



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA E FISIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

FERNANDA PRISCILA BARBOSA RIBEIRO

**RESTRIÇÃO DIETÉTICA INTRAUTERINA SUPRARREGULA COMPONENTES
DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: EFEITOS DOS ANTIOXIDANTES α -
TOCOFEROL E TEMPOL**

**Recife
2019**

FERNANDA PRISCILA BARBOSA RIBEIRO

**RESTRIÇÃO DIETÉTICA INTRAUTERINA SUPRARREGULA COMPONENTES
DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: EFEITOS DOS ANTIOXIDANTES α -
TOCOFEROL E TEMPOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Área de concentração: Ciência Biológicas

Orientadora: Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão

Coorientador: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

Recife
2019

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ribeiro, Fernanda Priscila Barbosa

Restrição dietética intrauterina supraregula componentes do sistema renina angiotensina :
efeitos dos antioxidantes α -tocoferol e tempol / Fernanda Priscila Barbosa Ribeiro. - 2020.

57 f. : il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Durce Oliveira da Paixão.

Coorientador: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologias. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife,
2020.

Inclui referências.

1. Gravidez – Aspectos nutricionais. 2. Desnutrição na gravidez. 3. Desnutrição fetal. I. Paixão, Ana Durce Oliveira da (orientadora). II. Vieira Filho, Leucio Duarte (coorientador) III. Título.

618.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-067

FERNANDA PRISCILA BARBOSA RIBEIRO

**RESTRIÇÃO DIETÉTICA INTRAUTERINA SUPRARREGULA COMPONENTES
DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: EFEITOS DOS ANTIOXIDANTES α -
TOCOFEROL E TEMPOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia

Aprovada em: 27 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profª. Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Edjair Vicente Cabral (Examinador interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Humberto Muzi Filho (Examinador externo)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dedico a Miguel Ribeiro, meu filho amado

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades concedidas.

À minha família, que me deu todo suporte para que conseguisse concluir a graduação e começar uma carreira na pós-graduação, em especial a minha mãe, Neide Maria, que compartilhou dos momentos de alegria, ansiedade e que sempre esteve segurando minha mão, confiando e me dando forças.

À avó paterna do meu filho, Nilzinha Braga, que tem sido uma segunda mãe para mim, cuida com muito amor de Miguel, tudo o que conquistei devo em parte a ela.

A meu filho, Miguel Ribeiro, que é a razão do meu viver e que compreende quando preciso me ausentar para estar no laboratório.

À minha orientadora, Prof^a Ana Durce, ao qual me ensinou que o mundo científico requer organização e dedicação.

A Prof^o Leucio Duarte, sua paciência o torna um ser especial.

A todos os integrantes da família do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal, que contribuíram muito com o meu trabalho e que me ensinaram que devemos sempre ser generosos e gratos.

Aos meus IC, Josias Cavalcante e Jennifer Carvalho, que estiveram sempre comigo nessa trajetória, obrigada, sem vocês o trabalho teria sido mais difícil.

À Leiliandry Melo, uma amiga que ganhei e que me deu suporte em vários momentos, serei eternamente grata.

Aos técnicos Daniele Dutra e Nielson Torres, sempre dispostos a ajudar.

À Prof^a Dayane Aparecida Gomes, que cedeu o espaço do seu laboratório para que pudesse desenvolver uma parte da minha pesquisa.

Ao CNPq e ao FACEPE, por todo o suporte financeiro.

Agradeço aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e a todos do Departamento de Fisiologia, que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”

Simone de Beauvoir

RESUMO

A restrição alimentar severa durante a gestação pode programar a síndrome metabólica (SM) na prole adulta, a SM é caracterizada por um conjunto de fatores de riscos metabólicos, que compreende obesidade, resistência a insulina, dislipidemias, hiperglicemia, hipertensão, elevando o risco de doenças cardiovasculares e diabetes. O tratamento com antioxidantes pode ser uma alternativa para minimizar danos provocados pela desnutrição intrauterina. Desta forma, investigou-se se a restrição dietética materna ou a suplementação com antioxidantes produzem alterações no perfil de estresse oxidativo no tecido adiposo subcutâneo da região inguinal (ISAT, do inglês inguinal subcutaneous adipose tissue) e no rim da prole adulta, e se induzem alterações no perfil de alguns componentes do sistema renina angiotensina (SRA) no rim da prole adulta. Foram usados ratos machos Wistar adultos obtidos de mães controles tratadas com óleo de milho (CV) ou alfa-tocoferol (CTOC) ou tempol (CT) e o grupo restrição, que recebera 50% da dieta, compondo os grupos RV, RTOC e RT. Avaliou-se a atividade da NADPH oxidase no TASI e nos rins, os níveis plasmáticos de TNF- α (fator de necrose tumoral), o receptor de angiotensina II (AT1R) e enzima conversora de angiotensina (ECA2) nos rins e a pressão arterial sistólica (PA). As mães do grupo restrição reduziram o peso durante a gestação, porém não comprometeu o número de filhotes por ninhada, que apresentaram peso inferior quando comparado ao grupo controle, exceto o grupo RT, aos 30 dias de idade essa diferença não existia mais. Os níveis de TNF- α não foram alterados. No tecido adiposo o alfa-tocoferol junto com a restrição alimentar materna aumentaram a produção de ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) dependente de NADPH. Nos rins o aumento do $O_2^{\cdot -}$ se deu pela atividade aumentada da NADPH no grupo RTOC, sendo reduzido no grupo RT. O tratamento com antioxidantes aumentou a expressão do AT1R no grupo controle e nos grupos RTOC e RV. A ECA2 aumentou sua expressão nos grupos controle e restrição, porém o RT foi reduzido. A restrição alimentar da mãe programou hipertensão na prole aos 90 e 120 dias, mas o tempol preveniu. Estes dados nos permitem concluir que níveis elevados de AT1R nos rins estão subjacentes à elevação da pressão arterial sistólica na prole submetida à restrição intrauterina. Já tempol associado à restrição alimentar materna preveniu a elevação da AT1R e também da PA.

Palavras-chave: Restrição dietética materna. Ânion superóxido. Rim, Tecido adiposo subcutâneo inguinal.

ABSTRACT

Severe food restriction during pregnancy can program metabolic syndrome (MS) in adult offspring. MS is characterized by a set of metabolic risk factors, which include obesity, insulin resistance, dyslipidemia, hyperglycemia, hypertension, increasing the risk of cardiovascular diseases and diabetes. Antioxidant treatment can be an alternative to minimize damage caused by intrauterine malnutrition. Thus, it was investigated whether maternal dietary restriction or supplementation with antioxidants produces changes in the oxidative stress profile in the inguinal subcutaneous adipose tissue (ISAT) and in the kidney of adult offspring, and if they are induced changes in the profile of some components of the renin angiotensin system (RAS) in the kidney of adult offspring. Male adult Wistar rats obtained from control mothers (C) or mothers subjected to dietary restriction (R) treated with corn oil (CV and RV) or alpha-tocopherol (CTOC and RTOC) or tempol (CT and RT). NADPH oxidase activity on ISAT and kidneys, plasma levels of TNF- α (tumor necrosis factor), angiotensin II receptor (AT₁R) and angiotensin-converting enzyme (ECA2) in the kidneys and systolic blood pressure (SBP) were evaluated. The mothers in the dietary restriction group had reduced body weight during pregnancy, but there was no compromise in the number of pups per litter. The body weight of the puppies of mothers submitted to the restriction was lower when compared to the control group, except in the RT group at 30 days of age. TNF- α levels were not altered between experimental groups. At ISAT, the RTOC group showed higher production of superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) and greater activity of NADPH oxidase than the CTOC and RV groups. In the kidneys, the increase in $O_2^{\cdot -}$ was due to the increased activity of NADPH in the RTOC group, being reduced in the RT group. Antioxidant treatment increased AT₁R expression in the control group and in the RTOC and RV groups. ECA2 increased its expression in the control and restriction groups, but the RT was reduced. The maternal dietary restriction programmed hypertension in the offspring at 90 and 120 days, but tempol prevented it. These data allow us to conclude that high levels of AT₁R in the kidneys are underlying the elevation of systolic blood pressure in the offspring subjected to intrauterine restriction, and that maternal antioxidant treatment is able to prevent these changes.

Keywords: Maternal dietary restriction. Superoxide anion. Kidney. Inguinal subcutaneous adipose tissue

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A molécula dos tocoferóis.....	20
Figura 2 - Estrutura molecular do tempol.....	21
Figura 3 - Produção e degradação de superóxido - Atuação do tempol.....	21
Figura 4 - Diferenciação da linhagem dos adipócitos.....	24
Figura 5 - Produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio.....	26
Figura 6 - Estrutura da região central das enzimas NADPH oxidase (NOX)	27
Figura 7 - Componentes clássicos das subunidades catalíticas NOX no rim.....	28

ARTIGO

Figure 1 - Levels of TNF- α in adult offspring.....	48
Figure 2 - Superoxide anion (O_2^-) levels in inguinal adipose tissue and kidneys in offspring at adult age.....	49
Figura 3 - AT ₁ R and Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) expressions in kidneys from offspring at adult age.....	50
Figura 4 - Systolic blood pressure from adult offspring at ages of 90 and 120 days.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios propostos para o diagnóstico clínico da Síndrome metabólica.....	23
---	----

ARTIGO

Table 1 - Maternal and offspring parameters.....	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT ₁	Receptor da Angiotensina II
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CC	Circunferência da cintura
Cl ⁻	Cloreto
CT	Controle tempol
CTOC	Controle alfa-tocoferol
CV	Controle veículo
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
ERK1	do inglês <i>serine/threonine kinase</i>
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina, do inglês <i>flavina adenina dinucleotide</i>
GJA	Glicemia de jejum alterada
GSH	Glutathiona reduzida
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
HO ·	Hidroxila
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IGC	Intolerância à glicose comprometida
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
ISAT	Tecido adiposo subcutâneo inguinal, do inglês <i>inguinal subcutaneous adipose tissue</i>
JAKs	Janus quinase, do inglês <i>Janus kinase</i>
MCP -1	Proteína quimiotática de monócitos – 1, do inglês <i>Monocyte chemoattractant protein -1</i>
Myf5	Fator miogênico 5
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase

NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NF- κ B	Fator nuclear Kappa B, do inglês factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico, do inglês <i>nitric oxide</i>
NOS	Óxido nítrico sintase, do inglês <i>nitric oxide synthase</i>
NOX	NADPH oxidase
O ₂	Oxigênio
¹ O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAI -1	Inibidor do ativador do plasminogênio – 1
PKC	Proteína quinase C
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativa de oxigênio, do inglês <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Restrição tempol
RTOC	Restrição alfa-tocoferol
RV	Restrição veículo
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SM	Síndrome metabólica
SOD	Superóxido desmutase
SOD 2	Superóxido desmutase 2
SPSHR	(ratos espontaneamente hipertensos propensos à acidente cerebrovascular)
SRA	Sistema Renina Angiotensina
TAM	Tecido adiposo marrom
TBA	Tecido adiposo branco
TFG	Taxa de filtração glomerular
TG	Triglicerídeos
TGF- β	Fator beta de transformação do crescimento, do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
TNF- α	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>
UCP1	Proteína de desacoplamento 1, do inglês <i>Uncoupling Protein-1</i>
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês <i>Vascular endothelial</i>

	<i>growth factor</i>
α -TOH	Alfa-tocoferol
α -TO.	Radical tocoferil

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	OBJETIVOS.....	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1	DESNUTRIÇÃO INTRAUTERINA.....	17
2.2	SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A GESTAÇÃO.....	19
2.3	SÍNDROME METABÓLICA E TECIDO ADIPOSEO.....	22
2.4	PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELA NADPH OXIDASE.....	25
2.5	SRA NA GORDURA E NO RIM.....	29
3	ARTIGO: DIETARY RESTRICTION, α-TOCOPHEROL OR TEMPOL DURING PREGNANCY INCREASE AT₁R AND ACE2 EXPRESSIONS IN THE RAT OFFSPRING KIDNEYS.....	31
4	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

O período intrauterino de vida é crítico e exige uma demanda aumentada das necessidades nutricionais. Portanto, o estado nutricional materno é um dos fatores que podem levar ao retardo do crescimento fetal (RAO; PADMAVATHI; RAGHUNATH, 2012). A gestação é uma condição que se caracteriza por estresse oxidativo elevado na mãe (CHIARELLO et al., 2018). A privação alimentar nesta fase está associada a um teor adicional de estresse oxidativo materno que pode ser transferido para prole (GUPTA et al., 2004). Assim, a redução da oferta de nutrientes para o feto associada ao aumento do estresse oxidativo perturbam o seu desenvolvimento e concomitantemente alteram estruturas e funções dos sistemas em desenvolvimento. Tais alterações podem acarretar, na idade adulta, a síndrome metabólica (EDWARDS et al., 2001). A síndrome metabólica se caracteriza por um conjunto de fatores de riscos metabólicos, tais como obesidade visceral, resistência à insulina, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensão, que contribuem para doenças cardiovasculares e diabetes (CAO et al., 2019). Neste conjunto de sintomas, o tecido adiposo central é uma fonte seminal de riscos metabólicos, pois os adipócitos secretam moléculas bioativas que contribuem para resistência à insulina, elevação do estresse oxidativo e inflamação sistêmica (MOTTILLO et al., 2010). Em roedores, o tecido adiposo visceral é predominantemente branco, tem perfil adipogênico e é fonte de moléculas bioativas inflamatórias, enquanto o tecido adiposo subcutâneo é predominantemente branco, mas tem fenótipo bege, o qual apresenta perfil lipolítico (WANG et al., 2013), como o tecido subcutâneo inguinal.

Associada ao acúmulo de tecido adiposo, a redução de massa renal, decorrente da restrição nutricional durante a vida fetal, contribuem para hipertensão e outras doenças cardiovasculares na idade adulta. Há dados que demonstram uma relação inversa entre baixo peso ao nascer e o declínio progressivo no número total de néfrons (NÜSKEN et al., 2018). O estresse oxidativo, quando elevado, no rim, reduz a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) o que pode gerar diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (TFG) (ABDULMAHDI et al., 2018). O tecido adiposo e os rins compartilham do mesmo sistema enzimático na produção de ânion superóxido, o complexo enzimático NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidase (HAN et al., 2012; YVES GORIN; KAREN BLOCK, 2013).

O SRA, presente tanto no tecido adiposo (MARCUS; SHEFER; STERN, 2013) quanto no rim (KOBORI et al., 2007) e naturalmente na circulação sanguínea de forma geral

pode ser responsável pela geração de estresse oxidativo nestes dois tecidos e, portanto, pode exacerbar a ocorrência de doenças cardiovasculares na idade adulta.

O tratamento com antioxidantes pode ser uma alternativa para atenuar danos produzidos por elevação do estresse oxidativo nos diversos órgãos (SILVA et al., 2015). Os tocoferóis são antioxidantes lipossolúveis, que são armazenados no tecido adiposo e que bloqueiam a formação de radicais livres, os quais têm efeitos benéficos na prevenção da restrição do crescimento intrauterino (TENÓRIO et al., 2018). O tempol, por ser um mimético da superóxido dismutase (SOD), também é utilizado como estratégia na redução na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, sigla em inglês – *reactive oxygen species*) (RAK et al., 2000).

Neste trabalho foi investigado se a restrição dietética materna severa ou a suplementação com antioxidantes produzem alterações no perfil de estresse oxidativo no tecido adiposo subcutâneo da região inguinal e no rim da prole adulta, bem como, foi investigado se estes tratamentos induzem alterações no perfil de alguns componentes do SRA no rim da prole adulta.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Investigar se a restrição dietética materna severa ou a suplementação com antioxidantes produzem alterações no perfil de estresse oxidativo no tecido adiposo subcutâneo da região inguinal e no rim da prole adulta, bem como, investigar se estes tratamentos induzem alterações no perfil de alguns componentes do SRA no rim da prole adulta.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar em ratos adultos, submetidos ou não à restrição dietética materna e tratamento com α -tocoferol ou tempol, os seguintes parâmetros:
 - Pressão arterial sistólica
 - Níveis de ânion superóxido no tecido adiposo e rins
 - Expressão renal de enzima conversora 2 e receptores AT_1 da angiotensina II
 - Dosagem de TNF- α

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DESNUTRIÇÃO INTRAUTERINA

O crescimento fetal saudável é o resultado da interação complexa entre três componentes placenta-mãe-feto que formam uma unidade. O crescimento e desenvolvimento normal do feto demanda consumo mais elevado de nutrientes. Por isso o consumo dietético inadequado materno é um fator que tem um impacto negativo no desenvolvimento fetal e leva a, entre outros danos, retardo no crescimento fetal e baixo peso no nascimento (GUPTA et al., 2004).

A restrição alimentar durante a gestação é uma das principais causas de morbidade e mortalidade fetal. O ambiente intrauterino adverso tem efeitos a longo prazo no metabolismo e programa na prole desordens que se perpetuam na vida adulta (LIUA et al., 2017). O baixo peso ao nascer indica um ambiente pré-natal desfavorecido e tem sido associado com obesidade, hipertensão, adiposidade aumentada e doença renal crônica (DRC) na idade adulta (YIM; YOO, 2014).

Vários modelos são descritos na literatura para induzir a má nutrição durante o período gestacional de ratas. Dieta materna com restrição de proteica repercute na prole modificando permanentemente seu metabolismo hepático com relação à via glicolítica (HEYWOOD et al., 2004). Uma dieta com restrição alimentar de 70% programa aumento acentuado na pressão arterial associada à disfunção vascular na prole adulta (OZAKI et al., 2001). Já desnutrição proteica isocalórica predispõe à hiperglicemia em ratos com doze semanas de idade e causa esteatose hepática leve, aumentando a suscetibilidade a distúrbios metabólicos (LIU et al., 2018). Filhotes machos de ratas que sofreram restrição dietética (50%) após o nono dia de gestação apresentaram aumento da pressão arterial sistólica quando adultos, isto se deve ao aumento da apoptose em células mesenquimais na zona nefrogênica do rim que está em desenvolvimento, impactando no número final de néfrons (TAFTI et al., 2011).

Diante da ingestão materna dietética deficiente, os tecidos fetais desenvolvem alterações que são necessárias para sobrevivência fetal e tais alterações são mantidas durante a vida pós-natal (HALES; BARKER, 2001). Essas mudanças resultam em adaptações permanentes do metabolismo, de estrutura e da fisiologia (WU et al., 2004). Entre estas alterações, podem ser mencionadas aumento da glicogênese hepática, liberação de ácidos graxos do tecido adiposo e expressão de receptores de insulina nos adipócitos para aumentar a captação de glicose. Portanto, tais alterações são vantajosas para promover a sobrevivência do animal exposto a má nutrição no período pré e pós natal (HALES; BARKER, 2001).

A deficiência de nutrientes durante o desenvolvimento também pode alterar o genoma fetal, através de metilação do DNA (Ácido desoxirribonucleico) e modificações covalentes das histonas (acetilação e metilação). Estas são alterações denominadas epigenéticas, as quais também podem programar doenças na vida adulta (WU et al., 2004). Godfrey et al, 2011 em um estudo de revisão, menciona que este processo é permanente e interfere com a plasticidade do desenvolvimento fetal, afetando a composição corporal e o fenótipo metabólico na idade adulta.

O período gestacional em que ocorre o insulto pode predizer o tipo de anormalidade metabólica. Quando a carência nutricional se dá no início da gestação, momento associado a hiperplasia fetal e crescimento da placenta, o impacto envolverá hipertensão no adulto. Por outro lado, quando a oferta restrita de calorias ocorre nos últimos meses gestacionais, que é um período importante para o ganho de peso fetal, as consequências estão mais associadas com o aumento da adiposidade e intolerância à glicose (LAKSHMY, 2013).

A associação do baixo peso ao nascer com o desenvolvimento de síndrome metabólica tem associação com distúrbios no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), elevação do estresse oxidativo e com modificações epigenéticas (LAKSHMY, 2013). No contexto do eixo HHA, a restrição alimentar gestacional reduz a atividade da enzima 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase na placenta. Esta enzima serve de barreira para os glicocorticoides produzidos pela mãe, portanto a má nutrição materna aumenta os níveis de cortisol que atravessam a placenta e alcançam o feto. A elevação de cortisol no feto afeta permanentemente o eixo HHA de forma que os níveis de cortisol são elevados na idade adulta e esta seria uma das razões, entre várias outras, da elevação da pressão arterial já que os glicocorticoides modulam o tônus vascular (EDWARDS et al., 1993).

A hipertensão programada pelo ambiente materno está associada também com o impacto da desnutrição sobre o peso renal. (GRAY et al., 2013) relataram que a restrição dietética intrauterina reduz o peso renal e repercute em diminuição do número de glomérulos com comprometimento da filtração glomerular. A redução da filtração a longo prazo resulta em retenção de fluido e pode ser um determinante da hipertensão. Em humanos, o desenvolvimento do rim tem início na 4ª ou 5ª semana termina na 36ª pós-concepção e por isso, perturbações nutricionais já nas semanas iniciais da gravidez repercutem negativamente sobre a nefrogênese e podem contribuir com hipertensão na idade adulta, repercutindo negativamente em sequelas renais (NÜSKEN et al., 2018).

Tanto os glicocorticoides quanto a subnutrição materna promovem aumento do estresse oxidativo placentário. As ROS em concentrações fisiológicas participam como

promotoras da diferenciação e proliferação celular que são eventos importantes no desenvolvimento fetal. Porém, em concentrações aumentadas geram modificações que incluem a transcrição de vários genes responsáveis pela captação de oxigênio pelo binômio placenta-feto (HITCHLER; DOMANN, 2007).

O consumo reduzido de macro e micronutrientes pela mãe resulta na produção deficiente dos elementos antioxidantes de defesa, pois muitos sistemas antioxidantes precisam dos minerais e das vitaminas como cofatores para sua atividade. Dessa forma, fetos com baixo peso ao nascer em que as mães sofreram desnutrição durante o período gestacional apresentam uma menor proteção contra insultos oxidativos e um aumento na peroxidação lipídica e oxidativa (GUPTA et al., 2004).

2.2 SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES DURANTE A GESTAÇÃO

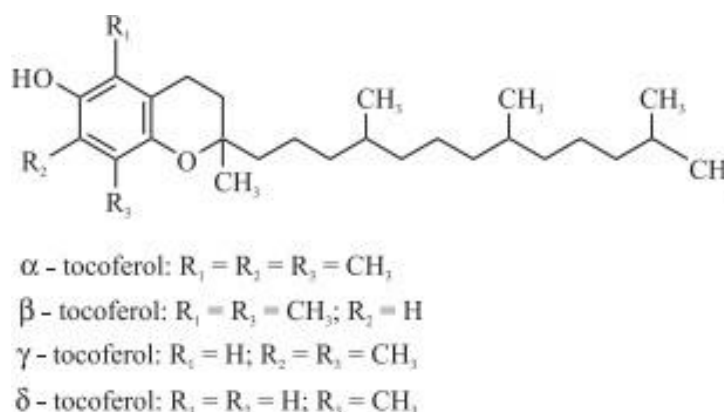
ROS e antioxidantes regulam processos reprodutivos, como fertilização, embriogênese, implantação embrionária, diferenciação e crescimento placentário. Porém, o desequilíbrio entre produção de ROS e os sistemas antioxidantes em favor de oxidantes, afeta negativamente estes processos e promove distúrbios relacionados à gravidez, tais como abortos espontâneos, embriopatias, pré-eclâmpsia, restrição do crescimento fetal, trabalho de parto prematuro e baixo peso ao nascer (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010). A suplementação com antioxidantes pode ser uma terapia utilizada na redução do estresse oxidativo na gestação (SILVA et al., 2015).

A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel que impede a propagação de radicais livres e tem efeitos benéficos na prevenção da restrição do crescimento intrauterino (TENÓRIO et al., 2018). A vitamina E é produzida pelas plantas e possui oito formas estruturais diferentes, quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, todas elas apresentam uma cadeia de 16 carbonos unida ao complexo aromático (Figura 1) formado por dois anéis, um fenólico e um heterocíclico (2-metil, 6-cromanol) e diferem em suas cadeias laterais, que são designadas α , β , γ ou δ . A vitamina E é um nome genérico para um grupo de compostos que exibem atividades biológicas semelhantes às do alfa-tocoferol (KAMAI-ELDIN; APPELQVIST, 1996; NAGASHIMADA; OTA, 2012). O alfa-tocoferol (α -TOH) apresenta maior atividade biológica e é portanto o representante mais importante do grupo de compostos com atividade de vitamina E, sua atividade antioxidante é atribuída ao hidrogênio do grupo hidroxila localizado no anel aromático do cromanol, que neutraliza radicais livres e ROS (HADI; VETTOR; ROSSATO, 2018). O α -TOH intercepta rapidamente radicais peroxil

que são radicais livres lipídicos importantes na peroxidação lipídica, os quais atacam moléculas lipídicas polinsaturadas. O α -TOH doa um átomo de hidrogênio do fenol para o radical peroxil, convertendo-o em hidroperóxido e produzindo um radical tocoferil ($\alpha\text{TO}\bullet$). Em altas doses, α -TOH tem efeito pró-oxidante e isto foi relacionado com o seu radical $\alpha\text{TO}\bullet$, que pode levar ao aumento na taxa de peroxidação lipídica (KAMAI-ELDIN; APPELQVIST, 1996).

SPSHR (ratos espontaneamente hipertensos propensos à acidente cerebrovascular) tratados com altas doses de α -TOH apresentam redução na expressão da SOD2 e têm aumento do estresse oxidativo acompanhados de elevação da pressão arterial e de danos no sistema nervoso central (MIYAMOTO et al., 2009). Neste estudo, os autores Miyamoto et al., 2009 utilizaram α -TOH (13 mg/dia) que é equivalente a 62.600 mg/dia para um humano de ~60 kg. Portanto, o equivalente a nove vezes mais do que a dose diária recomendada para humanos que é de a 400 UI (268 mg/dia).

Figura 1 - A molécula dos tocoferóis.

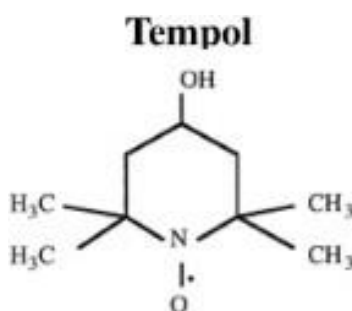


Fonte: Ramalho e Jorge, 2006

O tempol (4-Hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-N-óxido), (Figura 2) tem a característica de ser um nitróxido hidrofílico de baixo peso molecular e baixa estabilidade com notáveis efeitos antioxidantes (HAHN et al., 2000). Este antioxidante tem a propriedade de catalizar o ânion superóxido, ou seja, é um mimético da enzima SOD e atua como um atenuador da formação das ROS (RAK et al., 2000). O Tempol atua semelhante a catalase, facilitando o metabolismo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio (O_2) e água (H_2O), porém não é um mimético da catalase por si (SCHNACKENBERG, 2002). *In Vitro* ele limita a formação de radicais hidroxil produzidos pela reação de Fenton, atuando na oxidação de

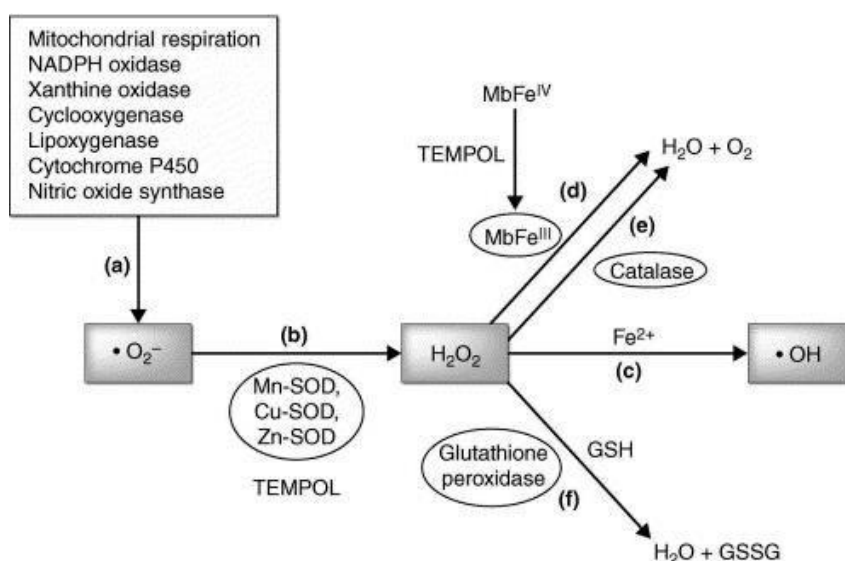
metais reduzidos como o cobre, ferro, cádmio ou cromo, reduzindo a viabilidade de espécies que participam como agentes oxidantes desta reação (WILCOX; PEARLMAN, 2008) (Figura 3). Há evidências de que o tempol tem efeito em diminuir a pressão arterial sistêmica e especula-se que esse efeito anti-hipertensivo ocorre pela diminuição do ânion superóxido que leva a uma diminuição da inativação do óxido nítrico, o qual é vasorelaxante (HAHN et al., 1999). O uso do tempol como agente farmacológico teria o benefício de uma administração fácil e de baixos riscos. Em ratos, sua administração se faz através da água potável, nos quais, entre tantos outros efeitos reduz o teor de ROS na bexiga (GONZALEZ et al., 2015).

Figura 2 - Estrutura molecular do tempol.



Fonte Santos et al., 2017

Figura 3 - Produção e degradação de superóxido – Atuação do tempol.



Observamos em a) Produção do ânion superóxido por diversos sistemas celulares b) Formação de H₂O₂ pode ser catalisado por isoformas de SOD (Mn, manganês; Cu, cobre; Zn, zinco) ou tempol. c) O radical hidroxil (OH•) é formado via reação de Fenton e pode ser decomposto em água pela metmioglobina (MbFe III), no qual o Tempol aumenta sua atividade, facilitando, portanto, a dismutação do peróxido de hidrogênio (d), catalase (e), glutathione peroxidase (f), glutathione reduzida GSH; glutathione oxidada GSSG.

Fonte: Modificado de Schnackenberg, 2002.

2.3 SÍNDROME METABÓLICA E TECIDO ADIPOSO

A síndrome metabólica se caracteriza por um conjunto de alterações metabólicas que contribuem para doenças cardiovasculares e diabetes (CAO et al., 2019). Dieta com elevados teores de carboidratos e de gorduras e o sedentarismo estão associadas com a síndrome metabólica, mas a suscetibilidade genética, racial e o envelhecimento são fatores críticos que também estão envolvidos na patogênese da síndrome (GRUNDY, 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 1998, propôs que a resistência à insulina seria a causa dominante da síndrome metabólica. Em 2001, o *National Cholesterol Education Program* (NCEP), tendo em vista a evidência de correlação entre gordura abdominal e resistência à insulina, determinou a largura da cintura como medida da obesidade, para simplificar o diagnóstico clínico (GAMI et al., 2007; GRUNDY, 2016). Os critérios da OMS, NCEP e da *International Diabetes Federation* (IDF) para o diagnóstico da SM estão descritos na tabela 1.

A NCEP e a FID têm discutido a obesidade como sendo a principal causa da síndrome metabólica, pondo em questão o papel da resistência à insulina como componente subjacente nesta patologia. O excesso de tecido adiposo central se associa fortemente a todos os fatores de risco metabólicos, pois os adipócitos secretam moléculas bioativas que contribuem para a resistência à insulina e inflamação sistêmica (MOTTILLO et al., 2010). 20 a 30% da população na maioria dos países apresentam síndrome metabólica e estes pacientes correm duas vezes mais riscos de sofrerem algum evento cardiovascular (GRUNDY, 2008).

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo de tecido adiposo que secreta várias adipocinas, tais como, inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), TNF- α , interleucina-6 (IL-6), resistina, leptina, proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), angiotensinogênio e adiponectina. O aumento da massa adipocitária está diretamente relacionado com elevação de TNF- α e PAI-1, substâncias envolvidas com trombose e inversamente relacionado com a adiponectina, uma adipocina protetora (WEISBERG et al., 2003). Dentre os fatores que aumentam a secreção dessas substâncias pró-fibróticas e pró-inflamatórias estão a produção aumentada de ROS pelos adipócitos, e isso se deve a uma superativação da NADPH oxidase, provocada pelo excesso de ácidos graxos. Na verdade, há um ciclo vicioso, no qual, ROS aumentam as expressões de RNAm (ácido ribonucleico) das subunidades NADPH oxidase, incluindo NOX4 nos adipócitos e no sangue. ROS aumentado no tecido adiposo e na circulação, levam respectivamente à resistência à insulina e hipertensão (FURUKAWA et al., 2004).

Tabela 1 - Critérios propostos para o diagnóstico clínico da Síndrome Metabólica

Medida clínica	OMS (1998)	NCEP (2001)	IDF (2005)
Resistência à insulina	IGC, GJA, DMT2 ou sensibilidade a insulina diminuída* mais quaisquer dos dois seguintes	Nenhum, mas três dos seguintes fatores	Nenhum
Peso corporal	Relação cintura-quadril em homens >0,90 e em mulheres >0,85 e/ou IMC >30 Kg/m ²	CC ≥102 cm em homens ou ≥88 cm em mulheres†	CC aumentado (população específica) mais dois fatores seguintes
Lipídeos	TG ≥150 mg/dL e/ou HDL-C <35 mg/dL em homens ou <39 mg/dL em mulheres	TG ≥150 mg/dL, HDL-C <40 mg/dL em homens ou <50mg/dL em mulheres	TG ≥150 mg/dL, HDL-C <40 mg/dL em homens ou <50mg/dL em mulheres
Pressão sanguínea	≥140/90 mm Hg	≥130/85 mm Hg	≥130 mm Hg sistólica ou ≥ 85 mm Hg diastólica
Glicose	IGC, IFG ou DMT2	≥ 110mg/dL(inclui diabetes)‡	≥100 mg/dL (inclui diabetes)
Outros	Microalbuminúria		

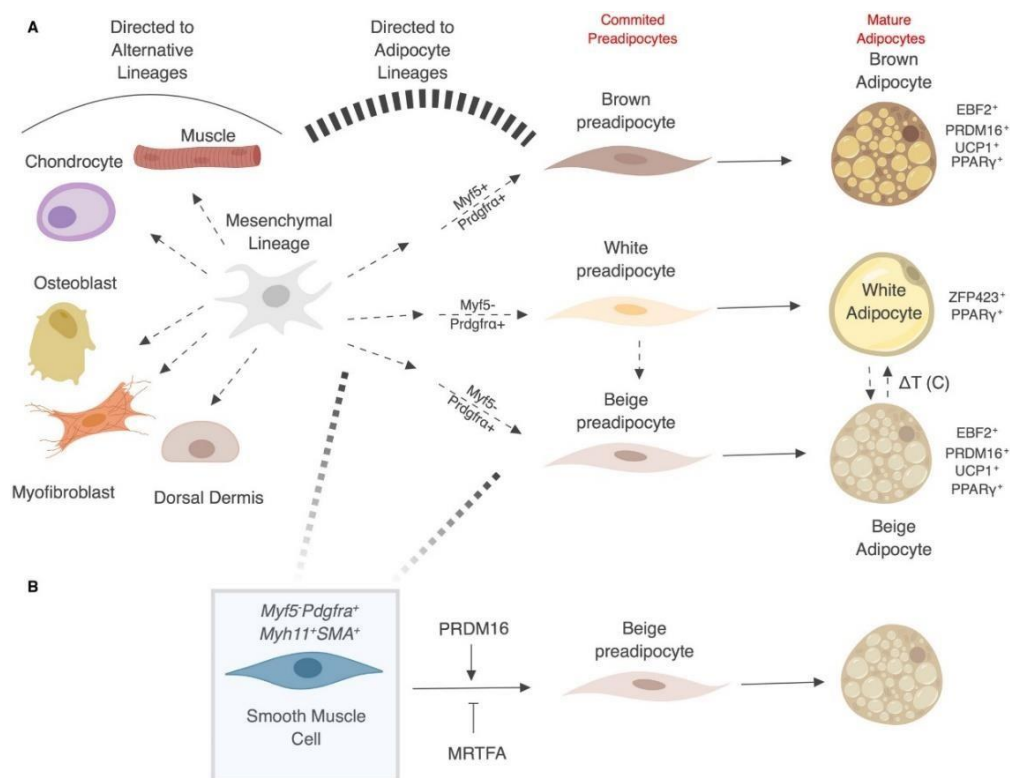
OMS, Organização Mundial de Saúde; NCEP, Programa Nacional de Educação sobre Colesterol; IDF, Federação Internacional de Diabetes, IGC, intolerância à glicose comprometida, GJA, glicemia de jejum alterada, DMT2, diabetes mellitus tipo 2, CC, circunferência da cintura, IMC, índice de massa corporal, TG, triglicerídeos, HDL-C, HDL colesterol. *sensibilidade à insulina medida em condições euglicêmicas hiperinsulinêmicas, captação de glicose abaixo do quartil mais baixo para população sob investigação. † Em populações asiáticas, o limiar de CC para obesidade abdominal é de 90 cm nos homens ou de 80 cm nas mulheres. ‡A definição de 2001 identificou glicose plasmática em jejum de 110 mg / dL (6,1 mmol / L) como elevada. Este foi modificado em 2004 para ser 100 mg / dL (5,6 mmol / L), de acordo com a definição atualizada da American Diabetes Associations de glicemia de jejum alterada (GJA).

Fonte: modificada de Grundy, 2008.

Os adipócitos são provenientes das células mesenquimais, que podem se diferenciar em tecido adiposo marrom (TAM) ou tecido adiposo branco (TAB), respectivamente, pela presença ou ausência do fator miogênico 5 (*Myf5*), já o tecido adiposo bege se desenvolve na ausência do *Myf5* (RAO; PADMAVATHI; RAGHUNATH, 2012). O TAM é formado por inúmeras mitocôndrias que oxidam glicose e lipídeos para fornecer calor ao corpo, dessa forma o TAM pode ser considerado um tecido termogênico (SHAPIRA; SEALE, 2019). Por outro lado, o TAB está envolvido no armazenamento de energia através da estocagem de triglicerídeos e eles são liberados para β -oxidação quando o sistema nervoso simpático é

ativado pela demanda aumentada de energia, como é no caso do jejum e atividade física. Há ainda uma terceira categoria de tecido adiposo, o tecido adiposo bege que advêm de células mesenquimais negativas para *Myf5*, assim como o TAB. O tecido adiposo bege, pode também ser originado do TAB em condições de baixa temperatura (10 - 19 °C). Portanto, o TAB apresenta alta plasticidade fisiológica, pois quando exposto ao frio os adipócitos aumentam a expressão da proteína de desacoplamento (UCP1). A UCP1 está presente na membrana da mitocôndria e interrompe o fluxo de elétrons da cadeia transportadora gerando calor (Figura 4) (WANG et al., 2013). Em ratos, o TAB subcutâneo inguinal tem fenótipo bege.

Figura 4 - Diferenciação da linhagem dos adipócitos.



Observamos (A) Os precursores mesenquimais (Os adipócitos marrons se desenvolvem a partir de células *Myf5*⁺, enquanto os adipócitos brancos e beges surgem de uma linhagem *Myf5*⁻. Os precursores mesenquimais também dão origem a tipos celulares alternativos, incluindo músculo, osso, cartilagem e derme. (B) Adipócitos bege foram propostos para se desenvolver a partir de células precursoras de músculo liso (caixa azul sombreada).

Fonte Shapira; Seale, 2019.

O tecido adiposo é distribuído de forma variada no corpo e possui funções biológicas específicas de acordo com sua localização, portanto a fisiologia e patologia estão mais fortemente associadas com seus compartimentos do que sua massa total (SHEN et al., 2003). O TAB é dividido em subcutâneo e visceral, sua classificação é baseada na sua localização

anatômica macroscópica. Nos ratos a gordura subcutânea está localizada nas regiões inguinal e interescapular. Já a gordura visceral é encontrada nas regiões perigonadal, retroperitoneal e mesentérica do corpo (BERRY et al., 2013). O risco cardiovascular está aumentado quando há um acúmulo de TAB visceral. Existem vários fatores etiológicos que contribuem para o acúmulo da gordura visceral, dentre eles estão a idade, gênero, etnia, genética, sedentarismo, hormônios sexuais, fatores nutricionais, hiperativação do sistema endocanabinoide e o aumento de glicocorticoides circulante e local (TCHERNOF; DESPRÉS, 2013).

Uma das razões para que o TAB visceral seja mais específico para fisiopatologia da síndrome metabólica e doenças cardiovasculares é o fato de que ele apresenta maior potencial angiogênico, o que implica maior suprimento sanguíneo, necessário para a manutenção e hipertrofia dos adipócitos. Os adipócitos que formam a gordura visceral apresentam uma densidade maior de células endoteliais quando comparados as células do TAB subcutâneo e também exibem uma propriedade inflamatória mais grave. Com base nestas evidências, foi demonstrado que o bloqueio do VEGF, um fator de crescimento endotelial que está envolvido na angiogênese, pode ser alvo farmacológico para o tratamento da obesidade (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Além da diferença, no que diz respeito a angiogênese, entre o TAB visceral e o TAB subcutâneo, os depósitos subcutâneos contêm adipócitos multiloculares (adipócitos beges) e uma taxa de renovação celular maior o que confere proteção contra o desarranjo metabólico (BERRY et al., 2013).

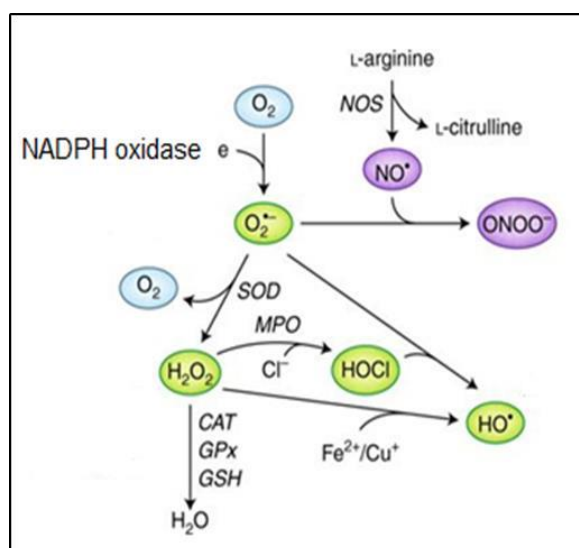
2.4 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO PELA NADPH OXIDASE

As ROS são metabólitos derivadas do oxigênio, que incluem radicais livres como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$) e hidroxila ($HO^{\cdot}$), e também espécie não reativas que podem ser convertidas em radicais, como H_2O_2 e oxigênio *singlete* (1O_2). Por outro lado, os radicais de óxido nítrico quando reagem com o ânion superóxido geram peroxinitrito e são denominados espécies reativas de nitrogênio. A formação do $O_2^{\cdot -}$ se dá através de um complexo enzimático, que reduz o O_2 , tornando-o um ânion instável (AVIELLO; KNAUS, 2018). A figura 5 mostra o esquema que sucede a formação do $O_2^{\cdot -}$.

A geração fisiológica de ROS está envolvida em um grande número de processos regulatórios reversíveis em praticamente todas as células e elas podem ocorrer como um subproduto de outras reações biológicas nas mitocôndrias, peroxissomos, citocromo P-450 e outros elementos celulares. Já a produção exacerbada dessas moléculas oxidantes reage com inúmeros componentes biológicos, como proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos

nucléicos, causando peroxidação lipídica, oxidação/nitração de proteínas, inativação de enzimas, danos ao DNA, ativação de citocinas inflamatórias, fatores de transcrição (NF- κ B), apoptose ou necrose celular, sendo um importante agente de dano celular e responsáveis pela origem de várias doenças (BEDARD; KRAUSE, 2007; SÁRKÖZY et al., 2018).

Figura 5 - Produção e eliminação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio.



O oxigênio (O_2) é reduzido a superóxido ($O_2 \cdot^-$) pela nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, podendo ser reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela superóxido dismutase (SOD) ou convertido em radical hidroxila ($HO \cdot$). O H_2O_2 pode sofrer a reação de Fenton e ser transformado em $HO \cdot$ ou é reduzido a água (H_2O) pelo sistema catalase (CAT) ou glutatona (GSH) / glutatona peroxidase (GPx). Na presença de íons cloreto (Cl^-) o H_2O_2 pode ser convertido em ácido hipocloroso (HOCl) pela mieloperoxidase de neutrófilos (MPO) e esta reação pode gerar ainda $HO \cdot$. A óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a oxidação de L-arginina a L-citrulina, liberando radicais de óxido nítrico ($NO \cdot$) que formam o potente oxidante peroxinitrito ($ONOO^-$) após reação com $O_2 \cdot^-$.

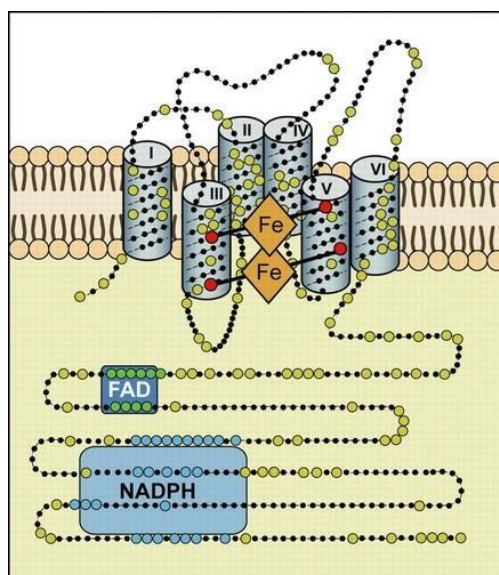
Fonte: adaptado de Aviello; Knaus, 2018.

O estresse oxidativo aumentado ocorre quando há um predomínio de moléculas oxidantes reativas em detrimento das defesas antioxidantes (BARDAWEEL et al., 2018). As vias antioxidantes podem ser enzimáticas, como a SOD, MnSOD, CuZnSOD, catalase e não enzimáticas, como o GSH, peroxirredoxina, ácido ascórbico e tocoferol. Estes antioxidantes têm como objetivo combater a formação excessiva de ROS (THOMPSON; AL-HASAN, 2012).

Uma importante fonte de produção de ROS é a NADPH oxidase (ou NOXs), que constitui um complexo enzimático transmembrana, o qual transfere elétrons para o oxigênio molecular (BEDARD; KRAUSE, 2007). Apesar da enzima está presente em vários tipos celulares, o mecanismo de ativação e distribuição tecidual dos diferentes membros da família NOX são diferentes. Dentre suas funções fisiológicas estão defesa contra microrganismos,

sinalização celular, regulação da expressão gênica e diferenciação celular, porém podem ser mediadores críticos de inúmeras desordens quando sua atividade é aumentada (ASABA et al., 2005). A família NOX compreender sete isoformas NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2, todas elas têm pelo menos seis domínios transmembranares, um dinucleótido de flavina adenina (FAD) e domínios citoplasmático de ligação a NADPH e atuam como um catalisador para a transferência de dois elétrons do NADPH através do seu domínio FAD e dois grupos protéticos de hemácias para o oxigênio molecular. As isoformas NOXs 1, 2, 3 e 5 geram superóxido, enquanto NOX4, DUOX 1 e 2 produzem o peróxido de hidrogênio (TARAFDAR; PULA, 2018). A figura 6 mostra a estrutura do complexo enzimático do NADPH.

Figura 6 - Estrutura da região central das enzimas NADPH oxidase (NOX).



Todos os membros da família NOX compartilham pelo menos de seis domínios transmembrana altamente conservados. Os domínios transmembrana III e V contêm, cada um, duas histidinas, abrangendo dois hemes assimétricos. O terminal COOH citoplásmico contém domínios FAD e NADPH. As enzimas NOX transportam elétrons individuais, passando elétrons do NADPH para o FAD, para o primeiro heme, para o segundo heme e, finalmente, para o oxigênio.

Fonte Bedard; Krause, 2007.

No rim, as isoformas NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5 estão presentes nos vasos renais, nas células glomerulares mesangiais, nos podócitos, na mácula densa, no ramo ascendente, no túbulo distal e nos ductos coletores (YVES GORIN; KAREN BLOCK, 2013). A ativação do receptor AT1 pela angiotensina II (Ang II), a hiperglicemia e o TGF- β (do inglês: *transforming growth factor* beta) tanto podem ativar esse complexo enzimático como podem aumentar sua expressão no rim, elevando a produção de ROS promovendo danos

quinases: Akt (quinase antiapoptótica), JAKs (Janus quinases), ERK1/2 (quinase regulada por sinais extracelulares), aumentando a IL-6, que é o resultado da ativação da Akt, JAK e ERK1/2 e a inibindo o receptor de insulina, levando a um quadro de resistência à insulina (MASLOV et al., 2019).

2.5 SRA NA GORDURA E NO RIM

Um dos papéis do SRA consiste na regulação da homeostase de sódio e água no organismo. O angiotensinogênio (AGT) quando clivado pela renina produz o decapeptídeo angiotensina I, após uma segunda clivagem agora pela enzima conversora de angiotensina (ECA), ela se transforma em angiotensina II, considerado o peptídeo mais ativo do SRA, ela atua nos receptores da angiotensina tipo 1 (AT₁) ou do tipo 2 (AT₂) (MORITZ et al., 2010). O AT₁ promove reabsorção renal de sódio e também vasoconstrição. A ECA 2 também presente nos rins tem atividade catalítica para converter Ang I em Ang II. Porém, sua eficiência catalítica é 400 vezes maior para converter Ang II em Ang (1-7), um peptídeo que se opõe a ação vasoconstritora da Ang II quando se liga ao receptor Mas (GUPTE et al., 2008).

Além da regulação do balanço hidroeletrólítico, o SRA é importante para o desenvolvimento renal. Ratos submetidos a insultos nutricionais durante a vida fetal apresentam redução na expressão renal desses componentes prejudicando a nefrogênese (WOODS; WEEKS; RASCH, 2004). Ratos expostos à insuficiência placentária apresentam aumento da expressão de renina e angiotensinogênio na vida adulta, apesar desses animais apresentarem redução desses componentes ao nascimento. A atividade da ECA renal também é elevada em ratos machos expostos à isquemia placentária durante a vida fetal (GRIGORE et al., 2007). Ratos expostos a restrição proteica durante a vida fetal exibem um aumento acentuado na atividade da renina plasmática (LORIA; POLLOCK; POLLOCK, 2010). A exposição pré-natal aos glicocorticóides regula positivamente a expressão do SRA renal (SINGH et al., 2007).

Os componentes do SRA são também expressos no TAB, eles estão envolvidos em múltiplos fenômenos como diferenciação e crescimento de adipócitos, expressão e liberação de adipocinas, além de promoverem o estresse oxidativo (CASSIS et al., 2008; MARCUS; SHEFER; STERN, 2013). Dentre os componentes do SRA encontrados nos adipócitos estão angiotensinogênio (AGT), renina, ECA 1, ECA 2, AT₁R e AT₂R (GUPTE et al., 2008).

As células do TAB apresentam um aumento dos receptores de pró-renina nas membranas celulares em ratos neonatos que foram submetidos a uma dieta hiperlipídica, com

isso a renina liga-se a esses receptores provocando um aumento na atividade enzimática da renina intracelular, o que resulta na formação de Ang II, que ao se ligar em seus receptores de modo parácrino/ autócrino (AT₁R e AT₂R) libera o AGT (MARCUS; SHEFER; STERN, 2013). O AT₂R é o principal receptor que medeia a regulação do AGT em adipócitos, mas em concentrações anormais de Ang II no plasma, o AT₂R reduz sua disponibilidade proporcionando maior ligação do Ang II com o AT₁R, com isso ela regula a expressão de AT₁R e de RNAm de AGT nessas células (LU et al., 2007). O AGT derivado de adipócitos participa do pool circulante de AGT e Ang II (MASSIÉRA et al., 2001). Já a renina produzida localmente pelo tecido adiposo é independente do SRA plasmático, diferente do AGT, que depende do AGT plasmático, portanto, o SRA adiposo local funciona independentemente do SRA plasmático através do controle dos níveis de renina (FOWLER et al., 2008).

O acúmulo de TAB visceral está relacionado com o aumento da pressão arterial e de distúrbios metabólicos, o SRA neste tecido está alterado, exibindo um aumento do RNAm para AGT, o que não acontece com os depósitos subcutâneos (GIACCHETTI et al., 2002). A Ang II estimula a secreção de adipocinas pró-inflamatórias, a redução da adiponectina e elevação do estresse oxidativo. O tratamento farmacológico que inibe o SRA pode aumentar a secreção de adiponectina (KADOWAKI et al., 2006).

3 ARTIGO: DIETARY RESTRICTION, α -TOCOPHEROL OR TEMPOL DURING PREGNANCY INCREASE AT₁R AND ACE2 EXPRESSIONS IN THE RAT OFFSPRING KIDNEYS

Manuscrito formatado de acordo com as normas do *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, Fator de impacto: 1,197.

Dietary restriction, α -tocopherol or tempol during pregnancy increase AT₁R and ACE2 expressions in the rat offspring kidneys

Fernanda Priscila Barbosa Ribeiro; Josias Pereira Cavalcante Júnior; Leiliandry de Araújo Melo; Linaldo Francisco Silva Filho; Laryssa Beatriz Silva Nascimento; Jennyfer Martins Carvalho; Leucio Duarte Vieira Filho, Ana Durce Oliveira da Paixão

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Abstract

Hypothesis: Fifty percent maternal dietary restriction, α -tocopherol or tempol during pregnancy affect the profile from some renin angiotensin system (SRA) components in the kidney and the superoxide anion dependent on NADPH oxidase in inguinal subcutaneous adipose tissue (ISAT) and kidneys of adult offspring.

Material and Methods: Male Wistar rat offspring was evaluated at 120 days-old. SRA components and superoxide anion were evaluated, respectively, by Western blotting and by lucigenin enhancement chemiluminescence.

Results: Maternal dietary restriction, α -tocopherol and tempol programmed increased AT₁R and ACE2 in the kidney, but tempol prevented both increments in offspring also submitted to maternal dietary restriction. α -Tocopherol associated to maternal dietary restriction increased NADPH oxidase activity in ISAT and kidney. Furthermore, maternal dietary restriction increased systolic blood pressure (SBP) that was not prevented by α -tocopherol, but was prevented by tempol.

Conclusions: Elevated levels of AT₁R in the kidneys is underlying the elevated SBP in the offspring submitted to maternal dietary restriction, while elevated SBP in maternal dietary restriction offspring also treated with α -tocopherol could be due to elevated oxidative stress in ISAT and kidneys, as well as, to elevated levels of AT₁R in the kidneys.

Keywords: Maternal dietary restriction, AT₁R, ACE2, superoxide anion, kidney, inguinal subcutaneous adipose tissue

Introduction

A report in 2017 by Gostin¹ brings a brief presentation of nations under hunger due to humanitarian crisis, which encompasses South Sudan, Yemen, Somalia, and northeastern Nigeria. This is one, amid several others evidence of hunger in the world. Hunger affects life quality while it is current. Furthermore, dietary restriction during pregnancy may affect fetal development to produce long term effects, to which is applied the concept of Developmental Origins of Health and Disease (DoHaD)² or phenotypic plasticity.³ After the lessons left by Dutch hunger, during World War II, the Great Chinese Famine, from 1959 to 1961, is spreading evidence that diabetes,⁴ dyslipidemia,⁵ cardiovascular disease^{6,7} and renal dysfunction⁸ could be programmed by maternal undernutrition. Associated to the prenatal undernutrition, postnatal quality of life/nutrition has a fundamental role in development of later disease, as has been enlightened by some reports.⁶

Cardiometabolic diseases are partially determined by functional alterations in adipose tissue and kidneys that involves changes in the status of oxidative stress.⁹ Among hormones produced by both organs are the components of renin angiotensin system (RAS).^{10,11} When angiotensin II (Ang II), the most important component of the RAS, is elevated oxidative stress is also elevated because there is a double-way hand, the AT₁R downstream increases oxidative stress, as well as oxidative stress upregulates AT₁R and sodium transporters activity in the kidney.^{12,13}

Prenatal undernutrition, induced by a multideficient diet, changes SRA components and oxidative stress in the kidney,^{14,15} where these alterations are prevented by early treatment with α -tocopherol. Intra-abdominal adipose tissue, but not subcutaneous adipose tissue, is increased by maternal 50% dietary restriction.¹⁶ However, increment in visceral adipose tissue, changes in hormonal production or changes in the inflammatory cytokines in adipose tissue after prenatal undernutrition are more common when the offspring is maintained, after weaning, on high fat diet.¹⁷⁻²¹ In spite the findings of increased pro-inflammatory cytokines in adipose tissue due to inappropriate nutrition,¹⁸ from our knowledge there is no evidence on effects of dietary restriction or of α -tocopherol supplementation on subcutaneous adipose tissue oxidative stress.

Taking into account that fifty percent dietary restriction for rats can partially reproduce some effects of population undernutrition subjected to food restriction,² this could be an effective tool to study undernutrition. The present study aimed to investigate whether severe maternal dietary restriction changes oxidative stress in the inguinal subcutaneous adipose

tissue (ISAT) and in the kidneys from adult offspring and whether α -tocopherol supplementation affects maternal dietary restriction effects. Furthermore, it aimed to investigate whether these treatments affect the profile from some SRA components in the kidney of adult offspring. In order to compare two antioxidant agent effects, α -tocopherol and the superoxide dismutase mimetic tempol (T) were employed.

Material and methods

Materials

α -Tocopherol (T3251), 4-hydroxy-tempo (tempol, 176141), protease inhibitor cocktail (S8820), β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH, N1630), N,N'-dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate (lucigenin, M8010), trizma base, acrylamide, glycine, N,N'-methylenebisacrylamide, bromophenol blue sodium salt, bovine serum albumin (BSA), Folin and Ciocalteu's phenol reagent and components for phosphatase cocktail inhibitor (sodium pyrophosphate decahydrate, sodium fluoride, sodium orthovanadate) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Copper (II) sulphate anhydrous and potassium sodium tartrate tetrahydrate were from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Nitrocellulose blotting membrane, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G (IgG) antibody and an ECL Prime Western blotting system were purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Primary antibody anti-AT1 (TONI-1, SC-57036) and primary antibody anti- β -actin (C4, SC-47778) were purchased from Santa-Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA). Rat TNF- α ELISA kit (ab46070) and primary antibody anti-ACE2, (ab108252) were obtained from ABCAM. All other reagents were from the highest purity available.

Experimental animals

The experimental procedures followed the guidelines from the Brazilian Society of Laboratory Animal Sciences (SBCAL), and underwent ethical review and approval by the Committee for Experimental and Animal Ethics at the Federal University of Pernambuco (23076.017536/2015-71). Female Wistar rats (n= 36) weighting 200 to 250 g and maintained in a 12h/12h cycle light/dark at 23°C were mated at age of 90 days. After pregnancy confirmation by presence of spermatozoid in vaginal smear, the dams were randomly separated for two groups, one with standard diet ad libitum (Presence, Neovia Nutrição e

Saúde Animal LTDA, Paulínia, SP, Brazil), the control group (C) and the other with 50% of dietary restriction (R). Dams were maintained in single cages and part from each group received the vehicle of α -tocopherol (V), corn oil (1 mL/kg/day), α -tocopherol (TOC, 350 mg/kg/day, by gavage) or tempol (T, 30 mg/kg/day, dissolved in the drinking water) to obtain groups of male offspring designated: CV (n = 9), CTOC (n = 11), CT (n = 7), RV (n = 12), RTOC (n = 10) and RT (n = 5). At the parturition day, litters were reduced to 8, from then both groups received food *ad libitum*. The litters were weaned at age of 21 days. Afterwards, groups of male rats corresponding to each group were maintained in collective cage, with 3 or 4 rats per group, with free access to water and food. At age of 90 and 120 days, systolic blood pressure was measured, by using cuff-tail plethysmography. Three days later, the animals were euthanized by decapitation, when blood samples were collected in EDTA-treated tubes to measure plasma TNF- α in part of groups and the inguinal subcutaneous adipose tissue (ISAT) and kidneys were harvested. The tissues were quickly frozen in liquid nitrogen and then kept in -80°C freezer, until experiments.

TNF- α levels in plasma

Samples of blood collected on EDTA was centrifuged at 4°C , for 30 min, at speed $7500\times g$. TNF- α was assessed by commercial radioimmunoassay kit, according to manufacturer.

Systolic blood pressure

Systolic blood pressure (SBP) was accessed by cuff-tail plethysmography (IITC Life Science B60-7/16", Life Science Instruments). The rats were acclimated to the measurement conditions for three consecutive days before the assessment of SBP that was an average from 5 measurements. During acclimation, as for the SBP measurements, rats were pre-heated at 36°C .

Superoxide anion(O_2^-) in inguinal subcutaneous adipose tissue (ISAT) and kidneys

O_2^- was measured by using lucigenin-enhanced chemiluminescence method. ISAT and kidney samples were thawed on an ice bath and homogenized immediately after resection in a tissue grinder tube with Teflon pestle (Kimble Chase, Rockwood, TN, USA) immersed in an ice-bath and coupled to a rotor (IKA®RW20, Staufen, Germany) at 1500 rpm for 5min, the ISAT and for 2 min, the kidney sample. Both tissues were homogenized in

radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer in proportions of 1g to 4 mL, the ISAT and 1g to 7 mL, the kidney sample. RIPA buffer was supplemented with protease and phosphatase inhibitors. The whole kidney homogenate was used for WB experiments and after centrifugation for O_2^- assessment. Both tissues homogenates were centrifuged in a micro refrigerated centrifuge (5430 R, Eppendorf, Hamburg, Germany), at 4 °C, for 12 min at 12000×g. Protein content in homogenate and supernatant was measured by using the Pholin pheno reagent method.²² The supernatant was used for O_2^- assessment after adding phosphate buffer saline (pH7.4) in a proportion of 0.1ml:0.8ml, in the absence and in the presence of 100μM NADPH. Chemiluminescence was measured in a luminometer (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finland) at 30s intervals for 5min at 37°C, before and after adding 10μM lucigenin. The assays were run in triplicate.

Expressions of ACE2 and AT₁R in the kidney

Aliquots of 80 μg protein were electrophoresed in 12.5% SDS-PAGE and transferred on to nitrocellulose membranes. Incubating membranes in 5% BSA prevented non-specific binding. The membranes were blotted with antibodies against ACE2 (1:1000), AT₁R (1:500) and β-actin (1:5000). Each membrane was submitted to two stripping. After membranes were exposed to the corresponding secondary antibodies, the blots were visualized with a chemiluminescence imaging system (ChemiDoc MP, BioRad, Hercules, CA, USA) after incubation with an enhanced chemiluminescence kit.

Statistical Analysis

The results are expressed as the mean ± SEM. Two-way ANOVA followed by a Bonferroni test was applied for comparisons among groups. One-way ANOVA followed by the Dunnett test was used to compare protein expressions with their respective control. GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) was used to perform data analyses.

Results

Maternal and offspring general parameters

As shown in Table 1, maternal dietary restriction reduced maternal body weight gain and offspring birth weight. Neither TOC nor T recovered body weight gain, but the RT offspring showed the same birth weight as CV group. At weaning, as well as, at adult age, 120

days old, all groups showed the same body weight. Furthermore, at 120 days old, all groups showed the same kidney weight.

Plasma TNF- α levels

As shown in Figure 8, the plasma levels of TNF- α , one marker of inflammatory process, was not changed in the adult offspring submitted to prenatal dietary restriction, or in the adult offspring submitted to both dietary restriction and TOC treatment.

O₂⁻ in ISAT and kidneys

In ISAT, neither TOC nor T affected basal or NADPH oxidase-dependent O₂⁻ levels in control group. However, RTOC group showed higher basal levels of O₂⁻ than CTOC and also than RV and RT groups. Additionally, RTOC group showed in ISAT, higher NADPH oxidase-dependent O₂⁻ levels than CTOC and also than RT groups.

In the kidneys, no prenatal treatment affected basal levels of superoxide anion. However, RTOC group presented higher levels of NADPH oxidase-dependent O₂⁻ than any other group.

Expressions of ACE2 and AT₁R in the kidney

ACE2 was increased in the kidney of CTOC and CT groups compared with CV. ACE2 was also increased in RV and RTOC groups compared with CV and RT groups. Regarding AT₁R, it is increased in CTOC, RV and RTOC compared with CV group (Figure 10).

Systolic blood pressure

Adult offspring submitted to prenatal dietary restriction showed increased SBP at age of 90 and 120 days. RTOC showed the same SBP as RV group at both ages, while RT showed lower levels of SBP than RV group at both ages (Figure 11).

Discussion

The unprecedented findings in this study are: i) tempol, but not α -tocopherol, prevented maternal dietary restriction-induced hypertension and recovered AT₁R and ACE2 levels in the kidneys; ii) TOC administered simultaneously with maternal dietary restriction increased levels of superoxide anion in ISAT, partially due to NADPH oxidase activity, as well as, increased activity of NADPH oxidase in kidneys.

The striking difference of 79% in maternal weight gain during pregnancy (Table 1), between control and restricted dams, indicates how severe was the undernutrition. As a parameter to compare, by using a multideficient diet to produce malnutrition in our Laboratory, 23% of difference in maternal weight gain was observed.¹⁴ To enlighten the undernutrition severity, TOC (350 mg/kg/day), the same dosage presently used, recovers LPS-induced low maternal weight gain, decreases hepatic and placental oxidative stress and recovers fetal weight,²³ likely by ameliorating general and placental blood flow. However, with the present dietary restriction, even hepatic and placental oxidative stress had been reduced by TOC, nutritional maternal reserve was not enough to recover maternal weight gain or the pup birth weight. As TOC, T did not recover maternal weight gain, although pup birth weight was similar to control group. This finding does not necessarily mean that T recovered the pup birth weight of dams submitted to dietary restriction, since birth weight of RT was also similar to RV group. Albeit the reduced offspring birth weight in RV and RTOC groups, the body weight catch up among groups was observed at weaning. Yura et al.¹⁷ has observed offspring body weight catch up at age of 10 days after 30% maternal dietary restriction during pregnancy. Similarly, Garofano et al.²⁴ observed offspring body weight catch up at weaning, after 50% maternal dietary restriction from the 15th pregnancy day up to parturition. These studies indicate that whether the maternal restriction has been moderate or severe, the body weight catch up is rapidly observed after dams are receiving appropriate dietary provision, likely due to a higher compensatory diet intake during lactation.²⁵

Desai et al.²⁶ have shown upregulation of adipogenic transcription factors in newborn and adult rats submitted to 50% maternal dietary restriction. Counteracting natural expectations, the adult offspring submitted to maternal dietary restriction did not show alteration in plasma TNF- α (Figure 8). TNF- α is a proinflammatory cytokine released by inflammatory cells infiltrating obese adipose tissue.²⁷ Two aspects are peculiar to the present study: First, in the present study dietary restriction was imputed during all pregnancy. In the mentioned study, Desai et al.²⁶ showed upregulation of adipogenic transcription factors in rats whose maternal dietary restriction began at 10th pregnancy day. He et al.²⁸ showed increased levels of TNF- α in Sprague-Dawley offspring rats submitted to 50% maternal dietary restriction from 10th pregnancy day to parturition. Similarly, placental hypoxia on the 19th pregnancy day also leads to high plasma levels of TNF- α in the offspring.²⁹ Second, in the present study the rats were maintained on standard diet after weaning and did not show overweight compared to control rats. Increment in inflammatory cytokines associated to

increment in visceral fat mass is common when the rodent receives a high fat diet at adult life.^{18,21} Development of adipose tissue during fetal organogenesis is not yet completely clear. In a recent review, Berry et al.³⁰ have delineated adipose tissue organogenesis in mice beginning at 13.5th day post-conception and finishing at 20th postnatal day. According to them, inguinal, periscapular and retroperitoneal white adipose tissue are formed until birth, while perigonadal and mesenteric white adipose tissue are formed from birth to 20th postnatal day. On the basis of this review, in the present study at the begin of adipogenesis maternal nutritional reserve was already reduced. On the other hand, during perigonadal and mesenteric adipogenesis, nursing mothers were on free access to diet. From our data, it is not clear how adipogenesis was affected, but on the basis of unaltered TNF- α and offspring body weight at age of 120 days, it may be suggested that adipose tissue was not affected.

Fifty per cent of maternal dietary restriction leads to compromised reactivity of strain vessels^{31,32} in the offspring at age of 105 days, that is recovered with apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase.³² Maternal malnutrition induced by a multideficient diet leads to augmented levels of MDA in the offspring kidney at age of 90 days,¹⁴ but this difference in the levels of MDA disappears in the offspring at age of 150 days.¹⁵ In the present study, increased levels of superoxide anion were not seen in the kidneys or in ISAT of offspring at age of 120 days. This finding leads to consider that ageing is characterized by reduction in MDA as a result of a balance between prooxidant and antioxidant molecules.³³ The effects of maternal undernutrition and antioxidant supplementation on status of oxidative stress in adipose tissue were investigated in the present study to seek mechanisms of hypertension programmed during intrauterine life, following previous studies of our Laboratory.^{15,23,34,35} In previous studies, it was observed that TOC induces hypertension, from age of 90 days when administered during lactation¹⁵ or after age of 210 days when it is administered during pregnancy²³ and in a higher dosage (500 mg/kg/day) it increases SBP from the 30 days old.³⁶ However, whether TOC is administered during lactation or during pregnancy, adulthood offspring does not show any alteration in levels of malondialdehyde (MDA) in the kidneys or in liver at adult life. On the other hand, juvenile rats treated with TOC during lactation present increased activities of PKC and PKA in the kidney.¹⁵ Furthermore, 90 days-old rats treated with TOC during prenatal life present augmented expressions of PKC ϵ , λ and ζ in the kidneys.³⁶ Therefore, increased superoxide anion dependent of NADPH oxidase in ISAT and kidneys in offspring submitted to simultaneous maternal dietary restriction and TOC (Figure 9) seems an effect of PKC downstream pathway, rather than NADPH oxidase overexpression, according previous finding.³⁶ Besides a programmed upstream of NADPH oxidase activity,

increased oxidative stress in adipose tissue may also indicate the presence of inflammatory infiltrating cells. Regardless the cause, increased oxidative stress in adipose tissue contributes to insulin resistance and hypertension.³⁷ In spite T has shown prooxidant effect in the kidney of neonate whose mothers were treated with T (30 mg/kg/day) along pregnancy, its effect on later renal oxidative stress disappeared,³⁶ as well as it was not present in ISAT or in the kidneys from the offspring submitted to T alone or in the offspring submitted simultaneously to maternal dietary restriction and T.

Previous studies have shown that hypertension induced by maternal protein restriction³⁸ and maternal multideficient diet^{14,15} is associated with changes in AT₁R in the kidneys along development. Furthermore, our previous studies have shown that AT₁R machinery signaling is affected and renal Na⁺ handling is partially accountable for maternal undernutrition-induced hypertension. Maternal dietary restriction also led to augmented abundance of AT₁R in the kidneys (Figure 10C). Different from our previous results whose maternal undernutrition was induced by a multideficient diet,¹⁴ TOC did not prevent the increment in AT₁R density. Further, TOC *per se* programmed elevation in the AT₁R abundance, as previously shown,³⁶ but the effect was not cumulative in the offspring of restricted mothers treated with TOC. T also programmed elevation in AT₁R in the kidney of adult offspring. However, the RT group (offspring of maternal dietary restriction mothers treated with tempol) showed the same level of AT₁R as the CV group. Taking into account the elevated levels of AT₁R in RV and RTOC groups, which showed elevated SBP and the reduced level of AT₁R in RT, which did not show elevated SBP, Ang II might be considered a pivot in elevation of SBP. The levels of ACE2 in the kidney also put SRA in the scenario of the hypertension. The question emerging is: why CTOC and CT, which showed increased AT₁R and ACE2 expressions, did not show elevated SBP? As above-mentioned TOC (350 mg/kg/dy) prenatally administered leads to hypertension at age of 210 days, while T (30 mg/kg/day) prenatally administered, besides AT₁R alterations shown herein impairs renal nephrogenesis, but do not lead to hypertension at age of 90 days,³⁶ or at age of 120 days.

ACE2 is a monocarboxypeptidase found in the kidney, especially in the proximal tubule brush border, in endothelial and smooth muscle cells of renal vessels, and in podocytes. It has a high catalytic efficiency to cleave Ang II to generate Ang (1–7), a biologically active peptide that binds to Mas receptor and antagonizes Ang II effects.^{39,40} Augmented ACE2 expression in the kidneys of CTOC, CT, RV and RTOC groups (Figure 3D) exhibits a parallelism with elevated AT₁R (Figure 10C), suggesting that increased Ang II action triggers increment of ACE2 expression. Not only maternal dietary restriction programmed increment

of ACE2, but TOC and T also did it. On the other hand, the RT group, which showed reduced levels of ACE2 also showed reduced levels of AT₁R. One report regarding repercussion of maternal dietary restriction on ACE2 in offspring⁴¹ shows elevated lung ACE2 activity and unaltered renal ACE2 mRNA. There is not yet a consensus regarding the profile of ACE2 in diseases. Genetic determined db/db diabetic mice show increased level,⁴² while SHR⁴³ show decreased level of ACE2 in the kidney. Anguiano et al.³⁹ in their review, suggest ACE2 upregulation as a compensatory mechanism to counteract renal dysfunction.

From the present findings, elevated levels of AT₁R in the kidneys is underlying the elevated systolic blood pressure in the offspring submitted to maternal dietary restriction (Figure 11), while elevated systolic blood pressure in the offspring submitted to maternal dietary restriction and simultaneously treated with α -tocopherol could be due to elevated oxidative stress in ISAT and kidneys, as well as, to elevated levels of AT₁R in the kidneys. On the other hand, tempol associated to maternal dietary restriction prevented elevation in AT₁R and also the elevation in systolic blood pressure. Effects of α -tocopherol on NADPH oxidase activity in ISAT and kidneys seems seminal to elevated systolic blood pressure, since the control offspring treated with α -tocopherol showed elevated AT₁R, but did not show elevated systolic blood pressure.

Acknowledgments

The authors are grateful to Dr Dayane Aparecida Gomes for providing access to the apparatus located in her laboratory and Nielson T. Mello and Danielle Dutra Pereira for technical support.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

Council for Scientific and Technological Development (CNPq; 307366/2015-4 and 132274/2017-5) and by the Pernambuco State Foundation (FACEPE; APQ-0409-2.07/14, APQ-1133-2.07/12).

References

1. Gostin LO. Hunger, Health, and Compassion. *JAMA* 2017; 317: 1939-1940.
2. Duranthon V and Chavatte-Palmer P. Long term effects of ART: What do animals tell us? *Mol Reprod Dev* 2018; 85: 348-368.
3. Silva JHC, Alves ACS and Fernandes MP. Developmental Origins of Cardiometabolic Diseases: Role of the Maternal Diet. *Front Physiol* 2016; 7: 504
4. Sun Y, Zhang L, Duan W, et al. Association between famine exposure in early life and type 2 diabetes mellitus and hyperglycemia in adulthood: Results from the China Health And Retirement Longitudinal Study (CHARLS). *J Diabetes* 2018; 10: 724-733.
5. Wang Z, Li C, Yang Z, et al. Fetal and infant exposure to severe Chinese famine increases the risk of adult dyslipidemia: Results from the China health and retirement longitudinal study. *BMC Public Health* 2017; 17: 488.
6. Wu L, Feng X, He A, et al. Prenatal exposure to the Great Chinese Famine and mid- age hypertension. *PLoS One* 2017; 12: e0176413.
7. Li Y, Jaddoe VW, Qi L, et al. Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hypertension in adulthood. *J Hypertens* 2011; 29: 1085-1092.
8. Wang N, Ning Z, Xia F, et al. Exposure to famine in early life and chronic kidney diseases in adulthood. *Nutr Diabetes* 2018; 8: 4.
9. Lakkis JI and Weir MR. Obesity and Kidney Disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2018; 61: 157-167.
10. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 807-825.
11. Zhang X and Lerman LO. The metabolic syndrome and chronic kidney disease. *Transl Res* 2017; 183: 14-25.
12. Rincón J, Correia D, Arcaya JL, et al. Role of Angiotensin II type 1 receptor on renal NAD(P)H oxidase, oxidative stress and inflammation in nitric oxide inhibition induced-hypertension. *Life Sci* 2015; 124: 81–90.
13. Banday AA and Lokhandwala MF. Oxidative stress-induced renal angiotensin AT1 receptor upregulation causes increased stimulation of sodium transporters and hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: 698-706.
14. Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, et al. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys* 2011; 505: 91-97.

15. Vieira-Filho LD, Cabral EV, Farias JS, et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br J Nutr* 2014; 111: 1932-1944.
16. Suzuki M, Shibamura M and Kimura S. Effect of severe maternal dietary restriction on growth and intra-abdominal adipose tissue weights in offspring rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2010; 56: 293-298.
17. Yura S, Itoh H, Sagawa N, et al. Role of premature leptin surge in obesity resulting from intrauterine undernutrition. *Cell Metab* 2005; 1: 371-378.
18. Xie L, Zhang K, Rasmussen D, et al. Effects of prenatal low protein and postnatal high fat diets on visceral adipose tissue macrophage phenotypes and IL-6 expression in Sprague Dawley rat offspring. *PLoS One* 2017; 12: e0169581.
19. Iwasa T, Matsuzaki T, Yano K, et al. The effects of prenatal undernutrition and a high-fat postnatal diet on central and peripheral orexigenic and anorexigenic factors in female rats. *Endocr J* 2017; 64: 597-604.
20. Zinkhan EK, Yu B, Callaway CW, et al. Intrauterine growth restriction combined with a maternal high-fat diet increased adiposity and serum corticosterone levels in adult rat offspring. *J Dev Orig Health Dis* 2018; 9: 315-328.
21. Lecoutre S, Petrus P, Rydén M, et al. Transgenerational Epigenetic Mechanisms in Adipose Tissue Development. *Trends Endocrinol Metab* 2018; 29: 675-685.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
23. Vieira-Filho LD, Farias JS, De Queiroz DB, et al. Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α -tocopherol. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864: 3577-3587.
24. Garofano A, Czernichow P, Bréant B. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 1997; 40: 1231-1234.
25. Suzuki M1, Shibamura M, Kimura S. Effect of severe maternal dietary restriction on growth and intra-abdominal adipose tissue weights in offspring rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 2010; 56: 293-298.
26. Desai M, Guang H, Ferelli M, et al. Programmed upregulation of adipogenic transcription factors in intrauterine growth-restricted offspring. *Reprod Sci* 2008; 15: 785-796.
27. Zamarron BF, Mergian TA, Cho KW, et al. Macrophage Proliferation Sustains Adipose Tissue Inflammation in Formerly Obese Mice. *Diabetes* 2017; 66: 392-406.

28. He J, Niu Y, Wang F, et al. Dietary curcumin supplementation attenuates inflammation, hepatic injury and oxidative damage in a rat model of intra-uterine growth retardation. *Br J Nutr* 2018; 120: 537-548.
29. Riddle ES, Campbell MS, Lang BY, et al. Intrauterine growth restriction increases TNF α and activates the unfolded protein response in male rat pups. *J Obes* 2014; 2014: 1-9.
30. Berry DC, Jiang Y and Graff JM. Emerging Roles of Adipose Progenitor Cells in Tissue Development, Homeostasis, Expansion and Thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27: 574-585.
31. Franco MCP, Dantas AP, Akamine EH, et al. Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40: 501-509.
32. Franco MCP, Akamine EH, Rebouças N, et al. Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: implications of oxidative stress. *Life Sci* 2007; 80: 709-715.
33. Erdinçler DS, Seven A, Inci F, et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: effects of aging and hypercholesterolemic diet. *Clin Chim Acta* 1997; 265: 77-84.
34. Paixão AD, Maciel CR, Teles MB, et al. Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. *Biol Neonate* 2001; 80: 239-246.
35. Vieira-Filho LD, Cabral EV, Santos FT, et al. Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. *Pediatr Nephrol* 2011; 26: 2019-2029.
36. Ribeiro VS, Cabral EV, Vieira-Filho LD, et al. Perinatal α -tocopherol overload programs alterations in kidney development and renal angiotensin II signaling pathways at birth and at juvenile age: Mechanisms underlying the development of elevated blood pressure. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2018; 1864: 2458-2471.
37. Reho JJ and Rahmouni K. Oxidative and inflammatory signals in obesity-associated vascular abnormalities. *Clin Sci* 2017; 131: 1689-1700.
38. Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, et al. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287: 262-267.
39. Anguiano L, Riera M, Pascual J, et al. Circulating ACE2 in Cardiovascular and Kidney Diseases. *Curr Med Chem* 2017; 24: 3231-3241.

40. Williams VR and Scholey JW. Angiotensin-converting enzyme 2 and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2018; 27: 35-41.
41. Rivière G, Michaud A, Breton C, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and ACE activities display tissue-specific sensitivity to undernutrition-programmed hypertension in the adult rat. *Hypertension* 2005; 46:1169-1174.
42. Chodavarapu H, Grobe N, Somineni HK, et al. Rosiglitazone treatment of type 2 diabetic db/db mice attenuates urinary albumin and angiotensin converting enzyme 2 excretion. *PLoS One* 2013; 8: 1-12.
43. Tikellis C, Cooper ME, Bialkowski K, et al. Developmental expression of ACE2 in the SHR kidney: a role in hypertension? *Kidney Int* 2006; 70: 34-41.

Table 1 - Maternal and offspring parameters

	CV (n=11)	CTOC (n=8)	CT (n=12)	RV (n=11)	RTOC (n=9)	RT (n=9)
Maternal body weight gain (g)	94±5	105±13	90±5	20±7***	22±3***	44±7***
Offspring birth weight (g)	6.4±0.2	6.3±0.2	6.3±0.1	5.5±0.1**	5.5±0.1*	5.8±0.1
Number of pups	9.2±0.5	9.8±0.7	9.5±0.4	9.5±0.4	9.5±0.3	9.8±0.4
Offspring body weight at 30 days (g)	86±4	82±3	84±3	81±4	74±3	82±8
Offspring body weight at 120 days (g)	363±9	346±9	349±7	343±8	351±17	364±18
Offspring kidney weight	1.3±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	1.1±0.1	1.2±0.1	1.2±0.1
Offspring renal Index (%)	69±1	67±1	67±3	67±1	67±3	69±2

Values are mean ± SEM. Statistical analyses was performed using two-way ANOVA followed by Bonferroni test: * P < 0.05, ** P 0.01, ***P < 0.001, effect of dietary restriction. C and R are, respectively, control group maintained with diet chow ad libitum and dietary restricted dams or offspring. Additionally, dams were simultaneously treated with vehicle (V, corn oil, 1ml/kg/day), α -tocopherol (TOC, 350 mg/kg/day, p.o., by gavage) or with tempol (T, 30 mg/kg/day, dissolved in drink water).

Figure 1 - Levels of TNF- α in adult offspring. CV and RV are, respectively, control (C) offspring whose mothers were maintained on free access to diet and with 50% dietary restriction (R) that were simultaneously treated with vehicle (V, corn oil) or α -tocopherol (TOC, 350 mg/kg/dia, p.o., by gavage). Values are mean $\pm$ SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni test: No statistical difference was observed between means.

Figure 2 - Superoxide anion (O_2^-) levels in inguinal adipose tissue and kidneys in offspring at adult age. Basal (A) and NADPH-dependent (B) O_2^- levels in inguinal adipose tissue. Basal (C) and NADPH-dependent (D) O_2^- levels in kidneys. Values are mean $\pm$ SEM from 5 to 7 experiments. Each preparation was obtained using pups from different mothers. C and R are, respectively, control offspring whose mothers were maintained with diet chow ad libitum, during pregnancy, and dietary restricted offspring, whose mothers were maintained with 50% dietary restriction. Additionally, dams were simultaneously treated with vehicle (V, corn oil, 1ml/kg/day), α -tocopherol (TOC, 350 mg/kg/day, p.o., by gavage) or with tempol (T, 30 mg/kg/day, dissolved in drink water). Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test: $\dagger p < 0.05$: RV vs RTOC, $*** p < 0.001$: RTOC vs CTOC, $\# p < 0.05$: RTOC vs RT; (B) $* p < 0.05$: RTOC vs CTOC, $## p < 0.01$: RTOC vs RT, (C) $* p < 0.05$ RV vs CV, $\dagger p < 0.05$ RTOC vs RV, (D) $\dagger p < 0.05$: RV vs RTOC, $\# p < 0.05$: RTOC vs RT, $\dagger p < 0.05$: CTOC vs RTOC.

Figure 3 - AT₁R and Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) expressions in kidneys from offspring at adult age. A and B are respectively representative image from immunoblotting for AT₁R and ACE2. C and D are, respectively, levels of AT₁R and ACE2 in whole kidney homogenate. Groups are described in Figure 2. Values are mean $\pm$ SEM from 5 to 7 experiments. Each experiment was performed using pups from different mothers. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by Dunnett test: $\ddagger\ddagger\ddagger P < 0.001$, effect from interaction; $** P < 0.01$, effect from dietary restriction; $*** P < 0.001$, effect from dietary restriction; $\# P < 0.05$, effect from T; $## P 0.01$, effect from T; $\dagger P < 0.05$, effect from TOC.

Figure 4 - Systolic blood pressure from adult offspring at ages of 90 and 120 days. Values are mean $\pm$ SEM from 4 to 6 rats born from different mothers. Groups are described in

Figure 2. Statistical analysis was performed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test: *** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$, effect of maternal dietary restriction; # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$, effect of T.

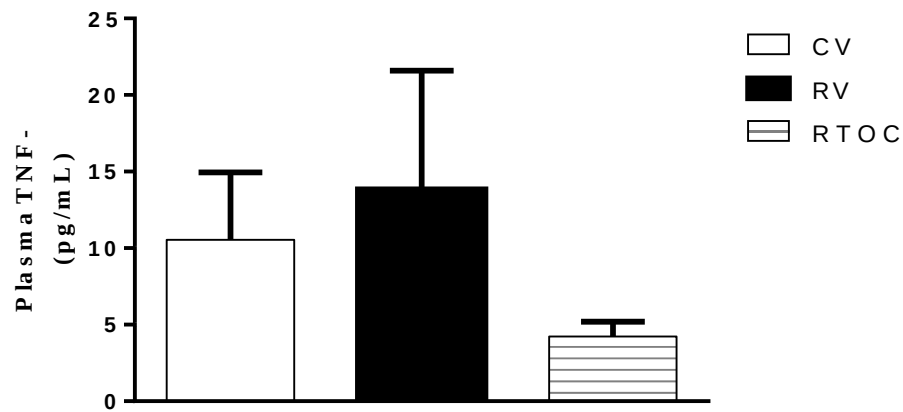


Figure 1 - Levels of TNF- α in adult offspring.

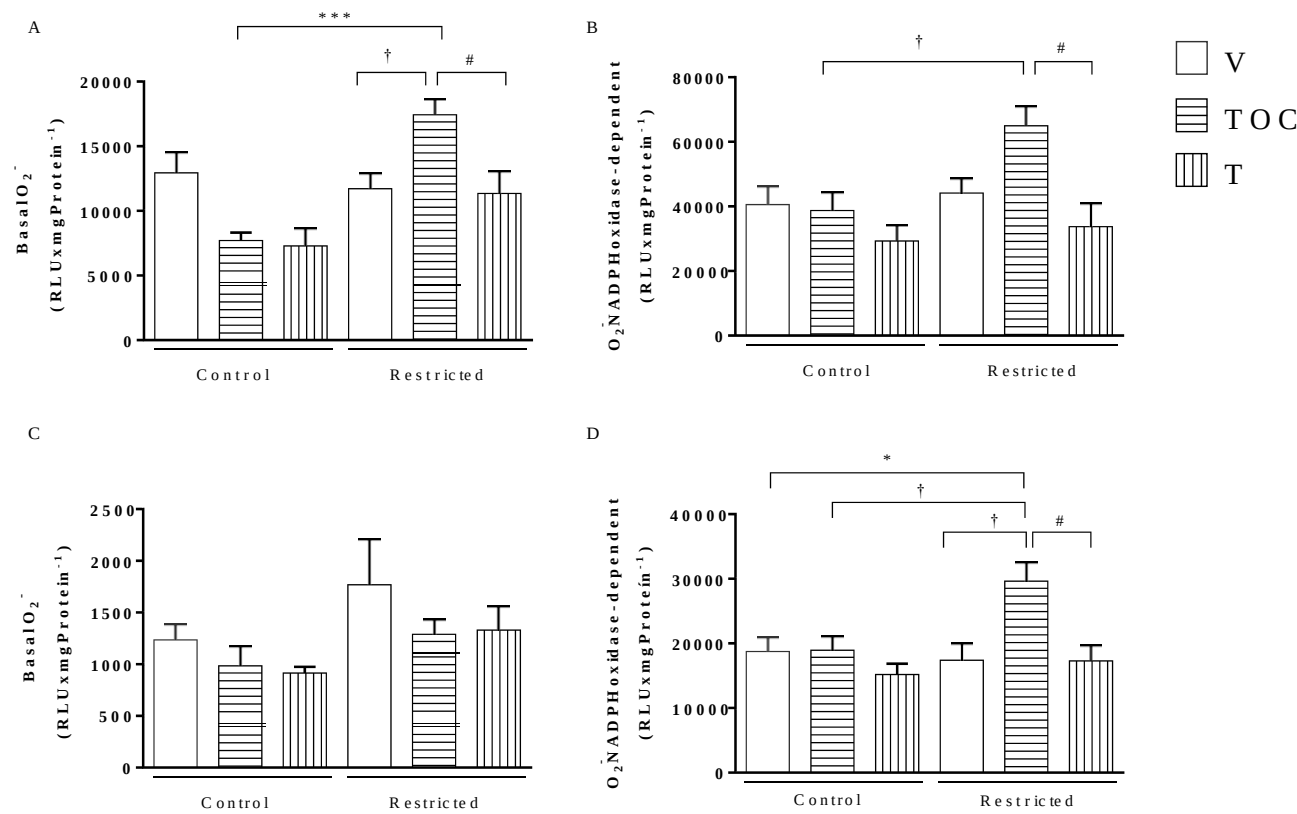


Figure 2 - Superoxide anion (O_2^-) levels in inguinal adipose tissue and kidneys in offspring at adult age.

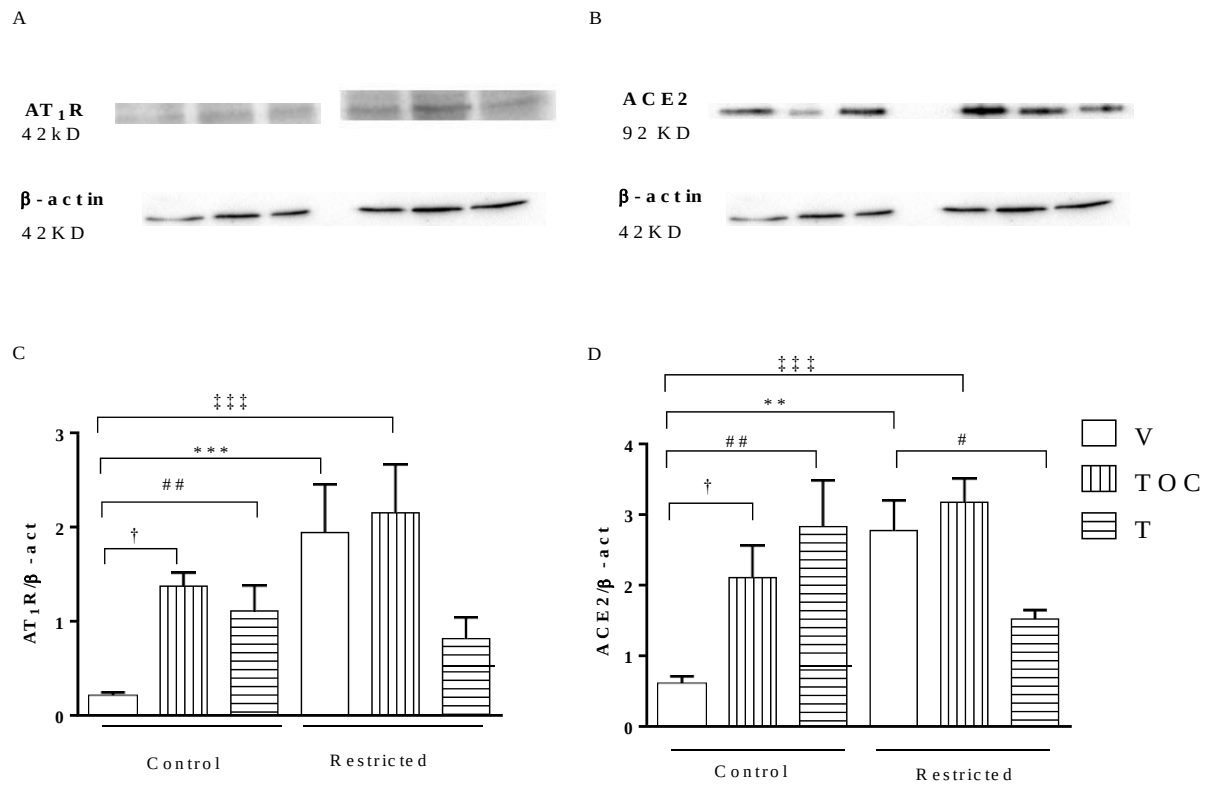


Figure 3 - AT₁R and Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) expressions in kidneys from offspring at adult age.

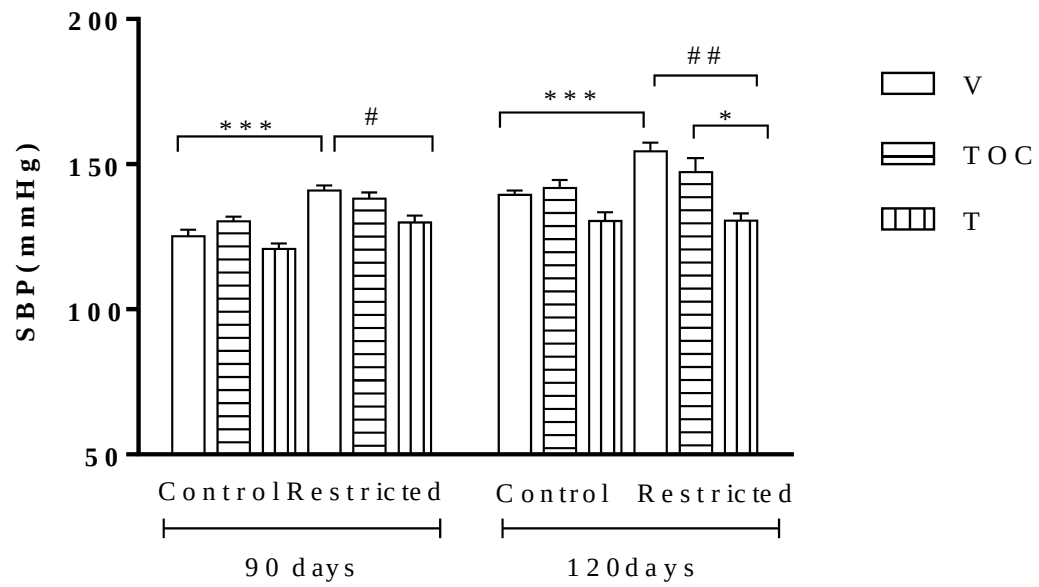


Figure 4 - Systolic blood pressure from adult offspring at ages of 90 and 120 days.

4 CONCLUSÃO

A partir dos achados atuais, concluímos que níveis elevados de AT1R nos rins são subjacentes à pressão arterial sistólica elevada na prole submetida à restrição alimentar materna. O α -tocoferol não preveniu a elevação da pressão arterial sistólica na prole submetida à restrição dietética materna, provavelmente porque não preveniu a elevação do AT1R nos rins, mas levou ao aumento do estresse oxidativo no tecido adiposo subcutâneo inguinal e nos rins. Por outro lado, o tempol associado à restrição dietética materna, não afetou o estresse oxidativo no tecido adiposo subcutâneo inguinal ou nos rins, impediu a elevação da AT1R e também a elevação da pressão arterial sistólica.

REFERÊNCIAS

- ABDULMAHDI, W. et al. Kidney dysfunction in the low birth weight murine adult: implications of oxidative stress. **American journal of physiology Renal physiology**, v. 315, n. 3, p. 583–594, 2018.
- AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The International Journal of Biochemistry The roles of cellular reactive oxygen species , oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 10, p. 1634–1650, 2010.
- ASABA, K. et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy. **Kidney international**, v. 67, n. 5, p. 1890–1898, 2005.
- AVIELLO, G.; KNAUS, U. G. NADPH oxidases and ROS signaling in the gastrointestinal tract. **Mucosal Immunology**, v. 11, n. 4, p. 1011–1023, 2018.
- BARDAWEEL, S. K. et al. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 50, n. 3, p. 193–201, 2018.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases : Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.
- BERRY, D. C. et al. The developmental origins of adipose tissue. **Development.**, v. 140, n. 19, p. 3939–3949, 2013.
- CAO, R. Y. et al. FNDC5: a novel player in metabolism and metabolic syndrome. **Biochimie**, v. 158, p. 111–116, 2019.
- CASSIS, L. A. et al. Local Adipose Tissue Renin-Angiotensin System. **Current Hypertension Reports**, v. 10, n. 2, p. 93–98, 2008.
- CHIARELLO, D. I. et al. Oxidative stress: Normal pregnancy versus preeclampsia. **Molecular Basis of Disease**, v. 18, p. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.12.005, 2018.
- EDWARDS, C. R. W. et al. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? **The Lancet**, v. 341, n. 8841, p. 355–357, 1993.
- EDWARDS, L. J. et al. Prenatal undernutrition, glucocorticoids and the programming of adult hypertension. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 11, p. 938–941, 2001.
- FOWLER, J. D. et al. Renin dynamics in adipose tissue : adipose tissue control of local renin concentrations. **American journal of physiology Endocrinology and metabolism**, v. 296, n. 2, p. 343–350, 2008.
- FURUKAWA, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004.

GAMI, A. S. et al. Metabolic Syndrome and Risk of Incident Cardiovascular Events and Death. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 49, n. 4, p. 403–414, 2007.

GIACCHETTI, G. et al. Overexpression of the Renin-Angiotensin System in Human Visceral Adipose Tissue in Normal and Overweight Subjects. **American Journal of Hypertension**, v. 15, n. 5, p. 381–388, 2002.

GODFREY, K. M. et al. Epigenetic Gene Promoter Methylation at Birth Is. **American Diabetes Association**, v. 60, n. 5, p. 1528–1534, 2011.

GONZALEZ, E. J. et al. The Effects of Tempol on Cyclophosphamide-Induced Oxidative Stress in Rat Micturition Reflexes. **The Scientific Word Journal**, v. 2015, p. 1–13, 2015.

GRAY, C. et al. Excess Maternal Salt Intake Produces Sex-Specific Hypertension in Offspring : Putative Roles for Kidney and Gastrointestinal Sodium Handling. **PLOS one**, v. 8, n. 8, p. 1–14, 2013.

GRIGORE, D. et al. Placental insufficiency results in temporal alterations in the renin angiotensin system in male hypertensive growth restricted offspring. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 2, p. 804–811, 2007.

GRUNDY, S. M. Metabolic Syndrome Pandemic. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 4, p. 629–636, 2008.

GRUNDY, S. M. Metabolic syndrome update. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 26, n. 4, p. 364–373, 2016.

GUPTA, P. et al. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers : a case control study. **BioMed Central Pediatrics**, v. 4, n. 14, p. 1–7, 2004.

GUPTE, M. et al. ACE2 is expressed in mouse adipocytes and regulated by a high-fat diet. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, n. 3, p. 781–788, 2008.

HADI, H. EL; VETTOR, R.; ROSSATO, M. Vitamin E as a Treatment for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Reality or Myth? **Antioxidants (Basel)**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2018.

HAHN, S. M. et al. Hemodynamic effect of the nitroxide superoxide dismutase mimics. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 5/6, p. 529–535, 1999.

HAHN, S. M. et al. Evaluation of the hydroxylamine tempol-h as an in vivo radioprotector. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n. 6, p. 953–958, 2000.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 5–20, 2001.

HAN, C. Y. et al. NADPH Oxidase-derived Reactive Oxygen Species Increases Expression of

Monocyte Chemotactic Factor Genes in Cultured Adipocytes *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 13, p. 10379–10393, 2012.

HEYWOOD, W. E. et al. Programming of defective rat pancreatic β -cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. **Clinical Science**, v. 107, n. 1, p. 37–45, 2004.

HITCHLER, M. J.; DOMANN, F. E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development development. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 1023–1036, 2007.

JHA, J. C. et al. Diabetes and Kidney Disease: **Antioxidants & redox signaling**, v. 25, n. 12, p. 657–684, 2016.

KADOWAKI, T. et al. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome Find the latest version : Review series Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 7, p. 1784–1792, 2006.

KAMAI-ELDIN, A.; APPELQVIST, L.-. The Chemistry and Antioxidant Properties of Tocopherols and Tocotrienols. **Lipids**, v. 31, n. 7, p. 671–701, 1996.

KOBORI, H. et al. The Intrarenal Renin-Angiotensin System : From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. **Pharmacological Reviews**, v. 59, n. 3, p. 251–287, 2007.

LAKSHMY, R. Metabolic syndrome: Role of maternal undernutrition and fetal programming. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 14, n. 3, p. 229–240, 2013.

LIU, X. et al. Maternal Protein Restriction Induces Alterations in Hepatic Unfolded Protein Response-Related Molecules in Adult Rat Offspring. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. doi: 10.3389/fendo.2018.00676, 2018.

LIUA, X. et al. iTRAQ-Based Proteomic Analysis of Neonatal Kidney from Offspring of Protein Restricted Rats Reveals Abnormalities in Intraflagellar Transport Proteins. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 185–199, 2017.

LORIA, A. S.; POLLOCK, D. M.; POLLOCK, J. S. Early life stress sensitizes rats to angiotensin II-induced hypertension and vascular inflammation in adult life. **Hypertension**, v. 55, n. 2, p. 494–499, 2010.

LU, H. et al. Angiotensin II increases adipose angiotensinogen expression. **American journal of physiology Endocrinology and metabolism**, v. 292, n. 5, p. 1280–1287, 2007.

MARCUS, Y.; SHEFER, G.; STERN, N. Adipose tissue renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) and progression of insulin resistance. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 378, n. 1–2, p. 1–14, 2013.

MASLOV, L. N. et al. Is oxidative stress of adipocytes a cause or a consequence of the

metabolic syndrome ? **Journal of Clinical & Translational Endocrinology**, v. 15, p. 1–5, 2019.

MASSIÉRA, F. et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 14, p. 2727–2736, 2001.

MIYAMOTO, K. et al. Very-High-Dose α -Tocopherol Supplementation Increases Blood Pressure and Causes Possible Adverse Central Nervous System Effects in Stroke-Prone Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 2, p. 556–566, 2009.

MORITZ, K. M. et al. Review: Sex specific programming: A critical role for the renal renin – angiotensin system. **Placenta**, v. 24, p. 40–46, 2010.

MOTTILLO, S. et al. The Metabolic Syndrome and Cardiovascular Risk. **Journal of American College of Cardiology**, v. 56, n. 14, p. 1113–1132, 2010.

NAGASHIMADA, M.; OTA, T. Role of Vitamin E in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **IMBMB Life**, v. 15, p. 641–648, 2012.

NÜSKEN, E. et al. Developmental Programming of Renal Function and Re-Programming Approaches. **Frontiers in Pediatrics**, v. 6, n. 36, p. 1–9, 2018.

OZAKI, T. et al. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. **Journal of Physiology**, v. 530, n. 1, p. 141–152, 2001.

RAK, R. et al. Neuroprotection by the stable nitroxide Tempol during reperfusion in a rat model of transient focal ischemia. **Journal of neurosurgery**, v. 92, n. 4, p. 646–651, 2000.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RAO, K. R.; PADMAVATHI, I. J. N.; RAGHUNATH, M. Maternal micronutrient restriction programs the body adiposity, adipocyte function and lipid metabolism in offspring: A review. p. 103–108, 2012.

SANTOS, G. B. et al. Nitroxide 4-Hydroxy-2,2',6,6'-tetramethylpiperidine 1-oxyl (Tempol) Inhibits the Reductase Activity of Protein Disulfide Isomerase via Covalent Binding to the Cys400 Residue on CXXC Redox Motif at the active site. **Chemico-Biological Interactions**, v. 272, p. 117–124, 2017.

SÁRKÖZY, M. et al. Mechanisms and Modulation of Oxidative / Nitrate Stress in Type 4 Cardio-Renal Syndrome and Renal Sarcopenia. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. doi: 10.3389/fphys.2018.01648, 2018.

SCHNACKENBERG, C. G. Oxygen radicals in cardiovascular – renal disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, n. 2, p. 105–194, 2002.

SHAPIRA, S. N.; SEALE, P. Transcriptional Control of Brown and Beige Fat Development and Function. **Obesity Biology and Integrated Physiology**, v. 27, n. 1, p. 13–21, 2019.

- SHEN, W. et al. Adipose Tissue Quantification by Imaging Methods: A Proposed Classification. **Obesity Research**, v. 11, n. 1, p. 5–16, 2003.
- SILVA, E. et al. Antioxidant Supplementation Modulates Age-Related Placental Bed Morphology and Reproductive Outcome in Mice. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 3, p. 1–11, 2015.
- SINGH, R. R. et al. Prenatal corticosterone exposure results in altered AT 1 / AT 2 , nephron deficit and hypertension in the rat offspring. **The Journal of Physiology**, v. 579, p. 503–513, 2007.
- SUN, K.; KUSMINSKI, C. M.; SCHERER, P. E. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 2011.
- TAFTI, S. A. et al. Maternal undernutrition upregulates apoptosis in offspring nephrogenesis. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 2, n. 4, p. 226–235, 2011.
- TARAFDAR, A.; PULA, G. The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. doi.org/10.3390/ijms19123824, 2018.
- TCHERNOF, A.; DESPRÉS, J. Pathophysiology of human visceral obesity : an update. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 1, p. 359–404, 2013.
- TENÓRIO, M. B. et al. Oral antioxidant therapy for prevention and treatment of preeclampsia: Meta-analysis of randomized controlled trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 28, n. 9, p. 865–876, 2018.
- THOMPSON, L. P.; AL-HASAN, Y. Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. **Journal of Pregnancy**, v. 2012, p. doi:10.1155/2012/582748, 2012.
- WANG, Q. A. et al. Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1338–1344, 2013.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.
- WOODS, L. L.; WEEKS, D. A.; RASCH, R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction : Role of nephrogenesis. **Kidney International**, v. 65, p. 1339–1348, 2004.
- WU, G. et al. Recent Advances in Nutritional Sciences Maternal Nutrition and Fetal. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 9, p. 2169–2172, 2004.
- YIM, H. E.; YOO, K. H. Early life obesity and chronic kidney disease in later life. **Pediatric Nephrology**, v. 30, n. 8, p. 1255–1263, 2014.
- YVES GORIN; KAREN BLOCK. “Nox4 and diabetic nephropathy: With a friend like this who needs enemies”. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 61, p. 130–142, 2013.