0,547$ HH vs $1,134 \pm 0,509$ NH, * $p < 0,05$, U/proteína mg).

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas no arco aórtico não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($2,408 \pm 0,759$ NN vs $4,361 \pm 1,907$ HN vs $3,145 \pm 1,711$ NH vs $2,591 \pm 1,249$ HH, nmol/mg proteína).

Figura 19 – Alterações das concentrações do TBARS, FRAP, SOD e PC no arco aórtico



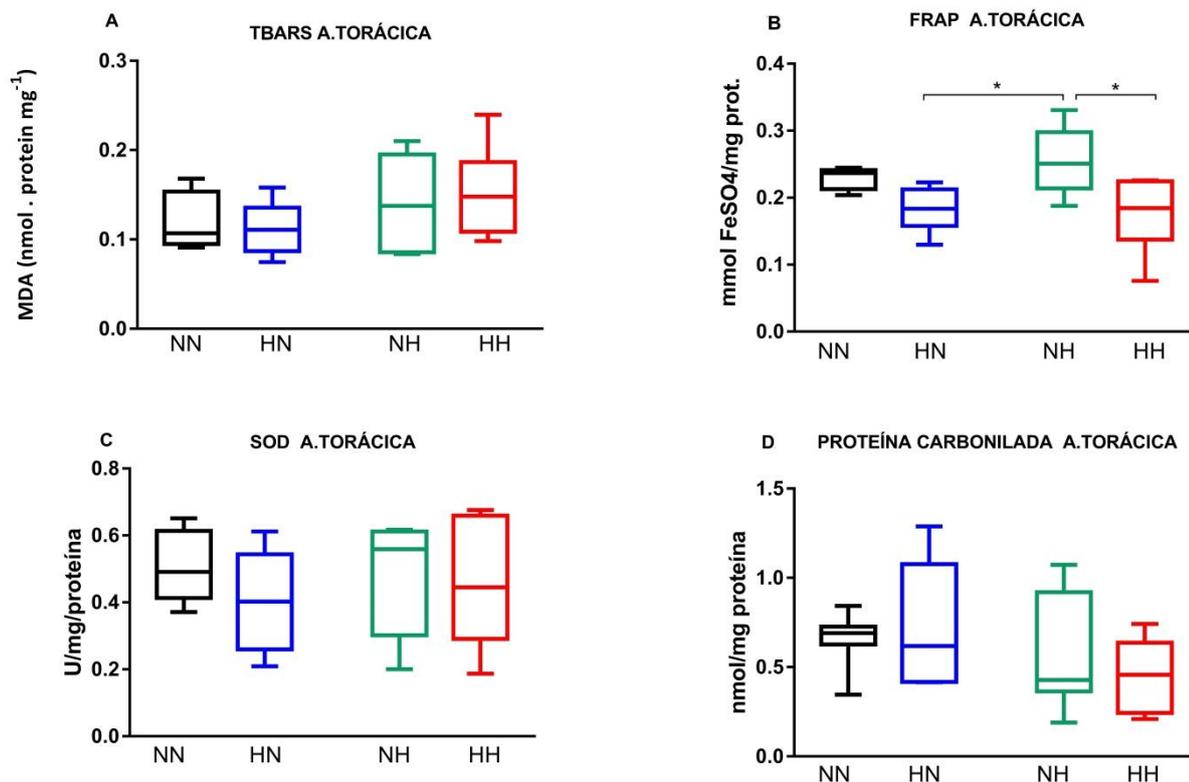
Notas: 1) A) alterações das concentrações do TBARS entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). B) alterações das concentrações do FRAP entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=6) e HH (n=6). C) alterações das concentrações da SOD entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=6) e HH (n=7). D) alterações das concentrações da PC entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey, # $p < 0,005$ e * $p < 0,05$.

Na artéria torácica (FIG. 20) a concentração do TBARS não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($0,120 \pm 0,031$ NN vs $0,112 \pm 0,029$ HN vs $0,142 \pm 0,04$ NH vs $0,154 \pm 0,04$ HH, nmol MDA/proteína mg).

A capacidade antioxidante total, medida pelo método FRAP na artéria torácica foi maior no grupo NH em comparação aos grupos HN ($0,252 \pm 0,050$ NH vs $0,182 \pm 0,033$ HN, * $p < 0,05$, mmol FeSO₄/mg proteína). Assim como foi maior no grupo NH em comparação ao grupo HH ($0,252 \pm 0,050$ NH vs $0,1755 \pm 0,056$ HH, * $p < 0,05$, mmol FeSO₄/mg proteína).

A atividade da SOD na artéria torácica não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($0,498 \pm 0,103$ NN vs $0,404 \pm 0,149$ HN vs $0,475 \pm 0,163$ NH vs $0,455 \pm 0,197$ HH, U/proteína mg).

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas na artéria torácica não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($0,652 \pm 0,153$ NN vs $0,721 \pm 0,366$ HN vs $0,546 \pm 0,321$ NH vs $0,459 \pm 0,209$ HH nmol/mg proteína).

Figura 20 - Alterações das concentrações do TBARS, FRAP, SOD, e PC na artéria torácica

Notas: 1) A) alterações das concentrações do TBARS entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). B) alterações das concentrações do FRAP entre os grupos NN (n=6), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=6). C) alterações das concentrações da SOD, entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=6). D) alterações das concentrações da PC entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de Tukey, * $p < 0,05$.

Nos ventrículos (FIG. 21) a concentração do TBARS foi maior no grupo HH em comparação ao grupo HN ($1,126 \pm 0,181$ HH vs $0,7729 \pm 0,157$ HN, * $p < 0,05$, nmol MDA/proteína mg).

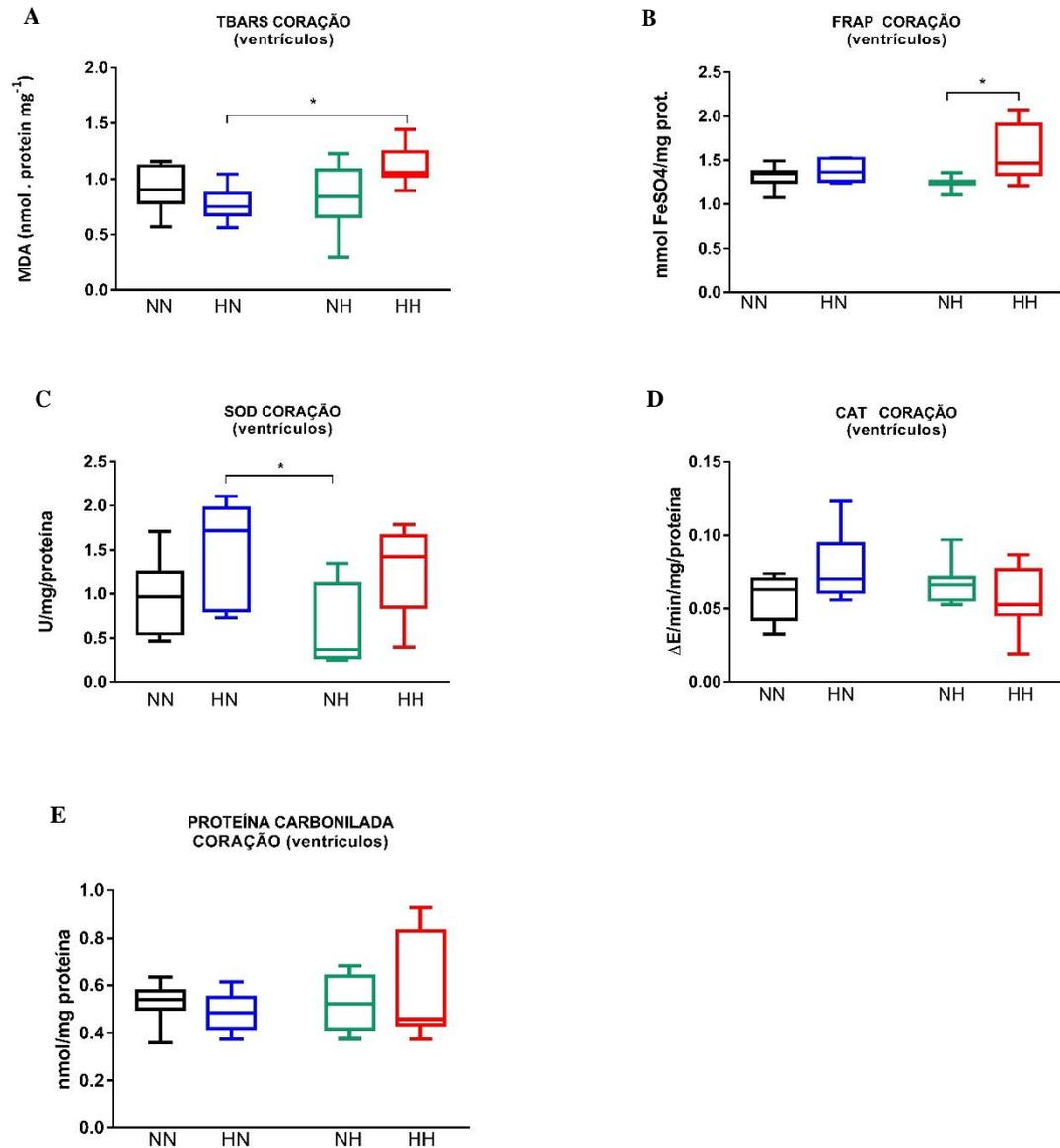
A capacidade antioxidante total, medida pelo método FRAP nos ventrículos foi maior no grupo HH em comparação ao grupo NH ($1,554 \pm 0,315$ HH vs $1,244 \pm 0,073$ NH, * $p < 0,05$, mmol FeSO₄/mg proteína).

A atividade da SOD nos ventrículos foi maior no grupo HN em comparação ao grupo NH ($1,506 \pm 0,583$ HN vs $0,611 \pm 0,468$ NH, * $p < 0,05$, U/proteína mg).

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas nos ventrículos não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($0,525 \pm 0,085$ NN vs $0,486 \pm 0,082$ HN vs $0,518 \pm 0,114$ NH vs $0,564 \pm 0,218$ HH, nmol/mg proteína).

A concentração da CAT nos ventrículos não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($0,056 \pm 0,015$ NN vs $0,077 \pm 0,024$ HN vs $0,067 \pm 0,014$ NH vs $0,055 \pm 0,022$ HH, $\Delta E/min/mg/proteína$).

Figura 21—Alterações das concentrações do *TBARS*, *FRAP*, *SOD*, *PC* e *CAT* nos ventrículos cardíacos



Notas: 1) A) alterações das concentrações do *TBARS* entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). B) alterações das concentrações do *FRAP* entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). C) alterações das concentrações da *SOD* entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=6) e HH (n=7). D) alterações das concentrações da *PC* entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). E) alterações das concentrações da *CAT* entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de *Tukey*, * $p < 0,05$.

Na adrenal (FIG. 22) a concentração do TBARS foi maior no grupo HN em comparação ao grupo NH ($1,886 \pm 1,044$ HN vs $0,722 \pm 0,297$ NH, # $p < 0,005$, nmol MDA/proteína mg). Igualmente maior no grupo HN em comparação ao grupo HH ($1,886 \pm 1,044$ HN vs $0,695 \pm 0,186$ HH, # $p < 0,005$ nmol MDA/proteína mg). Também maior no grupo HN em comparação ao grupo NN ($1,886 \pm 1,044$ HN vs $0,803 \pm 0,313$ NN, * $p < 0,05$, nmol MDA/proteína mg).

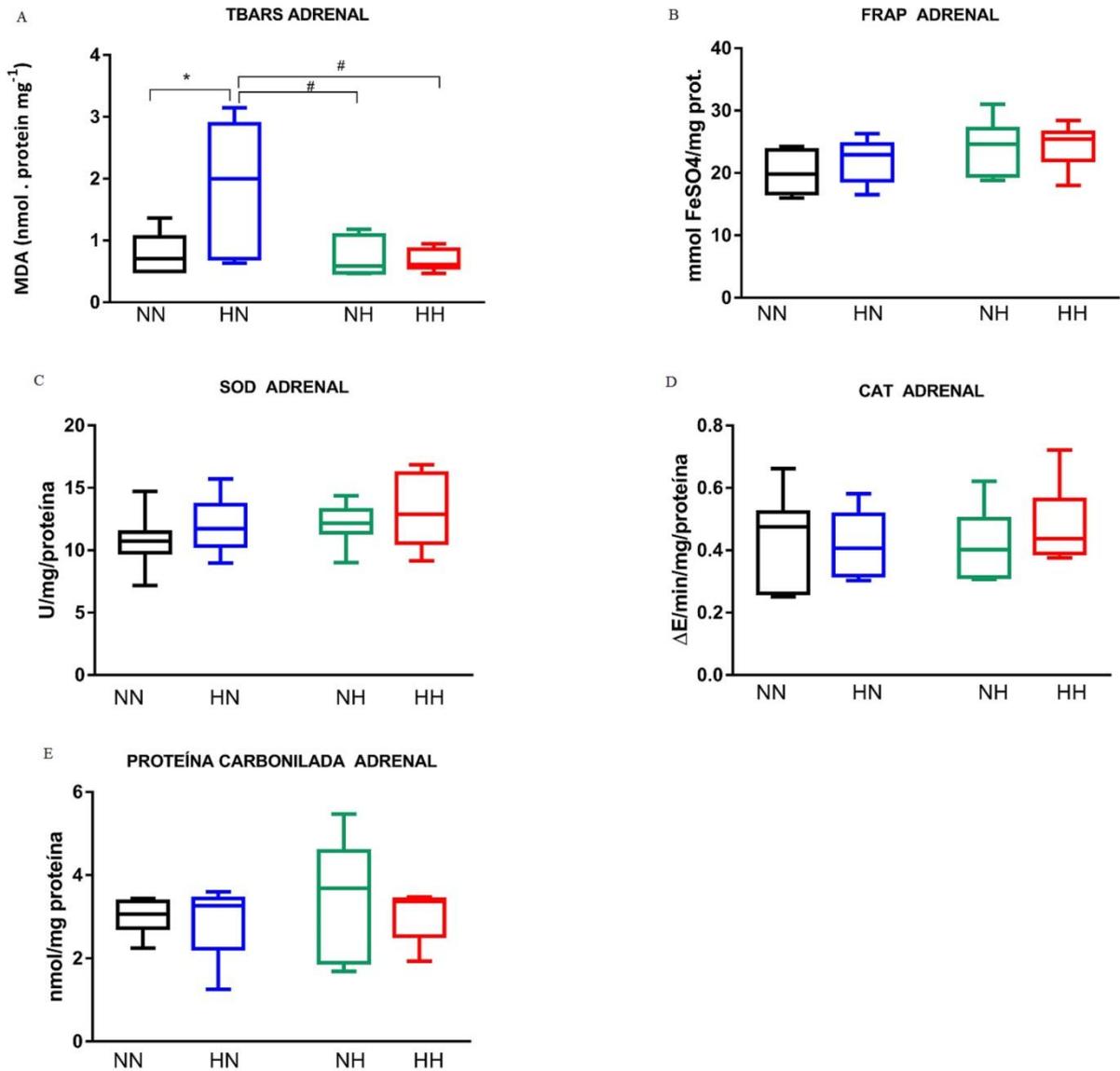
A capacidade antioxidante total, medida pelo método FRAP na adrenal não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($19,61 \pm 3,37$ NN vs $22,03 \pm 3,55$ HN vs $24,24 \pm 4,49$ NH vs $24,52 \pm 3,47$ HH, mmol FeSO₄/mg proteína).

A atividade da SOD na adrenal não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($10,78 \pm 2,24$ NN vs $11,98 \pm 2,25$ HN vs $12,073 \pm 1,69$ NH vs $13,06 \pm 2,80$ HH, U/proteína mg).

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas na adrenal não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($2,961 \pm 0,423$ NN vs $2,922 \pm 0,947$ HN vs $3,443 \pm 1,367$ NH vs $3,047 \pm 0,611$ HH, nmol/mg proteína).

A concentração da CAT na adrenal não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($0,442 \pm 0,145$ NN vs $0,419 \pm 0,111$ HN vs $0,418 \pm 0,116$ NH vs $0,493 \pm 0,123$ HH, $\Delta E/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$).

Figura 22– Alterações das concentrações do *TBARS*, *FRAP*, *SOD*, *PC* e *CAT* na adrenal



Notas: 1) A) alterações das concentrações do TBARS entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). B) alterações das concentrações do FRAP entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). C) alterações das concentrações da SOD entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=6) e HH (n=7). D) alterações das concentrações da PC entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=7). E) alterações das concentrações da CAT entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=6) e HH (n=7). 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de *Tukey*, * $p < 0,05$.

No rim (FIG. 23) a concentração do TBARS não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($2,44 \pm 0,41$ NN vs $2,45 \pm 0,48$ HN vs $2,98 \pm 0,39$ NH vs $3,02 \pm 0,44$ HH, nmol MDA/proteína mg).

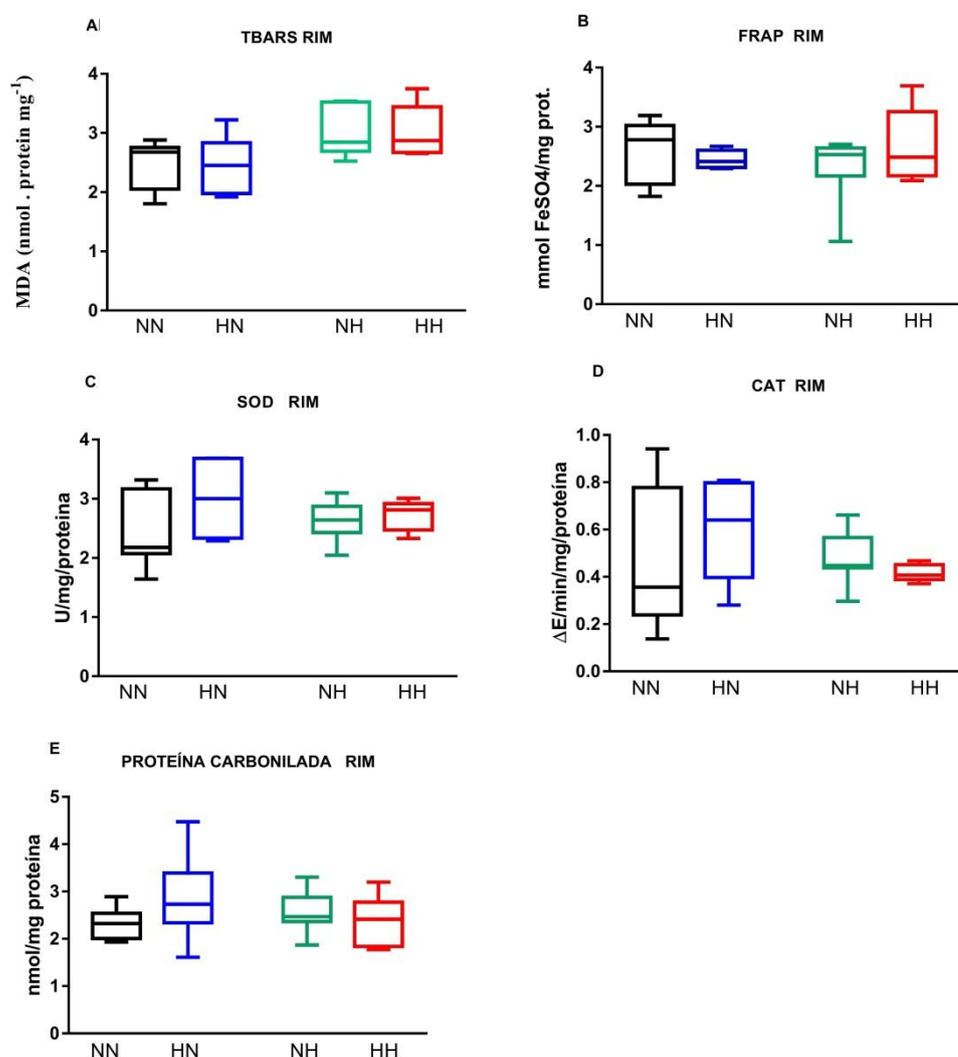
A capacidade antioxidante total medida pelo método FRAP no rim não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($2,54 \pm 0,53$ NN vs $2,44 \pm 0,15$ HN vs $2,30 \pm 0,57$ NH vs $2,67 \pm 0,61$ HH, mmol FeSO₄/mg proteína).

A atividade da SOD no rim não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($2,50 \pm 0,64$ NN vs $3,00 \pm 0,62$ HN vs $2,60 \pm 0,33$ NH vs $2,72 \pm 0,25$ HH, U/proteína mg).

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas no rim não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($2,34 \pm 0,33$ NN vs $2,85 \pm 0,92$ HN vs $2,57 \pm 0,45$ NH vs $2,38 \pm 0,52$ HH, nmol/mg proteína).

A concentração da CAT no rim não apresentou diferença estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH ($0,49 \pm 0,317$ NN vs $0,59 \pm 0,21$ HN vs $0,47 \pm 0,11$ NH vs $0,41 \pm 0,03$ HH, $\Delta E/\text{min}/\text{mg}/\text{proteína}$).

Figura 23 – Alterações das concentrações do TBARS, FRAP, SOD, PC e CAT no rim



Notas: 1) A) alterações das concentrações do TBARS entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=6). B) alterações das concentrações do FRAP entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=6). C) alterações das concentrações da SOD entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=6). D) alterações das concentrações da PC entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=6). E) alterações das concentrações da CAT entre os grupos NN (n=7), HN (n=6), NH (n=7) e HH (n=5). 2) ANOVA *two-way* medidas repetidas, com *post-hoc* de *Tukey*. 3) Valor de *p* não foi significativo.

6 DISCUSSÃO

O incremento do consumo de sal está fortemente associado à hipertensão, ao aumento do risco de doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral. Sendo assim, procuramos avaliar em nosso estudo a possibilidade do surgimento precoce de alterações endoteliais e do estado redox, assim como lesões em órgãos alvo, antes mesmo do advento de alterações da pressão arterial, através da sobrecarga de sal na dieta em uma prole de ratos *Wistar* como marcadores de sua programação fetal.

Durante as análises da pletismografia de cauda que foram realizadas ao final da primeira fase do nosso estudo, não observamos diferença significativa da pressão arterial de cauda e da frequência cardíaca derivada entre os grupos controle e tratado da geração parental (FIG. 11). Embora saibamos que o excesso de sódio na dieta tem forte ligação com as elevações da pressão arterial, recentes dados pré-clínicos e clínicos sustentam que, mesmo na ausência de um aumento na pressão arterial, o excesso de sódio dietético pode afetar adversamente órgãos-alvo, incluindo os vasos sanguíneos, coração, rins e cérebro (FARQUHAR *et al.*, 2015).

Estudos na literatura ratificam a associação entre o excesso de sal dietético com a hipertensão arterial e a lesão renal (GEURTS *et al.*, 2015). Desta forma, utilizamos marcadores na urina de 24 horas dos animais da geração P, para avaliarmos o risco de progressão e declínio da função renal.

A dosagem da creatinúria dos animais da geração P (FIG. 12) nos grupos controle e tratado foi praticamente a mesma (40 mg/24hs), não havendo diferença entre eles. Posto isso, procedemos ao cálculo da taxa de excreção da creatinina (IX *et al.*, 2010), para termos uma estimativa do funcionamento glomerular destes animais (FIG. 12). Em nossos cálculos, a taxa de excreção da creatinina foi praticamente a mesma (8,0mg/dl), portanto, não houve a princípio, diferenças no funcionamento glomerular dos animais dos grupos controle e tratado.

Todavia, a dosagem isolada da creatinina não representa uma boa estimativa da FG, pois constitui um parâmetro relativamente tardio para detecção da lesão renal, uma vez que essa só apresentará alterações após ter tido um comprometimento superior ao de 50% na FG (PINHO; CARVALHO; ARAÚJO, 2011). Por isso, as dosagens da proteinúria e microalbuminúria, foram realizadas, pois são marcadores mais sensíveis para a detecção de alterações renais. Contudo, em nossas observações as dosagens de proteinúria e microalbuminúria entre os grupos controle e tratado não apresentaram uma diferença estatística relevante (FIG. 12).

Em nosso desenho experimental tínhamos a expectativa de obter uma prole (geração F-1) com cerca de 80 animais (tendo em torno de 40 animais provenientes de cada grupo da geração P), entretanto duas das cinco fêmeas do grupo tratado com NaCl% não engravidaram (FIG. 13).

Presumimos então, que essa relação entre a sobrecarga de sal na dieta com a gestação e o seu efeito na pressão arterial, apesar de não ser a essência do nosso trabalho, abre o âmbito para futuras pesquisas, tendo em vista que na literatura há forte associação entre a dieta hipersódica e o aumento da taxa de gestações mal sucedidas. Relacionam-se também a hipertensão com uma diminuição global da função reprodutiva e a um decréscimo na taxa de ovulação e no número de ovócitos (RIBEIRO *et al.*, 2013; KARR-(DULLIEN; BLOOMQUIST, 1979).

Portanto, ao final da primeira fase da nossa observação, podemos concluir que, a dieta hipersódica não acarretou nenhuma alteração na pressão arterial de cauda e na frequência cardíaca no grupo tratado, assim como, não provocou nenhuma alteração nos marcadores na urina de 24 horas desses animais.

No decorrer da segunda etapa do nosso estudo, durante os 4 meses de dieta, foram realizadas medidas mensais da pressão arterial de cauda (FIG. 15). E, apesar de termos encontrado em nossas análises uma maior variabilidade pressórica nas medidas da pressão arterial de cauda nos animais da geração F-1, quando comparamos com os animais da geração P, não foi possível constatar em nossa análise estatística uma diferença significativa da pressão arterial de cauda entre os grupos NN, HN, NH e HH.

A principal desvantagem do método da pletismografia de cauda é a restrição física imposta ao animal. Além disso, a utilização do aquecimento prévio da mesma é geralmente usada para garantir que o fluxo sanguíneo da cauda seja suficiente, para que uma medida possa ser realizada. Mesmo quando o mínimo aquecimento externo é utilizado, a combinação da restrição e o aquecimento podem levar a aumentos significativos da temperatura corporal central (BUÑAG; TERÄVÄINEN, 1991), já que ambos, contenção e aquecimento, constituem estresses que podem afetar a pressão arterial. Os valores obtidos com a técnica do manguito de cauda podem refletir não apenas o nível geral de pressão arterial dos animais, mas também a reatividade da pressão arterial ao estresse do procedimento (VAN VLIET *et al.*, 2000).

Então, para termos um parâmetro mais confiável em nosso estudo, foi realizada, anteriormente, a avaliação da função endotelial, uma medida da pressão intra-arterial e da frequência cardíaca dos animais da geração F-1, uma vez que nesses animais já se

encontravam implantados em suas artérias um cateter de lúmen aberto com exteriorização inacessível ao mesmo. O catéter era conectado a um transdutor de pressão (LabChart) no qual seus valores eram apresentados momento a momento pelo software. Provavelmente, a desvantagem mais significativa dessa técnica se refere à viabilidade do cateter que é de curta duração.

Em um estudo cuidadosamente conduzido por Mattson sobre a medição da PA em camundongos, usando catéteres exteriorizados, mostrou uma taxa de falha de até 50% ao final da quarta semana após a implantação (MATTSON, 1998), entretanto essa possibilidade foi praticamente suprimida em nosso trabalho, uma vez que nossas medidas foram realizadas com menos de 24 horas, após a implantação dos catéteres.

Percebemos então uma menor variabilidade nas medidas da pressão intra-arterial (FIG. 16), se comparadas às medidas de pressão arterial no manguito de cauda (FIG. 15), entre os animais da geração F-1. Entretanto, essa variação não representou uma diferença significativa em nossa análise estatística.

Muitos trabalhos na literatura realizam medidas diretas de pressão arterial em seus modelos experimentais, conseqüentemente, fazem o uso de diferentes linhagens de roedores. Em sua grande maioria estes estudos evidenciaram que a raça *Wistar* é menos sensível à sobrecarga de sal, quando comparadas a outras linhagens e apresentam menores variações em sua pressão arterial.

No trabalho de Matavelli e colegas, as alterações fisiopatológicas e o aumento da mortalidade devida à sobrecarga de sal (4%, 6% e 8%) na dieta foram relatados em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR), entretanto sem relação com aumento da pressão arterial (MATAVELLI *et al.*, 2007). No estudo de Leenen e colaboradores ficou demonstrado os efeitos deletérios de uma dieta NaCl 8% durante 12 semanas, através das alterações no remodelamento cardíaco ocorridas em ratos *Wistar*, sem que os mesmos apresentassem variações em sua pressão arterial (LEENEN; YUAN, 1998). Varagic e colegas avaliaram a sobrecarga de sal (NaCl 8%) durante 16 semanas e suas conseqüentes alterações ventriculares ocorridas em ratos *Wistar* e SHR, neste estudo a pressão média medida da artéria aorta apresentava pouca modificação nos ratos *Wistar* (VARAGIC *et al.*, 2006). Susic e colaboradores avaliaram a sobrecarga de sal na função cardiovascular utilizando ratos *Wistar* e SHR, neste trabalho eles perceberam que a raça *Wistar* era pouco sensível a uma dieta hipersódica de curta ou de longa duração, devido às pequenas alterações sucedidas em sua pressão arterial (SUSIC; FARES; FROHLICH, 2009).

Já no estudo apresentado por Yo e colegas ficou demonstrado que uma dieta hipersódica (NaCl 8%) aumentava significativamente a pressão arterial sistólica e causava hipertrofia ventricular esquerda em ratos normotensos (YU *et al.*, 1998). Sendo assim, podemos inferir que a resposta da pressão arterial devido às variações na carga dietética de sódio não é uniforme e depende de vários fatores, incluindo os genéticos, hormonais, neuronais, dentre outras.

A determinação da frequência cardíaca, nos grupos da geração F-1, também foi realizada anteriormente através da avaliação da função endotelial. Em nossa análise estatística não conseguimos comprovar uma variabilidade significativa da mesma entre os grupos (FIG. 16), entretanto podemos observar uma tendência da redução da própria nos grupos HN, NH e HH em comparação ao grupo NN. Salientamos que os grupos HN, NH e HH receberam a dieta hipersódica pelo menos em uma de suas gerações (grupos HN e NH) e nas duas gerações (grupo HH).

O trabalho de Contreras e colaboradores mostrou que ratas tratadas com NaCl 3% apresentavam uma redução de sua frequência cardíaca através da diminuição da atividade simpática e do aumento da taxa de excreção de sódio (CONTRERAS *et al.*, 2000). Dessa maneira, aproximando a tendência observada de redução da frequência cardíaca nos grupos NH, HN e HH em comparação ao grupo NN (FIG. 11).

O termo disfunção endotelial tem sido utilizada para se referir a várias condições patológicas, incluindo alterações na coagulação, nas propriedades anti-inflamatórias do endotélio, na deficiência da modulação do crescimento vascular e na desregulação da remodelação vascular. No entanto, em grande parte da literatura o termo tem sido usado para se referir a uma deficiência de relaxamento vascular dependente do endotélio causado pela perda da bioatividade do óxido nítrico (NO) na parede do vaso (CAI; HARRISON, 2000).

A função endotelial em ratos acordados (FIG. 17) foi avaliada através das variações apresentadas na pressão intra-arterial média, em resposta à administração em bolus de (0,1 ml) de ACH nas seguintes doses (25, 50, 100, 200 ng/kg). Como esperado, obtivemos uma curva dose-resposta que mostrou que o relaxamento vascular dependente do endotélio teve uma maior variação da PAM em sua maior dosagem de ACH (200 ng/kg) e uma menor variação da PAM em sua menor dosagem de ACH (25 ng/kg), porém o relaxamento vascular dependente do endotélio não apresentou variações significativas em cada uma das doses de ACH administradas nos grupos NN, HN, NH e NN.

A curva dose resposta de ACH em nosso experimento foi semelhante à apresentada por Xu e colaboradores (XU, *et al.*, 2008), na qual uma maior variação da PAM

foi obtida na maior dosagem de ACH (200ng) e uma menor variação da PAM ocorreu em sua menor dosagem (25 ng/kg).

Para corrigirmos então as diferenças na reatividade do músculo liso vascular, a resposta à ACH (relaxamento vascular dependente do endotélio) foi normalizada pela resposta ao NPS (relaxamento vascular independente do endotélio) de acordo com a fórmula: $\Delta PAM (ACH) / \Delta PAM (NPS)$.

Encontramos um valor significativo com $p < 0,05$ entre os grupos HN e HH, na relação (200ng/20 μ g). Nas demais relações não foram observadas alterações significativas (Tabela 1). Desta forma, a normalização da ACH em resposta ao NPS evidenciou uma piora da reatividade vascular dependente do endotélio do grupo HH (razão < 1) quando comparado ao grupo HN, na sua maior relação. Acreditamos que a piora no relaxamento vascular mediado pelo NO do grupo HH ficou bem evidenciada tendo em vista que não ocorreu à interrupção da sobrecarga de sal nos animais deste grupo (MARUYAMA *et al.*, 2015).

Percebemos que o risco de desenvolver doenças cardiovasculares, ou de síndromes metabólicas na idade adulta é determinado por fatores que interagem ao longo da vida, incluindo os fortes efeitos do genótipo e das exposições dietéticas em todos os estágios da vivência. A persistência de eventos na primeira infância, como as respostas das influências aos desafios nutricionais na vida adulta, é uma confirmação da força da programação no início da existência e tem seus efeitos sobre o desenvolvimento de órgãos e sistemas (LANGLEY-EVANS, 2015). Desta maneira, ratificando a piora do relaxamento vascular dependente do endotélio mediado pelo NO grupo HH, devida à sobrecarga de sal.

Vários estudos têm relacionado a influência do aumento da carga de sal na dieta e seus efeitos deletérios no sistema renal (YU *et al.*, 1998; TOBIAN e HANLON, 1990 ; MATAVELLI *et al.*, 2007; BERNARDI *et al.*, 2012), por isso, utilizamos nos animais da geração F-1 os mesmos marcadores urinários utilizados na geração P, para avaliação do risco de progressão do declínio da função renal e do desenvolvimento de complicações cardiovasculares.

A creatinúria no grupo NN (grupo que não sofreu influência da dieta hipersódica em nenhuma das gerações), apresentou um valor de 36 mg/24hs, valor este próximo ao encontrado no grupo controle da geração P, 40 mg/24hs. Entretanto, os outros três grupos da geração F-1 (HN, NH e HH), que em algum momento do estudo receberam a dieta hipersódica, apresentaram valores bem reduzidos de creatinúria, quando comparados ao grupo NN, insinuando a possibilidade de alteração glomerular nesses animais. O grupo HN apresentou 24 mg/24 hs de creatinúria, com $p < 0,05$, quando comparado ao grupo NN,

enquanto os grupos NH com 11 mg/ 24 hs de creatinúria e o HH com 10 mg/ 24 hs de creatinúria, com $p < 0,005$, quando comparados ao grupo NN (FIG. 18).

Tendo em vista que os valores da creatinúria variaram bastante entre os grupos da geração F-1, calculamos a taxa de excreção de creatinina (como feito anteriormente na geração P). Os grupos NN e HN apresentaram uma taxa de excreção de creatinina semelhantes (2.8 mg/dl NN e 2.4 mg/dl HN). Ao passo que os grupos NH e HH apresentaram taxas de excreção de creatinina bem reduzidas (1.1 mg/dl NH e 1.0 mg/ dl HH), com $p < 0,005$ quando comparamos os grupos NN e HH (FIG. 16). No estudo de Ix e colaboradores percebemos então que uma redução na taxa de excreção de creatinina está fortemente associada à mortalidade em pacientes com doença arterial coronariana (IX *et al.*, 2010) e a uma baixa função renal (POLINDER-BOS *et al.*, 2017).

Devido aos diferentes valores encontrados na creatinúria e na taxa de excreção de creatinina nos grupos da geração F-1, procedemos então às dosagens dos marcadores urinários proteinúria e microalbuminúria, que são marcadores mais sensíveis à detecção da progressão da doença renal. A dosagem de proteinúria na urina de 24 horas não apresentou em nossa análise estatística uma variação significativa os grupos NN, HN, NH e HH. No entanto, a relação entre proteinúria com a progressão de doença renal e o desenvolvimento de doença cardiovascular é independente do nível de taxa de filtração glomerular (SARNAK; ASTOR, 2011). Sendo assim, realizamos as dosagens de microalbuminúria na urina de 24 horas, que nos evidenciou um aumento no grupo HH quando comparado ao grupo HN (FIG. 18), com $p < 0,05$.

Atualmente a lesão renal identificada pelo aumento da creatinina plasmática, ou pela presença de proteinúria deve ser considerada como um importante marcador de risco para complicações cardiovasculares futuras (LAZZERI *et al.*, 2012). Entretanto, o aumento da creatinina e a presença de proteinúria no exame de urina são parâmetros relativamente tardios para detecção da lesão renal.

Como o filtro glomerular (membrana basal) normal é extremamente delicado e permite apenas a passagem de peptídeos e proteínas de baixo peso molecular (geralmente inferior a 10 mil dáltons), a presença de microalbuminúria na urina deve ser considerado como um marcador precoce da lesão glomerular, anterior à proteinúria e ao aumento da creatinina plasmática (LAZZERI *et al.*, 2012). Como consequência, podemos aventar uma possível lesão renal em curso, devido a sobrecarga de sal, haja vista que a concentração da microalbuminúria na urina de 24 horas se encontrava elevada nos animais do grupo HH.

Então, em nosso trabalho foram analisadas as respostas dos biomarcadores do estado redox após 16ª semana de intervenção na geração F-1, utilizando os seguintes tecidos: arco aórtico, artéria torácica, ventrículos (coração), adrenal esquerda e rim esquerdo. Sabemos que em seres humanos, a sobrecarga de sal na dieta provoca um aumento agudo do estresse oxidativo (PIECHA *et al.*, 2012).

O arco aórtico é o trecho da artéria aorta na qual seu trajeto muda de ascendente para descendente. É a região da artéria aorta mais propensa ao estresse mecânico (Shear Stress), devida à pressão exercida em suas paredes pela força de contração do ventrículo esquerdo na sístole ventricular para superar a resistência vascular periférica (NELLS *et al.*, 2017). Nessas amostras constatamos um dano tecidual, confirmada pelo TBARS, assim como alterações em seu sistema de defesa antioxidante, provavelmente ocasionado pela sobrecarga de sal.

O primeiro efeito observado foi o da peroxidação lipídica, que é o dano oxidativo ocasionado aos lipídios pela ação das ERO, por remoção de um hidrogênio ou adição de um radical oxigênio, o que resulta em dano oxidativo, principalmente aos ácidos graxos poli-insaturados. Os produtos da peroxidação lipídica sofrem reações degradativas as quais dão origem a diversos compostos, incluindo o malondialdeído (MDA) que pode ser determinado pelo método TBARS (MONTEZANO *et al.*, 2015).

Observamos um aumento da concentração do TBARS no arco aórtico no grupo NH em comparação aos grupos HN ($P < 0,005$), HH ($P < 0,005$) e NN ($P < 0,05$), (FIG. 19). Os grupos HN e HH descenderam do grupo tratado e as ERO constituídas pela sobrecarga de sal nesse grupo, podem ter participado da modulação da expressão gênica dos mesmos, numa tentativa de proteção às futuras agressões acometidas a essa geração. (ALLEN; TRESINI, 2000).

Tendo em vista que o grupo NH não recebeu uma exposição prévia da dieta hipersódica em sua geração parental (derivaram do grupo controle), provavelmente, seu sistema de defesa antioxidante não estivesse preparado para uma eventual sobrecarga de sal, como ficou corroborado pelo aumento da concentração do malondialdeído no TBARS.

Atualmente é amplamente aceito que o ambiente inicial da vida pode influenciar a saúde a longo prazo da prole de várias maneiras. Um elemento chave da programação do desenvolvimento é a existência de efeitos “transgeracionais”, pelos quais uma exposição precoce pode afetar a saúde na vida tardia não só da geração F-1, mas também das gerações futuras. A aceitação de efeitos transgeracionais como parte integrante da programação de desenvolvimento é pertinente a um potencial propósito benéfico dos efeitos de

desenvolvimento em termos evolutivos (AIKEN; OZANNE, 2014), como apresentado nas amostras do arco aórtico nos grupos HN e HH.

Esta proteção fica mais explicitada quando analisamos o sistema de defesa antioxidante que tem por finalidade remover ERO, ou regenerar os antioxidantes oxidados, reduzindo-os. Uma das principais enzimas antioxidantes é a SOD, que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio. Em nosso estudo observamos um aumento da concentração da SOD no grupo HH, nas amostras do arco aórtico, quando comparado aos grupos NN ($P < 0,005$) e NH ($P < 0,05$). Apesar de não termos achado uma significância estatística no grupo HN, este, por sua vez, apresentou uma tendência de elevação da SOD, assemelhando à elevação (SOD) que ocorreu no grupo HH, quando comparado aos grupos NN e NH (FIG. 19).

Portanto, a elevação da SOD no arco aórtico nos grupos HH e HN atuou como mecanismo de defesa antioxidante enzimático, possivelmente pela prévia exposição da sobrecarga de sal, como ficou demonstrado pelo menor dano tecidual apresentado por esses grupos no TBARS.

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas no arco aórtico, assim como a capacidade antioxidante total, medida pelo método FRAP, que mensurou a capacidade de redução do ferro pelos antioxidantes não enzimáticos, presentes na amostra do arco aórtico, não apresentaram diferença significativa entre os grupos NN, HN, NH e HH em nosso estudo.

Outra amostra de tecido utilizada foi a artéria torácica, que vai do arco da aorta até aproximadamente o nível da 12^a vértebra torácica (HANNUKSELA; LUNDQVIST; CARLBERG, 2006). Quando analisamos a capacidade antioxidante não enzimática da artéria torácica, analisada pelo método de redução do ferro (FRAP), observamos um padrão de proteção nos grupos HN e HH equivalente ao encontrado nas amostras do arco aórtico (FIG.20). O grupo NH apresentou um aumento na capacidade antioxidante total não enzimática, quando comparado aos grupos HN ($P < 0,05$) e HH ($P < 0,05$).

Aparentemente a redução da capacidade antioxidante não enzimática nas amostras da artéria torácica dos grupos HN e HH se deveu ao desequilíbrio redox, ocasionado pela dieta hipersódica no grupo parental tratado (que as originaram). Naturalmente, tendo como consequências alterações em sua expressão gênica, ocasionando assim, o consumo excessivo de suas reservas antioxidantes. Como o grupo NH descendeu do grupo controle, o mesmo não recebeu uma sobrecarga prévia de sal, logo, suas reservas antioxidantes se encontravam menos utilizadas.

A Peroxidação lipídica (TBARS) à atividade antioxidante enzimática da SOD, assim como a concentração de derivados carbonílicos em proteínas na artéria torácica não apresentaram diferença significativa em nossa análise estatística entre os grupos NN, HN, NH e HH.

Outra amostra manipulada em nosso estudo foi a dos ventrículos. Os ventrículos são câmaras do coração cuja função é bombear o sangue para a circulação sistêmica, através da artéria aorta no caso do ventrículo esquerdo; e para a circulação pulmonar através da artéria pulmonar, no caso do ventrículo direito (CASTANHEIRA *et al.*, 2014). Foi observado um aumento significativo da concentração de TBARS no grupo HH quando comparados ao grupo HN ($P < 0,05$).

Aparentemente o padrão apresentado pelo grupo HN no homogenato dos ventrículos (FIG. 21) se assemelhou com o modelo exibido no arco aórtico (para o grupo HN), tendo em vista que as amostras de tecidos dos ventrículos, neste grupo, apresentaram um menor dano lipídico quando comparados aos demais grupos da geração F-1 (NN, NH e HH), com $P < 0,05$ quando comparado ao grupo HH.

O grupo HN apresentou também sua maior capacidade antioxidante enzimática (SOD), quando comparado ao grupo NH ($P < 0,05$), resultado semelhante ao encontrado no arco aórtico. Portanto, os insultos alimentares podem gerar sinais sob a forma de mudanças no ambiente hormonal que são transmitidos do compartimento materno para o fetal, através da placenta. A programação materna resultante dos tecidos somáticos fetais pode levar a mudanças nos resultados de saúde a longo prazo na primeira geração (BALE, 2015), provavelmente, como forma de proteção decorrente da sobrecarga ao sal.

Entretanto o grupo HH, que recebeu a mesma dieta hipersódica do grupo HN em sua geração parental, não apresentou nas amostras dos ventrículos esse mesmo padrão de proteção visto no grupo HN que ficou evidenciado no arco aórtico. Mesmo o grupo HH tendo apresentado a maior capacidade antioxidante não enzimática medida no método FRAP quando comparado os demais grupos, sendo $P < 0,05$ quando comparado ao grupo NH, este não se mostrou eficiente o bastante, pois o grupo HH apresentou o maior dano tecidual, como ficou demonstrado pelo aumento da concentração do MDA no TBARS (FIG. 21).

Considerando que os determinantes de risco, em qualquer fase da vida, não são simples interações do indivíduo com o seu ambiente, naquele ponto do tempo em particular, são de fato produtos das exposições durante toda existência. O ambiente encontrado em cada fase da vida, a partir do período periconceptual até a senescência modifica as respostas do

indivíduo aos nutrientes e a outros sucessivos estágios e desafios (LANGLEY-EVANS, 2015).

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas no homogenato dos ventrículos não apresentaram uma diferença importante entre os grupos da geração F-1, assim como a capacidade antioxidante enzimática medida pela CAT em nosso trabalho. Alguns estudos na literatura apontam que a atividade da CAT é severamente comprometida com o congelamento e que os mecanismos envolvidos podem estar relacionados à desnaturação irreversível da enzima por formação de cristais de gelo (SHIKAMA; YAMAZAKI, 1961). Eventualmente, nossas amostras podem ter sofrido essa influência do congelamento, uma vez que elas ficaram cerca de 48 horas armazenadas em nitrogênio líquido, visto que a atividade da CAT em todas nossas amostras não apresentou uma diferença significativa em nossa análise estatística.

Outro tecido utilizado em nosso estudo foi a adrenal, que é uma glândula endócrina responsável pela síntese e liberação de vários hormônios, como a aldosterona, o cortisol, e a adrenalina. Na adrenal (FIG. 22), percebemos um aumento significativo da peroxidação lipídica do grupo HN quando comparamos aos grupos NN ($p < 0,05$) e NH ($p < 0,05$) e ao grupo HH ($p < 0,005$). Nesse tecido, o padrão de proteção evidenciado pelo grupo HN como em outras amostras (arco aórtico e ventrículos cardíacos) não se repetiu. Provavelmente, uma hiperativação dessa glândula estivesse ocorrendo, acarretando em aumento da peroxidação lipídica do grupo HN, supostamente como forma de proteção, como ficou demonstrado em outras amostras no grupo HN, pela redução na concentração de MDA.

Entretanto, estudos apontam que o córtex da adrenal poderia estar relacionado a uma maior vulnerabilidade devido aos efeitos adversos da peroxidação lipídica, em parte em virtude à sua alta concentração de ácidos graxos insaturados. A peroxidação lipídica pode efetuar a inativação das enzimas esteroideogênicas ligadas à membrana e, assim, influenciar a produção de hormônios. Talvez por causa dessa vulnerabilidade a peroxidação lipídica e a outros danos oxidativos, o córtex adrenal contenha uma grande quantidade de vários antioxidantes (BURCZYNSKI *et al.*, 1999).

Apesar de não termos encontrado uma diferença significativa em nossa análise estatística na avaliação da capacidade antioxidante enzimática da SOD e CAT, assim como na capacidade antioxidante não enzimática no método FRAP, na glândula adrenal dos animais da geração F-1, conseguimos comprovar em nosso estudo uma maior concentração dessas enzimas antioxidantes, quando comparamos as mesmas enzimas em outros tecidos (arco aórtico, artéria torácica, ventrículos e rim). Em adição, equiparando os nossos achados na

glândula adrenal ao trabalho de Burczynski e colegas, percebemos que a concentração de derivados carbonílicos da adrenal não apresentou uma diferença significativa entre os grupos NN, HN, NH e HH em nosso trabalho.

A última amostra de tecido utilizada em nosso estudo foi a do rim. Nos ensaios realizados (TBARS, FRAP, SOD, CAT e PC), não foi possível detectar em nossa análise estatística nenhuma diferença significativa entre os grupos da geração F-1 (FIG. 23). Concluimos, portanto, que o número de animais usados (n=6) pode ter influenciado de alguma forma os resultados apresentados.

Nos ensaios utilizando biomarcadores do estado redox, um fator de proteção com relação à dieta hipersódica ficou demonstrado, através da menor peroxidação lipídica apresentada nos grupos que descenderam do grupo tratado (HN e HH) quando comparamos com os grupos que vieram do grupo controle (NN e NH) nas amostras do arco aórtico.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do nosso estudo em modelo animal reforçam e contribuem para o conhecimento na teoria da origem do desenvolvimento na saúde e doenças, tendo em vista que conseguimos demonstrar que a sobrecarga de sal na dieta em uma primeira geração de ratos Wistar, independentemente de alteração na pressão arterial, acarretou modificações na programação fetal em sua prole. Observamos piora da função endotelial e uma provável lesão renal em curso nos animais do grupo HH, assim como identificamos um fator de proteção ao dano oxidativo ocasionado ao grupo HN. No entanto, mais estudos serão necessários para identificar os mecanismos responsáveis pela proteção e o aumento do risco destas transformações.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R. V.; CHASE, S. D. Rapid, fluorimetric–liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. **Journal of Chromatography B**, v. 775, n. 1, p. 121-126, 25 Jul 2002.
- AIKEN, C. E.; OZANNE, S. E. Transgenerational developmental programming. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 1, p. 63–75, 1 Jan 2014.
- ALLEN, R. G.; TRESINI, M. Oxidative stress and gene regulation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 3, p. 463–499, 1 Feb 2000.
- ANDERSON, T. J. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 34, n. 3, p. 631–638, Sep 1999.
- BALE, T. L. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 16, n. 6, p. 332–344, Jun 2015.
- BARKER, D. J. *et al.* Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet (London, England)**, v. 2, n. 8663, p. 577–580, 9 Sep 1989.
- BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet (London, England)**, v. 1, n. 8489, p. 1077–1081, 10 May 1986.
- BARKER, D. J. P. The developmental origins of chronic adult disease. **Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)**, v. 93, n. 446, p. 26–33, Dec 2004. Suplemento.
- BARRETO, T. O. *et al.* Swim training does not protect mice from skeletal muscle oxidative damage following a maximum exercise test. **European Journal of Applied Physiology**, v. 112, n. 7, p. 2523–2530, jul. 2012.
- BATLOUNI, M. Endotélio e hipertensão arterial. **Revista Brasileira de Hipertensão**, v. 8, n. 3, p. 328–338, jul./set.2001.
- BAYOL, S. A.; FARRINGTON, S. J.; STICKLAND, N. C. A maternal ‘junk food’ diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for ‘junk food’ and a greater propensity for obesity in rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 98, n. 04, p. 843–851, Out 2007.
- BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **The American Journal of Physiology**, v. 271, n. 5, parte 1, p. C1424–1437, Nov 1996.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 15 Jul 1996.

BERGER, S. L. *et al.* An operational definition of epigenetics. **Genes & Development**, v. 23, n. 7, p. 781–783, 1 Apr 2009.

BERNARDI, S. *et al.* High-salt diet increases glomerular ACE/ACE2 ratio leading to oxidative stress and kidney damage. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 5, p. 1793–1800, May 2012.

BONETTI, P. O.; LERMAN, L. O.; LERMAN, A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 2, p. 168–175, 1 Feb 2003.

BRAGULAT, E.; DE LA SIERRA, A.; ANTONIO, M.T; COCA, A. Endothelial dysfunction in salt-sensitive essential hypertension. **Hypertension**. 37:444-448, 2001.

BRANDES, R. P.; FLEMING, I.; BUSSE, R. Endothelial aging. **Cardiovascular Research**, v. 66, n. 2, p. 286–294, 1 May 2005.

BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 2, p. 682–685, Jan 1990.

BRETON, C. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. R19–R31, 18 Jan 2013.

BUGA, G. M. *et al.* Endothelium-derived nitric oxide relaxes nonvascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 1, p. 61–72, 14 Feb 1989.

BUÑAG, R. D.; TERÄVÄINEN, T.-L. Tail-cuff detection of systolic hypertension in different strains of ageing rats. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 59, n. 1–2, p. 197–213, Jun 1991.

BURCZYNSKI, J. M. *et al.* Species differences in adrenal lipid peroxidation. **FreeRadical Biology & Medicine**, v. 26, n. 7–8, p. 987–991, Apr 1999.

BUSSE, R.; MÜLSCH, A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. **FEBS Letters**, v. 265, n. 1–2, p. 133–136, 4 Jun 1990.

CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation Research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 10 Nov 2000.

CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal Origins of adult disease. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 41, n. 6, p. 158–176, Jul 2011.

CASTANHEIRA, J. *et al.* Morfologia do ventrículo esquerdo em adolescentes: comparação entre atletas e não atletas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 20, n. 6, p. 480–485, dez. 2014.

CHEONG, J. N. *et al.* Sex-Specific metabolic outcomes in offspring of female rats born small or exposed to stress during pregnancy. **Endocrinology**, v. 157, n. 11, p. 4104–4120, Nov 2016.

CONTRERAS, R. J. *et al.* High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. **Physiology & Behavior**, v. 71, n. 1–2, p. 173–181, 2000.

DALLE-DONNE, I.; GIUSTARINI, D.; COLOMBO, R. *et al.* Protein carbonylation in human diseases. **Trends in Molecular Medicine**. v. 9, n.4, p. 169-176, Apr 2003.

DEANFIELD, J. E.; HALCOX, J. P.; RABELINK, T. J. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. **Circulation**, v. 115, n. 10, p. 1285–1295, 13 Mar 2007.

DUSTING, G. J.; MACDONALD, P. S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Annals of Medicine**, v. 27, n. 3, p. 395–406, Jun 1995.

EPSTEIN, F. H.; MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 30 Dec 1993.

FARQUHAR, W. B. *et al.* Dietary sodium and health. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 65, n. 10, p. 1042–1050, Mar 2015.

FENG, B.; ZHANG, T.; XU, H. Human adipose dynamics and metabolic health: Human adipose dynamics and metabolic health. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1281, n. 1, p. 160–177, Apr 2013.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, mar. 1997.

FORSDAHL, A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? **British Journal of Preventive & Social Medicine**, v. 31, n. 2, p. 91–95, Jun 1977.

FORSTERMANN, U. Endothelial Nitric Oxide Synthase in Vascular Disease: From Marvel to Menace. **Circulation**, v. 113, n. 13, p. 1708–1714, 4 Apr 2006.

FORTUÑO, A. *et al.* Oxidative stress and vascular remodelling: Oxidative stress and vascular remodelling. **Experimental Physiology**, v. 90, n. 4, p. 457–462, Jul 2005.

FURCHGOTT, R. F.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. **FASEB Journal**, v. 3, n. 9, p. 2007–2018, Jul 1989.

FURCHGOTT, R. F.; ZAWADZKI, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 288, n. 5789, p. 373–376, 27 Nov 1980.

GUYTON, A.C.; COLEMAN, T.G.; WILCOX, C.S: Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. **J Am Soc Nephrol**, 10:2248-2258, 1969.

GEURTS, A. M. *et al.* Maternal diet during gestation and lactation modifies the severity of salt-induced hypertension and renal injury in Dahl salt-sensitive rats. **Hypertension**, v. 65, n. 2, p. 447–455, 1 Feb 2015.

GLUCKMAN, P. D. *et al.* Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 1, p. 61–73, 3 Jul 2008.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, A. S. Non-genomic transgenerational inheritance of disease risk. **BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology**, v. 29, n. 2, p. 145–154, Feb 2007.

GRIENGLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation Research**, v. 86, n. 5, p. 494–501, 17 Mar 2000.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 5–12, Dec 1994. Suplemento 10.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. 4th. ed. New York: Oxford University, 2007. 851 p.

HANNUKSELA, M.; LUNDQVIST, S.; CARLBERG, B. Thoracic aorta – dilated or not? **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v. 40, n. 3, p. 175–178, Jan 2006.

HE, FJ; MACGREGOR, GA. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, issue 1. Art. no. CD004937, 2004

HO, S.-M. *et al.* Environmental epigenetics and its implication on disease risk and health outcomes. **ILAR journal**, v. 53, p. 289–305, 2012.

IADECOLA, C.; DAVISSON, R. L. Hypertension and cerebrovascular dysfunction. **Cell Metabolism**, v. 7, n. 6, p. 476–484, Jun 2008.

INTERSALT COOPERATIVE RESEARCH GROUP: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hours urinary sodium and potassium excretion. **BMJ**, 297(6644):319–328. 1998.

IX, J. H. *et al.* Urinary creatinine excretion rate and mortality in persons with coronary artery disease: the heart and soul study. **Circulation**, v. 121, n. 11, p. 1295–1303, 23 Mar 2010.

JESPERSEN *et al.* **Femoral arterial and venous catheterization phymep**. 2 Dec 2014. Disponível em: <<http://www.phymep.com/femoral-arterial-and-venous-catheterization/>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

JEW, S. ABUMWEIS, SS. JONES, PJ. (2009) **Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention**. **J Med Food** 12(5):925–934.

JONES, D. P.; RADJ, R. Redox pioneer: professor helmut sies. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 18, p. 2459–2468, 20 Dec 2014.

JUHASZ, A. *et al.* Efficacy and safety of azilsartan medoxomil, an angiotensin receptor blocker, in Korean patients with essential hypertension. **Clinical Hypertension**, v. 24, 7 Feb 2018.

KAGOTA, S. High salt intake impairs vascular nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in spontaneously hypertensive rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 1, p. 344–351, 1 Jul 2002.

KARR-DULLIEN, V.; BLOOMQUIST, E. The influence of prenatal salt on the development of hypertension by spontaneously hypertensive rats (SHR). **Proceedings of the Society for Experimental Biology and medicine**, v. 160, n. 4, p. 421–425, 1 Apr 1979.

KEMPNER, W. Treatment of hypertensive vascular disease with the rice diet. **Am J Med** 4:545-577, 1948.

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 433–441, dez. 2003.

KUSCHE-VIHRIG, K.; SCHMITZ, B.; BRAND, E. Salt controls endothelial and vascular phenotype. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 467, n. 3, p. 499–512, Mar 2015.

LANGLEY-EVANS, S. C. Developmental programming of health and disease. **The Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 1, p. 97–105, Feb 2006.

LANGLEY-EVANS, S. C. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 28, p. 1–14, Jan 2015.

LAZZERI, C. *et al.* Microalbuminuria in non-diabetic stemi: an independent predictor for acute kidney injury. **Scandinavian Cardiovascular Journal**, v. 46, n. 6, p. 324–329, Dec 2012.

LEE, S.-Y.; CHOI, M. E. Urinary biomarkers for early diabetic nephropathy: beyond albuminuria. **Pediatric Nephrology**, v. 30, n. 7, p. 1063–1075, Jul 2015.

LEENEN, F. H.; YUAN, B. Dietary-sodium-induced cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rat versus Wistar-Kyoto rat. **Journal of Hypertension**, v. 16, n. 6, p. 885–892, Jun 1998.

LEVINE, R. L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LOPERENA, R.; HARRISON, D. G. Oxidative stress and hypertensive diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 1, p. 169–193, Jan 2017.

LOSCALZO, J.; WELCH, G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 38, n. 2, p. 87–104, Oct 1995.

LOYD-JONES, D. M *et al.* Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic impact goal through 2020 and beyond. **Circulation**, 121(4):586–613, 2010.

LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 2, p. 401S-406S, 1 Feb 1998.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, Dec 2014.

MATAVELLI, L. C. *et al.* Salt loading produces severe renal hemodynamic dysfunction independent of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 292, n. 2, p. H814–H819, Feb 2007.

MATTSON, D. L. Long-term measurement of arterial blood pressure in conscious mice. **The American Journal of Physiology**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. R564-570, Feb 1998.

MCCONNELL, J. M. L. A mitochondrial component of developmental programming. In: GLUCKMAN, P.; HANSON, M. (Ed.). **Developmental origins of health and disease**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. p. 75–81.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–142, Jun 1991.

MONTEZANO, A. C. *et al.* Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 31, n. 5, p. 631–641, May 2015.

MURPHY, M. P. Nitric oxide and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, n. 2–3, p. 401–414, 5 May 1999.

MYATT, L.; ROBERTS, V. Placental mechanisms and developmental origins of health and disease. In: GLUCKMAN, P.; HANSON, M. (Ed.). **Developmental origins of health and disease**. Cambridge: Cambridge University Press, 2006. p. 130–142.

NELLIS, J. R. *et al.* Modeling Outcomes: modified aortic arch advancement for neonatal hypoplastic arch. **Innovations (Philadelphia, Pa.)**, v. 12, n. 2, p. 109–115, Apr 2017.

NEVES, R. V. P. *et al.* Resistance training in spontaneously hypertensive rats with severe hypertension. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, n. 3, p. 201–209, mar. 2016.

OESTREICH, A. K.; MOLEY, K. H. Developmental and transmittable origins of obesity-associated health disorders. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 6, p. 399–407, Jun 2017.

OJEDA, N. B.; GRIGORE, D.; ALEXANDER, B. T. Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 15, n. 2, p. 101–106, Apr 2008.

PAL, S.; TYLER, J. K. Epigenetics and aging. **Science Advances**, v. 2, n. 7, p. e1600584, 19 p., 29 Jul 2016.

PATTI, M. E. Intergenerational programming of metabolic disease: evidence from human populations and experimental animal models. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 9, p. 1597–1608, May 2013.

PIECHA, G. *et al.* High salt intake causes adverse fetal programming-vascular effects beyond blood pressure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 27, n. 9, p. 3464–3476, 1 Sep 2012.

PINHO, C. P. S.; CARVALHO, B. S. de S.; ARAÚJO, M. L. D. Sensibilidade da creatinina sérica como marcador da função renal em pacientes coronariopatas. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 9, n. 5, p. 343–349, out. 2011.

POLINDER-BOS, H. A. *et al.* Low urinary creatinine excretion is associated with self-reported frailty in patients with advanced chronic kidney disease. **Kidney International Reports**, v. 2, n. 4, p. 676–685, Jul 2017.

PRASAD, A. S. *et al.* Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 837–844, Mar 2007.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 13, p. 5193–5197, Jul 1990.

REICHETZEDER, C. *et al.* Developmental origins of disease - crisis precipitates change. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 919–938, 2016.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Reproductive dysfunction in female rats with renovascular hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 26, n. 1, p. 104–110, 1 Jan 2013.

ROSEBOOM, T. J. *et al.* Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. **Heart (British Cardiac Society)**, v. 84, n. 6, p. 595–598, Dec 2000.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 14 Jan 1999.

SANDERS, P.W. Vascular consequences of dietary salt intake. **Am J Physiol Renal Physiol** 297:F237–F243.2009.

SARNAK, M. J.; ASTOR, B. C. Implications of Proteinuria: CKD progression and cardiovascular outcomes. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 18, n. 4, p. 258–266, Jul 2011.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308–313, ago. 2004.

SHIKAMA, K.; YAMAZAKI, T. Denaturation of catalase by freezing and thawing. **Nature**, v. 190, n. 4770, p. 83–84, Apr 1961.

SIBAL, L. *et al.* The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. **Current Cardiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 82–90, May 2010.

SUSIC, D.; FARES, H.; FROHLICH, E. D. Salt, Arterial pressure, and cardiovascular and renal damage. **The Ochsner Journal**, v. 9, n. 4, p. 197–203, 2009.

TEIXEIRA, B. C. *et al.* Inflammatory markers, endothelial function and cardiovascular risk. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 2, p. 108–115, abr. 2014.

TOBIAN, L.; HANLON, S. High sodium chloride diets injure arteries and raise mortality without changing blood pressure. **Hypertension**, v. 15, n. 6, parte 2, p. 900–903, 1 Jun 1990.

URAKAMI-HARASAWA, L. *et al.* Importance of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human arteries. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 11, p. 2793–2799, 1 Dec 1997.

VAN VLIET, B. N. *et al.* Direct and indirect methods used to study arterial blood pressure. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, n. 2, p. 361–373, Oct 2000.

VARAGIC, J. *et al.* Myocardial fibrosis, impaired coronary hemodynamics, and biventricular dysfunction in salt-loaded SHR. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 4, p. H1503–H1509, Apr 2006.

VASQUEZ-VIVAR, J. *et al.* Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 16, p. 9220–9225, 4 Aug 1998.

VEHASKARI, V. M.; AVILES, D. H.; MANNING, J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. **Kidney International**, v. 59, n. 1, p. 238–245, Jan 2001.

WADDINGTON, C. H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature**, v. 150, n. 3811, p. 563–565, Nov 1942.

XU, P. *et al.* Endothelial dysfunction and elevated blood pressure in MAS gene-deleted mice. **Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)**, v. 51, n. 2, p. 574–580, Fev 2008.

YU, H. C. M. *et al.* Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. **Circulation**, v. 98, n. 23, p. 2621–2628, 8 Dez 1998.

ZOHDI, V. *et al.* Developmental programming of cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: findings utilising a rat model of maternal protein restriction. **Nutrients**, v. 7, n. 1, p. 119–152, 29 Dec 2014.