



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DOUTORADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

ROBERVAN VIDAL DOS SANTOS

**ALTERAÇÕES VASCULARES NA PROLE DE RATOS
MACHOS EXPOSTOS A UMA DIETA OCIDENTAL NO
PERÍODO PERINATAL**

**SÃO CRISTÓVÃO
2017**

ROBERVAN VIDAL DOS SANTOS

**ALTERAÇÕES VASCULARES NA PROLE DE RATOS
MACHOS EXPOSTOS A UMA DIETA OCIDENTAL NO
PERÍODO PERINATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de
Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana
Filho

Co-orientador: Prof. Dr. João Henrique da Costa
Silva

**SÃO CRISTÓVÃO
2017**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237a	Santos, Robervan Alterações vasculares na prole de ratos machos expostos a uma dieta ocidental no período perinatal / Robervan Vidal dos Santos ; orientador Valter Joviniano de Santana Filho. – São Cristovão, 2017. 77f.:il. Tese (doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de Sergipe, 2017. 1. Estresse oxidativo. 2.Dieta. 3. Gravidez 4. Lactação. 5. Aorta, I. Santana Filho, Valter Joviniano de, Orient. II. Título. CDU 613.2. 03:612.64
-------	---

ROBERVAN VIDAL DOS SANTOS

**ALTERAÇÕES VASCULARES NA PROLE DE RATOS
MACHOS EXPOSTOS A UMA DIETA OCIDENTAL NO
PERÍODO PERINATAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de
Sergipe como requisito à obtenção do grau de
Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Valter Joviniano de Santana Filho

1º Examinador: Prof.^a Dr.^a. Josimari Melo de Santana

2º Examinador: Prof.^a. Dr.^a. Thallita Kelly Rabelo

3º Examinador: Prof. Dr. André Sales Barreto

4º Examinador: Prof. Dr. Daniel Badauê Passos Júnior

DEDICATÒRIA

Dedico primeiramente a Deus dono de toda ciência sabedoria e poder.

Aos meus pais, irmãos, esposa e minhas duas filhas. Seja qual for à natureza da jornada, é importante saber por quem você luta.

Dedico todo meu amor a vocês!

AGRADECIMENTOS

Mais uma jornada concluída e se esse dia chegou foi porque Deus todo misericordioso me concedeste essa vitória. Muito obrigado senhor, só tu sabes quantas vezes pensei em desistir, mas, fortaleceu-me nos momentos mais difíceis.

Um agradecimento especial as pessoas que mais amo no mundo, meus pais: Maria José de Souza Santos e Renato Vidal dos Santos (*in memorian*). Não tenho palavras para descrever tamanha gratidão por todos os ensinamentos e principalmente pelo investimento. A minha mãe por nunca ter medido esforços, para me oferecer o que nunca teve na vida. Pai, como gostaria nesse momento de dividir essa vitória nos seus braços. Muito obrigado por tudo e a única coisa que posso fazer e retribuir com muito amor.

Aos meus irmãos em especial a Yuri Vidal, mesmo distante sei que sempre torceu por mim e agradeço de coração toda a sua admiração. Desejo-te toda felicidade e amor, ainda vamos compartilhar as suas vitórias.

A minha esposa Fabiana Frizzera pelo amor, tolerância e companheirismo. Sempre estive ao meu lado incentivando-me. Agradeço por ter abdicado da sua vida profissional para que eu pudesse realizar meus sonhos. Amo você.

As pessoas que transformaram o amor em um substantivo concreto, minhas duas filhas: Júlia Vidal Frizzera e Valentina Vidal Frizzera. Mesmo sem saberem foram as que mais me incentivaram e deram forças. Hoje, a luta é mais prazerosa e menos árdua. É sempre importante saber, independente da jornada, por quem você luta. Papai ama vocês.

Aos colegas de laboratório, principalmente para aqueles que contribuíram na execução dos protocolos experimentais: João Eliakim (neguinho), Fabrício, Rodrigo, Peligris e José Marden.

Ao Prof. Dr. Valter Joviniano Santana Filho, que mesmo sem me conhecer, aceitou ser meu orientador, muito obrigado professor pela oportunidade, que essa parceria seja eterna e que possamos publicar muitos papers juntos.

A Prof^a Dr^a Josimari de Santana pelas contribuições no PROASA, qualificação e defesa do mestrado e doutorado.

A Prof^a Dr^a Sandra Lauton por abrir as portas do seu laboratório, foi determinante para realização do trabalho.

A prof^a Dr^a. Elisabeth Nascimento e Prof. Dr. João Henrique da UFPE pelas contribuições na escrita do paper e pelos insumos fornecidos.

A todos os professores do programa de pós-graduação em ciências fisiológicas, meu agradecimento especial pelo conhecimento adquirido, serei eternamente grato.

Um muito obrigado à Universidade Federal de Sergipe pela oportunidade

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de apoio a pesquisa e a inovação tecnológica (FAPITEC) pelo apoio financeiro.

EPÍGRAFE

"Buscai, em primeiro lugar, o reino de Deus e a sua justiça, e todas as suas necessidades vos serão dadas por acréscimo".

(Mateus 6 –33)

RESUMO

Alterações vasculares na prole de ratos machos expostos a uma dieta ocidental no período perinatal. Robervan Vidal dos Santos. São Cristóvão/2017.

Introdução: O ambiente intrauterino é responsável pelo desenvolvimento e saúde da progênie. Assim, o consumo de dietas com o padrão ocidental durante o período perinatal pode causar efeitos deletérios no feto com consequências patológicas persistentes da adolescência e vida adulta. **Objetivo:** Avaliar se a oferta de uma dieta ocidental durante a gestação e a lactação, promove alterações vasculares e nos marcadores do estresse oxidativo da prole de ratos machos com 60 dias de vida. **Métodos:** Foram utilizadas 16 ratas virgens e 8 ratos machos da linhagem *Wistar* com 2 a 3 meses. A partir da determinação da prenhez foi oferecida uma dieta ocidental (O = 8, 31% lipídios) ou controle (C = 8, 18% de lipídios) até o desmame dos filhotes. Após 60 dias de vida, os ratos da prole ocidental (PO, n = 34) ou controle (PC, n = 32) foram eutanasiados, e o leito aorta torácico (LAT) foi removido para a realização do estudo de reatividade vascular. Foram realizadas curvas concentração respostas à acetilcolina (ACh), nitroprussiato de sódio (NPS), fenilefrina (FEN), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de cálcio (CaCl_2) em um banho isolado de órgãos. Além disso, foi mensurada a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Também, foram mensurados nas células musculares da aorta torácica os níveis intracelulares do óxido nítrico (NO) e do ânion superóxido através de sondas que emitem fluorescência na presença destes substratos (NO e $\text{O}^\cdot$). Os valores foram expressos como a média $\pm$ EPM. Teste *t* não pareado para os valores da resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (Log EC50) extraídos das curvas de reatividade vascular. Foi utilizado também o teste *t* não pareado para os marcadores do estresse oxidativo com exceção da biodisponibilidade de NO que foi utilizado Anova one way com pós-teste de Bonferroni. **Resultados:** Aos 60 dias foi observou-se um aumento na eficácia (RMax) à fenilefrina em anéis sem endotélio (PC: $5,78 \pm 0,3$ vs. PO: $7,7 \pm 0,5^*$ mN/mm) e com endotélio (PC: $4,6 \pm 0,4$ vs. PO: $6,43 \pm 0,4^*$ mN/mm), ao cloreto de potássio (KCl) em anéis com endotélio (PC: $3,89 \pm 0,28$ vs. PO: $4,64 \pm 0,26$ mN/mm) e sem endotélio (PC: $3,78 \pm 0,12$ vs. PO: $4,82 \pm 0,09$ mN/mm) e ao CaCl_2 em anéis sem endotélio (PC: $5,7 \pm 0,16$ vs. PO: $6,75 \pm 0,18$ mN/mm) e uma redução da eficácia à ACh (PC: $93 \pm 3,1$ vs. PO: $86 \pm 1,8^*$ %relax) como na sensibilidade (Log EC50) ao NPS (PC: $8,5 \pm 0,05$ vs. PO: $8,2 \pm 0,04^*$ %relax). Além disso, a PO apresentou uma menor biodisponibilidade do NO em condição basal (PC: $1,0 \pm 0,03$ vs. PO: $0,4 \pm 0,01$ ua) e estimulados com ACh (PC: $1,46 \pm 0,04$ vs. PO: $0,88 \pm 0,02$ ua). Ademais, a PO apresentou uma maior produção do ânion superóxido (PC: $1,0 \pm 0,06$ vs. PO: $2,06 \pm 0,13$ ua) associado a uma maior atividade da SOD (PC: $0,026 \pm 0,004$ vs. PO: $0,27 \pm 0,06$ mg/ptn) e uma redução da CAT (PC: $0,021 \pm 0,03$ vs. PO: $0,08 \pm 0,03$ mg/ptn). **Conclusão:** A introdução de uma dieta ocidental no período perinatal reduziu o relaxamento e aumentou a contração do leito aórtico torácico associado a redução da biodisponibilidade do NO e elevação nos níveis intracelulares do ânion superóxido na prole de ratos machos com 60 dias de vida.

Palavras - chave: Dieta ocidental, Gestação, Lactação, Prole, Aorta, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Vascular changes in male rats offspring exposed to a western diet in the perinatal period. Robervan Vidal dos Santos. São Cristovão / 2017.

Introduction: The intrauterine environment is responsible for the development and health of the progeny. Thus, consumption of diets with the western pattern during the perinatal period can cause deleterious effects on the fetus with persistent pathological consequences of adolescence and adult life. **Objective:** To evaluate the supply of a western diet during gestation and lactation, promoting vascular and markers of oxidative stress in offspring of male rats at 60 days of age. **Methods:** Sixteen male rats and eight male Wistar rats were available for 2 to 3 months. From the determination of pregnancy, a western diet (O = 8, 31% lipids) or control (C = 8, 18% of lipids) was offered until the weaning of the pups. After 60 days of life, rats from the western offspring (PO, n = 34) or control (PC, n = 32) were euthanized, and the thoracic aorta bed (LAT) was removed for the vascular reactivity study. Concentration curves were performed on acetylcholine (ACh), sodium nitroprusside (NPS), phenylephrine (FEN), potassium chloride (KCl) and calcium chloride (CaCl₂) in an isolated organ bath. In addition, the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) was measured. Also, intracellular levels of nitric oxide (NO) and superoxide anion were measured in the muscle cells of the thoracic aorta by probes that emit fluorescence in the presence of these substrates (NO and O₂⁻). Values were expressed as the mean $\pm$ SEM. Unpaired t-test for the maximum response (R_{max}) and sensitivity (Log EC₅₀) values extracted from the vascular reactivity curves. The unpaired t-test for oxidative stress markers was also used, except for NO bioavailability, which was used with Bonferroni post-test Anova one-way. **Results:** At 60 days, an increase in efficacy (R_{Max}) to phenylephrine in rings without endothelium (PC: 5.78 ± 0.3 vs. PO: 7.7 ± 0.5 * mN / mm) and with endothelium (PC: 4.6 ± 0.4 vs. PO: 6.43 ± 0.4 * mN / mm), to potassium chloride (KCl) in rings with endothelium (PC: 3.89 ± 0.28 vs. PO: 4.0 ± 0.12 vs PO: 4.82 ± 0.09 mN / mm) and to CaCl₂ in rings without endothelium (PC: 5.7 ± 0.16 vs. PO: 6.75 ± 0.18 mN / mm) and a reduction in efficacy to ACh (PC: 93 ± 3.1 vs. PO: 86 ± 1.8 *% relax) as in Sensitivity (Log EC₅₀) to NPS (PC: 8.5 ± 0.05 vs. PO: 8.2 ± 0.04 *% relax). In addition, the PO presented a lower bioavailability of NO in the basal condition (PC: 1.0 ± 0.03 vs. PO: 0.4 ± 0.01 ua) and stimulated with Ach (PC: 1.46 ± 0.04 vs. PO: 0.88 ± 0.02 water). In addition, PO presented a higher production of superoxide anion (PC: 1.0 ± 0.06 vs. PO: 2.06 ± 0.13 water) associated with a higher SOD activity (PC: 0.026 ± 0.004 vs. PO: 0.27 ± 0.06 mg / ptn) and a reduction of CAT (PC: 0.021 ± 0.03 vs. PO: 0.08 ± 0.03 mg / ptn). **Conclusion:** The introduction of a western diet in the perinatal period reduced relaxation and increased contraction of the thoracic aortic bed associated with the reduction of NO bioavailability and elevation of intracellular levels of superoxide anion in the offspring of 60 - day - old male rats.

Keywords: Western Diet, Pregnancy, Lactation, Offspring, Aorta, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo da síntese, liberação e mecanismo de ação do NO nas células vasculares lisas.....	12
Figura 2: Esquema ilustrativo da hiperglicemia estimulando a síntese das EROs.....	19
Figura 3: Esquema ilustrativo associando o consumo da dieta ocidental com a redução na biodisponibilidade da molécula de NO.....	23
Figura 4: Esquema ilustrativo do mecanismo de defesa antioxidante enzimático.....	25
Figura 5: Pré-contração com KCl 60 mM.....	40
Figura 6A: Curvas concentração resposta com acetilcolina no leito aórtico torácico com endotélio.....	41
Figura 6B: Área sob a curva (ASC) das curvas com acetilcolina.....	41
Figura 7A: Curvas concentração resposta com nitroprussiato de sódio no leito aórtico torácico sem endotélio.....	42
Figura 7B: Área sob a curva (ASC) das curvas com nitroprussiato de sódio.....	42
Figura 8A: Curvas concentração resposta com acetilcolina no leito aórtico torácico com endotélio na presença do L-NAME.....	43
Figura 8B: Área sob a curva (ASC) das curvas com acetilcolina na presença do L-NAME.....	43
Figura 9A: Curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina no leito aórtico torácico com endotélio.....	44
Figura 9B: Área sob a curva (ASC) das curvas com cloridrato de fenilefrina com endotélio.....	44
Figura 10A: Curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina no leito aórtico torácico sem endotélio.....	46
Figura 10B: Área sob a curva (ASC) das curvas com cloridrato de fenilefrina sem endotélio.....	46
Figura 11A: Curvas concentração resposta com KCl no leito aórtico torácico com endotélio.....	47
Figura 11B: Área sob a curva (ASC) das curvas com KCl com endotélio.....	47
Figura 12A: Curvas concentração resposta com KCl no leito aórtico torácico sem endotélio.....	48
Figura 12B: Área sob a curva (ASC) das curvas sem KCl com	

endotélio.....	48
Figura 13A: Curvas concentração resposta com CaCl_2 no leito aórtico torácico sem endotélio.....	49
Figura 13B: Área sob a curva (ASC) das curvas com CaCl_2 sem endotélio.....	49
Figura 14: Força de contração com cloridrato de fenilefrina sem cálcio extracelular.....	50
Figura 15A: Concentração plasmática de glicose.....	51
Figura 15B: Sensibilidade periférica à insulina (TTI).....	51
Figura 16: Concentração dos hidroperóxidos totais no leito aórtico torácico.....	51
Figura 17: Atividade da superóxido dismutase na aorta torácica.....	52
Figura 18: Atividade da catalase no leito aórtico torácico.....	52
Figura 19: Níveis intracelulares de óxido nítrico basal e estimulado com acetilcolina.....	53
Figura 20: Níveis intracelulares do ânion superóxido.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição centesimal das dietas controle (AIN-93G), ocidental (O) e labina e a contribuição energética dos macronutrientes em relação à energia total.....	28
Tabela 2: Composição de ácidos graxos das dietas controle (AIN-93G) e ocidental (% de ácidos graxos totais).....	29
Tabela 3: Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com acetilcolina...	41
Tabela 4: Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com nitroprussiato de sódio.....	42
Tabela 5: Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com acetilcolina na presença do L-NAME.....	43
Tabela 6: Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina com endotélio.....	45
Tabela 7: Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina sem endotélio.....	46
Tabela 8: Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com KCl com endotélio.....	47
Tabela 9: Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com KCl sem endotélio.....	48
Tabela 10: Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com CaCl ₂ sem endotélio.....	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Solução nutritiva Krebs-Henseleit.....	31
Quadro 2: Solução de cloreto de potássio (KCl) 60 mM.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS

ACh – Acetilcolina;
AGEs – Produtos da glicação protéica;
AGPI-CL – Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa;
AIN – Instituto Americano de nutrição;
AKT – Proteína quinase B;
AMPc – Monofosfato de adenosina cíclico;
ASC – Área sob a curva
ATP – Adenosina trifosfato;
BH4 – Tetrahidrobiopterina;
Ca²⁺ - Cálcio;
CaCl₂ – Cloreto de cálcio;
CAM - Calmodulina;
CAT – Catalase;
CEPA – Comitê de ética de pesquisa com animais;
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
CuSO₄ – Sulfato de cobre;
DAG – Diacilglicerol;
DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis;
DE – Disfunção endotelial;
DHA – Ácido docosahexanóico;
DM – Diabetes *Mellitus*;
DM2 - Diabetes *Mellitus* tipo 2;
DNA – Ácido desoxirribonucléico;
DOHAD – Desenvolvimento da origem da saúde e da doença;
EDHF - Fator hiperpolarizante derivado do endotélio;
EDRF – Fator relaxante derivado do endotélio;
EO – Estresse oxidativo;
EPM – Erro padrão da média;
EPA – Ácido eicosapentanóico;
FAD – Flavina adenina dinucleotídeo;
FEN – Fenilefrina;
FMN – Flavina adenina mononucleotídeo;
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético;
eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial;
GMPc – Monofosfato cíclico de guanosina;
GR – Glutathione Redutase;
GSH – Glutathione;
GSHPx – Glutathione Peroxidase;
G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase;
H₂O – Água;
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio;
HCLO – Ácido hipocloroso;
HAS – Hipertensão Arterial sistêmica;
IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística;
IL – 6 – Interleucina – 6;
IL - 1 β – Interleucina – 1 beta;
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida;
IP3 – Inositol trifosfato;

IPR3 – Receptor do Inositol trifosfato;
IRS1 – Substrato do receptor de insulina – 1;
K⁺ - Potássio;
KCl – Cloreto de potássio;
LAT – Leito aórtico torácico;
L-NAME - N^o-nitro-L-arginina metil éster;
LNED – Laboratório de nutrição experimental e dietética;
M1 – Muscarínico 1;
M3 – Muscarínico 3;
M5 – Muscarínico 5;
MDA – Malonaldeído;
MLC – Cadeia leve da miosina;
MLCK – Cadeia leve da miosina quinase;
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase;
NaOH – Hidróxido de sódio;
NHA – N^G- hidroxil-L-arginina;
NO – Óxido nítrico;
NOS – Óxido nítrico sintases;
nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal;
NPS – Nitroprussiato de sódio;
O₂ – Oxigênio;
OH – Hidroxila;
ONOO⁻ - Peroxinitrito;
PBS – Tampão fosfato salino;
PC – Prole controle;
PIP2 – Fosfatilinositol 4,5 –bifosfato;
PKA – Proteína quinase A;
PKC – Proteína quinase C;
PLC – Fosfolipase C;
PO – Prole ocidental;
PPP – Pentoses fosfato;
PVAT – Tecido adiposo perivascular;
R_{max} – Resposta máxima;
SHR – Rato espontaneamente hipertenso;
SNA – Sistema nervoso autônomo;
SRA – Sistema renina angiotensina;
SNC – Sistema nervoso central;
SOD – Superóxido dismutase;
TTI – Teste de tolerância à insulina
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa;
VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade;
UFS – Universidade Federal de Sergipe;
UFPE - Universidade Federal de Pernambuco
 ω -3 – Ômega -3 (ácido alfa-linolênico);
 ω -6 – Ômega -6 (ácido alfa-linoléico);

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1 Papel dos lipídios no crescimento e desenvolvimento fetal.....	4
2.2 Programação fetal.....	6
2.3 Endotélio vascular.....	8
2.4 Óxido nítrico.....	10
2.5 Síntese do óxido nítrico endotelial.....	11
2.6 Contração e relaxamento do músculo liso vascular.....	13
2.7 Estresse oxidativo e redução na biodisponibilidade do óxido nítrico.....	16
2.8 Glicemia X estresse oxidativo.....	17
2.9 Alterações endócrinas e disfunção endotelial.....	19
2.10 Mecanismo de defesa antioxidante.....	23
3. OBJETIVOS.....	26
3.1 Geral.....	26
3.2 Específicos.....	26
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Dietas experimentais.....	27
4.2.1 Composição de ácidos graxos das dietas.....	28
4.2.2 Grupos experimentais.....	30
4.3.Drogas.....	30
4.4 Soluções nutritivas.....	31
4.5 Procedimentos experimentais.....	32
4.5.1 Obtenção e preparação dos anéis de aorta torácica.....	32
4.5.2 Verificação da integridade do músculo vascular liso e da funcionalidade endotelial.....	32
4.5.3 Avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina e nitroprussiato de sódio.....	33
4.5.4 Verificação da participação do óxido nítrico (NO) no vasorrelaxamento estimulado pela acetilcolina.....	33
4.5.5 Avaliação da resposta vasoconstrictora à fenilefrina.....	34
4.5.6 Avaliação da resposta vasoconstrictora ao cloreto de potássio (KCl).....	34

4.5.7 Avaliação da resposta vasoconstrictora ao cloreto de cálcio (CaCl ₂).....	34
4.5.8 Avaliação do papel do cálcio intracelular na resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina.....	35
4.6 Ensaios bioquímicos.....	35
4.6.1 Determinação da concentração total de proteínas.....	35
4.6.2 Glicemia de jejum.....	36
4.6.3 Teste de tolerância à insulina.....	36
4.6.4 Mensuração dos hidroperóxidos totais.....	36
4.6.5 Determinação da atividade da SOD.....	37
4.6.6 Determinação da atividade da CAT.....	37
4.7 Mensuração das Concentrações Intracelulares do NO.....	37
4.8 Mensuração do ânion superóxido (O ₂ ⁻) intracelular.....	38
4.9 Descartes.....	38
4.10 Análise estatística.....	38
5. RESULTADOS.....	39
5.1 Pré contração com KCl 60 mM.....	39
5.2 Curvas concentração resposta com acetilcolina.....	40
5.2.1 Valores do Log da EC ₅₀ e da resposta máxima das curvas com acetilcolina.....	41
5.3 Curvas concentração resposta com nitroprussiato de sódio.....	41
5.3.1 Valores do Log da EC ₅₀ e da resposta máxima das curvas com nitroprussiato de sódio.....	42
5.4 Curvas concentração resposta com acetilcolina na presença do L-NAME.....	43
5.4.1 Valores do Log da EC ₅₀ e da resposta máxima das curvas com acetilcolina na presença do L-NAME.....	43
5.5 Curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina com endotélio funcional...	44
5.5.1 Valores do Log da EC ₅₀ e da resposta máxima das curvas com cloridrato de fenilefrina com endotélio funcional.....	45
5.6 Curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina sem endotélio funcional...	45
5.6.1 Valores do Log da EC ₅₀ e da resposta máxima das curvas com cloridrato de fenilefrina sem endotélio funcional.....	46
5.7 Curvas concentração resposta com KCl com endotélio funcional.....	46
5.7.1 Valores do Log da EC ₅₀ e da resposta máxima das curvas com KCl com endotélio	

funcional.....	47
5.8 Curvas concentração resposta com KCl sem endotélio funcional.....	47
5.8.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com KCl sem endotélio Funcional.....	48
5.9 Curvas concentração resposta com CaCl ₂ sem endotélio funcional.....	48
5.9.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com CaCl ₂ sem endotélio funcional.....	49
5.10 Força de contração com Cloridrato de fenilefrina (10 ⁻³ M) sem cálcio extracelular.....	49
5.11(A) Glicemia de jejum	50
5.11 (B) Teste de tolerância à insulina.....	50
5.12 Concentração dos hidroperóxidos totais.....	51
5.13 Atividade da superóxido dismutase.....	51
5.14 Atividade da catalase.....	52
5.15 Biodisponibilidade do óxido nítrico basal e estimulado com acetilcolina (10 ⁻⁶ M).....	52
5.16 Níveis intracelulares do ânion superóxido.....	53
6. DISCUSSÃO.....	54
7. CONCLUSÃO.....	59
8. REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO A – CEPA.....	76

1. INTRODUÇÃO

O ambiente intrauterino tem sido associado com o surgimento das doenças crônicas não transmissíveis na vida pós-natal. Nesse contexto, insultos nutricionais ocorridos durante este período (gestação e lactação) podem comprometer o desenvolvimento e o crescimento do feto e ocasionar consequências patológicas na adolescência e vida adulta (BARKER e MARTYN, 1993). Dessa forma, o termo “desenvolvimento da origem da saúde e da doença” (DOHAD) é definida pelas informações supracitadas e tem sido correlacionado com o aumento na incidência das doenças cardiovasculares (hipertensão arterial sistêmica) e endócrinas (diabetes *mellitus*), em humanos e modelos animais expostos a um ambiente obesogênico durante a vida perinatal (TAMASHIRO e MORAN, 2010).

Surpreendentemente tem sido reportado por pesquisas experimentais, clínicas e epidemiológicas que eventos adversos experimentados no útero ou durante o período perinatal (gestação, lactação e primeira infância) podem afetar o desenvolvimento de sistemas fisiológicos e aumentar a predisposição de hipertensão arterial e doenças metabólicas na vida adulta (MEHTA, 2008; FERRO CAVALCANTE et al., 2013). Dessa forma, a dieta materna é um dos principais insultos que ocorre na vida intrauterina e assume caráter decisivo quanto ao possível desenvolvimento de doenças que poderão comprometer a saúde do indivíduo quando adulto, sendo assim a nutrição adequada é um dos fatores de maior impacto na saúde infantil e é a melhor forma de evitar/prevenir o desenvolvimento de doenças metabólicas (Perez-Escamilla and Kac 2013).

Nesse contexto, o consumo de dietas ocidentais (elevado conteúdo de gordura saturada e carboidratos simples), durante a gestação e a lactação tem promovido insultos nutricionais (ambiente obesogênico), que levam ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (FEOLI et al.; 2003; BUETTNER et al.; 2007). Sendo assim, estudos em roedores têm sido realizados para elucidar os mecanismos pelo qual este tipo de dieta ofertada durante a vida intrauterina promove alterações no funcionamento dos sistemas biológicos da prole (BUETTNER et al.; 2007; BARROS et l.; 2015).

Um estudo publicado recentemente pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que a introdução de uma dieta ocidental durante o período perinatal promoveu maior peso corporal, hiperfagia, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e taquicardia associada à disfunção no

funcionamento do sistema nervoso autônomo (SNA) e diminuição da sensibilidade dos barorreceptores em ratos com 60 dias de vida. Além das alterações hemodinâmicas evidenciadas nestes animais, os mesmos desenvolveram hiperglicemia, dislipidemia associada a diminuição na sensibilidade periférica à insulina (VIDAL-SANTOS et al., 2016). Adicionalmente, os achados deste estudo têm associação com fatores que promovem a disfunção endotelial (DE). A DE está presente em diversas doenças metabólicas e/ou cardiovasculares, como na obesidade, intolerância à glicose, hiperglicemia (diabetes mellitus), hipertensão arterial e dislipidemia (CARVALHO, COLAÇO e FORTES, 2006). Em todas essas condições ocorre resistência insulínica, a qual se apresenta como um distúrbio metabólico que se manifesta pela redução na utilização da glicose principalmente pelo músculo esquelético (FERRANNINI, et al.; 1997)), e tem sido fortemente associada com a DE e que pode ocorrer precocemente nestas condições fisiopatológicas (HSUEH, LYON e QUIÑONES, 2004).

Ademais, a literatura tem mostrado que a hiperglicemia promove o aumento da glicose intracelular, que é responsável por ativar vias que induzem o aumento na síntese das espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando um quadro clínico denominado de estresse oxidativo (EO) (MATHEUS, et al.; 2013). EO é definido como um desequilíbrio entre a síntese das EROs e sua inativação pelos sistemas antioxidantes endógenos (OLIVEIRA-SALES et al., 2008). Além disso, é bem documentado na literatura que o EO promove alterações vasculares importantes em modelos experimentais de diabetes, sendo um dos principais mecanismos fisiopatológicos para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares (SUSUKI et al., 1995; FUKUI et al., 1997; PARK et al., 2008).

Recentes evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que a obesidade durante a gestação e/ou lactação aumenta a suscetibilidade da prole desenvolver obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão arterial (Buettner, Scholmerich et al. 2007; Tamashiro, Terrillion et al. 2009; Cerf and Louw 2010). No entanto, a literatura é carente de estudos que avaliam prole de mães que foram expostas a dietas ocidentais e/ou hiperlipídicas na ausência da obesidade. Assim, diante das evidências apresentadas, testaremos a hipótese de que animais provenientes de mães submetidas a um ambiente obesogênico durante a gestação e lactação promovam alterações vasculares e nos marcadores do estresse oxidativo na prole de ratos machos com 60 dias de vida. Para testar esta hipótese foi avaliado a reatividade vascular

e os marcadores do estresse oxidativo no leito aórtico torácico de ratos expostos a uma dieta ocidental durante gestação e a lactação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Papel dos lipídios no crescimento e desenvolvimento fetal

A nutrição durante a gestação e em estágios precoces da vida pós-natal (lactação) é determinante para a ontogênese e maturação de órgãos e sistemas. Assim, uma alimentação equilibrada durante esses estágios (gestação e lactação) é fundamental para o crescimento e desenvolvimento normal do feto (SMART e DOBBING, 1971; MORGANE et al., 1993). Dessa forma, o ácido linolênico (ω -3) e o linoléico (ω -6) são considerados lipídios essenciais devido o organismo humano e de ratos não são capazes de sintetizá-los. Adicionalmente, o ω -3 e o ω -6 são fundamentais para o desenvolvimento fisiológico do feto durante a gestação e a lactação. No entanto, as dietas ocidentais são deficientes em ω -3 e apresentam elevados teores de gorduras saturadas e ω -6 (ácido linoléico), sendo este último, encontrado em abundância na maioria dos óleos vegetais (soja, girassol, milho) (CLANDININ et al., 1980; NEURINGER e CONNOR, 1986; LEAF et al., 1992; FOREMAN-VAN et al., 1995; GIBSON, MUHLHAUSLER e MAKRIDES, 2011).

O consumo de dietas hiperlipídicas e/ou ocidentais durante a gestação aumenta as concentrações plasmáticas dos ácidos graxos livres e colesterol, que são moléculas lipossolúveis capazes de ultrapassar a barreira placentária (HERRERA et al., 2006). No entanto, alguns tipos de lipídios como os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL) provenientes da dieta e/ou do metabolismo materno, são fundamentais para o crescimento fetal que ocorre principalmente durante o primeiro semestre da gestação (LOPEZ-LUNA, MUNOZ e HERRERA, 1986). Nas dietas ocidentais ocorre um desbalanço na fração lipídica dietética caracterizada por elevada quantidade de gordura saturada e redução no consumo das insaturadas, esse insulto promovido durante a vida gestacional compromete a neurogênese fetal (HERRERA et al., 2006). O ácido alfa-linolênico (ω -3) é um lipídio insaturado essencial, encontrado principalmente em produtos de origem marinha (óleos e peixes), sendo este que este tipo de gordura está presente em grandes quantidades no sistema nervoso central de mamíferos. Além disso, o ácido docosahexanóico (DHA) e eicosapentanóico (EPA) são substratos derivados a partir do ω -3 sendo essenciais para o desenvolvimento normal do sistema nervoso central (SNC) (INNIS, 2008).

A placenta desenvolve papel importante no desenvolvimento do (SNC) fetal através da transferência do DHA, sendo que a presença deste substrato na circulação do feto depende do consumo dietético materno (CRAWFORD, HASSAM e WILLIAMS, 1976; CRAWFORD, HASSAM e STEVENS, 1981; KING et al., 1994; COLETTA, BELL e ROMAN, 2010). Um estudo realizado por Innis (2007) mostrou que uma dieta carente em DHA ofertada durante a vida perinatal comprometeu a neurotransmissão de neurônios dopaminérgicos e serotoninérgicos pela redução na síntese e alterações na interação com os respectivos receptores. Além disso, a deficiência do DHA durante a gestação desencadeia transtornos comportamentais e compromete a função cognitiva (WAINWRIGHT, 2002). Adicionalmente, uma redução no consumo das gorduras poliinsaturadas durante a gestação e um desenvolvimento inadequado do SNC, depende da idade gestacional, duração e intensidade do insulto (GEORGIEFF e INNIS, 2005).

Na composição do leite materno, os lipídios estão presentes na forma saturada e insaturada e representa a maior fonte de energia (40 a 55%) consumida pelo lactente (INNIS, 2003; CONNOR, 2000). Além disso, a qualidade e a quantidade de lipídios presentes no leite materno dependem diretamente do consumo materno e da composição corporal (VILLALPANDO e DEL PRADO, 1999; KOLETZKO et al., 2001; DA CUNHA, MACEDO DA COSTA e ITO, 2005). No entanto, a síntese dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (butirato, acetato e propionato) é originada a partir da fermentação no cólon das e fibras alimentares (FA). Sendo assim, a presença dos AGCC no leite materno depende do consumo das FA (BARBER et al., 1997). Adicionalmente, a incorporação dos lipídios no leite materno é dependente de adaptações fisiológicas que ocorrem na glândula mamária durante a lactação (HERRERA, 2002b).

Ademais, o consumo materno de peixes, leite, carnes e ovos são importantes para fornecer EPA e DHA no leite materno. Além disso, quando os AGPI-CL são consumidos na dieta são degradados pelas lipases do trato digestório, reesterificados após a absorção nos enterócitos, incorporados nos quilomicrons, transportado para a corrente sanguínea, digerido pela lipase lipoprotéica e transferidos para a glândula mamária para a posterior síntese do leite materno. Por outro lado, os triglicerídeos endógenos hepáticos são transportados na circulação pela lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) para a glândula mamária. A lipase lipoprotéica é a enzima que digere as lipoproteínas transportadoras de triacilglicerol, promovendo o aumento na concentração dos ácidos graxos livres na circulação. Durante a

lactação a atividade da lipase lipoprotéica é reduzida no tecido adiposo e aumentada na glândula mamária para favorecer a síntese do leite materno (KOLETZKO, et al., 2001).

A qualidade e quantidade da dieta materna durante a gestação e a lactação e determinante para o desenvolvimento e crescimento em períodos críticos do desenvolvimento (gestação, lactação e primeira infância) (MCARDLE et al., 2006). Apesar, do consumo de dietas hiperlipídicas durante a gestação ser considerada fator promotor de DCNT na adolescência e na vida adulta, os lipídios, são fundamentais, pois, desempenham papel importante como aporte energético, crescimento e no desenvolvimento do SNC (CABRAL, 2005; FREEMAN et al., 2011).

2.2 Programação fetal

A teoria da programação metabólica ou fetal é definida como alterações no meio ambiente intrauterino (gestação) e/ou em estágios precoces do desenvolvimento fisiológico pós-natal (lactação e primeira infância) podem promover respostas adaptativas na prole que, dependendo do estágio o qual ocorra o insulto, podem desencadear limitações na ontogênese e aumentar a predisposição de doenças crônicas e/ou degenerativas na vida adulta (BARKER e MARTYN, 1993; LUCAS, 1998; GLUCKMAN e HANSON, 2004).

O desenvolvimento e o crescimento do SNC e endócrino de humanos e de roedores de laboratório iniciam durante a vida intrauterina, atingindo a maturidade durante estágios precoces da vida pós-natal (lactação e primeira infância) (SANTOS-MONTEIRO et al., 2002; SYMONDS et al., 200). Em estágios precoces de desenvolvimento os neurônios hipotalâmicos estão mais propensos aos insultos ambientais predispondo os descendentes ao desenvolvimento das DCNT (DAVIDOWA e PLAGEMANN, 2001). Entre as influências ambientais que predispõe a prole ser mais susceptível as DCNT destaca-se os insultos nutricionais (DIETZ, 1994). Dessa forma, a oferta de dietas inadequadas durante o período perinatal torna o ambiente intrauterino desfavorável comprometendo a ontogênese de células, tecidos e sistemas fisiológicos, desencadeando doenças na prole na vida adulta (GLUCKMAN e HANSON, 2004).

Os mecanismos fisiopatológicos pelo qual a programação fetal ou metabólica predispõe a prole a doenças na vida adulta ainda não estão completamente elucidados . No

entanto, existem evidências científicas que insultos vivenciados durante a vida perinatal promovem modificações na expressão de genes ocasionando alterações fisiológicas na função de células e tecidos (LANGLEY-EVANS, 2006; BURDGE et al., 2007). Adicionalmente, as alterações na expressão gênica tornam os descendentes mais predispostos a doenças cardiovasculares como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) e metabólica como o diabetes *mellitus* (DM) (GODFREY e BARKER, 2000).

Sendo assim, influências ambientais, patologias e estímulos estressores durante o período perinatal são eventos determinantes que podem promover disfunção nos sistemas fisiológicos da prole (FOWDEN GIUSSANI e FORHEAD 2006). É bem documentado na literatura que o padrão dieta materna durante a gestação e a lactação é um fator que pode comprometer a saúde da progênie na adolescência e vida adulta (BARKER e MARTYN, 1993; LUCAS, 1998; FOWDEN et al., 2006; BURDGE et al., 2007). Os primeiros trabalhos que mostraram associação entre o ambiente intrauterino e o desenvolvimento de DCNT na prole foi realizado Widdowson e McCance (1963), foi mostrado que a desnutrição intrauterina reduziu o ganho ponderal na vida pós-natal mesmo com acesso livre a ração. Ademais, quando o protocolo de desnutrição foi realizado no pós desmame os animais tiveram uma recuperação mais rápida o peso.

Além disso, Barker et al., (1993) mostrou em um estudo epidemiológico a existência de uma relação diretamente proporcional entre o baixo peso ao nascer e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta. Ademais, modelos experimentais de desnutrição intrauterina induzido com a oferta de dietas hipoprotéicas promove disfunção em sistemas fisiológicos, modificações estruturais em células e tecidos, alterações no comportamento alimentar e repercussões metabólicas deletérias dos descendentes na vida pós-natal (BARRETO-MEDEIROS et al., 2007; OZANNE et al., 2004; LANGLEY-EVANS.,2006; TOSCANO et al., 2008).

Ademais, a restrição no crescimento intrauterino é uma resultante promovida principalmente pela desnutrição protéica durante a vida intrauterina em humanos e roedores de laboratório que tem sido associado com o desenvolvimento de HAS na vida adulta (LANGLEY-EVANS, 2006; GODFREY e BARKER, 2001, BARKER, 2006). Apesar, da desnutrição acometer uma grande parcela da população no globo, a transição nutricional ocorrida em meados da década de 80 aumentou o número de indivíduos obesos no mundo,

sendo esta morbidade um dos principais fatores que aumentam a incidência das DCNT. Além disso, a obesidade atinge 45,9% da população mundial podendo aumentar mais dois terços em 2020 (CHOPRA, GALBRAITH e DARNTONHILL 2002).

Com as modificações no perfil nutricional e epidemiológico da população mundial é fundamental realizar protocolos experimentais que mimetizam o consumo das dietas ocidentais que é caracterizada pelo alto consumo de gordura saturada, cloreto de sódio e carboidrato simples (CESARETTI e JUNIOR, 2006; DIEZ, 2003). Adicionalmente, a literatura vem mostrando que modelos animais alimentados com dietas hiperlipídicas desenvolvem HAS (KHAN et al., 2003), aterosclerose (PALINSKI et al., 2001), lesão endotelial (KHAN et al., 2005) e alterações no mecanismo de transdução de sinal da insulina (TAYLOR et al., 2005).

2.3 Endotélio vascular

A literatura tem demonstrado que a camada endotelial além de desencadear hematose e captação de nutrientes através da corrente sanguínea para as demais camadas vasculares, exibem também funções parácrinas importantes e cruciais na modulação do tônus muscular, manutenção da permeabilidade vascular, regulação imunológica, e o controle na composição sanguínea (AIRD, 2004).

Dessa forma, para promover estas ações fisiológicas é necessário as células endoteliais produzir e secretar substratos bioativos com mecanismos parácrinos. Inicialmente, Moncada et al., (1977) demonstraram que a camada endotelial é capaz de sintetizar moléculas vasoativas. Adicionalmente, foi identificado a prostaciclina (PGI₂), um substrato que possui características vasodilatadoras e na redução da agregação plaquetária gerado pelas células vasculares da camada íntima. Ademais, este trabalho mostrou a participação das células endoteliais na modulação da contração e/ou relaxamento da musculatura vascular lisa e na ausência de complicações vasculares quando o endotélio encontrava-se íntegro.

As ações fisiológicas promovidas pela molécula de NO foram descritas inicialmente no trabalho de Furchgott e Zawadzki, em 1980. Eles identificaram que a vasodilatação promovida pela molécula de acetilcolina em aortas de coelhos era dependente do endotélio funcional, sendo identificado que o mecanismo de ação que promovia o relaxamento era

dependente da interação da acetilcolina com receptores muscarínicos localizado na superfície das células endoteliais. Os achados do estudo supracitado, foi o marco inicial que estimulou os pesquisadores a realizarem estudos para identificar a molécula de NO sendo denominado neste estudo como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Adicionalmente, estudos posteriores iniciaram a descrição do mecanismo de ação de como o EDRF promovia vasodilatação e identificaram que este substrato era capaz de ativar uma enzima presente nas células vasculares do músculo liso denominada guanilato ciclase solúvel (GCS) que por sua vez promovia reações de desfosforilação na molécula guanosina trifosfato (GTP) convertendo-a em monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) em uma variedade de grupamentos celulares. No entanto, nestes estudos a molécula de NO não foi descrito como um mediador sintetizado pelo organismo (ARNOLD et al., 1977; IGNARRO et al 1987; PALMER, FERRIGE e MONCADA 1987; MONCADA, PALMERS E HIGGS 1988).

Destarte, além das ações vasodilatadoras e anti-trombogênicas estimuladas pelo NO, este substrato é responsável por controlar uma variedade de funções nas células vasculares como: minimizar a hipertrofia e a hiperplasia das células do músculo liso vascular desencadeado pela endotelina-1 e angiotensina-2 (BOUALLEGUE, DAOU E SRIVASTAVA 2007). Além disso, a literatura tem demonstrado que uma redução na biodisponibilidade de NO está associado com uma variedade de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como a obesidade e doenças pulmonares (STAPLETON et al., 2008; AIRES et al., 2013).

Ademais, o endotélio sintetiza outro substrato de caráter vasodilatador de natureza desconhecida denominado fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Estudos sugerem que o EDHF é um composto humoral produzido pela camada endotelial, podendo ser o potássio (K^+) (GARLAND, HILEY, e DORA, 2010), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SHIMOKAWA, 2010), a anadamida (WHITE e HILEY 1977) ou intermediários do ácido araquidônico oriundos do citocromo P-450 (FISSLTHALER, FLEMING e BUSSE, 2000), que promove uma resposta vasodilatadora através do processo de hiperpolarização (DE WIT e WOLFLE, 2007). No entanto, a literatura ainda especula outros mecanismos para explicar o relaxamento promovido pelo EDHF, uma das teorias sugeridas, é através da propagação do potencial de ação elétrico das células endoteliais para as musculares através das junções comunicantes do tipo GAP localizada entre estas células (GRIFFITH, CHAYTOR e EDWARDS 2004; DE WIT e WOLFLE, 2007). Apesar de várias teorias tentarem elucidar a natureza do mecanismo pelo qual o EDHF promove vasodilatação, é um evento fisiológico

importante que controla o tônus muscular em uma variedade de leitos vasculares (DE WIT e WOLFLE, 2007).

Adicionalmente, os metabólitos do ácido araquidônico sintetizado pelas células endoteliais (prostanoides e eicosanoides) derivados da via das ciclooxygenases possuem propriedades vasoativas (FELETOU, HUANG E VANHOUTTE, 2011). Outro substrato sintetizado pelo endotélio que possui característica vasoconstrictora é um peptídeo de 21 aminoácidos denominado endotelina-1 (LEVIN, 1995; BOUALLEGUE, DAOU E SRIVASTAVA 2007). Além disso, o endotélio sintetiza todos os componentes do sistema renina - angiotensina (SRA) incluindo a enzima conversora de angiotensina e os receptores da angiotensina II. Os produtos do SRA participa ativamente da resposta contrátil vascular (ZHOU et al., 2006).

2.4 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa simples. No ar atmosférico está presente em pequenas quantidades, com elevada toxicidade devido à presença de um elétron desemparelhado tornando-o altamente reativo. Quando o NO está em solução aquosa apresenta uma meia vida de 10 segundos devido à rápida oxidação a nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-). Além disso, a molécula de NO é sintetizada a partir da L-arginina um aminoácido condicionalmente essencial produzido no organismo em quantidades insuficientes para suprir todos os processos fisiológicos (SNYDER e BREDT, 1992).

A descoberta dos óxidos de nitrogênio ocorreu em meados da década de 80 em experimentos realizados em camundongos germ-free que demonstraram a produção de nitratos (GREEN, TANNENBAUM e GOLDMANN, 1981). Além disso, em um estudo realizado por Stuehr e Marletta (1985), foi demonstrado que os produtos da oxidação da molécula de NO (nitrito e nitrato) são sintetizados por macrófagos ativados por lipopolissacarídeos bacterianos.

Esse radical livre sintetizado pelas células da camada endotelial é essencial para promover proteção e preservar a integridade dos vasos sanguíneos dentre estas funções podem – se citar: inibição da agregação plaquetária, adesão de monócitos e leucócitos, proliferação

do músculo liso vascular, além de ações antioxidantes e vasodilatadoras (GEWALTIG e KOJDA, 2002, TRIGGLE et al., 2003). Adicionalmente, a integridade da função endotelial está associada à biodisponibilidade do óxido nítrico e a uma razão entre a síntese e a degradação desse substrato vasoprotetor. Um desbalanço nesta razão é o fator etiológico promotor da disfunção endotelial (DEANFIELD, HALCOX e RABELINK, 2007).

2.5 Síntese do óxido nítrico endotelial

Está bem documentado na literatura, que o óxido nítrico (NO) pode ser produzido por uma variedade de células através da ação enzimática das óxido nítrico sintases (NOS) em associação com moléculas das quais podemos citar: tetrahidrobiopterina (BH₄), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e mononucleotídeo de flavina (FMN). Além disso, três isoformas da enzima foram reconhecidas como promotoras da síntese deste radical livre. De acordo com os tecidos a qual estas enzimas foram identificadas, foram nomeadas como isoforma I ou neuronal (nNOS), isoforma II ou induzida por citocinas (iNOS) e isoforma III ou endotelial (eNOS) (FORSTERMANN et al., 1994).

A síntese do óxido nítrico endotelial é promovida principalmente pela eNOS que se encontra na forma inativa quanto está associada a proteína calveolina – 1 (NASCIMENTO et al., 2003). Agentes químicos (acetilcolina, bradicinina, serotonina, histamina, substância P, adenosina trifosfato e a adenosina difosfato) promovem um aumento na concentração intracelular de cálcio promovendo a associação do complexo cálcio-calmodulina (Ca²⁺ - CAM) que permiti a ativação da eNOS. Além disso, estímulo mecânico (shear stress ou tensão de cisalhamento) também é capaz de ativar a enzima em uma via independente de cálcio intracelular, através da atividade da proteína quinase B (Akt) e quinase A (PKA) que fosforilam a serina 1177 e a 635 da eNOS potencializando a sensibilidade do cálcio presente no citoplasma (BOO et al., 2002; HAMBRECHT et al., 2003; GREEN et al., 1996).

A eNOS ativa é responsável por catalisar reações de hidroxilação dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para sintetizar o produto N^G-hidroxil-L-arginina (NHA) e consequentemente a modificação do NHA em L-citrulina e NO, o substrato mais importante produzido pelas células endoteliais (DUSSE, VIEIRA e CARVALHO 2003).

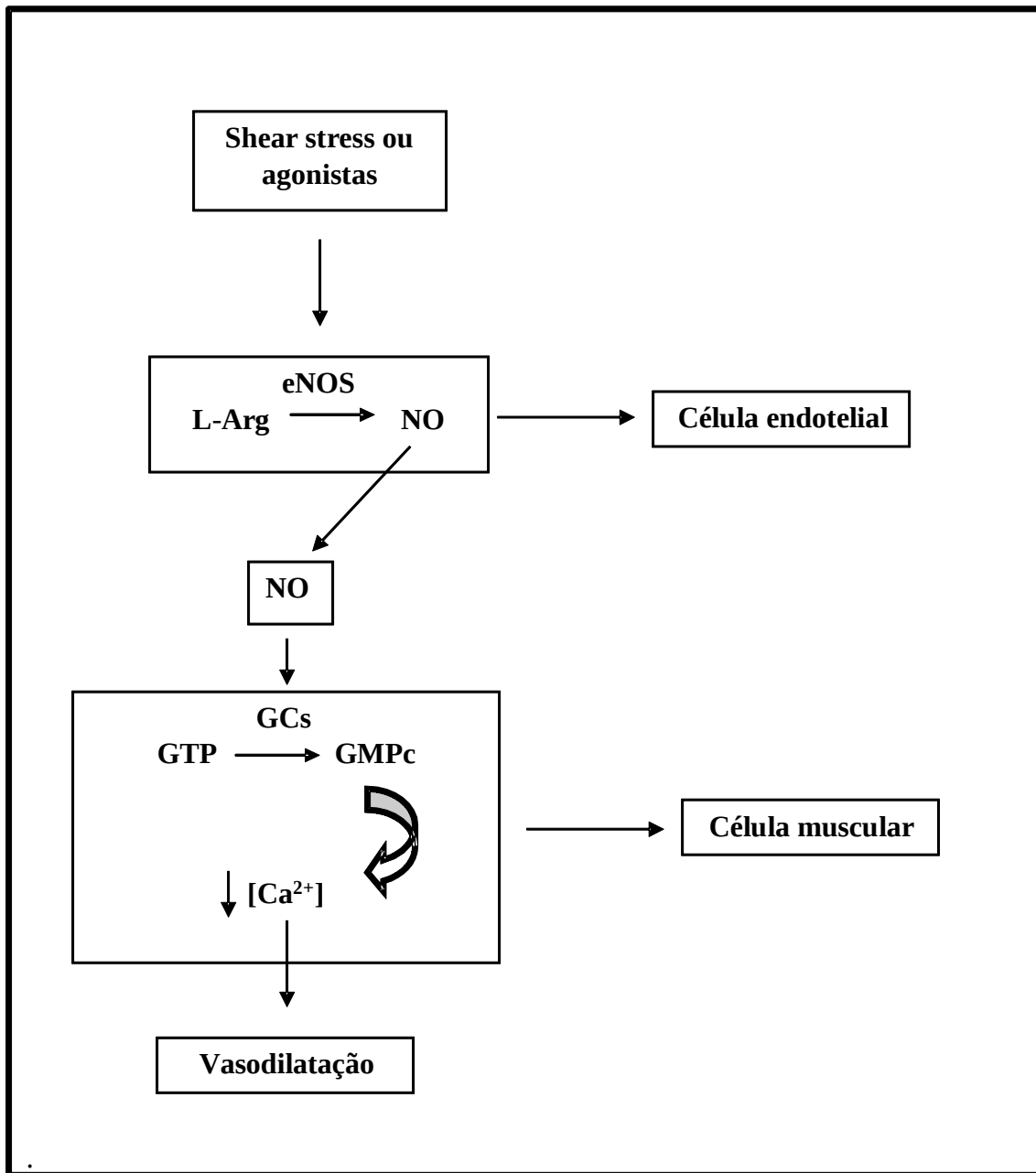


Figura 1. Mecanismo de ação para a síntese do óxido nítrico nas células endoteliais estimulado pelo shear stress e agonistas farmacológicos estimulando o vasorrelaxamento nas células vasculares do músculo liso. Com a interação do agonista com o respectivo receptor, ocorre a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel que promove a redução no influxo de cálcio desencadeando o vasorrelaxamento das células vasculares do músculo liso.

2.6 Contração e relaxamento do músculo liso vascular

A contração e/ou relaxamento das células do músculo liso vascular é dependente de oscilações na concentração intracelular de cálcio como também de reações de fosforilação de

proteínas que ativam a maquinaria contrátil. Os leitos vasculares em condições fisiológicas encontram-se parcialmente contraído (tônus vasomotor) sendo esta propriedade fundamental para a manutenção dos sinais regulatórios, como neural, endotelial, humoral e miogênico (AKATA, 2007).

Teoricamente, a contração das células do músculo liso vascular pode ocorrer por dois mecanismos distintos, ou através da condução elétrica ou uso de agonistas contratéis sendo que ambos promovem o acoplamento dos filamentos da actina com a miosina. O primeiro mecanismo ocorre devido estímulos que geram o potencial de ação nestas células aumentando o influxo de cálcio através dos canais do tipo L, voltagem dependente. Esse mecanismo estimula a liberação de cálcio armazenada no retículo sarcoplasmático promovendo o mecanismo de contração (AKATA, 2007).

Já, agonistas contratéis interagem com seus respectivos receptores na superfície das células musculares promovendo o influxo de cálcio e posteriormente a liberação desse íon que está retido no retículo sarcoplasmático desencadeando o processo contrátil (OGUT e BROZOVICH, 2003). Dentre estes agonistas podemos citar os adrenérgicos que interage com receptores metabotrópicos (acoplados a proteína Gq) e os colinérgicos que interagem com receptores muscarínicos (M1, M3 e M5) ambos aumentam o influxo de cálcio nas células vasculares lisas (SILVA, 2012). Dessa forma, as interações dos agonistas supracitados com seus respectivos receptores ativam uma enzima denominada fosfolipase C (PLC) que promove reações de hidrólise com um fosfolípido da membrana plasmática intitulado fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) gerando dos segundos mensageiros que são fundamentais para o processo de contração das células vasculares lisas. Os segundos mensageiros formados a partir do PIP2 são o trifosfato de inositol (IP3) e o diacilglicerol (DAG). Posteriormente o IP3 se associa aos seus receptores (IP3R) situados na membrana plasmática das células do retículo sarcoplasmático que estimulam a bomba de cálcio promovendo assim a liberação deste íon para o citoplasma. Além disso, o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) uma enzima que promove reações de fosforilação em canais de cálcio situados na membrana plasmática (AKATA, 2007). Adicionalmente, outro mecanismo contrátil promovido pela PKC é a inibição da miosina fosfatase (MP). A MP é uma enzima que atenua a resposta contrátil, pois, promove reações de desfosforilação na cadeia leve de miosina (MLC) atenuando a interação dos filamentos de actina e miosina reduzindo assim a resposta contrátil (OGUT e BROZOVICH, 2003; AKATA, 2007). Dessa forma, com a

inibição da MP pela PKC aumenta-se a resposta contrátil das células do músculo liso vascular.

Adicionalmente, o aumento na concentração intracelular de cálcio oriundo dos estoques intracelulares e/ou do meio extracelular promovem a associação de 4 íons de cálcio a uma proteína denominada de calmodulina (CaM) gerando um complexo 4Ca^{2+} -CaM, que ativa uma enzima denominada cinase da cadeia leve de miosina (MLCK), devido a sua alta afinidade por este substrato. Posteriormente, a MLCK promove reações de fosforilação na MLC em um local específico desencadeando o processo de clivagem da molécula de ATP e consequentemente a liberação de energia para o desencadeamento do mecanismo contrátil (AKATA, 2007).

Da mesma forma, a mobilização do cálcio citoplasmático para o interior do retículo sarcoplasmático e/ou o efluxo do cálcio desencadeia alterações importantes para o relaxamento muscular. O desligamento dos íons de cálcio da calmodulina é o principal mecanismo que cessa o processo da contração muscular. Os eventos fisiológicos que culminam na redução do cálcio intracelular são: o efluxo de cálcio pela bomba Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática (PMCA), pelo trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), pela bomba Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) e pelas proteínas ligantes de Ca^{2+} citosólicas. A literatura demonstra que os eventos mais importantes para a redução do cálcio intracelular são a atividade da SERCA e a PMCA (AKATA, 2007).

No entanto, existem outras vias promotoras da vasodilatação que independem do cálcio. Um dos mecanismos está associado a ativação de canais para potássio (K^+) que aumenta o efluxo do K^+ ocasionando um processo denominado de hiperpolarização resultando consequentemente em atenuação do influxo de cálcio através dos canais sensíveis a voltagem. Além disso, o aumento dos segundos mensageiros, como o AMPc e GMPc promovem vasodilatação através da redução do cálcio intracelular. Outro mecanismo proposto é a ativação da miosina fosfatase que promove reações de desfosforilação reduzido o complexo 4Ca^{2+} -CaM e consequentemente atenuando a resposta contrátil (KARAKI et al., 1997; SOBEY, 2001; AKATA, 2007).

A literatura demonstra que a síntese dos nucleotídeos cíclicos promove uma resposta vasodilatadora. Ademais, a elevação intracelular destes segundos mensageiros é desencadeada

através da interação com receptores acoplados a proteína Gs na superfície da membrana plasmática das células musculares lisas que promovem uma cascata intracelular sendo iniciada pela ativação de uma enzima que está associada à membrana plasmática denominada adenilato ciclase que catalisa formação de cAMP (adenosina monofosfato cíclico) a partir de ATP (adenosina trifosfato). No entanto, outra enzima envolvida na resposta vasodilatadora é a guanilato ciclase solúvel que catalisa a reação que produz cGMP (guanosina monofosfato cíclico) a partir do GTP. Esses substratos intracelulares promovem uma diminuição na concentração intracelular de cálcio através da atividade da PKA e PKG e pelo aumento na atividade da SERCA, da PMCA e do NCX. Outro mecanismo envolvido é a ativação dos canais para potássio por esses segundos mensageiros reduzindo a atividade da maquinaria contrátil (AKATA, 2007; GAO, 2009).

Destarte, os mecanismos elétricos e farmacológicos que modulam o tônus vascular são essenciais para garantir a homeostase e funcionalidade dos tecidos. Em situações fisiopatológicas como na hipertensão arterial sistêmica (HAS) um dos fatores desencadeantes a um comprometimento no processo de contração e/ou relaxamento. Um estudo realizado por Li et al.; (2007) demonstrou que humanos hipertensos e modelos experimentais de hipertensão são mais responsivos a agonistas que promovem a resposta contrátil. Adicionalmente, Cho et al., (2011) mostrou que o músculo liso de artérias de resistência apresentam uma maior resposta contrátil devido a um maior grau de fosforilação de proteínas que ativam a maquinaria contrátil, sendo este um dos mecanismos intracelulares associados a fisiopatologia da hipertensão. Além disso, Callera e colaboradores (2004) demonstraram que em modelos de hipertensão renovascular, um dos fatores etiológicos é um comprometimento no mecanismo de hiperpolarização. Além disso, nesse modelo experimental foi demonstrado um menor responsividade a acetilcolina devido a uma menor ativação dos canais de cálcio sensíveis ao potássio (BKCa).

Adicionalmente, está bem documentada na literatura que em indivíduos portadores das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como na hipertensão, na obesidade e no diabetes *mellitus* (DM) ocorre uma redução no vasorrelaxamento dependente das óxido nítrico sintases (NOS), óxido nítrico (NO) e guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Nessas condições fisiopatológicas existe uma redução na biodisponibilidade da molécula de NO e conseqüentemente uma redução na resposta vasodilatadora (NISHIMATSU et al., 2005; KAGOTA et al., 2006; SIVITZ et al., 2007; MENDIZABAL LLORENS e NAVA 2011).

2.7 Estresse oxidativo e redução na biodisponibilidade do óxido nítrico

A literatura demonstra que existe uma razão fisiológica entre a produção espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e a defesa antioxidante endógena. Porém, em condições fisiopatológicas o sistema antioxidante não é eficiente para promover o equilíbrio fisiológico entre a produção das EROs e os mecanismos que protegem a oxidação das estruturas orgânicas desencadeando assim um fenômeno denominado como estresse oxidativo (HALLIWELL, 2001; SALVADOR e HENRIQUES 2004; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Além disso, a elevação dos níveis teciduais de espécies reativas de oxigênio pode desencadear a oxidação de biomoléculas promovendo injúria celular gerando consequências como: ajuste celular por up-regulation, lesão celular ou morte celular por apoptose ou necrose (BEHL e MOOSMANN, 2002; HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

Adicionalmente, EROs é um termo genérico que, não está associado somente com os radicais formados a partir da redução do oxigênio tais como, ânion superóxido (O_2^-) e o O_2 , radical hidroxil ($OH^\cdot$), mas, também algumas moléculas não derivadas do oxigênio como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e o ozônio (O_3) (Halliwell e Gutteridge, 1999). Ademais, existem ainda neste contexto as espécies reativas de nitrogênio (ERN) sendo o óxido nítrico (NO), e o peroxinitrito ($ONOO^\cdot$).os principais representantes. Em mamíferos as EROs são sintetizados principalmente na cadeia transportadora de elétrons, pela enzima xantina oxidase e o complexo enzimático pró-oxidante nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NAD(P)H oxidase a qual é a que mais contribui com a produção dessas moléculas tóxicas nas células vasculares (KOJDA e HARRISON, 1999).

Um dos principais mecanismos envolvidos na redução da biodisponibilidade do NO é através da reação com as espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são produzidas normalmente pelas células durante o metabolismo das macromoléculas que derivam da redução incompleta do átomo de oxigênio e promovem toxicidade pela capacidade de oxidar biomoléculas alterando a estrutura e conseqüentemente a função biológica (MACCORD, 2000). No entanto, a produção basal das EROs é essencial para a manutenção de funções celulares importantes principalmente nas células endoteliais, células imunológicas, sinalização celular (apoptose), coagulação e cicatrização (POLYTARCHOU e PAPADIMITRIOU, 2005). Nesta situação, o ânion superóxido ou outras espécies reativas de

oxigênio pode reagir com a molécula de NO no interior das células endoteliais reduzindo a biodisponibilidade e convertendo-o a ONOO⁻ ma espécie reativa nitrogenada extremamente nociva para o endotélio (NASCIMENTO et al., 2003). Adicionalmente, o ONOO⁻ promove reações de oxidação, nitração, S-nitrosilação de proteínas, lipídios e DNA. Essas reações podem alterar a estrutura de biomoléculas inativando-as e ativando vias de degradação ocasionando a morte celular (PACHER, BECKMAN e LIAUDET 2007)

2.8 Glicemia X Estresse oxidativo

Está bem estabelecida na literatura a participação do estresse oxidativo em promover injúrias celulares aos tecidos em uma variedade de patologias humanas (HALLIWELL, 2001). Além disso, o estresse oxidativo tem um papel importante na fisiopatologia do diabetes mellitus (DM) e suas consequências (DONNE et al., 2006). Existem evidências em humanos e modelos experimentais de DM que mostram que a hiperglicemia torna os indivíduos mais predispostos à síntese das EROs (BAYNES, 1991; CHANG et al., 1993; BAYNES e THORPE, 1999;) e/ou um comprometimento no sistema antioxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1990).

Uma variedade de hipóteses justificam o aumento na produção das EROs no DM, tais como a oxidação da glicose, a glicação não enzimática de proteínas, a ativação da proteína quinase C, a redução na concentração dos antioxidantes no tecido e o comprometimento na atividade das enzimas antioxidantes teciduais (BAYNES e THORPE, 1999; BROWNLEE, 2001).

O aumento na concentração plasmática de glicose é a principal manifestação clínica do DM sendo está a principal promotora do estresse oxidativo através da geração direta das EROs ou promovendo um desequilíbrio no sistema redox (RAINS e JAINS, 2011). Ademais, a literatura tem sugerido os mecanismos pelo qual a hiperglicemia causa o estresse oxidativo no tecido vascular são: fluxo aumentado de açúcares através da via do poliol, elevação na síntese intracelular dos produtos da glicação avançada (AGEs), aumento na expressão dos receptores dos AGEs, ativação de isoformas da proteína quinase C (PKC) e aumento da atividade da via da hexosamina. A literatura demonstra que os mecanismos supracitados podem ser ativados pelo ânion superóxido (GIACCO e BROWNLEE, 2010). Este radical

livre pode ser sintetizado nas mitocôndrias ou no citoplasma via NADPH oxidase (SERPILLON et al., 2009).

A hiperglicemia induz alterações no metabolismo da NADPH, associadas principalmente com a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) enzima crucial na via das pentoses fosfato (PPP). No metabolismo oxidativo a via das PPP sintetiza NADPH, o substrato determinante para a atividade das enzimas glutathione redutase e NADPH oxidases (MARTINS et al., 1986). Estudos demonstraram que em modelos experimentais de hiperglicemia crônica, promove o aumento do ânion superóxido no miocárdio via NADPH oxidase (GUPTE et al., 2005; GUPTE et al., 2006; SERPILLON et al., 2009).

No sistema nervoso central (SNC) a hiperglicemia promove danos neuronais. No entanto, não estão completamente elucidados estas alterações promovidas pelo estresse oxidativo (BIESSELS et al., 2002). É bem documentado na literatura que o aumento na concentração plasmática de glicose é um dos principais promotores na geração das EROs e consequente peroxidação lipídica a nível central nas células de Schwann pela alta quantidade de lipídios poliinsaturados presentes na membrana plasmática (ARAGNO et al., 2000; KUMAR e MENON, 1993). No entanto, as consequências danosas promovidas pela hiperglicemia evidenciada na maioria dos estudos está fortemente associado com a vida adulta. Porém, a literatura, é carente de dados que mostrem a associação da elevação da concentração plasmática de glicose durante a vida perinatal e os danos promovidos pelo estresse oxidativo nos descendentes.

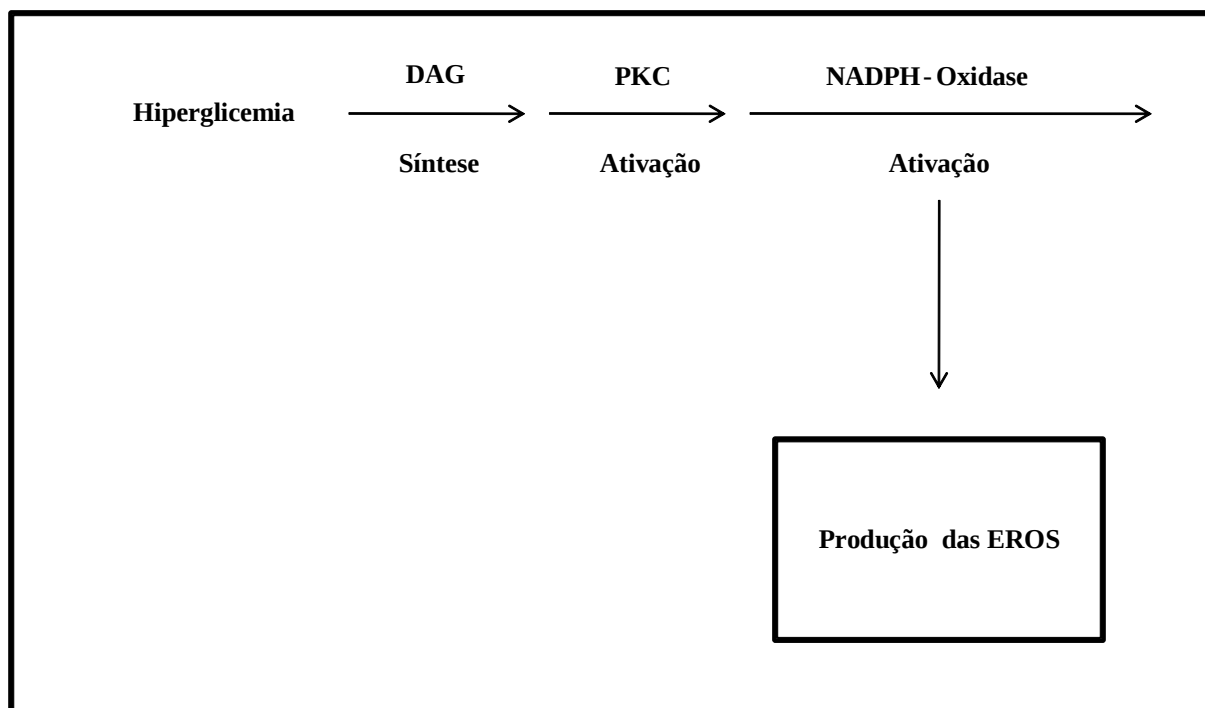


Figura 2. Geração das espécies reativas de oxigênio (EROs) via NAPH – oxidase estimulada pelas concentrações elevadas de glicose. Esta enzima está presente no citoplasma das células vasculares lisas promovendo um aumento da síntese do ânion superóxido.

2.9 Alterações endócrinas e disfunção endotelial

As alterações endócrinas têm uma associação muito íntima com sobrepeso e obesidade. Esse desequilíbrio do estado nutricional está associado com balanço energético positivo e sedentarismo. Uma variedade de morbidades está associada com o excesso de peso como a hipertensão arterial sistêmica, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) que é caracterizado pela resistência na ação da insulina e dislipidemia. Adicionalmente, essas são as patologias que mais promovem disfunção endotelial (STAPLETON et al., 2008).

A obesidade é uma pandemia mundial que compromete a qualidade de vida e sobrecarrega a economia de uma população. Dados epidemiológicos demonstram que existe aproximadamente 1,5 bilhão de adultos obesos no mundo sendo 10% desta população obesa (WHO, 2015). Os últimos dados do IBGE mostram que o percentual de homens com sobrepeso acima de 20 anos é maior que 50% e representa mais que o dobro quando comparado com 20 anos atrás (29,9%). No público feminino o aumento foi menos significativo aumentando aproximadamente 7% nos últimos 20 anos (IBGE, 2008-2009). A obesidade e as morbidades associadas refletem o cenário político – econômico sobrecarregando os sistemas públicos e privados de saúde devido à adoção de cuidados

preventivos, consultas multiprofissionais, fármacos, internações, exames e cirurgias e indiretamente aumentando a taxa de absenteísmo e tempo de lazer perdido (MELO, 2011).

Atualmente, o tecido adiposo branco é o órgão que mais secretam substâncias no organismo humano, aproximadamente 100 proteínas distintas sendo classificado como um órgão endócrino ativo. As proteínas sintetizadas por este tecido são intituladas de adipocinas que possuem propriedades capazes de modular o tônus vascular influenciando diretamente a função de outros tecidos e/ou órgãos (GAO et al., 2007; LEUNG E KWAN, 2008).

Uma das adipocinas envolvidas no controle da pressão arterial é a leptina. Este hormônio tem ação bifásica no controle da pressão arterial devido promover hiperatividade simpática e ativar mecanismos envolvidos no relaxamento vascular periférico, em vias de sinalização dependente e independente do endotélio (BELTOWSKI, 2006). Além disso, Chen et al. (2003) mostraram o papel da adiponectina, uma adipocina com característica antiinflamatória a qual sua síntese é indiretamente proporcional ao tamanho do tecido adiposo branco é capaz de estimular a liberação de NO pelo endotélio e promover vasodilatação. Destarte, foi demonstrado que a adiponectina é um agente humoral importante na vasodilatação de artérias de condutância como a aorta e de resistência como a leito mesentérico de ratos devido a ativação de canais retificadores de potássio (Kv) nas células musculares lisas (FESUS et al., 2007). Além disso, o processo inflamatório estimula a síntese e secreção de citocinas (TNF- α , IL-10 e IL-1 β) que interfere no tônus vascular (STAPLETON et al., 2008).

O aumento do tecido adiposo visceral está associado com a fisiopatologia da síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e resistência à insulina (ZRAIKA et al., 2002; JONK et al., 2007). A resistência à insulina e as alterações vasculares são morbidades que estão associados a modelos experimentais da obesidade, ocasionada por uma redução na atividade e na sensibilidade na via de sinalização PI3K/AKT. Posteriormente, essa redução na sensibilidade promove uma atenuação na síntese e na biodisponibilidade de óxido nítrico reduzindo consequentemente a resposta vasodilatadora (ZECCHIN et al., 2007). Além disso, é importante destacar que a obesidade é caracterizada como uma doença inflamatória crônica que compromete a via de sinalização da insulina através da secreção de citocinas na corrente sanguínea ocasionando dessa forma as alterações vasculares (MUNIYAPPA et al., 2007; APOVIAN et al. 2008). Adicionalmente, os mecanismos envolvidos nas alterações vasculares em indivíduos obesos na ausência da resistência à insulina ainda não estão completamente

elucidados. Desta forma, tornam-se necessárias outras investigações para compreender os mecanismos envolvidos na disfunção vascular de indivíduos obesos sem resistência à insulina.

Adicionalmente, a literatura vem documentando a modulação do tecido adiposo perivascular (PVAT) em associação com as células endoteliais no controle no tônus vascular. O PVAT é capaz de secretar fatores que promovem uma atenuação na resposta contrátil estimulada pela fenilefrina, angiotensina II e serotonina em aorta de ratos. Esses fatores anticonstritores secretados pelo PVAT são capazes de reduzir a força de contração devido possuírem propriedades de ativar os canais para potássio dependente de tirosina cinase (LOHN et al., 2002). Além disso, a modulação do PVAT no tônus vascular é estimulada por vias que dependem e/ou não dependem do endotélio através da participação efetiva do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e da enzima guanilato ciclase solúvel (GAO et al., 2007).

Uma das consequências da obesidade é a infiltração de lipídios em células não adiposas (hepatócitos e células pancreáticas), promovendo alterações na expressão de receptores de membrana ou fatores de transcrição gênica, ocasionando um desbalanço na função celular ou até mesmo morte celular (RASOULI et al., 2007; SHARMA et al., 2008). Destarte, foi demonstrado que a retenção de lipídios em cardiomiócitos é determinante para reduzir a sensibilidade à insulina ocasionando disfunções metabólicas como uma redução na captação da glicose e consequentemente uma progressão para falência cardíaca (SHARMA et al., 2008). Além disso, estes achados têm uma forte associação com o aumento no espessamento entre a camada íntima e média, redução na elasticidade vascular e processos inflamatórios que são morbidades que promovem as doenças cardiovasculares (GUSTAFSON 2010).

Adicionalmente, a secreção de citocinas inflamatórias pelo tecido adiposo branco desencadeia um quadro pró-inflamatório de baixa intensidade (RASOULI et al., 2007; STAPLETON et al., 2008). Nessas condições os adipócitos reduzem a sensibilidade à ação da insulina e consequentemente aumenta a atividade de enzimas lipolíticas, elevando a concentração plasmática de ácidos graxos livres acarretando resistência à insulina nas células musculares e consequentemente DM (RASOULI et al., 2007). As citocinas secretadas pelo tecido adiposo (TNF – α e IL – 6) são capazes de ativar vias de sinalização intracelular, que resultam na fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) em serina com efeito

deletério no mecanismo de transdução de sinal da insulina (DANDONA, ALJADA e BANDYOPADHYAY, 2004).

No entanto, os mecanismos envolvidos na disfunção vascular associado à obesidade não estão completamente elucidados devido a variações quanto à resposta ao leito vascular estudado e ao modelo animal utilizado (STAPLETON et al., 2008; HAJER, VAN HAEFTEN, e VISSEREN, 2008). Além disso, algumas morbididades associadas à obesidade como hipertensão arterial sistêmica é comum a ocorrência de lesão endotelial com consequente redução na biodisponibilidade do óxido nítrico. No entanto, esta alteração na função endotelial pode ser atenuada pela elevação na síntese do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (TADDEI et al., 2001). Um estudo demonstrou que o consumo de uma dieta hiperlipídica resultou em uma elevação na expressão de canais para potássio sensíveis ao cálcio de condutância intermediária (IKCa) na veia safena, este evento foi capaz de preservar o tônus vascular nesse leito (CHADHA et al., 2010). No entanto, um estudo realizado por Roberts e colaboradores (2005) demonstraram que a introdução de uma dieta ocidental na vida pós-natal em ratos promoveu uma redução na expressão da enzima eNOS comprometendo a resposta relaxante na aorta induzida pela acetilcolina predispondo os animais à hipertensão arterial devido a uma redução na biodisponibilidade do óxido nítrico e uma predisposição a aterosclerose devido o protocolo promover injúria endotelial.

Os estudos demonstram que os fatores associados à disfunção endotelial dependem da síntese das adipocinas e a idade de início do desenvolvimento da obesidade sendo o fator determinante para causar resultados heterogêneos na literatura. A hiperleptinemia em estágios iniciais do desenvolvimento fisiológico pode promover a dilatação arterial, aumentando a biodisponibilidade do NO modulando de forma adequada o tônus vascular. Esses dados demonstram que em estágios precoces do desenvolvimento e/ou crescimento, é capaz de promover ajustes no organismo ocasionado uma maior massa corpórea e consequente elevação da oferta de sangue para esse novo tecido (SINGHAL et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2007).

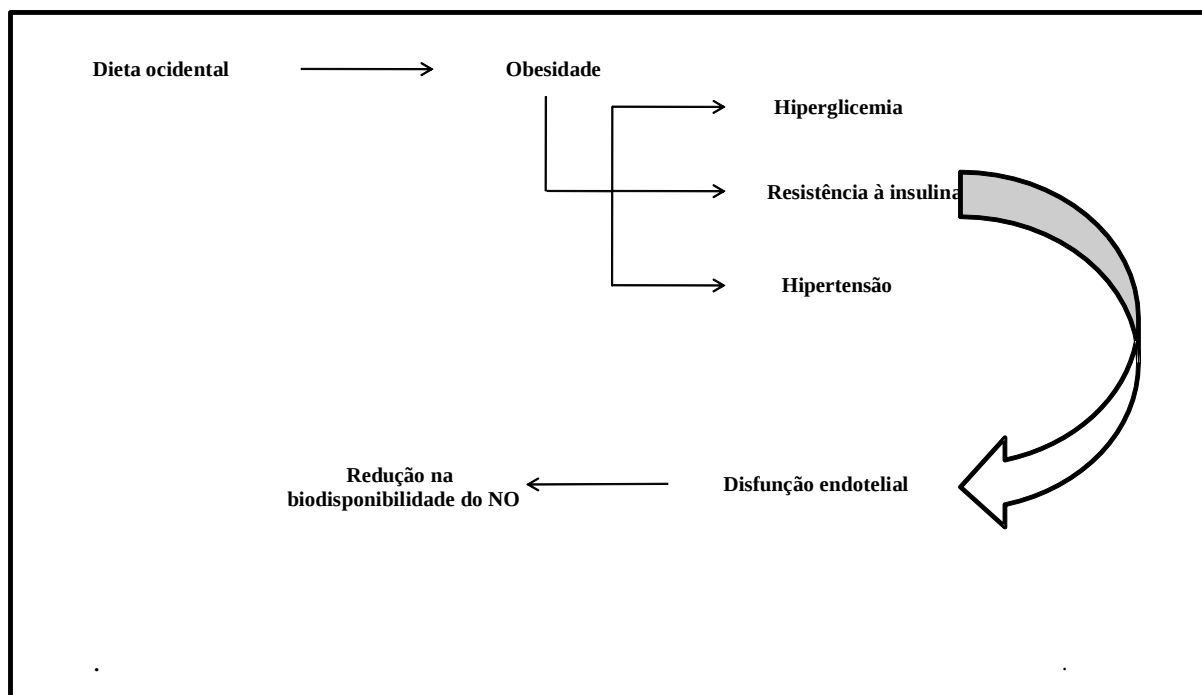


Figura 3. Esquema ilustrativo que mostra o insulto durante a gestação e a lactação e a associação com as doenças crônicas na vida adulta. O consumo materno de uma dieta ocidental e as repercussões na prole na vida pós natal.

2.10 Mecanismos de defesa antioxidante

Os mecanismos de defesa que previnem o estresse oxidativo são classificados como antioxidantes não enzimáticos como exemplos podem ser citados: o ácido ascórbico, o alfa-tocoferol e uma variedade de fitoquímicos presentes nos alimentos. E os antioxidantes enzimáticos sendo estes nutrientes essenciais para ativar enzimas que são responsáveis por neutralizar as EROs. As enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD) sendo está dependente de cobre, zinco e manganês, a catalase (CAT) que possui no centro da cadeia um íon de ferro (Fe^{3+}) e a glutathione peroxidase (GSHPx) que é dependente de selênio. A concentração dessas enzimas antioxidantes é bem variada dependendo do tecido e/ou tipo de célula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

O substrato para síntese das EROs é o oxigênio inspirado podendo estes substratos oxidantes serem produzidos principalmente nas mitocôndrias durante a geração de energia na cadeia transportadora de elétrons como também em menores quantidades no citoplasma principalmente pela ação da enzima NADP(H) oxidase. A oxidação mitocondrial incompleta do oxigênio gera o ânion superóxido sendo que este passa por uma reação de dismutação catalisada pela SOD convertendo-a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (FRIDOVICH, 1975; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Em organismos eucarióticos

existem duas isoformas da SOD. Uma está presente no citoplasma das células sendo que a atividade desta enzima depende de níveis adequados de cobre e zinco. Para que a atividade cinética da isoforma mitocondrial da SOD seja eficiente é necessário que o estado nutricional do manganês esteja preservado. Ademais, a dieta é fundamental para que o sistema antioxidante enzimático seja efetivo na prevenção do estresse oxidativo. Além disso, independente da isoforma da SOD é catalisada a mesma reação bioquímica (MACCORD e FRIDOVICH, 1969; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Adicionalmente, a partir da dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), é iniciada uma nova reação bioquímica pelo sistema antioxidante enzimático promovida pelas enzimas CAT e GSHPx. A literatura, não considera o H_2O_2 um radical livre devido esta molécula não apresentar elétrons desemparelhados. No entanto, este substrato pode reagir com metais de transição como o ferro (Fe^{2+}) é gerar o radical hidroxila ($OH^\cdot$), um das EROs mais nocivas do organismo humano. A reação bioquímica catalisada pela CAT e a decomposição do H_2O_2 em oxigênio devido esta molécula ser reduzida em água (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Esta enzima está presente tanto em organismos vegetais e animais localizados predominantemente organelas citoplasmáticas intituladas peroxissomas e em menores proporções no citoplasma e mitocôndria (MARKS, MARKS e SMITH 1996; WARD e PETERS, 1995).

Ademais, a GSHPx atua sobre o mesmo substrato da CAT e outros produtos oxidantes capazes de promover a peroxidação lipídica. Esta peroxidase promove a decomposição do H_2O_2 através da oxidação da glutathione redutase. Além disso, ela é capaz de reduzir os hidroperóxidos provenientes dos ácidos graxos. Em células eucarióticas existem duas isoformas da GSHPx sendo que a atividade cinética da mitocondrial é dependente de selênio. No entanto, a isoforma citoplasmática não depende do selênio (MARKS, MARKS e SMITH 1996; PROHASKA et al., 1977).

Além das enzimas supracitadas é importante salientar a contribuição da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) que atua na via das pentoses sendo esta responsável por catalisar a modificação glicose-6-fosfato (G6P) em 6-fosfogluconolactona. Esta reação bioquímica é fundamental para a geração do NADPH, um substrato que previne injúrias celulares promovidas pelas EROs devido a sua ação modulatória na atividade da enzima glutathione redutase (GR) (FROSALI et al., 2004; TSAI e CHEN 1998).

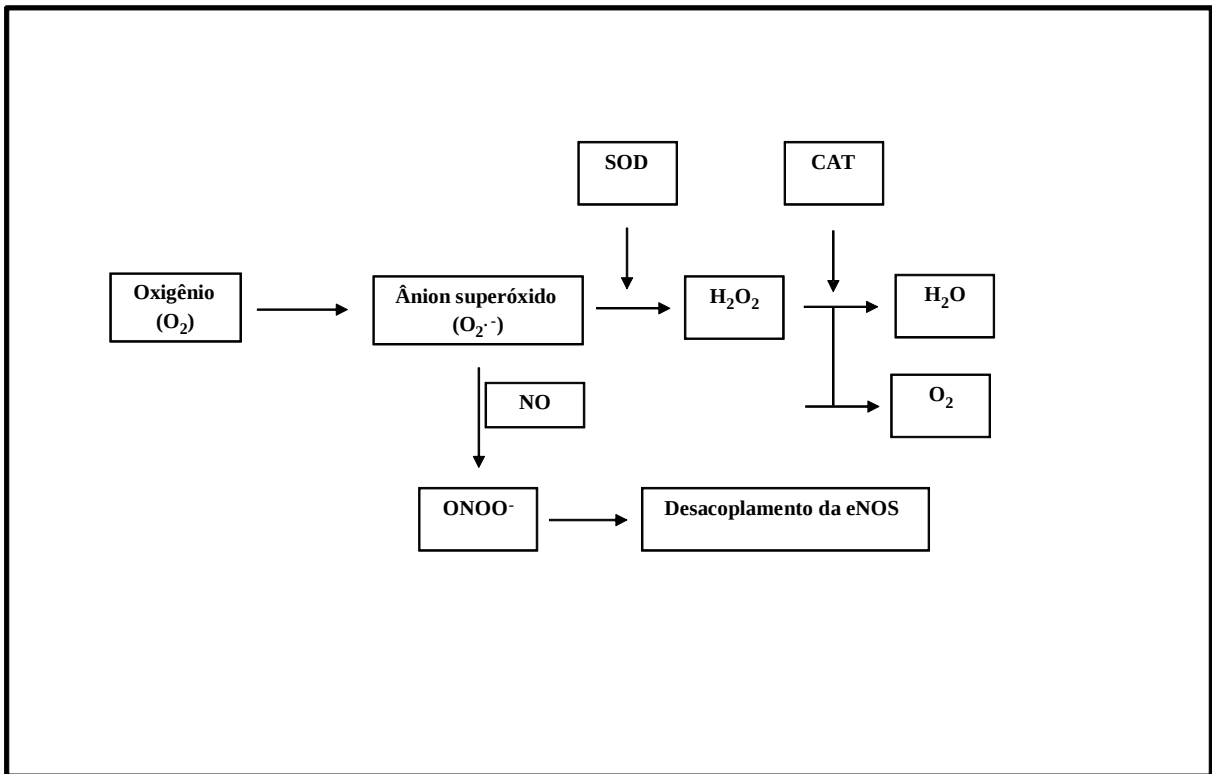


Figura 4. Sistema antioxidante endógeno realizado pelas enzimas superóxido dismutação que promove uma reação de dismutação no ânion superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio e oxigênio e a catalase que decompõe o peróxido de hidrogênio em moléculas de água.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a função vascular e os marcadores do estresse oxidativo no leito aórtico torácico de ratos expostos a uma dieta ocidental durante a vida perinatal.

3.2 Específicos

- Avaliar se a exposição da prole de ratos machos a uma dieta ocidental no período perinatal promovem alterações no controle glicêmico e na sensibilidade periférica à insulina;
- Estudar a participação do óxido nítrico no efeito vasorrelaxante na presença e na ausência do endotélio;
- Investigar se a exposição da prole a uma dieta ocidental durante a gestação e a lactação aumenta a resposta contrátil na aorta torácica estimulada por agentes farmacológicos e despolarizantes;
- Estudar a participação do cálcio armazenado no retículo sarcoplasmático no mecanismo contrátil do leito aórtico torácico.
- Analisar se o consumo da dieta ocidental na gestação e na lactação promove alterações na atividade das enzimas antioxidantes;
- Estudar a participação dos marcadores do estresse oxidativo na função vascular do leito aórtico torácico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para o estudo foram utilizados ratos de ambos os sexos da linhagem Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (máximo 4 animais/gaiola), com água e ração *ad libitum*. A temperatura foi mantida de 22 a 25°C.

O presente trabalho atendeu as normas para a realização de pesquisa em animais e todos os procedimentos foram de acordo com os princípios éticos da experimentação animal preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (CEPA/UFS), conforme o parecer 11/2016 (anexo 1).

4.2 Dietas experimentais

A dieta utilizada como controle durante o período de gestação e lactação foi a AIN-93G, à base de caseína, específica para roedores em fase de crescimento (REEVES, 1993). Além disso, a AIN-93G contém valores adequados de todos os macronutrientes e a dieta experimental foi manipulada para que apresentasse elevado teor de gordura (tabela 1).

A formulação da dieta experimental ocidental foi baseada na Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) e a dieta controle, AIN-93G (tabela 1), sendo realizados alguns ajustes na sua composição centesimal (CARVALHO et al., 2013). Dentre estes ajustes, encontra-se o aumento do teor de lipídeos e carboidratos simples, de forma a incrementar fatores organolépticos, culminando com odor e textura agradável, assemelhando-a a dieta ocidental, e a adequação do teor protéico, visto que os percentuais de proteína da dieta POF são inadequados para a fase de reprodução e crescimento em ratos e finalmente um ajuste para a fase de manutenção dos ratos (15,5g% de proteína). A tabela 1 expõe a comparação de macronutrientes das dietas administradas durante a pesquisa.

As dietas, com exceção da Labina®, foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental e Dietética (LNED) do Departamento de Nutrição, UFPE. Os ingredientes secos

que compunham as dietas eram misturados e peneirados para adequada homogeneização. Em seguida, adicionaram-se os componentes líquidos ou semi-sólidos antes da adição de água. A etapa seguinte foi secá-las em estufa com circulação de ar a 60-70° C durante 24-36h. As dietas foram armazenadas a 4°C até o momento de uso.

Tabela 1 - Composição centesimal das dietas controle (AIN-93G), ocidental (O) e labina e a contribuição energética dos macronutrientes em relação à energia total.

Ingredientes	Dietas		Nutrientes	Dietas	
	AIN-93G	Ocidental		AIN-93G	Ocidental
	g/100	g/100		g/100	g/100
Amido de milho	52,9	11,8	Proteína total	17,3	20,8
Farinha de trigo	-	12,0	Proteína Animal	17,0	16,0
Biscoito de maisena	-	7,2	Proteína Vegetal	0,3	4,8
Farinha de soja	-	8,5	Lipídio	7,0	14,7
Soja	-	0,1	Carboidrato	55,0	51,7
Banha	-	5,5	Fibras (celulose)	5,0	0,3
Margarina (65% de lipídio)	-	3,5	Mix mineral	3,5	2,5
Creme de leite (20% de lipídio)	-	3,0	Mix Vitaminas	1,0	0,7
Caseína (proteína>85%)	20,0	20,0	DL-metionina	0,3	0,3
Sacarose	10,0	20,0	Bitartarato de colina	0,25	0,25
Óleo de soja	7,0	4,0	BTH	0,0014	0,0014
Fibras (celulose)	5,0	0,3	Composição de acordo com o valor energético total (%)		
Mix mineral (AIN-93G-MX)	3,5	2,5		AIN-93G	Ocidental
Mix vitaminas (AIN-93G-VX)	1,0	0,7		g/100	g/100
DL-metionina	0,3	0,3	Proteína	18,0	19,0
Bitartarato de colina	0,25	0,25	Lipídio	19,0	31,0
Butilhidroquinona (BTH)	0,0014	0,0014	Carboidrato	63,0	49,3
Cloreto de sódio	-	0,36	Labina® **		
Soma	100,0	100,0	Proteína		26
Energia (Kcal/g)	3,6	4,2	Lipídio		11
			Carboidrato		63

Fonte: ocidental- Adaptado da Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2002/2003; AIN-93G-Adaptado de Reeves, 1997 por Carvalho et al., 2013. *Os cálculos da composição centesimal foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos, pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) e análise do LEAAL ** Dieta normocalórica (Purina®), determinado pelo Instituto Adolfo Lutz, 1985.

4.2.1 Composição de ácidos graxos das dietas

Inicialmente, foram extraídos os lipídios das dietas por transesterificação direta, seguindo-se de análise em um cromatógrafo a gás (Shimadzu GC-14B, Japão) com um FID detector. A coluna foi SUPELCOWAX (30 m x 0,25 mm x 0,25 ml), com um fluxo de 1,3 mL min⁻¹ de hélio, durante um tempo de execução de 60 min. A composição de ácidos graxos das dietas está apresentada na tabela 2. As análises foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos das dietas controle (AIN-93G) e ocidental (% de ácidos graxos totais).

Ácidos Graxos	Controle (AIN-93G)	Ocidental
C6:0	Nd	42,1
C8:0	0,02	nd
C10:0	0,03	nd
C12:0	0,2	8,16
C14:0	0,19	1,15
C15:0	0,02	1,53
C16:0	9,27	11,25
C18:0	15,31	3,4
C20:0	0,33	nd
C22:0	0,51	nd
C23:0	0,07	nd
C24:0	0,04	nd
Total saturado	25,99	67,59
C14:1	Nd	1,84
C16:01	2,72	0,64
18:01n9	9,36	13,99
20:01	0,24	nd
Total monoinsaturado	12,32	16,47
18:2n6	55,36	14,07
18:3n3	6,04	1,87
20:02	0,04	nd
20:5n3	0,03	nd
22:2n	0,05	nd
22:6n3	0,13	nd
Total poliinsaturado	61,65	15,94
18:2n6/18:3n3	9,17	7,52
P/S	5,0	1,0

Dieta controle (AIN-93G) e Dieta ocidental (O). A principal fonte de gordura na dieta controle foi o óleo de soja. As principais fontes de gordura na dieta O foram banha, gordura animal, manteiga e óleo de soja. P / S - poliinsaturados/saturados. nd = não determinado.

4.2.2 Grupos experimentais

Foram utilizadas 16 ratas Wistar virgens e machos férteis com idade entre 90 e 120 dias de vida e peso médio 225 (± 25) gramas. Elas foram acasaladas com ratos machos na

proporção de 2:1. O esfregaço vaginal foi realizado diariamente e a presença de espermatozóide no esfregaço indicou o início da gestação, sendo as ratas divididas em dois grupos conforme a dieta recebida: Controle (C, n=8) e ocidental (O=8). Após 24 horas do nascimento das ninhadas, foi realizado o ajuste para oito neonatos, sendo respeitada quando possível, a mesma proporção de machos e fêmeas. Nos protocolos experimentais foram utilizados somente machos para evitar a influência de flutuações hormonais nos resultados. É importante salientar que as mães foram mantidas na mesma dieta até o desmame dos filhotes. Destarte, após o desmame os filhotes foram divididos em dois grupos: Prole Controle (PC, n = 32) e Prole Ocidental (PO, n = 34). Além disso, para cada protocolo experimental o grupo foi formado por 1 macho de cada ninhada com o objetivo de avaliar se os achados do presente estudo estavam presentes em todas as ninhadas.

De acordo com a dieta administrada nos diferentes períodos de vida os grupos de filhotes foram distribuídos da seguinte forma:

1. **Prole Controle (PC):** filhos de mães que foram alimentadas com dieta controle para roedores durante gestação e lactação (AIN-93G).
2. **Prole Ocidental (PO):** filhos de mães que foram alimentadas com dieta ocidental na gestação e na lactação.

Ressalta-se que, após o desmame, a dieta controle passou a ser ração comercial desenvolvida para ratos de laboratório (Labina®). Segundo o fabricante (Purina do Brasil LTDA), tal dieta contém o mínimo de 23% de proteína bruta, extrato etéreo mínimo de 4%, o máximo de 10% de mineral, o máximo de 5% de matéria fibrosa e possui 3,6 Kcal/g.

4.3 Drogas

Cloreto de acetilcolina (ACh), cloridrato de fenilefrina (FEN) , N^ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e nitroprussiato de sódio (NPS) foram aplicadas neste estudo, todos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). Todas as drogas foram dissolvidas livremente em solução salina (0,9% de NaCl em água destilada). Além disso, foram utilizados seguintes sais: cloreto de potássio (KCl) e cloreto de cálcio (CaCl₂) da Neon (Suzano, São Paulo, Brasil).

4.4 Soluções nutritivas

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as soluções nutritivas contendo os seguintes sais: cloreto de sódio (NaCl), KCl, fosfato de potássio (KH_2PO_4), sulfato de magnésio (MgSO_4), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), Glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) e CaCl_2 (NG et al., 2013; ZHU et al., 2013).

Os quadros seguintes apresentam as composições das soluções utilizadas nos protocolos experimentais:

SAIS	CONCENTRAÇÃO (m MOL/L)
NaCl	118
KCl	4,7
KH_2PO_4	1,2
MgSO_4	1,2
NaHCO_3	25
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	11
CaCl_2	1,8

Quadro1 – Composição da solução de KREBS (pH – 7,4) (NG et al., 2013; ZHU et al., 2013).

SAIS	CONCENTRAÇÃO (m MOL/L)
NaCl	62,7
KCl	60
KH_2PO_4	1,2
MgSO_4	1,2
NaHCO_3	25
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	11
CaCl_2	1,8

Quadro 2 – Composição da solução isosmótica despolarizante contendo concentração de 60 mM do KCl.

4.5 Procedimentos experimentais

4.5.1 Obtenção e preparação dos anéis de aorta torácica

Os animais foram eutanasiados por decapitação sem anestesia para evitar alterações nos protocolos de reatividade vascular. Com o tórax do animal aberto, a aorta torácica foi

identificada e cuidadosamente retirada. Foram removidos o tecido conectivo e adiposo em uma placa de petri, contendo solução nutritiva – Krebs-Henseleit com preparação descrita anteriormente e aerada a uma mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂). A aorta foi seccionada em anéis com comprimento de 3-4 mm. Duas hastes metálicas foram passadas cuidadosamente através do lúmen do vaso e uma dessas hastes foi acoplada a um transdutor de tensão isométrica. Os anéis foram imersos em cubas contendo 10 mL de solução de Krebs-Henseleit, aeradas ininterruptamente a uma mistura carbogênica, com temperatura constante de 37°C e pH de 7,4. Após a montagem, os anéis foram submetidos a um período de estabilização de 60 min com tensão constante de 1 g e o meio trocado a cada 15 min, a fim de se evitar a interferência de metabólitos liberados pelo vaso. Os sinais de tensão foram registrados por transdutores sensíveis a tensão isométrica (Word Precision Instruments-Sarasota, Flórida, EUA), acoplados a um amplificador (TBM – 4, Word Precision Instruments – Sarasota, Flórida, EUA) conectado a um microcomputador. A aquisição dos dados foi proporcionada pelo programa Windaq Data Acquisition – Dataq Instruments (Akron, Ohio, EUA).

4.5.2 Verificação da integridade do músculo vascular liso e da funcionalidade endotelial

Primeiramente, todos os anéis foram pré-contraídos com KCl 60 mM, sendo esta uma etapa anterior a verificação do endotélio. Este procedimento experimental teve como objetivo avaliar a integridade do músculo liso vascular. Os dados foram expressos em força de contração e normalizados pelo tamanho do anel (mN/mm).

Posteriormente, a funcionalidade do endotélio foi observada pelo relaxamento dos anéis na presença da ACh (1 µM), como descrito por Furchgott e Zawadzki (1980). Após o período de estabilização de 60 min, no qual a tensão de 1,0 g foi mantida, os anéis foram pré-contraídos com FEN (1 µM), um agonista dos receptores α₁ adrenérgicos (BÜSCHER et al., 1999) e, no componente tônico da contração, foi administrada acetilcolina (1 µM), que ativa os receptores muscarínicos (M₃) existentes no endotélio (REN; NAKANE; CHIBA, 1993). Os anéis foram considerados com endotélio quando o relaxamento na presença de acetilcolina foi superior a 80%. Para a realização dos protocolos sem o endotélio funcional os anéis foram submetidos a uma pressão mecânica nas hastes metálica com o objetivo de remover o endotélio antes da fase de estabilização. Após a verificação do endotélio um relaxamento até

10% foram considerados sem endotélio e os anéis com relaxamento entre 10% e 80% foram descartados dos protocolos experimentais.

4.5.3 Avaliação da resposta vasodilatadora à acetilcolina e nitroprussiato de sódio

Com o objetivo de avaliar a participação do endotélio no relaxamento foi realizado uma curva concentração resposta com acetilcolina e para verificar a resposta vasodilatadora na ausência do endotélio foi utilizado um doador exógeno de óxido nítrico (NPS). Dessa forma, após 30 minutos do teste da integridade funcional do endotélio os anéis de aorta com ou sem endotélio foram pré-contráídos com fenilefrina (10^{-3}). Atingida a fase de estabilização da resposta contrátil (aproximadamente de 10 a 15 minutos) foi realizada em anéis de aorta com endotélio a curva concentração resposta com cloridrato de acetilcolina (10^{-9} – 10^{-5} M) e em anéis sem endotélio foi induzido o relaxamento com NPS (10^{-12} - 10^{-5} M) de maneira cumulativa, com intervalos de 2 a 3 minutos em cada concentração, tempo necessário para estabilização da resposta vasodilatadora. Os dados foram expressos em percentual de relaxamento. A partir das curvas foram expostos os seguintes dados: área sob a curva (ASC), a concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax)

4.5.4 Verificação da participação do óxido nítrico (NO) no vasorrelaxamento estimulado pela acetilcolina

Para avaliar a participação do óxido nítrico na via de relaxamento em anéis com endotélio preservado foi realizada uma curva concentração resposta com acetilcolina (10^{-9} – 10^{-4} M) na presença do L-NAME (100 μ M), um inibidor inespecífico das enzimas óxido nítrico sintases (NOS), (MONCADA; HIGGS, 1993). Após a verificação da funcionalidade do endotélio vascular, como anteriormente descrito, os anéis foram pré-incubados com o inibidor durante 30 min. Após esse período, uma contração foi induzida por FEN (1 μ M) e na fase tônica dessa contração, foi realizado uma curva concentração resposta com cloridrato de acetilcolina. Os dados foram expressos em percentual de relaxamento. A partir das curvas foram expostos os seguintes dados: ASC, -Log EC50 e Rmax.

4.5.5 Avaliação da resposta vasoconstrictora à fenilefrina

Para avaliar a resposta contrátil por mecanismo farmacocinético foram realizadas curvas concentração resposta na presença e na ausência do endotélio com cloridrato de fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) um agonista seletivo dos receptores α_1 -adrenérgico. Após, 30 minutos do teste da integridade funcional do endotélio, foi administrado as concentrações de maneira cumulativa, com intervalos de 3 minutos entre cada concentração, tempo necessário para estabilização da resposta contrátil. Os anéis usados para estes experimentos foram os mesmos utilizados nas curvas concentração resposta com cloridrato de acetilcolina e NPS. Os dados foram expressos em força de contração e normalizados pelo tamanho do anel (mN/mm). A partir das curvas foram expostos os seguintes dados: ASC, -Log EC50 e Rmax.

4.5.6 Avaliação da resposta vasoconstrictora ao cloreto de potássio (KCl)

Para avaliar a resposta contrátil por agente despolarizante foi realizada uma curva concentração resposta com KCl. Após 30 minutos do teste da integridade funcional do endotélio, foram realizadas curvas concentração-resposta com solução de KCl em concentrações crescentes de maneira cumulativa em anéis de aorta com endotélio e sem endotélio (4×10^{-3} a 48×10^{-3}) com intervalos de 5-8 minutos entre cada concentração, tempo necessário para a estabilização da resposta contrátil. Os dados foram expressos pela força de contração e normalizados pelo tamanho do anel (mN/mm). A partir das curvas foram expostos os seguintes dados: ASC, -Log EC50 e Rmax.

4.5.7 Avaliação da resposta vasoconstrictora ao cloreto de cálcio (CaCl_2)

Para avaliar a possível participação dos canais para Ca^{2+} no efeito vasoconstrictor, os anéis com endotélio removido foram pré-expostos a uma solução despolarizante com KCl 60 mM, na ausência de Ca^{2+} com 0,5 mM de EDTA (um quelante de Ca^{2+}), durante 30 min. Após esse período, foram realizadas curvas concentração-resposta com solução de CaCl_2 em concentrações crescentes de maneira cumulativa (10^{-6} a 3×10^{-2}), com intervalos de 3 minutos entre cada concentração, tempo necessário para a estabilização da resposta contrátil. Os dados foram expressos pela força de contração e normalizados pelo tamanho do anel (mN/mm). A partir das curvas foram expostos os seguintes dados: ASC, -Log EC50 e Rmax.

4.5.8 Avaliação do papel do cálcio intracelular resposta vasoconstrictora induzida pela fenilefrina

Para avaliar exclusivamente a participação dos estoques de cálcio armazenados no retículo sarcoplasmático na força de contração em anéis sem endotélio, após estabilização de 60 minutos, os anéis da aorta foram incubados durante 30 minutos com uma solução de Krebs-Henseleit livre de cálcio (Ca^{2+}) mais EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) um quelante de cálcio. Em seguida, foi adicionada fenilefrina (10^{-6}M) no banho. A adição de fenilefrina induziu uma contração transiente e de pequena magnitude e retornando em seguida para a tensão basal (Silva-Filho et al., 2012). Os dados foram expressos em força de contração e normalizados pelo tamanho do anel (mN/mm).

4.6 Ensaios bioquímicos

Amostras do leito aórtico torácico foram pesadas e utilizadas em conformidade com os respectivos protocolos para a realização dos ensaios enzimáticos como descritos nas próximas sessões.

4.6.1 Determinação da concentração total de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada em triplicata pelo método de Lowry (1951). Para tanto, foram adicionados às amostras NaOH (0,5 mmol/L) e, após 15 minutos, Na_2CO_3 3%, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 4%, CuSO_4 2% e reagente de Folin (1:1). Em seguida, foram incubadas por 30 minutos e depois realizada leitura a 630 nm em espectrofotômetro de placa (ELx800, BIOTEK Instruments®- Winooski, Vermont, EUA) e, por fim, foi construída uma curva padrão de albumina bovina (Sigma-Aldrich® - St. Louis, Missouri, EUA) para aferição da concentração de proteínas nas amostras testes.

4.6.2 Glicemia de jejum

Para avaliar a concentração plasmática de glicose foi realizado o método enzimático colorimétrico. No 60º dia de vida, os animais foram mantidos em um período de 12 horas de jejum e logo após foi coletado aproximadamente 5 ml de sangue através da decaptação. O sangue foi acondicionado em um tubo de separação e posteriormente centrifugado a 3500 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos para obtenção do soro. O sobrenadante foi retirado com auxílio de uma pipeta e transferido para um tubo Eppendorf®. Para avaliar a glicemia de jejum utilizou-se um teste enzimático colorimétrico da marca (Biomed, Belo Horizonte, BR).

A leitura do substrato foi realizada no espectrofotômetro da marca (FEMTO, 800 XI, São Paulo, BR) de acordo com as normas estipuladas pelo fabricante.

4.6.3 Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTI)

Para avaliar a sensibilidade periférica a insulina foi realizado o TTI. Os animais foram submetidos a jejum de seis horas e analisado a glicemia no tempo zero. Em seguida, foram injetados 0,75U/kg i.p. de insulina regular humana e as amostras de sangue foram coletadas da veia caudal nos tempos, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos subsequentes para medidas da glicemia (YUAN et al., 2011).

4.6.4 Mensuração de hidroperóxidos totais

A quantificação dos hidroperóxidos totais foi realizada de acordo com Jiang, Hunt e Wolff (1992). O método se baseia basicamente na oxidação de íons ferroso (Fe^{2+}) a íons férricos (Fe^{3+}) em condições ácidas, pelos hidroperóxidos lipídicos. O indicador utilizado é o xilenol orange que reage com os íons Fe^{3+} produzindo um cromóforo azul-arroxeadado, o qual pode ser medido espectrofotometricamente a 560 nm. O ensaio foi realizado em reagente de FOX, o qual é composto por xilenol Orange, (0,25 mmol/L), sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25 mmol/L), hidroxitolueno butilado (BHT, 4,4 mmol/L), metanol (CH_4O) e ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 97%). Em um microtubo, foi adicionado reagente de FOX ao homogenato. Após 30 minutos, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante colocado em microplaca. A quantificação dos hidroperóxidos foi expressa em mol/L, e foi utilizado o coeficiente de extinção molar $4,3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.6.5 Determinação da atividade da SOD

As amostras de tecido foram homogeneizadas em tampão salina fosfato (PBS - 50 mmol/L, pH 7,4) e centrifugadas a 12000 rpm (Heal Force, Neofuge 15R) por 30 minutos. A reação foi realizada pipetando-se em triplicata na microplaca: sobrenadante obtido, PBS, MTT (1,25 mmol/L) e pirogalol (100 $\mu\text{mol/L}$). Em seguida, a microplaca foi agitada por 5 minutos e adicionado DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Biotek, ELx800 Absorbance Microplate Reader- Winooski, Vermont, EUA) a 570 nm e a

atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD por miligrama de proteína (MADESH & BALASUBRAMANIAN, 1998).

4.6.6 Determinação da atividade da CAT

As amostras foram homogeneizadas em PBS e, em seguida, os homogenatos foram centrifugados (Heal Force, Neofuge 15R - Changning District, Shanghai, China) a 12000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Em cubetas de quartzo foram pipetados tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) e o sobrenadante. A reação foi iniciada com a adição de H₂O₂ (0,3 mol/L), em ambiente protegido de luz, e as medidas realizadas em espectrofotômetro (Hitachi, Japão), em intervalos de 15 segundos, a 25 °C, no comprimento de onda de 240 nm. A atividade da enzima foi expressa pela diferença da variação das absorbâncias (ΔE)/minuto/miligrama de proteínas (NELSON e KIESOW, 1972).

4.7 Mensuração das Concentrações Intracelulares do NO

A biodisponibilidade do NO em anéis do leito aórtico torácico foi avaliada em uma situação basal e estimulada com cloridrato de acetilcolina (10^{-6}). Dessa forma, para detecção das concentrações intracelulares de NO, os anéis do leito aórtico torácico de ambos os grupos foram obtidos como previamente descrito e carregados com 10 μ M da sonda fluorescente sensível ao NO, 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM), Invitrogen TM/Molecular Probes®, por 30 minutos a 37°C. As amostras foram incubadas com sondas fluorescentes em solução de Krebs- Henseleit e então, lavadas no mesmo tampão para remover o excesso das mesmas. Para a execução deste experimento, os anéis do leito aórtico torácico foram previamente carregados com a sonda e colocados em um meio crioprotetor, Tissue-Tek O.C.T. (SAKURA Finetek®, Dubai, EAU) e mantidos a -80°C. Posteriormente foram realizados cortes em criostato (Leica CM 1850 criostato, Leica Instruments, Buffalo Grove, Illinois, EUA) com espessura de 20 μ m. Os cortes dos anéis foram transferidos para lâminas histológicas, e para aquisição de imagens fluorescentes, foi utilizado microscópio de fluorescência (IX2-ICB, Olympus®, EUA) acoplado a câmera digital (XM-10, Olympus ®, EUA) com excitação e emissão em comprimentos de onda semelhante ao utilizado para detecção em células vasculares (GIL-ORTEGA et al., 2014).

O software ImageJ 1.38 (NIH) foi utilizado para processamento das imagens capturadas. As imagens de microscopia de fluorescência foram analisadas de acordo com a intensidade de fluorescência por área e os resultados obtidos foram expressos em unidades arbitrárias (u.a.).

4.8 Mensuração do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) intracelular

Para detecção de $O_2^{\cdot-}$ intracelular, os anéis do leito aórtico torácico foram processados como acima descrito, porém, carregados com 10 μ M da sonda fluorescente sensível ao $O_2^{\cdot-}$, di-hidroetídeo (DHE), Calbiochem[®], por 30 min a 37°C. (GIL-ORTEGA et al., 2014). As imagens foram capturadas e as análises processadas como descrito anteriormente

4.9 Descartes

Após eutanásia dos animais por decaptação, as carcaças foram depositadas em sacos plásticos apropriados e armazenadas no freezer de coleta de material biológico situado no Biotério do Departamento de Fisiologia da UFS para posterior recolhimento durante a coleta de lixo biológico. Os resíduos perfurocortantes foram armazenados em caixas adequadas e levados até o Hospital Universitário para descarte junto ao material hospitalar.

4.10 Análise estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As curvas de relaxamento foram expressas em percentual de relaxamento e as de contração em milinewton por milímetro (mN/mm) sendo normalizadas pelo comprimento do anel. Foi utilizado o teste *t* não pareado para realizar a análise estatística da R_{max} , - Log EC_{50} e da ASC das curvas concentração resposta e dos marcadores do estresse oxidativo. No entanto, para avaliar a biodisponibilidade do óxido nítrico basal e estimulado foi utilizado Anova one way com pós-teste de Bonferroni devido este protocolo experimental ser composto por mais de dois grupos. Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($P < 0.05$). Foi utilizado em todos os testes estatísticos foi GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, California, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Pré-contração com KCl 60 mM

A figura 5 abaixo representa a pré-contração induzida com solução de KCl 60 Mm em anéis do leito aórtico torácico. A PO apresentou uma maior força contrátil (PC: $5,1 \pm 0,36$ vs. PO: $7,1 \pm 0,8$ mN/mm) quando comparados com a PC.

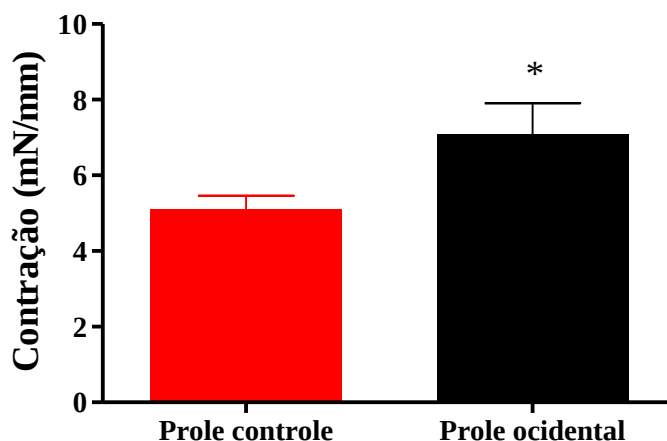


Figura 5. Pré-contração com solução de KCl 60mM etapa anterior a verificação do endotélio em anéis do leito aórtico torácico. Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste t não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa entre os grupos.

5.2 Curvas concentração resposta com acetilcolina

A figura 6A ilustra o relaxamento induzido por concentrações crescentes de acetilcolina (10^{-9} M - 10^{-5} M) em anéis vasculares do leito aórtico torácico com endotélio funcional. A prole ocidental (PO) apresentou um menor ASC (PC: $215 \pm 9,4$ vs. PO: $162 \pm 8,6$ ua) quando comparado com a prole controle (PC) (Figura 6B). Além disso, a PO apresentou uma menor sensibilidade ($-\text{Log EC}_{50}$) e potência (R_{max}) conforme está descrito na tabela 3.

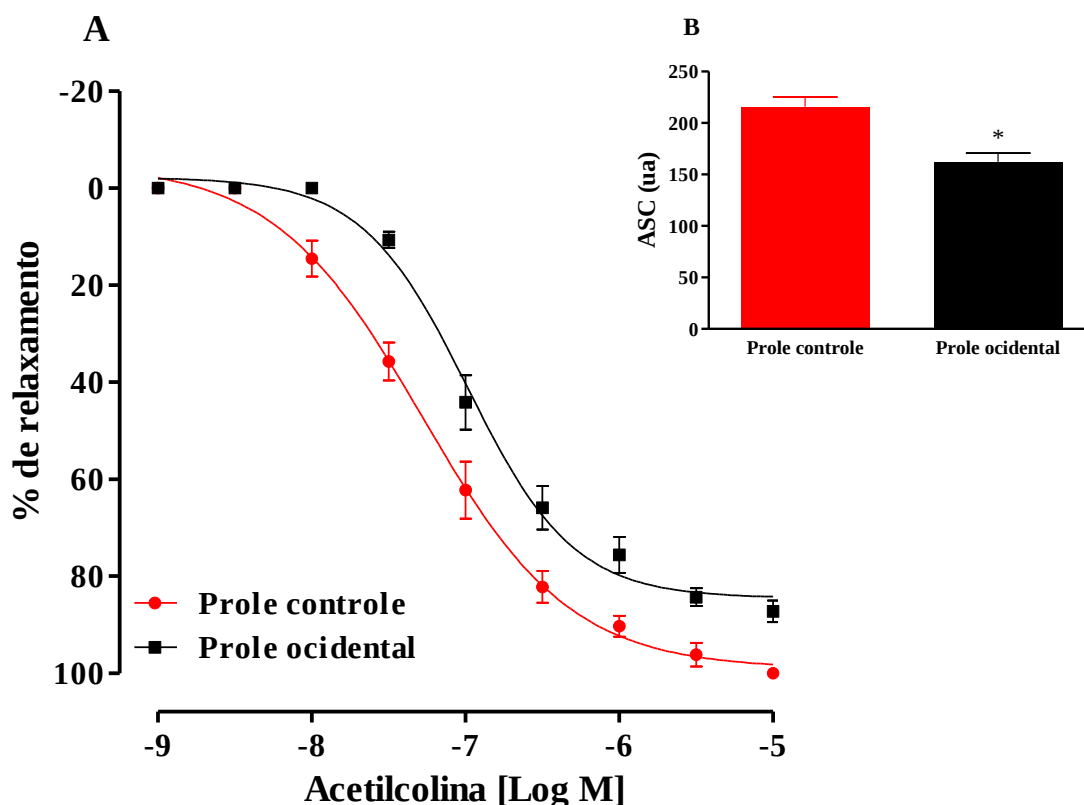


Figura 6. Curvas concentração-resposta para a acetilcolina (10^{-9} - 10^{-5} M) em anéis isolados do leito aórtico torácico de ratos adultos na presença do endotélio (A) e a resposta máxima (B). Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$ quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste t não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa na ASC do grupo PC vs PO.

5.2.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com acetilcolina

Tabela 3 – Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com acetilcolina.

Parâmetros	GRUPOS	
	Prole controle (PC)	Prole ocidental (PO)
- Log EC50	7,28 $\pm$ 0,05	6,98 $\pm$ 0,04*
Rmax	99 $\pm$ 2,46	84 $\pm$ 2,17*

Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste t não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa no - Log EC50 e Rmax entre os grupos.

5.3 Curvas concentração resposta com nitroprussiato de sódio

A figura 7A representa o relaxamento induzido por concentrações crescentes de nitroprussiato de sódio (3×10^{-11} M - 10^{-6} M) em anéis vasculares do leito aórtico torácico sem endotélio funcional. A figura 7B representa que a PO apresentou menor ASC (PC: 323 ± 8.8 vs. PO: $280 \pm 14,09$ ua). Além disso, a tabela 4 mostra que a PO apresenta uma menor sensibilidade (- Log EC50) quando comparados com a PC.

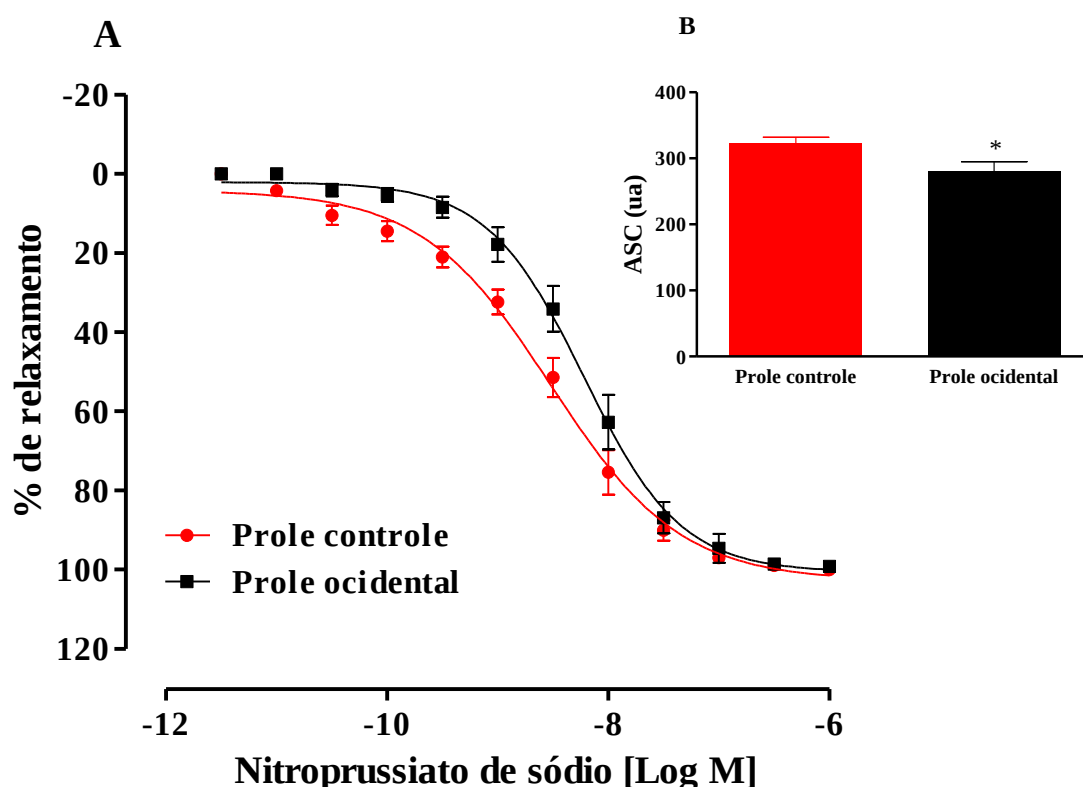


Figura 7. Curvas concentração-resposta para o nitroprussiato de sódio (3×10^{-11} - 10^{-6} M) em anéis isolados do leito aórtico torácico de ratos sem endotélio (A) e a ASC (B). Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas na ASC da prole controle (PC, n = 8) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 8). Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa entre os grupos PC vs PO.

5.3.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com nitroprussiato de sódio

Tabela 4 – Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com nitroprussiato de sódio em anéis do leito aórtico torácico sem endotélio funcional.

Parâmetros	GRUPOS	
	Prole controle (PC)	Prole ocidental (PO)
- Log EC 50	$8,51 \pm 0,06$	$8,21 \pm 0,05^*$
Rmax	$100 \pm 2,3$	$100 \pm 2,5$

Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa no - Log EC50 entre os grupos.

5.4 Curvas concentração resposta com acetilcolina na presença do L-NAME

A figura 8A representa o relaxamento induzido por concentrações crescentes de acetilcolina (10^{-9} M – 10^{-4} M) em anéis vasculares do leito aórtico torácico com endotélio

funcional na presença do inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) N ω -nitro-arginina-metil-ester (L-Name). Entretanto, não houve diferença significativa na ASC entre os grupos (PC: $14,5 \pm 1,01$ vs. PO: $16,7 \pm 1,42$ ua) (figura 8B). Além disso, não houve diferença nos valores do – Log EC50 e a Rmax conforme descrito na tabela 5.

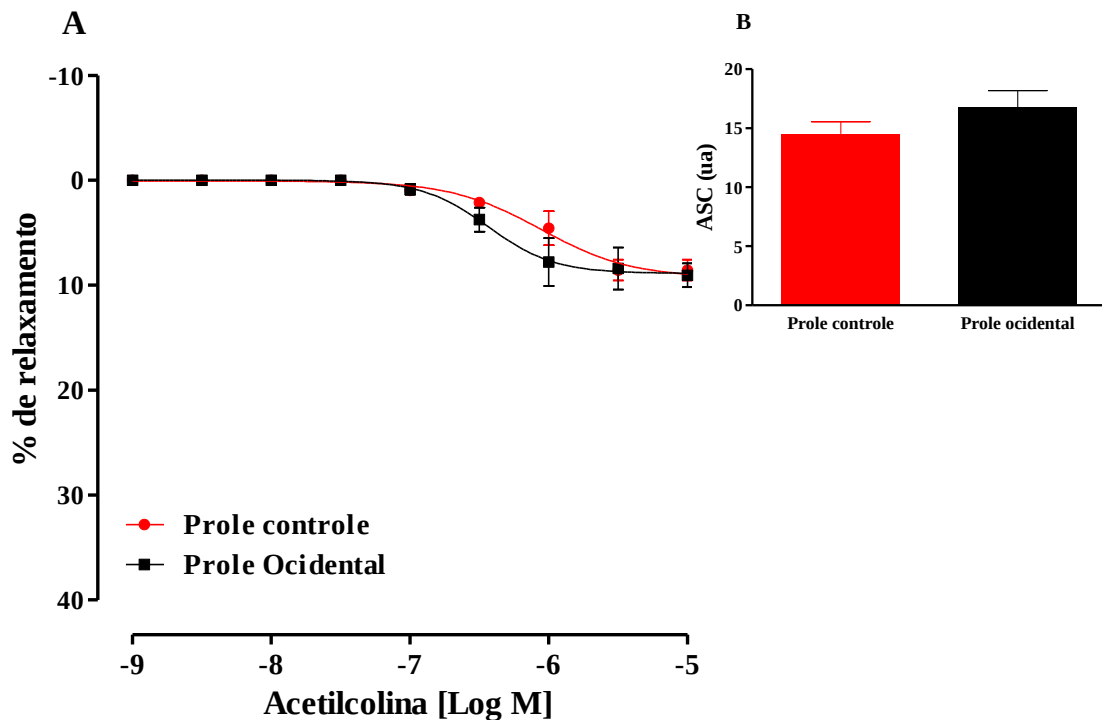


Figura 8. Curvas concentração-resposta para a acetilcolina (10^{-9} – 10^{-4} M) em anéis isolados do leito aórtico torácico de ratos com endotélio na presença do L-NAME(A) e a resposta máxima (B). Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Não houve diferença significativa na ASC da prole controle (PO, n = 6) quando comparados com a prole ocidental (PC, n = 6). Teste *t* não pareado.

5.4.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com acetilcolina na presença do L-NAME

Tabela 5 – Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com acetilcolina presença do inibidor da óxido nítrico sintase (NOS) N ω -nitro-arginina-metil-ester (L-Name).

Parâmetros	GRUPOS	
	Prole controle (PC)	Prole ocidental (PO)
- Log EC 50	$6,05 \pm 0,05$	$6,43 \pm 0,05$
Rmax	$9,3 \pm 0,46$	$8,8 \pm 0,39$

Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Não houve diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste *t* não pareado.

5.5 Curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina com endotélio funcional

A figura 9A ilustra a contração induzida por concentrações crescentes de cloridrato de fenilefrina (10^{-9} M - 10^{-5} M) em anéis vasculares do leito aórtico torácico com endotélio funcional. A prole ocidental (PO) apresentou maior ASC (PC: $7,6 \pm 0,86$ vs. PO: $11,04 \pm 0,3$

ua) quando comparado com a prole controle (PC) (Figura 9B). Os valores exibidos na tabela 6 demonstram que a PO apresentou uma maior Rmax quando comparado com a PC.

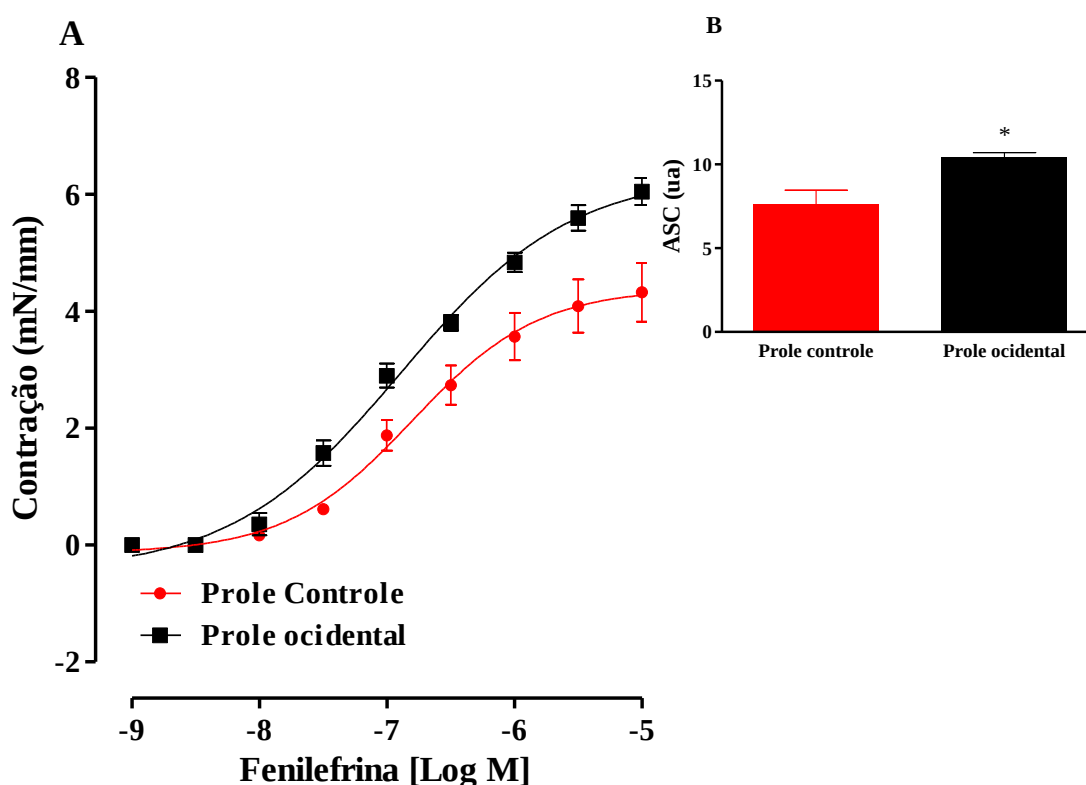


Figura 9. Curvas concentração-resposta para a fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) em anéis isolados do leito aórtico torácico de ratos com endotélio (A) e a ASC (B). Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste *t* de Student. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa na ASC entre os grupos PC vs PO.

5.5.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com cloridrato de fenilefrina com endotélio funcional

Tabela 6 – Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina em anéis do leito aórtico torácico com endotélio funcional.

Parâmetros	GRUPOS	
	Prole controle (PC)	Prole ocidental (PO)
- Log EC 50	6,8 $\pm$ 0,13	6,9 $\pm$ 0,07
Rmax	4,4 $\pm$ 0,33	6,3 $\pm$ 0,29*

Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa na Rmax entre os grupos.

5.6 Curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina sem endotélio funcional

A figura 10A ilustra a resposta contrátil induzida por concentrações crescentes de cloridrato de fenilefrina (10^{-9} M - 10^{-5} M) em anéis vasculares do leito aórtico torácico sem endotélio funcional. A PO apresentou uma maior ASC (PC: 11 ± 1 vs. PO: $16 \pm 1,5$ ua) quando comparado com a PC (Figura 10B). Ademais, na tabela 7 apresentam os valores do – Log EC50 e da Rmax de ambos os grupos.

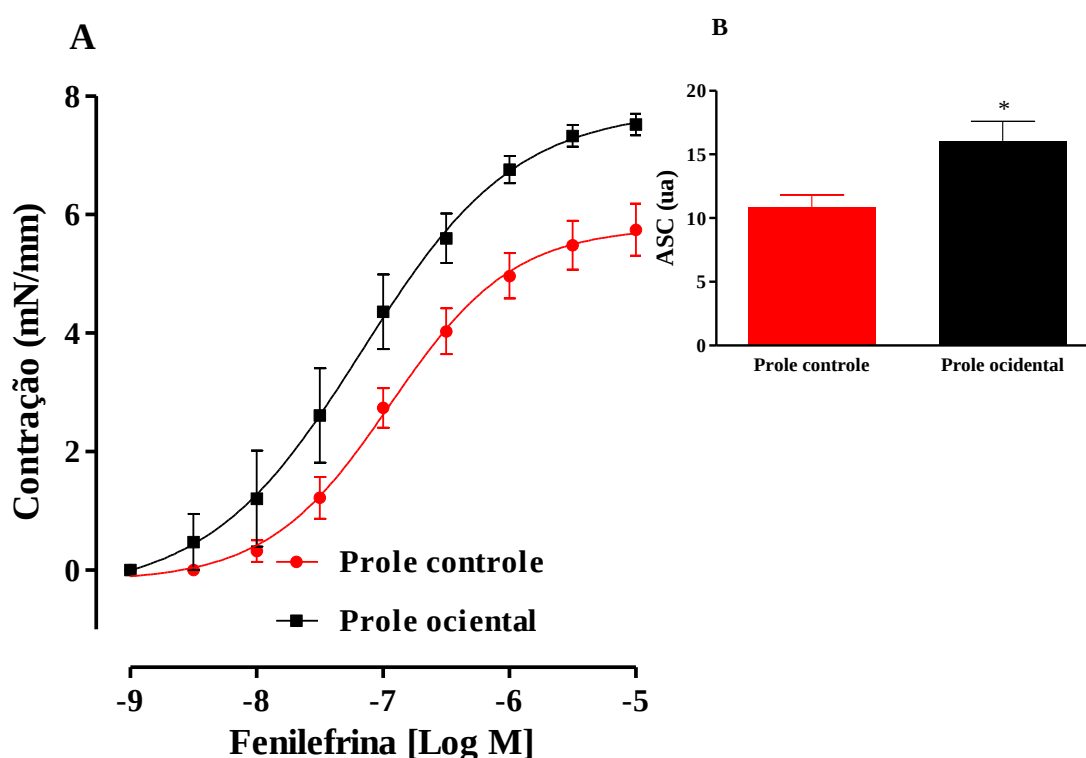


Figura 10. Curva concentração-resposta para a fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M) em anéis isolados do leito aórtico torácico de ratos sem endotélio. Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa na ASC entre os grupos PC vs PO.

5.6.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com cloridrato de fenilefrina sem endotélio funcional

Tabela 7 – Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com cloridrato de fenilefrina em anéis do leito aórtico torácico sem endotélio funcional.

Parâmetros	GRUPOS	
	Prole controle (PC)	Prole ocidental (PO)
- Log EC 50	6,9 ± 0,1	7,1 ± 0,15
Rmax	5,8 ± 0,31	7,8 ± 0,56*

Dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * p<0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste t não pareado. *p<0,05 para representar a diferença significativa na Rmax entre os grupos.

5.7 Curvas concentração resposta com KCl com endotélio funcional

A figura 11 representa as curvas concentração resposta do KCl (4×10^{-3} – 48×10^{-3}) um agente despolarizante em anéis do leito aórtico torácico com endotélio preservado. A PO apresentou maior ASC (PC: $1,7 \pm 0,14$ vs. PO: $2,37 \pm 0,07$ ua) quando comparados a PC (figura 11B). A tabela 8 ilustra os valores do – Log EC50 e a Rmax.

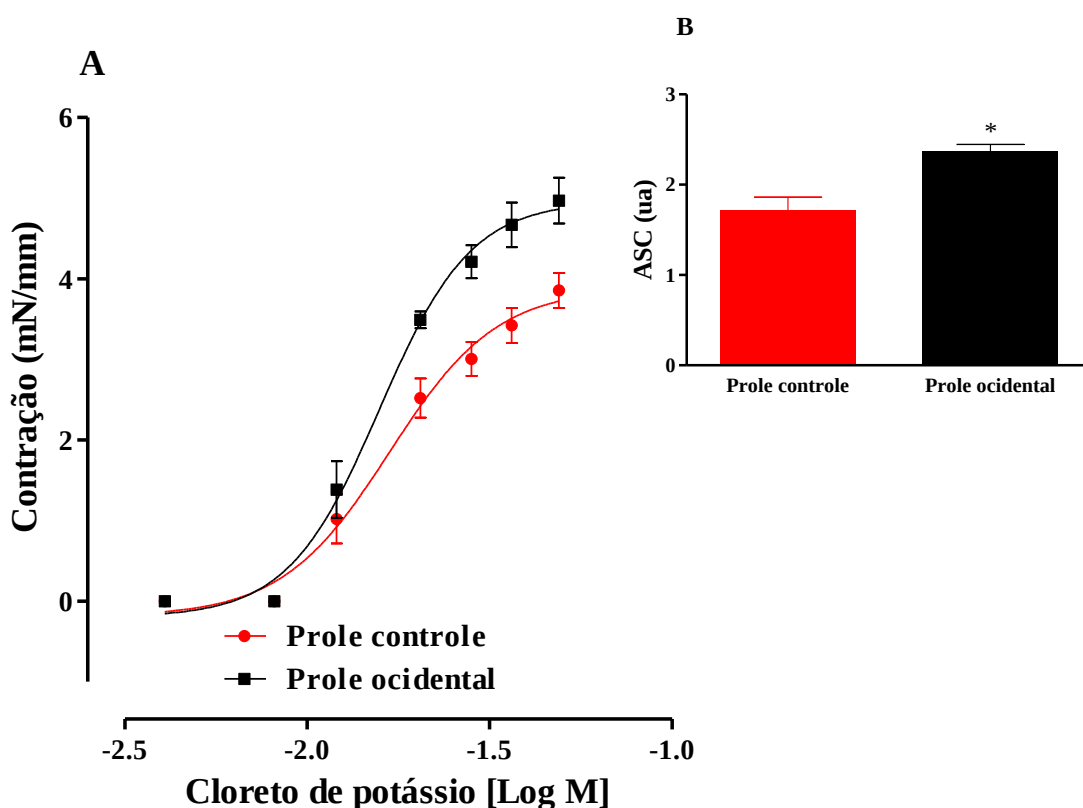


Figura 11. Curvas concentração-resposta para o cloreto de potássio (4×10^{-3} – 48×10^{-3} M) em anéis isolados do leito aórtico torácico de ratos com endotélio funcional. Dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * p<0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 7). Teste t não pareado. *p<0,05 para representar a diferença significativa na ASC entre os grupo PC vs PO.

5.7.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com KCl com endotélio funcional

Tabela 8 – Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com cloreto de potássio (KCl) em anéis do leito aórtico torácico com endotélio funcional.

Parâmetros	GRUPOS	
	Prole controle (PC)	Prole ocidental (PO)
- Log EC 50	1,77 ± 0,03	1,79 ± 0,03
Rmax	3,9 ± 0,3	4,96 ± 0,23*

Dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * p<0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste t não pareado. *p<0,05 para representar a diferença significativa na Rmax entre os grupos.

5.8 Curvas concentração resposta com KCl sem endotélio funcional

A figura 12 representa as curvas concentração resposta do KCl (2×10^{-3} – 48×10^{-3}) um agente despolarizante em anéis do leito aórtico torácico sem endotélio. A PO apresentou uma maior ASC (PC: $2,8 \pm 0,11$ vs. PO: $4,2 \pm 0,15$ ua) quando comparados a PC (figura 12B). Na tabela 9 estão ilustrado os valores do - Log EC50 e o Rmax.

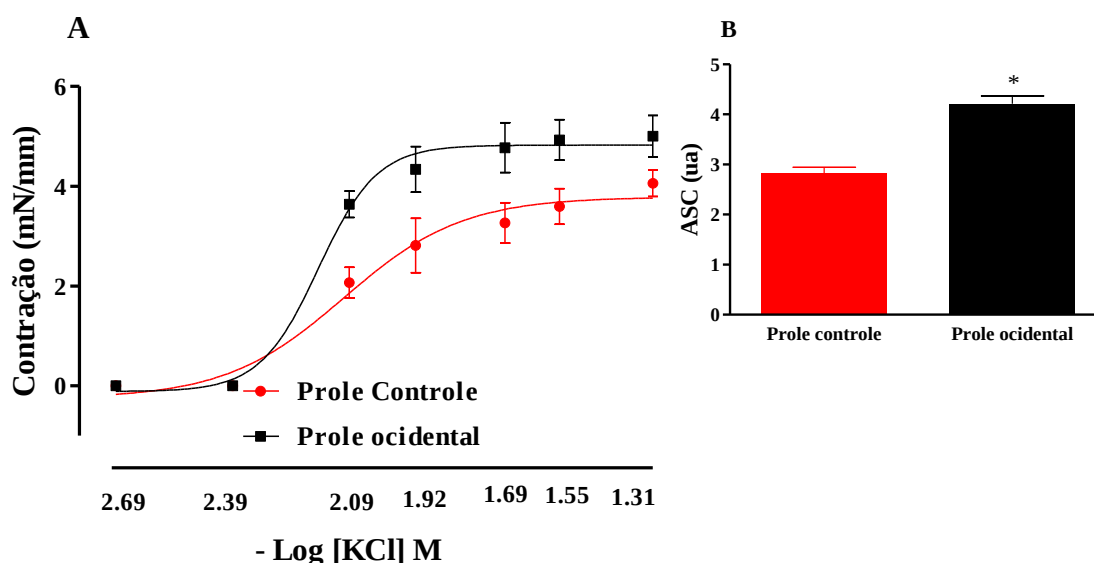


Figura 12. Curvas concentração-resposta para o cloreto de potássio (2×10^{-3} – 48×10^{-3} M) em anéis isolados do leito aórtico torácico de ratos sem endotélio. Dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * p<0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 5). Teste t não pareado. *p<0,05 para representar a diferença significativa na ASC entre os grupos PC vs PO.

5.8.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com KCl sem endotélio funcional

Tabela 9 – Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com cloreto de potássio (KCl) em anéis do leito aórtico torácico sem endotélio funcional.

Parâmetros	GRUPOS	
	Prole controle (PC)	Prole ocidental (PO)
- Log EC 50	2,1 ± 0,02	2,16 ± 0,02
Rmax	3,78 ± 0,12	4,82 ± 0,09*

Dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * p<0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste t não pareado. *p<0,05 para representar a diferença significativa na Rmax entre os grupos.

5.9 Curvas concentração resposta com CaCl₂ sem endotélio funcional

A figura 13A exibe a curva concentração resposta do CaCl₂ (10^{-6} – $10^{-0,2}$ M) em anéis do leito aórtico torácico sem endotélio. Não houve diferença na ASC (PC: $10,9 \pm 0,64$ vs. PO: $12,8 \pm 0,16$) entre os grupos (figura 13B). Além disso, na tabela 10 representa os valores do - Log EC50 e a Rmax.

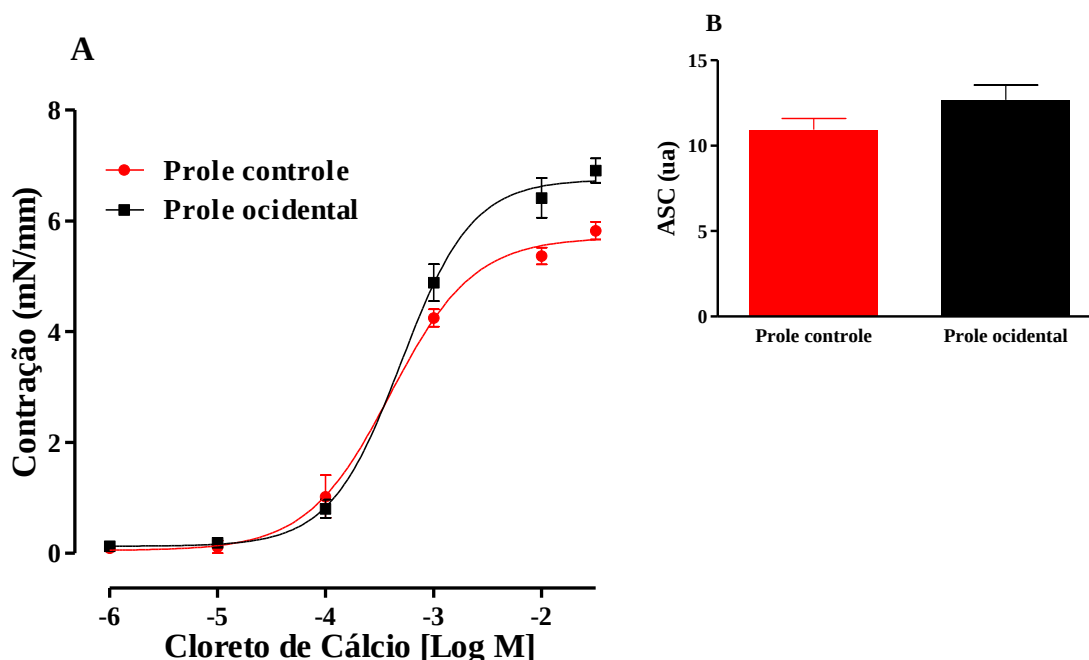


Figura 13. Curvas concentração-resposta para o cloreto de cálcio (10^{-6} – $\times 10^{-0,2}$ M) em anéis isolados do leito aórtico torácico de ratos sem endotélio. Dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * p<0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 5). Teste t não pareado. *p<0,05 para representar a diferença significativa na ASC entre os grupos PC vs PO.

5.9.1 Valores do Log da EC50 e da resposta máxima das curvas com CaCl₂ sem endotélio funcional

Tabela 10 – Valores da concentração que induziu a metade do efeito máximo (-Log EC50) e a resposta máxima (Rmax) das curvas concentração resposta com cloreto de cálcio (CaCl₂) em anéis do leito aórtico torácico sem endotélio funcional.

Parâmetros	GRUPOS	
	Prole controle (PC)	Prole ocidental (PO)
- Log EC 50	3,4 ± 0,07	3,3 ± 0,06
Rmax	5,7 ± 0,16	6,7 ± 0,18*

Dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * p<0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste *t* não pareado. *p<0,05 para representar a diferença significativa na Rmax entre os grupos.

5.10 Força de contração com Cloridrato de fenilefrina (10⁻⁶M) sem cálcio extracelular

A figura 14 ilustra a força de contração dependente somente do cálcio intracelular armazenado no retículo sarcoplasmático com cloridrato de fenilefrina 10⁻⁶ M em uma solução nutritiva sem cálcio mais EDTA em anéis sem o endotélio funcional. A PO apresentou uma maior força de contração (PC: 0,64 ± 0,09 vs. PO: 0,96 ± 0,05) quando comparados com a PC.

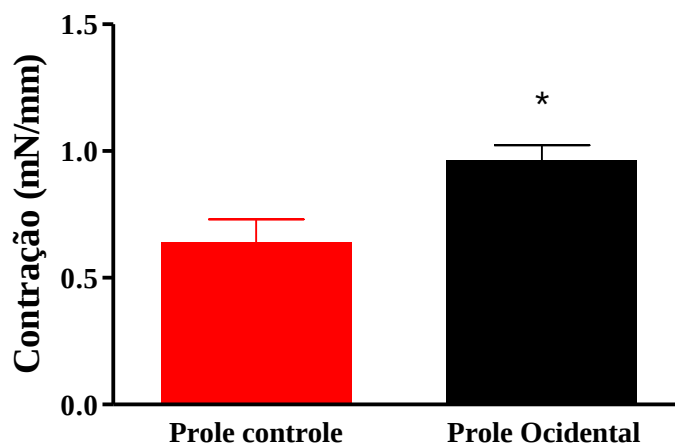


Figura 14. Força de contração em anéis do leito aórtico torácico sem endotélio funcional com cloridrato de fenilefrina 10⁻⁶ M em ratos expostos a uma dieta controle (PC) ou ocidental (PO) incubados em uma solução nutritiva de Krebs sem cálcio mais um quelante (EDTA) na prole de ratos com 60 dias de vida. Dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * p<0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste *t* não pareado. *p<0,05 para representar a diferença significativa entre os grupos PC vs PO.

5.11 Glicemia de jejum (A) e teste de tolerância à insulina (B)

Os dados representados na figura 15A mostram a concentração plasmática de glicose após 12 horas de jejum. A PO apresentou maior glicemia de jejum (PC: $118 \pm 4,8$ vs. PO: $147 \pm 6,6$ mg/dL). Além disso, a figura 15B ilustra que a PO obteve uma menor sensibilidade periférica à insulina no tempo 15 (PC: $97 \pm 3,9$ vs. $118 \pm 4,2$ mg/dL) e no tempo 30 (PC: $77 \pm 4,6$ vs. $97 \pm 3,5$ mg/dL) quando comparados com a PC.

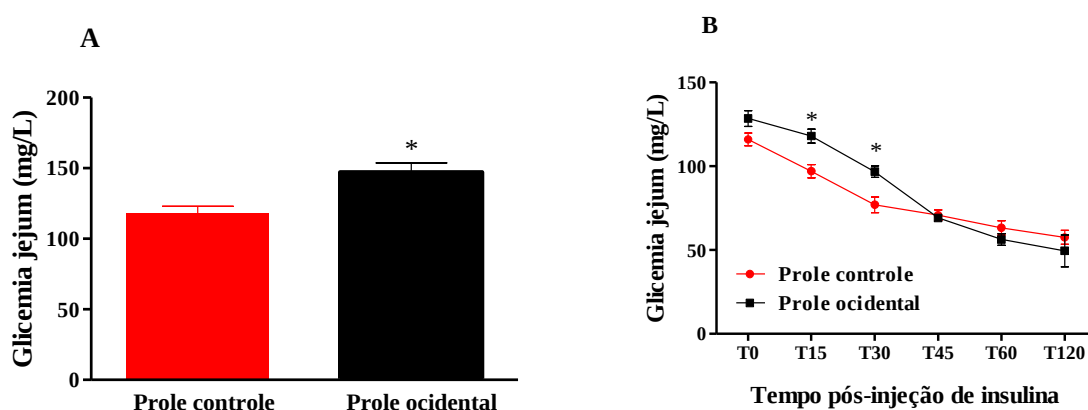


Figura 15. Concentração plasmática da glicose do soro (A) e teste de sensibilidade à insulina (B) em ratos machos com 60 dias de vida. Dados expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole ocidental (PO, $n = 6$); * $p < 0,05$ quando comparados com o controle (PC, $n = 6$). Teste t não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa entre os grupos PC vs PO.

5.12 Concentração dos hidroperóxidos totais

A figura 16 representa a concentração dos hidroperóxidos totais no leito aórtico torácico. A PO apresentou níveis maiores de produtos da peroxidação lipídica (PC: $6,56e -007$ vs. PO: $9,51e -007$ mol/L) quando equiparado com a PC.

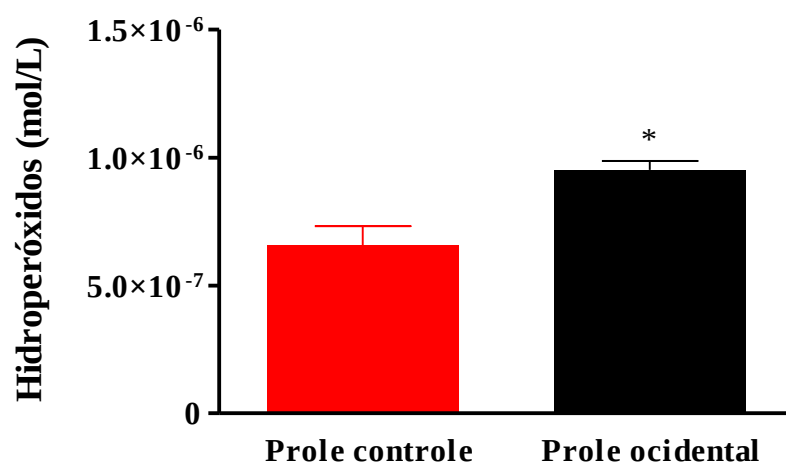


Figura 16. Concentração de hidroperóxidos no leito aórtico torácico de ratos adultos com 60 dias de vida. Os valores foram representados em média $\pm$ EPM e expressos em moles por litro (mol/L). Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste t não pareado.

5.13 Atividade da superóxido dismutase

A figura 17 representa a atividade da superóxido dismutase medida no leito aórtico torácico. A PO apresentou maior responsividade desta enzima antioxidante (PC: $0,026 \pm 0,004$ vs. PO: $0,27 \pm 0,06$, USOD/mg proteína).

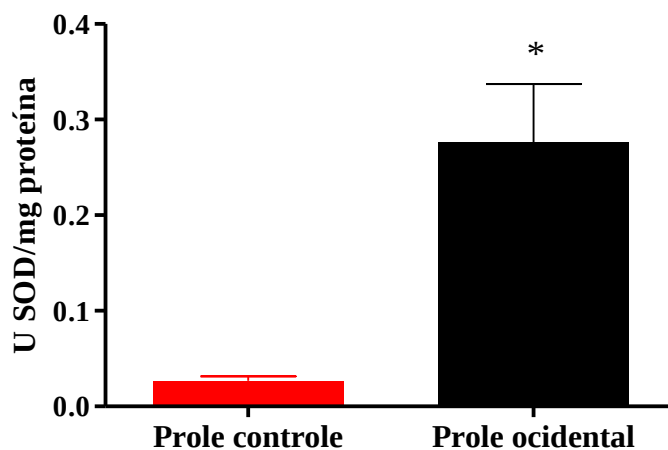


Figura 17. A atividade da SOD foi mensurada na aorta torácica na prole de ratos expostas a dieta controle (PC) ou ocidental (PO) com 60 dias de vida. Dados foram representados em média $\pm$ EPM e expressos em unidade de SOD por miligrama de proteína (U/mg de proteína). Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste t não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa entre os grupos PC vs PO.

5.14 Atividade da catalase

A figura 18 ilustra a atividade da catalase mensurada no leito aórtico torácico. A PO apresentou menor responsividade desta enzima antioxidante (PC: $0,021 \pm 0,03$ vs. PO: $0,08 \pm 0,03$ UCAT/mg proteína) quando comparados com a prole controle.

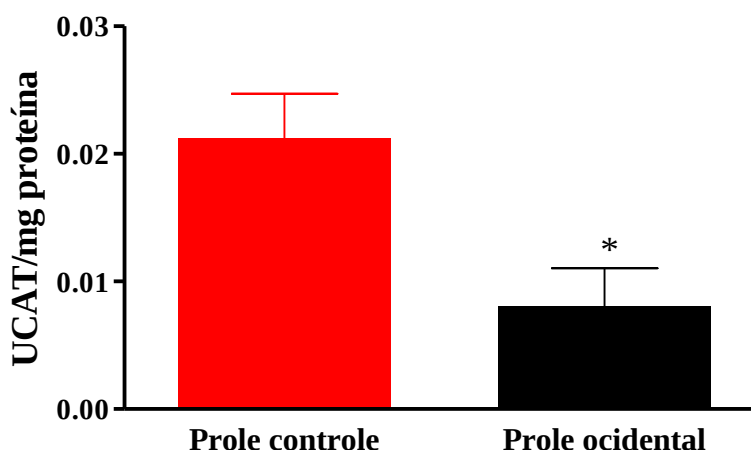


Figura 18. A atividade da catalase foi mensurada na aorta torácica na prole de ratos expostas a dieta controle (PC) ou ocidental (PO) com 60 dias de vida. Dados foram representados em média $\pm$ EPM e expressos pela diferença de absorbância por minuto, por miligrama de proteína ($\Delta E/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). Diferenças significativas da prole controle (PC, n = 6) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). Teste *t* não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa entre os grupos PC vs PO.

5.15 Biodisponibilidade do óxido nítrico basal e estimulado com acetilcolina (10^{-6}M)

Na Figura 19, ilustra-se a produção intracelular de NO basal (-) e estimulados com acetilcolina 10^{-6} mM (+) em anéis do leito aórtico torácico endotélio preservado. A PO reduziu a biodisponibilidade do NO em condição basal (PC: $1,0 \pm 0,03$ vs. PO: $0,4 \pm 0,01$, u.a.) e estimulado (PC: $1,46 \pm 0,04$ vs. PO: $0,88 \pm 0,02$, u.a.) quando comparados com a PC.

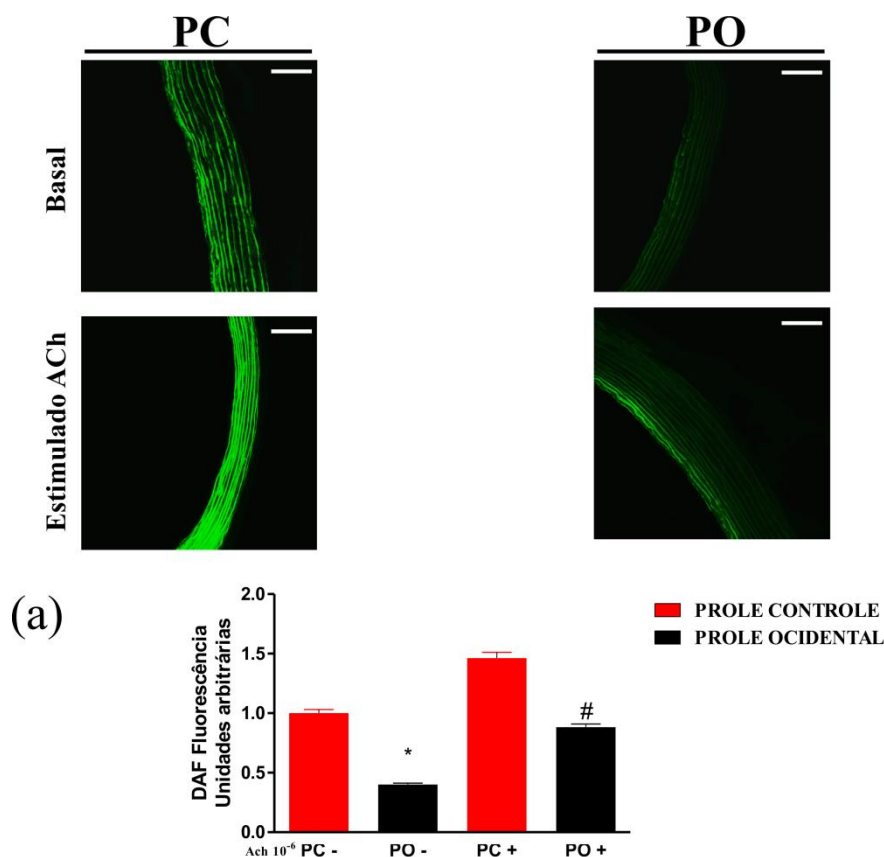


Figura 19. Produção basal de óxido nítrico em anéis do leito aórtico torácico com endotélio funcional da prole de ratos expostos a uma dieta ocidental (PO) ou controle (PC) durante a gestação e a lactação com 60 dias de vida. Escala = 20 μ m. Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas em ambas as situações (basal e estimulado) da prole controle (PC, n = 6) * p < 0,05, quando comparados com a prole ocidental (PO, n = 6). ANOVA one way, com pós-teste de Bonferroni. Foi considerado um. *p < 0,05 para representar a diferença significativa entre os grupos PC vs PO.

5.16 Níveis intracelulares do ânion superóxido

A figura 20 representa a concentração intracelular do ânion superóxido em condição basal em anéis do leito aórtico torácico com endotélio preservado. A PO apresentou uma maior concentração desta espécie reativa de oxigênio (PC: $1,0 \pm 0,06$ vs. PO: $2,06 \pm 0,13$, .u.a.) quando comparados com a PC.

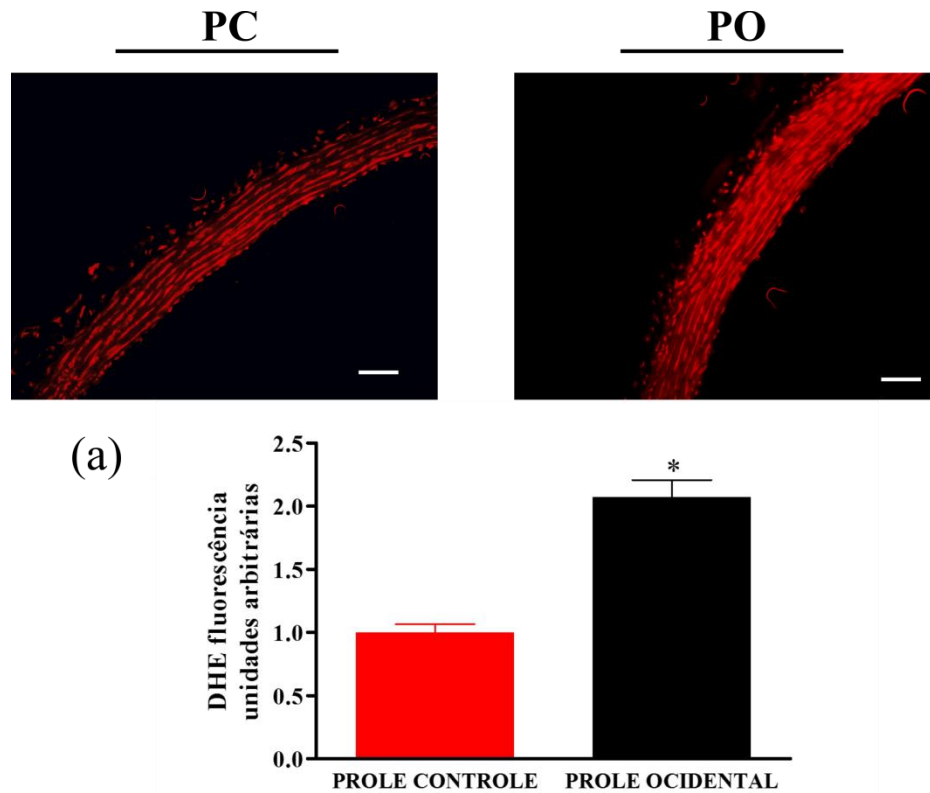


Figura 20. Produção basal de ânion superóxido em anéis do leito aórtico torácico com endotélio funcional da prole de ratos expostos a uma dieta ocidental (PO) ou controle (PC) durante a gestação e a lactação com 60 dias de vida. Dados foram expressos em média $\pm$ EPM. Diferenças significativas da prole controle (PC, $n = 6$) * $p < 0,05$, quando comparados com a prole ocidental (PO, $n = 6$). Teste t não pareado. * $p < 0,05$ para representar a diferença significativa entre os grupos PC vs PO.

6. DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo foi que a exposição da prole durante a vida perinatal a um ambiente obesogênico promoveu alterações no tônus muscular do leito aórtico torácico, tais como nas vias de relaxamento estimulado por acetilcolina e nitroprussiato de sódio e nas de contração estimulado por fenilefrina e agentes despolarizantes (KCl e CaCl_2). Além disso, a dieta ocidental reduziu a biodisponibilidade do NO e aumentou a concentração intracelular do ânion superóxido no leito aórtico torácico na prole de ratos machos com 60 dias de vida.

Um estudo recente publicado pelo nosso grupo de pesquisa mostrou que a exposição de uma dieta ocidental durante a gestação e a lactação na ausência da obesidade promoveu alterações ponderais, hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão arterial associadas à disautonomia cardiovascular na prole de ratos machos com 60 dias de vida (VIDAL et al., 2016). Além disso, Ferro-Cavalcante et al. (2014) mostraram que o mesmo protocolo experimental ocasionou maior depósito de gordura visceral, hipertrofia cardíaca, hiperinsulinemia e intolerância a glicose na prole de ratos machos.

No presente estudo, a PO apresentou hiperglicemia associado à redução na sensibilidade periférica a insulina. Além disso, a PO exibiu menor relaxamento na presença da acetilcolina um agonista muscarínico em anéis da aorta torácica com endotélio preservado e menor sensibilidade ao nitroprussiato de sódio em anéis sem endotélio. Ademais, na presença do , um inibidor (L-NAME) não específico das sintases de óxido nítrico (NOS), a resposta foi abolida em aproximadamente, 91% em anéis com endotélio preservado, mostrando que a via de relaxamento é totalmente depende do óxido nítrico (NO). Adicionalmente, a PO exibiu maior concentração dos produtos da peroxidação lipídica, associado à maior concentração intracelular do ânion superóxido e redução da biodisponibilidade do NO. Dessa forma, é bem documentado na literatura que a disfunção endotelial no sistema vascular é uma das principais complicações do DM e um preditor para doenças cardiovasculares durante o curso da doença (DE HAAN e COOPER, 2011; SITIA et al., 2010). Os dados apresentados mostram que a dieta ocidental ofertada durante a vida perinatal promoveu alterações vasculares nas células endoteliais e musculares lisas devido à redução no relaxamento quando administrados agonistas vasorrelaxantes na ausência e na presença do endotélio.

O sistema cardiovascular se tornar funcional durante a vida intrauterina. O desenvolvimento precoce do sistema circulatório é fundamental para garantir o desenvolvimento e o crescimento adequado da prole (PAIGE et al., 2015). Adicionalmente, durante a lactação, ocorrem numerosos ajustes hemodinâmicos que incluem alterações na frequência cardíaca, resistência vascular periférica e redistribuição do fluxo sanguíneo (DAWES, 1961). Um estudo publicado por Armitage et al. (2005) mostrou que a oferta de uma dieta com 24,3% de lipídios, principalmente de origem saturada durante a gestação alterou a estrutura da aorta, ocasionando redução do volume das células endoteliais, redução do número das células musculares e da elasticidade.

Um estudo realizado por Jarret et al. (2016) mostraram redução do relaxamento à acetilcolina e maior produção intracelular do ânion superóxido em animais saudáveis quando os mesmos foram expostos a uma concentração de 30 milimolar (mM) de glicose. Adicionalmente, quando os anéis foram expostos a um mimético da enzima superóxido dismutase (*tiron*) o relaxamento foi restaurado.

Assim, a hiperglicemia é um dos principais fatores que contribui para o estresse oxidativo através da geração direta das espécies reativas de oxigênio (EROS) ou promovendo alterações no equilíbrio redox (RAINS e JAIN, 2011). A elevação da concentração plasmática de glicose estimula a produção do ânion superóxido através da enzima NADPH oxidase mediado pela proteína quinase C (INOBUCHI et al., 2003). Adicionalmente, a NADPH oxidase é a que mais contribui com a produção dessa molécula tóxica nas células vasculares (KOJDA e HARRISON, 1999). Além disso, o ânion superóxido ou outras espécies reativas de oxigênio pode reagir com a molécula de NO no interior das células endoteliais convertendo-o a peróxido de nitrito (ONOO^-) uma espécie reativa nitrogenada extremamente nociva para o endotélio (NASCIMENTO et al., 2003) que promove o desacoplamento da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (CASSUTO et al., 2014). Outrossim, em estudo realizado por Nyby et al. (2006) verificou-se que uma dieta rica em frutose (60%) ofertada durante quatro semanas aumenta a expressão da enzima NADPH oxidase na aorta e no tecido cardíaco de ratos. O presente estudo mostrou redução da biodisponibilidade do óxido nítrico basal como estimulado pela acetilcolina. Dessa forma, sugere-se que a hiperglicemia e a resistência à insulina, sejam os principais promotores da disfunção endotelial.

A fenilefrina é agonista adrenérgico que interage com receptores que possuem sete domínios transmembrana acoplados a proteína Gq, denominados alfa-1 adrenérgicos

(MINNEMAN, 1988). Promove vasoconstricção através da mobilização do cálcio extracelular e intracelular devido à síntese dos segundos mensageiros inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), respectivamente, com consequente ativação da proteína quinase C (PKC) (MINNEMAN, 1988; ZHANG, HIRAOKA e HIRANO et al., 1998; ZHONG e MINNEMAN 1999). A PO apresentou maior resposta contrátil quando estimulados pela fenilefrina, agonista dos receptores alfadrenérgicos no músculo liso na presença e na ausência do endotélio.

Quando foi realizado a pré-contracção com KCl 60 mM para avaliar a integridade do músculo vascular liso foi observado que a PO apresentou maior força de contracção. Dessa forma, foi necessário realizar curvas concentração resposta com os agentes despolarizantes (KCl e $CaCl_2$). Adicionalmente, quando realizado os protocolos foi comprovado que a dieta ocidental também promoveu aumento da força de contracção pelo processo de despolarização quando expostos a concentrações crescentes e cumulativas de KCl e $CaCl_2$. Além disso, a PO mostrou maior contracção transitória com o cálcio armazenado no interior do retículo sarcoplasmático quando estimulados com fenilefrina 10^{-6} mM em uma solução livre de cálcio mais EDTA. É bem documentado na literatura que a ativação dos receptores adrenérgicos nas células endoteliais resulta em vasodilatação através da liberação de NO (BOER et al., 1999; FILIPPI et al., 2001). Adicionalmente, a redução na biodisponibilidade do óxido nítrico e um aumento na produção do ânion superóxido são as principais disfunções vasculares que desencadeiam a fisiopatologia da hipertensão arterial sistêmica (HAS) (GRUNFELD et al., 1995; WEI et al., 1985).

Adicionalmente, a exposição da prole a solução com 20% de frutose introduzida durante a gestação aumentou a expressão dos receptores da angiotensina II associados a mecanismos epigenéticos na aorta de ratos da linhagem Sprague-Dawley (WU et al., 2016). É importante destacar, que a quantidade de frutose presente na dieta utilizada neste estudo é similar a do supracitado. Ademais, estimulação simpática e ativação de receptores alfadrenérgicos em aortas isoladas de ratos normotensos aumentam a resposta contrátil das células musculares lisas via SRA (MAESO et al., 1996; MALIK e NASJLETTI 1976; ZIOGAS e STORY 1987).

Um estudo publicado Rodrigo et al. (2016) mostrou que a introdução de uma solução com 10% de frutose durante a gestação não alterou os produtos da peroxidação lipídica no plasma, fígado e tecido adiposo materno. No entanto, a exposição da prole com a mesma

solução promoveu uma maior concentração do malonaldeído (MDA) no plasma, no fígado e na placenta e redução na expressão da hemeoxigenase-1 (HO-1) na placenta um potente antioxidante endógeno com 21 dias de vida em ratos. Dessa forma, a manipulação dietética durante a vida intrauterina é determinante para desencadear o estresse oxidativo na vida pós-natal.

O presente trabalho mostrou que os animais expostos a uma dieta ocidental durante a vida perinatal apresentaram níveis maiores de marcadores do estresse oxidativo. Além disso, a PO aumentou a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD). Esse aumento da atividade dá-se pela maior produção do ânion superóxido, o substrato catalizado por esta enzima, que promove reação de dismutação, convertendo-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2).

Adicionalmente, a PO apresentou menor atividade da enzima catalase que decompõe o H_2O_2 em água (H_2O) e O_2 . A catalase é uma proteína que possui uma cadeia polipeptídica de estrutura quaternária idênticas, com um grupo heme com íon de ferro (Fe^{3+}) localizado no centro da cadeia que atua como um agente redox (ZÁMOCKÝ e KOLLER 1999; CHELIKANI RAMANA e RADHAKRISHNAN 2005). É bem documentado na literatura que o ânion superóxido reduz a atividade da enzima catalase devido a oxidação do Fe^{3+} localizado no centro desta molécula (KONO e FRIDOVICH 1982; SHIMIZU KOBAYASHI e HAYASHI 1984). Consequentemente, sempre que H_2O_2 interage com metais de transição (Cu^{2+} e Fe^{2+}) é gerado os radicais $OH^\cdot$ altamente reativo, que são capazes de danificar os lipídios de membrana de todas as biomoléculas (Halliwell, 2001). Com os dados apresentados, sugere-se que a PO apresenta maior nível de H_2O_2 no tecido aórtico. Ademais, o H_2O_2 desempenha um papel importante na homeostase vascular e, em concentrações patológicas, pode causar disfunção endotelial e aumentar a resposta contrátil na aorta (SATO et al., 2014).

O H_2O_2 pode ser sintetizado pelas células endoteliais e musculares lisas (GRIENDLING et al., 2000). Ademais, é um substrato que tem ação bifásica na regulação do tônus vascular, ocasionando vasoconstrição (JIN e RHOADES 1997; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1998; HIBINO et al., 1999; YANG et al., 1999; GAO e LEE 2001). e vasodilatação (FUJIMOTO et al., 2001). Em aortas com e sem endotélio, a ativação do receptor alfa-1-adrenérgico estimula a síntese do H_2O_2 (SILVA et al., 2013). Adicionalmente,

não foram identificados receptores na superfície celular para o H_2O_2 . No entanto, esta molécula consegue atravessar facilmente membrana plasmática. Dessa forma, os mecanismos que envolvem contração de anéis isolados de aorta são de origem intracelular (SALVEMINI e BOTTING, 1993; SALVEMINI et al., 1993).

Um dos trabalhos pioneiros que mostrou os mecanismos envolvidos no processo de contração da aorta isolada de ratos através do H_2O_2 foi realizado por Yang et al. (1998), evidenciando a associação desse substrato com o aumento da concentração intracelular de cálcio, a partir do meio extracelular e dos estoques do retículo sarcoplasmático. Um dos mecanismos propostos pelo estudo supracitado é que o H_2O_2 aumenta o catabolismo do ácido araquidônico, promovendo aumento dos seus metabólitos (prostaglandinas e tromboxanos) pela via da cicloxigenases. Estes metabólitos aumentam a concentração intracelular de IP_3 via degradação do fosfatidilinositol -4-5- bifosfato, potencializando a resposta contrátil. Esses dados foram confirmados através de uma curva concentração resposta do H_2O_2 na presença da indometacina, um inibidor das cicloxigenases. Ademais, o H_2O_2 aumenta o influxo de cálcio através dos canais tipo L voltagem dependente em células musculares lisas (SASAKI e OKABE, 1993).

Adicionalmente, o H_2O_2 pode ativar diretamente a fosfolipase C que degrada fosfolipídios de membrana em IP_3 que interage com receptores no retículo sarcoplasmático, promovendo a mobilização para o citosol e o DAG, que ativa a proteína quinase C promovendo a fosforilação de canais de cálcio na membrana plasmática e estimulando a maquinaria contrátil na aorta (SHASBY et al., 1988). O presente estudo mostrou maior resposta contrátil na PO. Dessa forma, sugere-se a participação do estresse oxidativo nesta disfunção vascular é mediada, principalmente, pela redução da biodisponibilidade do óxido nítrico e um aumento nas concentrações do H_2O_2 .

7. CONCLUSÃO

Os achados do presente estudo mostraram que a exposição da prole a uma dieta ocidental na ausência da obesidade aumentou a concentração plasmática de glicose associado a uma redução na sensibilidade periférica à insulina. Além disso, a hiperglicemia e alterações no mecanismo de transdução de sinal da insulina têm associação com o aumento dos produtos da peroxidação lipídica e dos níveis intracelulares do ânion superóxido. Adicionalmente, a dieta ocidental ocasionou um desbalanço nas defesas antioxidantes através do aumento da atividade da superóxido dismutase e redução na atividade da catalase, instalando um quadro denominado estresse oxidativo o qual promoveu alterações vasculares importantes, tais como redução no relaxamento e maior resposta contrátil associado principalmente à menor biodisponibilidade do óxido nítrico e elevação das concentrações intracelulares de cálcio.

Dessa forma, concluímos que exposição dos descendentes a dietas com o padrão ocidental em períodos críticos de desenvolvimento promoveu alterações vasculares associadas ao estresse oxidativo. Esses achados são eventos fisiopatológicos importantes que aumentam o risco do desenvolvimento das doenças cardiovasculares da prole na vida adulta.

REFERÊNCIAS

1. Aires RD, Capettini LS, Silva JF, et al. Paraquat poisoning induces TNF-alpha-dependent iNOS/NO mediated hyporesponsiveness of the aorta to vasoconstrictors in rats. *PLoS One*;2013; 8(9), e73562.
2. Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med*. 2004; 32(5 Suppl), S271-9.
3. Akata T. Cellular and molecular mechanisms regulating vascular tone. Part 1: basic mechanisms controlling cytosolic Ca²⁺ concentration and the Ca²⁺-dependent regulation of vascular tone. *J Anesth*. 2007; 21(2), 220-31.
4. Apovian CM, Bigornia S, Mott M, et al. Adipose macrophage infiltration is associated with insulin resistance and vascular endothelial dysfunction in obese subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28(9), 1654-9.
5. Aragno M, Parola S, Tamagno E, et al. Oxidative derangement in rat synaptosomes induced by hyperglycaemia: restorative effect of dehydroepiandrosterone treatment. *Biochem Pharmacol*. 2000; 60, 389-395.
6. Armitage JA, Lakasing L, Taylor PD, et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol*. 2005; 15, 171-84.
7. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*.1977; 74(8), 3203-7.
8. Barber MC, Clegg RA, Travers MT, et al. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1347, 101-126.
9. Barker DJP, Martyn CN. The maternal and fetal origins of cardiovascular disease. *J Epidemiol Community Health*. 1993; 46, 8-11.
10. Barker DJP, Gluckman PD, Godfrey KM, et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993; 341, 938-941.
11. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol*. 2006; 49, 270-83.
12. Barreto-Medeiros J, Queiros-Santos A, Cabral-Filho JE, et al. Stress/Aggressiveness-Induced Immune Changes Are Altered in Adult Rats Submitted to Neonatal Malnutrition. *Neuroimmunomodulat*. 2007; 14, 229-334.
13. Barros MA, De Brito Alves JL, Nogueira VO, et al. Maternal low-protein diet induces changes in the cardiovascular autonomic modulation in male rat offspring. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2015; 25, 123-30.
14. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991; 40, 405-412.

15. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999; 48, 1-9.
16. Behl C, Moosmann B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 2002; 33, 182 -191.
17. Beltowski J. Role of leptin in blood pressure regulation and arterial hypertension. *J Hypertens*. 2006; 24(5), 789-801.
18. Biessels GJ, Van Der Heide LP, Kamal A, et al. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 2002; 441, 1-14.
19. Boer C, Scheffer GJ, De Lange JJ. et al. Alpha1-adrenoceptor stimulation induces nitric oxide release in rat pulmonary arteries. *J Vasc Res*. 1999; 36, 79–81.
20. Boo YC, Hwang J, Sykes M, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A dependent mechanism. *Am J of Physiol. Heart Circ Physiol*. 2002; 283, H1819-28.
21. Bose R, Sutherland GR, Pinsky C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochem Res*. 1989; 14(3), 217-20.
22. Bouallegue A, Daou GB, Srivastava AK. Nitric oxide attenuates endothelin-1-induced activation of ERK1/2, PKB, and Pyk2 in vascular smooth muscle cells by a cGMP-dependent pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293(4), H2072-9
23. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414, 813-820.
24. Büscher R, Herrmann V, Ring KM, et al. Variability in phenylephrine response and essential hypertension: a search for human alpha(1B)-adrenergic receptor polymorphisms. *The J of pharmacol and exp ther*. 1999; 291(2), 793–8.
25. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007; 15, 798-808.
26. Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, et al. Epigenetic regulation of transcription: A mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life. *Br. J. Nutr.* 2007; 97, 1036–1046.
27. Cabral GA. Lipids as bioeffectors in the immune system. *Life Sci*. 2005; 77, 1699-1710.
28. Callera GE, Yogi A, Tostes RC, et al. Ca²⁺-activated K⁺ channels underlying the impaired acetylcholine-induced vasodilation in 2K-1C hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 309(3), 1036-42.
29. Carvalho, MHC; Colaço, AL; Fortes, ZB. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. *Arq Bras EndocrinolMetab*. 2006; 50(2), 304-312.

30. Carvalho MF, Evangelista da Costa MKM, Muniz GS, et al. Experimental diet based on the foods listed in the Family Budget Survey is more detrimental to growth than to the reflex development of rats. *Rev. Nutr.* 2013; 26, 177–196.
31. Cassuto J, Dou H, Czikora I, et al. Peroxynitrite disrupts endothelial caveolae leading to eNOS uncoupling and diminished flow-mediated dilation in coronary arterioles of diabetic patients. *Diabetes.* 2014; 63(4), 1381-93.
32. Cerf ME. and Louw J High fat programming induces glucose intolerance in weanling Wistar rats." *Horm Metab Res.* 2010; 42(5), 307-310.
33. Cesaretti MLR, Junior OK. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2006; 50, 190-197.
34. Chadha PS, Haddock RE, Howitt L, et al. Obesity up-regulates intermediate conductance calciumactivated potassium channels and myoendothelial gap junctions to maintain endothelial vasodilator function. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 335(2), 284-93.
35. Chang KC, Chung SY, Chong WS, et al. Possible superoxide radical induced alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin -treated rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993; 266, 992-1000.
36. Chelikani P, Ramana T, Radhakrishnan TM. Catalase: A repertoire of unusual features. *Indian J Clin Biochem.* 2005; 20(2), 131-5.
37. Chen H, Montagnani M, Funahashi T, et al. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2003; 278(45), 45021-6.
38. Chopra M, Galbraith S, Darnton-Hill I. A global response to a global problem: the epidemic of overnutrition. *Bulletin of the World Health Organization.* 2002, 80, 952-958.
39. Cho YE, Ahn DS, Morgan KG, et al. Enhanced contractility and myosin phosphorylation induced by Ca(2+)-independent MLCK activity in hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2011; 91(1), 162-70.
40. Clandinin MT, Chappell JE, Leong S, et al. Intrauterine fatty acid accretion rates in human brain: implications for fatty acid requirements. *Early Hum Dev.* 1980; 4, 121-129.
41. Coletta JM, Bell SJ, Roman AS. Omega-3 Fatty acids and pregnancy. *Rev Obstet Gynecol.* 2010; 3, 163-171.
42. Connor WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71, 171-175.
43. Crawford MA, Hassam AG, Williams G. Essential fatty acids and fetal brain growth. *Lancet.* 1976; 28, 452-3.
44. Crawford MA, Hassam AG, Stevens PA. Essential fatty acid requirements in pregnancy and lactation with special reference to brain development. *Prog Lipid Res.* 1981; 20, 31-40.

45. Da Cunha J, Macedo Da Costa TH, Ito MK. Influences of maternal dietary intake and suckling on breast milk lipid and fatty acid composition in low-income women from Brasilia, Brazil. *Early Hum Dev.* 2005; 81, 303-311.
46. Da Luz PL, Libby P, Chagas ACP, et al. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Endotélio e doenças cardiovasculares.. São Paulo. *Atheneu*, 2003.
47. Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay, A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 2004; 25(1), 4-7.
48. Davidowa H, Plagemann A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport.* 2001; 12, 3201-4.
49. Dawes GS. Changes in the circulation at birth. *Br. Med. Bull.* 1961; 17, 148-153.
50. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation.* 2007; 115, 1285-95.
51. De Haan JB, Cooper ME. Targeted antioxidant therapies in hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011; 1(3), 709-29.
52. De Wit C, Wolfle SE. EDHF and gap junctions: important regulators of vascular tone within the microcirculation. *Curr Pharm Biotechnol.* 2007; 8(1), 11-25.
53. Dietz WH. Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr.* 1994; 59, 955-959.
54. Diez GRW. Reflexos da globalização na cultura alimentar: considerações sobre as mudanças na alimentação urbana. *Rev. Nutr.* 2003; 16, 483-492.
55. Donne ID, Ranieri R, Roberto C, et al. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.* 2006; 52, 601-623.
56. Dusse LM, Vieira LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico. *J Bras de Patol e Med Lab.* 2003; 39, 343-50.
57. Feletou M, Huang Y, Vanhoutte PM. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(3), 894-912.
58. Feoli AM, Roehrig C, Rotta LN, et al. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. *Nutrition.* 2003; 19, 789-793.
59. Ferrannini, E; Natali, A; Capaldo, B; et al. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. *Hypertension* 1997; 30, 1144-9.
60. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais Livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Ver. Ass. Med. Brasil.* 1997; 43, 61-68.

61. Ferro Cavalcante TC, Lima da Silva JM, da Marcelino da Silva AA, et al. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. *Lipids*. 2013; 48, 1157-1168.
62. Ferro Cavalcante TC, Marcelino da Silva AA, Lira MC, et al. Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring. *Int J Food Sci Nutr*. 2014; 65(8), 989-93.
63. Fesus G, Dubrovskaya G, Gorzelniak K, et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res*. 2007; 75(4), 719-27.
64. Filippi S, Parenti, A, Donnini S, et al. Alpha(1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 296, 869–875.
65. Fisslthaler B, Fleming I, Busse R. EDHF: a cytochrome P450 metabolite in coronary arteries. *Semin Perinatol*. 2000; 24(1), 15-9.
66. Foreman-Van Drongelen MM, Van Houwelingen AC, Kester, AD, et al. . Long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants: status at birth and its influence on postnatal levels. *J Pediatr*. 1995; 126, 611-618.
67. Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*. 1994; 23, 1121-31.
68. Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiol*. 2006; 21, 29-37.
69. Freeman LR, Haley-Zitlin V, Stevens C, et al. Diet-induced effects on neuronal and glial elements in the middle-aged rat hippocampus. *Nutr Neurosci*. 2011; 14, 32-44.
70. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1975; 44, 147-159
71. Frosali S, Di Simplicio P, Perrone S, et al. Glutathione recycling and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of term and preterm newborns at birth. *Biol Neonate*. 2004; 85(3),188-94.
72. Furchgott RF, Zawadzki JV The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288(5789), 373-6.
73. Fujimoto S, Asano T, Sakai, M, et al. Mechanisms of hydrogen peroxide- induced relaxation in rabbit mesenteric small artery. *Eur. J. Pharmacol*. 2001; 412, 291 – 300.
74. Fukui T, Ishizaka N, Rajagopalan S, et al. p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circ Res*. 1997; 80, 45-51.
75. Gao YJ, Lee RMKW. Hydrogen peroxide induces a greater contraction in mesenteric arteries of spontaneously hypertensive rats through thromboxane A2 production. *Br. J. Pharmacol*. 2001; 134, 1639 – 1646.

76. Gao YJ, Lu C, Su LY, et al. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol*. 2007; 151(3), 323-31.
77. Gao Y. The multiple actions of NO. *Pflugers Arch*. 2009; 459(6), 829-39.
78. Garland CJ, Hiley CR, Dora KA. EDHF: spreading the influence of the endothelium. *Br J Pharmacol*. 2010; 164(3), 839-52.
79. Georgieff MK, Innis SM. Controversial nutrients that potentially affect preterm neurodevelopment: essential fatty acids and iron. *Pediatr Res*. 2005; 57, 99-103.
80. Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovascular Research*. 2002; 55, 250-60.
81. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010; 107, 1058-1070.
82. Gibson RA, Muhlhausler B, Makrides M. Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Matern Child Nutr*. 2011; 7, 17-26.
83. Gil-Ortega M, Condezo-Hoyos L, García-Prieto CF, et al. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates longterm high-fat diet-derived endothelial dysfunction. *PLoS ONE*. 2014; 9, e95312.
84. Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*. 2004; 305,1733–6.
85. Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, et al. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. *Hypertension*. 1995; 26(6 Pt 1), 854-7.
86. Godfrey KM, Barker DJP. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71, 1344–52.
87. Godfrey KM, Barker DJP. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutrition*. 2001; 4, 611-624.
88. Green LC, Tannenbaum SR, Goldmann P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science* 1981; 212, 56-58.
89. Green DJ, O'driscoll G, Blanksby BA, et al. Control of skeletal muscle blood flow during dynamic exercise: contribution of endothelium-derived nitric oxide. *Sports Medicine*. 1996; 21, 119-46.
90. Griffith TM, Chaytor AT, Edwards DH. The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. *Pharmacol Res*. 2004; 49(6), 551-64.
91. Gupte SA, Kaminski PM, Floyd B, et al. Cytosolic NADPH may regulate differences

in basal Nox oxidase-derived superoxide generation in bovine coronary and pulmonary arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288, H13-21.

92. Gupte SA, Levine RJ, Gupte RS, et al. Glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH fuels superoxide production in the failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41, 340-349

93. Gustafson B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2010; 17(4), 332-41.

94. Hajer GR, Van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J.* 2008; 29(24), 2959-71.

95. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186, 1-85.

96. Halliwell B, Gutteridge MC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3ed. New York: Oxford. 1999 University Press Inc.

97. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 2001; 18, 685-716.

98. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142, 231-255.

99. Halliwell B, Gutteridge JM. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. In: Halliwell B, Gutteridge JMC (eds) Free Rad. Biol. Med. Oxford University Press Inc., Oxford: 2007; 187-267

100. Hambrecht R, Adams V, Erbs S, et al. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation.* 2003; 107(25), 3152-8.

101. Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta.* 2002a; 23, 9-19.

102. Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine.* 2002b; 19, 43-55.

103. Herrera E, Amusquivar E, Lopez-Soldado I, et al. Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res.* 2006; 65, 59-64.

104. Hibino M, Okumura K, Iwama Y, et al. Oxygen-derived free radical-induced vasoconstriction by thromboxane A2 in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999; 33, 605 – 610.

105. Hsueh WA, Lyon, CJ, Quiñones MJ. Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med* 2004; 117, 109-17.

106. IBGE, POF 2008-2009: Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil 2010.
107. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(24), 9265-9.
108. Innis SM. Perinatal biochemistry and physiology of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr*. 2003; 143, 1-8.
109. Innis SM. Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr*. 2007; 137, 855-859.
Innis SM. Dietary omega 3 fatty acids and the developing brain. *Brain Res*. 2008; 1237, 35-43.
110. Inoguchi T, Sonta TT, Subouchi H, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol*. 2003; (14), S227-S232
111. Jarrett CL, Ahmed Z, Faust JJ, et al. High glucose impairs acetylcholine-mediated vasodilation in isolated arteries from Mourning doves (*Z. macroura*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2016 ;201, 141-5.
112. Jonk AM, Houben AJ, De Jongh RT, et al. Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology (Bethesda)*. 2007; 22, 252-60.
113. Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal biochem*. 1992; 202(2), 384-389.
114. Jin N, Rhoades RA. Activation of tyrosine kinases in H₂O₂-induced contraction in pulmonary artery. *Am.J.Physiol*. 1997; 272, H2686 – H2692
115. Karaki H, Ozaki H, Hori M, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*. 1997; 49(2), 157-230.
116. Khan IY, Taylor PD, Dekou V, et al. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension*. 2003; 41, 168–175.
117. Khan IY, Dekou V, Douglas G, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp.Physiol*. 2005; 288, 127–133.
118. King JC, Butte NF, Bronstein MN, et al. Energy metabolism during pregnancy: influence of maternal energy status. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59, 439-445.
119. Kagota S, Yamaguchi Y, Tanaka N, et al. Disturbances in nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate system in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci*. 2006; 78(11), 1187-96.

120. Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular Research*. 1999; 43, 562-71.
121. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, et al. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Dev*. 2001; 65, 3-18.
122. Kono Y, Fridovich I. Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem*. 1982; 257, 5751–5754
123. Kumar JS, Menon VP. Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism*. 1993; 42, 1435-1439.
124. Langley-Evans SC. Developmental programming of health and disease. *Nutrition Society*. 2006; 65, 97–105.
125. Leaf AA, Leighfield MJ, Costeloe KL, et al. Long chain polyunsaturated fatty acids and fetal growth. *Early Hum Dev*. 1992; 30, 183-191.
126. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995; 333(6), 356-63.
127. Leung YM, Kwan CY. Dual vascular effects of leptin via endothelium: hypothesis and perspective. *Chin J Physiol*. 2008; 51(1), 1-6.
128. Li J, Cao YX, Liu H, et al. Enhanced G-protein coupled receptors-mediated contraction and reduced endothelium-dependent relaxation in hypertension. *Eur J Pharmacol*. 2007; 557(2-3), 186-94.
129. Lohn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, et al. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. *FASEB J*. 2002; 16(9), 1057-63.
130. Lopez-Luna P, Munoz T, Herrera E. Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation. *Life Sci*. 1986; 39, 1389-1393.
131. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1), 265-275.
132. Lucas A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr*. 1998; 128, 401-406.
133. Madesh M, Balasubramanian KA. Microtiter plate assay for superoxide dismutase using MTT reduction by superoxide. *J Biochem Biophys*. 1998; 35(3), 184-8.
134. Maeso R, Navarro-Cid J, Muñoz-García R, et al. Losartan Reduces Phenylephrine Constrictor Response in Aortic Rings From Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 1996; 28, 967-972.
135. Malik KU, Nasjletti A. Facilitation of adrenergic transmission by locally generated angiotensin II in rat mesenteric arteries. *Circ Res*. 1976; 38, 26-30.

136. Martins RN, Stokes GB, Masters CL. Regulation of liver and brain hexose monophosphate dehydrogenases by insulin and dietary intake in the female rat. *Mol. Cell Biochem.* 1986; 70, 169-175.
137. Matheus AS, Tannus LR, Cobas RA, et al. Impact of Diabetes on Cardiovascular Disease: An Update. *Int J Hypertens.* 2013; 2013, 653789.
138. Marks DB, Marks AD, Smith, CM. Basic Medical Biochemistry: a clinical approach. Maryland: *Lippincott Williams & Wilkins.* 1996, 143.
139. Mccardle HJ, Andersen HS, Jones H, et al. Fetal programming: causes and consequences as revealed by studies of dietary manipulation in rats. a review. *Placenta.* 2006; 27, 56-60.
140. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969; 244, 6049 -6055.
141. Mccord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The Am J of Med.* 2000; 108, 652-9.
142. Morgane PJ, Austin-Lafrance R, Bronzino J. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993; 17, 91-128.
143. Mehta SH. Nutrition and pregnancy. *Clin Obstet Gynecol.* 2008; 51, 409-418.
144. Melo MED. Custos da obesidade no Brasil e no mundo. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. *ABESO.* 2011.
145. Mendizabal Y, Llorens S, Nava E. Reactivity of the aorta and mesenteric resistance arteries from the obese spontaneously hypertensive rat: effects of glitazones. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011; 301(4); H1319-30.
146. Minneman KP. Alfa1-adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. *Pharmacol Rev.* 1988; 40, 87–119, 1988.
147. Moncada S, Herman AG, Higgs EA, et al., Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res.* 1977; 11(3), 323-44.
148. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension.* 1988; 12(4), 365-72.
149. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl j med.* 1993; 329(27), 2002–12, 1993.
150. Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, et al. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev.* 2007. 28(5), 463-91.
151. Nascimento CA, Patriarca G, Heimann .C. Estrutura orgânica do endotélio vascular. In: Endotélio e doenças cardiovasculares. Da Luz PL, Laurindo FRM, Chagas ACP. São Paulo: Atheneu, 2003.

152. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem.* 1972; 49(2), 474-8.
153. Neuringer M, Connor WE. n-3 fatty acids in the brain and retina: evidence for their essentiality. *Nutr Rev.* 1986; 44, 285-294.
154. NG HK, Ting FP, Lam SK, et al. Potassium channel openers and prostacyclin play a crucial role in mediating the vasorelaxant activity of *Gynura procumbens*. *BMC complement altern med.* 2013; 13, 188.
155. Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, et al. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288(4), H1770-6.
156. Nyby MD, Abedi K, Smutko V, et al. Vascular angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens. Res.* 2007; 30, 451–457.
157. Ogut O, Brozovich FV. Regulation of force in vascular smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol.* 2003; 35(4), 347-55.
158. Oliveira-Sales EB, Dugaich AP, Carillo BA, et al. Oxidative stress contributes to renovascular hypertension. *Am J Hypertens.* 2008; 21, 98-104.
159. Ozanne SE, Lewis R, Jennings BJ, et al. Early programming of the weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. *Clin. Sci.* 2004; 106, 141-145.
160. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007; 87(1), 315-424.
161. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 1967; 70(1), 158-69.
162. Paige SL, Plonowska K, Xu A, et al. Molecular regulation of cardiomyocyte differentiation. *Circ. Res.* 2015; 116, 341-53.
163. Palinski W, D'Armiento FP, Witztum JL, et al. Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circ. Res.* 2001; 89, 991–996.
164. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987; 327(6122), 524-6.
165. Park YM, Lim BH, Touyz RM, et al. Expression of NAD(P)H oxidase subunits and their contribution to cardiovascular damage in aldosterone/salt-induced hypertensive rat. *J Korean Med Sci.* 2008; 23, 1039-45.

166. Polytarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J of Pharma*. 2005; 510, 31-8, 2005.
167. Prohaska JR, Oh SH, Hoekstra WG, Ganther HE. Glutathione peroxidase: inhibition by cyanide and release of selenium. *Biochem Biophys Res Commun*. 1977; 4, 64-71.
168. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, diabetes. *Free Radic. Biol. Med*. 2011; 50, 567-575.
169. Rasouli N, Molavi B, Elbein SC, et al. Ectopic fat accumulation and metabolic syndrome. *Diabetes Obes Metab*. 2007; 9(1), 1-10.
170. Ren LM, Nakane T, Chiba S. Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilation and vasoconstriction in isolated, perfused simian coronary arteries. *J of cardiovasc pharmacol*. 1993; 22(6), 841-6.
171. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*. 1993; 123, 1939-1951
172. Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, et al. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. *J Appl Physiol*. 2005;. 98, 203-10.
173. Rodriguez A, Fortuño A, Gómez-Ambrosi J, et al. The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide dependent mechanism. *Endocrinology*. 2007; 148(1); 324-31.
174. Rodrigo S, Rodríguez L, Otero P, et al. Fructose during pregnancy provokes fetal oxidative stress: The key role of the placental heme oxygenase-1. *Mol Nutr Food Res*. 2016; 60(12), 2700-2711.
175. Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EG, Baena, AB, et al. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br. J. Pharmacol*. 1998; 125, 1329 – 1335
176. Salvador M, Henriques JAP. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. 1ª edição. 2004. Canoas, RS: editora Ulbra.
177. Salvemini D, Botting R. Modulation of platelet function by free radicals and free-radical scavengers. *Trends Pharmacol Sci*. 1993; 14(2), 36-42.
178. Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(15), 7240-4
179. Santos-Monteiro J, Guedes RCA, Manhães-De-Castro R, et al. Estimulação psicossocial e plasticidade cerebral em desnutridos. *Rev. Bras. Saude Mater. Infant*. 2002; 2, 101-108.

180. Sasaki H, Okabe E. Modification by hydroxyl radicals of functional reactivity in rabbit lingual artery. *Jpn. J. Pharmacol.* 1993; 62, 305–314
181. Serpillon S, Floyd BC, Gupte R.S, et al. Superoxide production by NAD(P)H oxidase and mitochondria is increased in genetically obese and hyperglycemic rat heart and aorta before the development of cardiac dysfunction. The role of glucose-6-phosphate dehydrogenase-derived NADPH. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297, H153-162.
182. Sharma V, Dhillon P, Wambolt R, et al. Metoprolol improves cardiac function and modulates cardiac metabolism in the streptozotocin-diabetic rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294(4), H1609-20.
183. Shasby DM, Yorek M, Shasby SS. Exogenous oxidant initiate hydrolysis of endothelial cell inositol phospholipids. *Blood.* 1988; 72, 491–499
184. Shimizu N, Kobayashi K, Hayashi, K. The reaction of superoxide radical with catalase. *J. Biol. Chem.* 1984; 259, 4414–4418.
185. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27, 916-921.
186. Silva BRB. Sinalização de Ca²⁺ na contração celular in Sinalização de Cálcio: Bioquímica e Fisiologia Celulares, R.R. Resende, Guatimosim, S.; Leite, M. F., Editor. 2012, Sarvier, 2012: São Paulo.
187. Silva BR, Pernomian L, Grando MD, et al. Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 2013; 5;721(1-3), 193-200.
188. Silva-Filho JC, Oliveira NN, Arcanjo DD et al. Investigation of mechanisms involved in (-)-borneol-induced vasorelaxant response on rat thoracic aorta. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2012; 110(2), 171-7
189. Singhal A, Farooqi IS, Cole TJ, et al. Influence of leptin on arterial distensibility: a novel link between obesity and cardiovascular disease? *Circulation.* 2002; 106(15), 1919-24.
190. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.* 2010; 9(12), 830-4.
191. Sivitz WI, Wayson SM, Bayless ML, et al. Obesity impairs vascular relaxation in human subjects: hyperglycemia exaggerates adrenergic vasoconstriction arterial dysfunction in obesity and diabetes. *J Diabetes Complications.* 2007; 21(3), 149-57.
192. Smart JL, Dobbing J. Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.* 1971; 28, 85-95.
193. Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(1), 28-38.

194. Stapleton PA, James ME, Goodwill AG, et al. Obesity and vascular dysfunction. *Pathophysiology*. 2008; 15(2), 79-89.
195. Satoh K, Godo S, Saito H, et al. Dual roles of vascular-derived reactive oxygen species—with a special reference to hydrogen peroxide and cyclophilin A. *J.Mol.Cell.Cardiol*. 2014; 73, 50-6.
196. Suzuki H, Swei A, Zweifach BW, et al. In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography. *Hypertension*. 1995; 25, 1083-9.
197. Symonds ME, Budge H, Stephenson T, et al. Fetal endocrinology and development manipulation and adaptation to long-term nutritional and environmental challenges. *Reproduction*. 2001; 121, 853–862.
198. Shimokawa H. Hydrogen peroxide as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Pflugers Arch*. 2010; 459(6), 915-22.
199. Snyder SH, Brecht DS. Biological role of nitric oxide. *Science Am* 1992; 266, 68-77.
200. Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82, 7738-7742.
201. Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Endothelial dysfunction in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2001; 38 Suppl 2, S11-4.
202. Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, et al. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes*. 2009; 58(5), 1116-1125.
203. Tamashiro KLK, Moran TH. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring, *Physiology & Behavior*. 2010; 100, 560–566.
204. Taylor PD, McConnell J, Khan IY, et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2005; 288, 134–139.
205. Toscano AE, Manhaes-De-Castro R, Canon F. Effect of a low-protein diet during pregnancy on skeletal muscle mechanical properties of offspring rats. *Nutrition*. 2008; 24, 270-8.
206. Triggle CR, Hollenberg M, Anderson TJ, et al. The endothelium in health and disease: a target for therapeutic intervention. *Journal of Smooth Muscle Research*. 2003; 39, 249-67.
207. Tsai CS, Chen Q. Regulation of D-glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Cell Biol*. 1998; 76(4), 645-8.
208. Vidal-Santos R, Macedo FN, Santana MNS, et al. Western diet in the perinatal period promotes dysautonomia in the offspring of adult rats. *J Dev Orig Health Dis*. 2016; 8(2), 216-225.

209. Villalpando S, Del Prado M. Interrelation among dietary energy and fat intakes, maternal body fatness, and milk total lipid in humans. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999; 4, 285-295.
210. Wainwright PE. Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc Nutr Soc*. 2002; 61, 61-69.
211. Ward RJ, Peters TJ. Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects. New York: Churchill Livingstone. 1995; 765-777.
212. Wei EP, Kontos HA, Christman CW et al. Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced cerebral arteriolar dilation after acute hypertension. *Circ Res*. 1985; 57(5), 781-7.
213. White R, Hiley CR. A comparison of EDHF-mediated and anandamide induced relaxations in the rat isolated mesenteric artery. *Br J Pharmacol*, 1997; 122(8), 1573-84.
214. WHO, WHO Obesity and overweight. 2015.
215. Widdowson EM, Mccance RA. The effect of finite periods of undernutrition at different ages on the composition and subsequent development of the rat. *Proc R Soc Lond B Sci*. 1963; 158, 329-42.
216. Wu L, Shi A, Zhu D et al. High Sucrose Intake during Gestation Increases Angiotensin II Type 1 Receptor-Mediated Vascular Contractility Associated with Epigenetic Alterations in Aged Offspring Rats. *Peptides*. 2016; 86, 133-144.
217. Yang ZW, Zheng T, Zhang A, et al. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced contraction of rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 1998; 5;344(2-3), 169-81.
218. Yang Z, Zhang A, Altura BT. et al. Hydrogen peroxide-induced endothelium-dependent relaxation of rat aorta involvement of Ca²⁺ and other cellular metabolites. *Gen.Pharmacol*. 1999; 33, 325 – 336.
219. Yuan Q, Chen L, Liu C,et al. Postnatal pancreatic islet beta cell function and insulin sensitivity at different stages of lifetime in rats born with intrauterine growth retardation. *PLoS One*. 2011; 6, e25167
220. Zámocký M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999; 72(1), 19-66.
221. Zecchin HG, Priviero FB, Souza CT, et al. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/Akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes*. 2007; 56(4), 1014-24.
222. Zhang S, Hiraoka M, Hirano Y. Effects of alpha1-adrenergic stimulation on L type calcium current in rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30, 1955–1965.

223. Zhong H, Minneman KP. $\alpha 1$ - Adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol.* 1999; 375, 261-276.
224. Zhou MS, Hernandez Schulman I, Pagano PJ, et al. Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure. *Hypertension.* 2006; 47(1), 81-6.
225. Zhu J. Kang L, Ye Q, et al. Effects of Shenfu injection and its main components on the contraction of isolated rat thoracic aortic rings. *PloS one.* 2013; 8(10), e78026.
226. Ziogas J, Story DF. Effect of locally generated angiotensin II on noradrenergic neuroeffector function in the rat isolated caudal artery. *J Hypertens.* 1987; 5(suppl 2), S47-S52.
227. Zraika S, Dunlop M, Proietto J, et al. Effects of free fatty acids on insulin secretion in obesity. *Obes Rev.* 2002; 3(2), 103-12