

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

LUIS PAULO NOGUEIRA CABRAL BORGES

EFEITOS DA RESTRIÇÃO DIETÉTICA MATERNA OU DE ANTIOXIDANTES,
DURANTE A GRAVIDEZ, SOBRE INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
RIM DA PROLE DE RATOS

RECIFE

2013

LUIS PAULO NOGUEIRA CABRAL BORGES

EFEITOS DA RESTRIÇÃO DIETÉTICA MATERNA OU DE ANTIOXIDANTES,
DURANTE A GRAVIDEZ, SOBRE INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
RIM DA PROLE DE RATOS

Dissertação apresentada como cumprimento das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa Ana Durce Oliveira da Paixão.

RECIFE

2013

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Borges, Luis Paulo Nogueira Cabral

Efeitos da restrição dietética materna ou de antioxidantes, durante a gravidez, sobre indicadores de estresse oxidativo no rim da prole de ratos. / Luis Paulo Nogueira Cabral Borges - Recife: O Autor, 2013.

44 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Durce O. da Paixão.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2013.

Inclui referências e apêndices

1. Antioxidantes 2. Dieta 3. Rim I. Paixão, Ana Durce O. da (orient.) II. Título

613.286

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-388

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUIS PAULO NOGUEIRA CABRAL BORGES

EFEITOS DA RESTRIÇÃO DIETÉTICA MATERNA OU DE ANTIOXIDANTES,
DURANTE A GRAVIDEZ, SOBRE INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO
RIM DA PROLE DE RATOS

Aprovada em 28 de fevereiro de 2013.

Prof.^a Dr.^a Ana Durce O. da Paixão
Universidade Federal de Pernambuco
Orientadora – Titular interno

Prof.^a Dr.^a Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Universidade Federal de Pernambuco
Avaliadora externo – Titular externo

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva
Universidade Federal de Pernambuco
(Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão)
Avaliador externo- Titular externo

Prof. Dr. Rubem Carlos Araujo Guedes
Universidade Federal de Pernambuco
Avaliador externo- Titular interno

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier
Universidade Federal de Pernambuco
Suplente interno

Prof.^a. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão
Universidade Federal de Pernambuco
Suplente externo

Dedicado a toda minha família, por sempre estar ao meu lado e me dando total apoio em meus estudos. Em especial aos meus pais, Luiz N. Borges e Alda Maria C. Borges, e meus irmãos, Wagner N. C. Borges e Danilo N. C. Borges. Também a todos os meus amigos e pessoas que me deram seu apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me mostrar os caminhos certos a seguir. Como também, por ser o apoio nas horas difíceis e por toda luz que Ele dá em relação à ciência e ao conhecimento.

A Prof.^a Dr.^a Ana Durce O. da Paixão por ter aberto as portas de seu laboratório e permitir a execução desse trabalho. Também sou grato por toda ciência e conhecimento que me foi passado.

Ao Prof. Dr. Carlos Peres da Costa por ter me aberto as portas do departamento de fisiologia e farmacologia e por ter, com muita sabedoria, me passado um pouco de seu conhecimento em relação a fisiologia cardíaca, vascular e respiratória. Minha formação como fisiologista não seria a mesma sem oportunidade de ter estado com ele.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Carvalho, Universidade Federal da Paraíba, por ter me colocado nos caminhos da ciência e sempre estar me dá seu apoio e sábios conselhos. Sou muito grato por toda confiança e oportunidades.

A veterinária Cláudia Paiva por toda dedicação e empenho em cuidar dos animais.

Aos professores Rubem Guedes e Belmira Lara pelos conhecimentos de neurociência que me foram passados. A Prof.^a Glória Isolina pelos conhecimentos de farmacologia. E todos os professores da Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da UFPE por sempre se mostrarem abertos para partilhar sua ciência, conhecimento e informação.

Ao Laboratório de Farmacologia e Toxologia Pré-Clínica de Compostos Bioativos, na pessoa do Prof. Almir Wanderley e todos os seus alunos, por toda disponibilidade e partilha de equipamentos, muitas vezes sendo fundamentais para o bom andamento dos experimentos.

Ao Laboratório de Biofísica das Membranas, nas pessoas do prof.^o Cláudio Gabriel Rodrigues e todos os seus alunos, também por toda disponibilidade e partilha de equipamentos.

Ao Laboratório de Neurofisiologia, nas pessoas da Prof.^a Belmira Lara e todos os seus alunos, por todo o apoio que foi dado numa hora muito difícil desse trabalho, principalmente disponibilizando animais para que se pudesse dar continuidade ao bom andamento do mestrado.

A todos os amigos e companheiros de laboratório, em especial a Leucio Duarte Vieira-Filho, Edjair Vicente Cabral, Natalie Emanuelle R. e Silva, Daianna Rosse M.

Gonçalves, Bruna da Rosa Maggi Sant’Helena, Manoel Marcelino, Regina Souza Aires e Julianne Farias, por sempre se mostrarem presente dando total apoio, mostrarem empenho pessoal e trocando conhecimentos que foram fundamentais para a execução desse trabalho.

A todos os amigos e funcionários do departamento, especialmente David Felip, Alinny Issac, Fredson, Ricciely, Diego Queiroz e Fernanda Elizabeth por sempre estarem presentes e disponíveis quando necessário.

A todos os meus amigos e parceiros para todas as horas Oziel Albuquerque, Jefferson Alexandre, Diego Xavier, Renan Xavier, Antônio Luiz, Marcus Antonius, Gilberto, Israel Bezerra, Ivanildo Félix, Rivelino Gomes, Pedro Domingos, Marcone Trigueiro e tantos outros que sempre estão comigo em todas as horas e independente da situação.

A Tatiane Queiroz por todo seu apoio e dedicação ao meu lado, a cada dia se mostrando ser uma mulher incrível.

*Nenhuma tarefa, executada corretamente,
é realmente particular. É parte do trabalho
do mundo – Woodrow Wilson.*

RESUMO

Nesse trabalho foi investigado se o status antioxidante materno, durante a gestação, altera a expressão da gp91^{phox}, uma subunidade de membrana da NADPH oxidase, como também outros marcadores de estresse oxidativo no rim, e consequentemente os níveis de pressão sanguínea arterial da prole após o desmame. Ratas Wistar grávidas foram tratadas durante toda gestação com alfa-tocoferol, tempol, ou com uma restrição da ingestão dietética diária na ordem de 50% para reduzir as defesas antioxidantes. Aos 30 dias de idade a pressão arterial média foi mensurada, assim como os níveis de malondialdeído, glutathione reduzida e a expressão da gp91^{phox} no homogenato renal. O número de células positivas para angiotensina II foi contado, tanto no glomérulo como na região túbulo-intersticial dos rins, através da técnica de imunohistoquímica. Adicionalmente, o número de néfrons foi avaliado. Nenhum dos tratamentos modificou a expressão da gp91^{phox}, embora o alfa-tocoferol tenha determinado redução nos níveis de malondialdeído no grupo controle (27,5%, $p < 0,05$), porém não na prole que sofreu restrição dietética. Além disso, ratos que sofreram restrição exibiram níveis reduzidos de glutathione reduzida (42%, $p < 0,05$). Embora o alfa-tocoferol tenha programado redução nos níveis de malondialdeído (51%, $p < 0,05$), ele juntamente com o tempol reduziu o glutathione reduzida (43%, $p < 0,05$) na prole controle. Nenhum dos tratamentos mudou os níveis de pressão arterial média na prole, nem mesmo o grupo submetido à restrição dietética, o qual apresentou número de néfrons reduzido (26%, $p < 0,05$) e aumento de angiotensina II na área túbulo-intersticial (147%, $p < 0,05$). Contudo, tanto o alfa-tocoferol quanto o tempol recuperaram o peso ao nascer e a evolução do peso corporal da prole com restrição dietética, mesmo sem aumentar o baixo ganho de peso das mães que foram submetidas à restrição dietética. Concluindo, a administração de antioxidantes melhorou a circulação uteroplacentária que levou a recuperação do peso ao nascer e a evolução do peso corporal na prole submetida à restrição dietética materna. O alfa-tocoferol, em particular, programou níveis reduzidos de estresse oxidativo no rim da prole, um efeito não mediado pela redução da expressão da gp91^{phox}. Ademais, na idade de 30 dias, nem o alfa-tocoferol, nem o tempol ou a restrição dietética modificaram os níveis de pressão arterial média da prole.

Palavras chaves: Restrição dietética. Estresse oxidativo. Tempol. α -tocoferol.

ABSTRACT

This work investigated if the maternal antioxidant status during the pregnancy changes the expression of the gp91^{phox}, a membrane subunit of the NADPH oxidase, as also another oxidative stress markers in kidney, and consequently the arterial pressure levels of offspring after the weaning. Pregnant Wistar rats who were treated throughout their pregnancy with alpha-tocopherol, tempol, or with a daily dietary restriction in the order of 50% to reduce antioxidant defences. After 30 days age the mean arterial pressure was measured as well as malondialdehyde, glutathione reduced and the expression of gp91^{phox} in kidney homogenate. Positive cells number to angiotensin II was counted in glomerulus as well as in the tubulo-interstitial region of the kidneys, through immunohistochemistry technique. Further more, nephrons number was evaluated. No one of the treatments modified the expression of the gp91^{phox}, although the alpha-tocopherol had determined reduction on malondialdehyde levels in the control group (27.5%, $p < 0.05$), however, this is not occurred on offspring who had been in dietary restriction. Moreover, rats who had been in dietary restriction shows reduction on glutathione reduced levels (42%, $p < 0.05$). Although, the alpha-tocopherol had programed reduction on malondialdehyde levels (51%, $p < 0.05$), alpha-tocopherol together with tempol reduced the reduced glutathione (43%, $p < 0.05$) on offspring control. No one of the treatments changed mean arterial pressure levels on offspring, not even the group submitted to dietary restriction, which shows nephrons number reduced (26%, $p < 0.05$), and increase of angiotensin II on tubulo-interstitial region (147%, $p < 0.05$). However, the alpha-tocopherol as well as the tempol recovered the weight after birth and the corporal weight evolution of the offspring who had been submitted to dietary restriction even without to increase the low gain of weight by mothers who had been submitted to dietary restriction. To sum up, antioxidants applyment improved the uterus-placental blood circulation what contributed to recover the weight after birth and to the corporal weight evaluation of the offspring who had been submitted to maternal dietary restriction. Specifically, the alpha-tocopherol programed reduction on oxidative stress levels in offspring kidney which is an effect no mediated by reduction on expression of the gp91^{phox}. In addition, on 30 days age neither alpha-tocopherol nor tempol or dietary restriction modified mean arterial pressure levels of the offspring.

Keywords: Dietary restriction. Oxidative stress. Tempol. α -tocopherol.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DESNUTRIÇÃO.....	12
1.2 DESNUTRIÇÃO MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO.....	14
1.3 DESNUTRIÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO	15
1.4 SISTEMA CARDIOVASCULAR, RIM E ESTRESSE OXIDATIVO.....	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
REFERÊNCIAS	20
3 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>British Journal of Nutrition</i>.....	25
Abstract	26
Introduction	27
Material and Methods.....	27
Materials.....	27
Rats and treatment.....	28
Mean arterial pressure assessment.	28
Measurement of oxidative stress markers.	28
Measurement of Ang II in the kidney and number of nephrons.	29
Protein measurement.....	30
Statistical analysis.....	30
Results.....	30
Discussion	31
Tables.....	33
Figure Legends.....	37
References.....	38
Figures	41
4 CONCLUSÕES.....	44

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a organização de agricultura e alimentos das nações unidas (FAO, 2010), em pleno século 21 a desnutrição ainda é um desafio mundial. No ano de 2009, a insegurança alimentar, ou seja, a falta de disponibilidade ou dificuldade ao acesso aos alimentos, atingiu 1.02 bilhões de pessoas no mundo e 180 milhões de crianças menores que 5 anos foram consideradas desnutridas. Adicionalmente, Abdelaziz & Hegazy (2012), estudando os fatores de risco para desnutrição verificou que o baixo nível educacional materno e paterno e o pobre comportamento nutricional estão entre os mais evidentes e podem ser utilizados para identificar possíveis grupos de risco e desenhar programas de intervenção para prevenção da desnutrição.

Shönfeldt & Hall (2012), analisando dados acerca da ingestão de proteínas em comunidades africanas, relata que na África do Sul algumas populações têm uma dieta que consiste principalmente de mingau de milho branco refinado mais um subsídio do governo que consiste de pão e chá com leite e açúcar, sendo essa dieta pobre em termos de qualidade, quantidade e diversidade. Segundo os autores, essa refeição dispõe de uma quantidade limitada de cerca de 30 g de proteínas diárias consumida, o que está a baixo do recomendado da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2007), que é de 75 g de proteínas diárias, para um homem de 90 kg. Os autores ressaltam ainda que a dieta em muitas partes da África é similar e baseada em cereais, legumes e amiláceos e que o consumo de animais tal como carnes, aves domésticas e peixe é limitado principalmente devido às condições econômicas, culturais e religiosas.

Segundo o Ministério da Saúde (2009), os dados da Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher - PNDS, no ano de 2006, a distribuição espacial da prevalência dos déficits de altura-para-idade (um dos indicadores antropométricos do estado nutricional das crianças) indica que o retardo de crescimento na infância foi ligeiramente mais frequente no meio rural (7,5%) do que no meio urbano (6,9%) e acentuadamente mais frequente na região Norte (14,7%) que nas demais macrorregiões do país (região sul com 8,5%; e regiões Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste com pouco menos de 6%). Felizmente, segundo os dados do próprio ministério da saúde há possibilidade de nos próximos 10 a 15 anos o Brasil virtualmente controlar ou eliminar a desnutrição infantil (HOFFMANN, 1995; BRASIL, 2009), sendo a desnutrição ainda um problema vigente em nossa sociedade.

Lima *et al.* (2010), analisando as causas do declínio da desnutrição no nordeste brasileiro, verificaram que, no período de 1986 a 1996, a prevalência da desnutrição caiu de 33,9% para 22,2%, principalmente devido as melhorias na escolaridade materna e na disponibilidade de serviços de saneamento. Já no período de 1996 a 2006, essa prevalência caiu de 22,2% para 5,9%, neste caso, além de novamente haver melhorias na escolaridade materna esta queda também ocorreu devido ao aumento no poder aquisitivo das famílias mais pobres.

De acordo com Belik *et al.* (2001), as políticas alimentares de combate à fome no Brasil mudaram de caráter ao longo das décadas. No início do século passado predominavam políticas intervencionistas para combater os preços altos e a falta de alimentos; no início dos anos 30 predominava a atuação nas estruturas de distribuição de alimentos; a partir da década de 60 foi criada, a nível nacional, ampla estrutura de estocagem e distribuição; em seguida, nos anos 70, a intervenção pública passou a atuar no incentivo à produção agropecuária, gestão direta das estruturas de comercialização e na regulação do mercado; os anos 90 foram marcados por dois períodos: o primeiro, após intensa mobilização social, houve pela primeira vez a formação de uma institucionalidade integrada, o Conselho Nacional de Segurança Alimentar (CONSEA), formado por 8 ministros e 21 integrantes da sociedade civil que tinham como objetivo coordenar e elaborar a implantação do plano nacional de combate à fome e à miséria dentro dos princípios da solidariedade, parceria e descentralização, contudo, devido às restrições da área econômica as políticas sociais foram marginalizadas e o CONSEA funcionou apenas por 2 anos; o segundo período foi marcado por desmonte das estruturas anteriores e sua substituição por políticas focalizadas de articulação com a comunidade e pelo fornecimento de programas com renda mínima como o bolsa-escola, bolsa-saúde, etc. Para Swaminathan (2012), hoje o Brasil tem um exemplo a ser imitado de política de combate à fome, que é o programa Fome Zero, iniciado em 2003 e que auxilia bastante a diminuir o número de brasileiros que vivem na extrema linha da pobreza.

Portanto, embora nossa realidade atual seja promissora no sentido de ultimar definitivamente a desnutrição em massa, nosso passado deixou marcas de desnutrição que pode ter programado doenças metabólicas e cardiovasculares quando a desnutrição ocorreu durante o período perinatal. Ademais, a desnutrição em massa infelizmente ocorre ainda em outros países, como nos países africanos. Assim para compreender as repercussões tardias da desnutrição muito se faz necessário em termos de estudos experimentais.

1.1 MODELOS EXPERIMENTAIS DE DESNUTRIÇÃO

Embora as investigações sobre os efeitos da desnutrição calórico-protéica tenham ocupado lugar de destaque na literatura científica, Pessoa *et al.* (2005) faz referência as dificuldades de comparação entre os diversos estudos, focando as diferenças metodológicas entre eles. Para esses autores, há variações na época em que a desnutrição é implantada, na duração dos períodos de desnutrição e no tipo de desnutrição que é causada, de modo que, o grau de severidade das sequelas varia de um estudo para outro.

De verdade, a análise da literatura exhibe vários modelos experimentais de desnutrição, entre outros, podemos citar como exemplo: 1) desnutrição provocada através da alteração no número da ninhada durante a lactação (permitindo-se um número excessivo de filhotes durante o período de amamentação), e da restrição do tempo de sucção diária (FIORETTO *et al.*, 2002); 2) desnutrição provocada pela completa restrição alimentar durante um período de tempo determinado (NUTTER *et al.*, 1979); 3) desnutrição através de alterações apenas nos níveis protéicos da dieta, sendo mantida normal a quantidade dos outros elementos constituintes e os valores calóricos (PISSAIA *et al.*, 1980); 4) desnutrição provocada por dietas que tentam mimetizar hábitos alimentares de uma determinada comunidade-alvo (TEODÓSIO *et al.*, 1990); 5) desnutrição provocada por restrição dietética diária parcial, por exemplo, 50% da ingestão do grupo controle utilizado (FRANCO *et al.*, 2002, 2003, 2007).

Para Krawinkel (2012), tanto a insegurança alimentar (falta de disponibilidade e acesso aos alimentos) quanto a desnutrição são manifestadas, em si, como deficiência de micronutrientes. De fato, o crescimento e a manutenção das dimensões corporais exigem a presença de condições ótimas, principalmente quanto à ingestão e utilização biológica de calorias e proteínas (HOFFMANN, 1995).

As proteínas são componentes fundamentais para a estrutura e função celular, de modo que a desnutrição calórico-protéica pode afetar o desenvolvimento e função de uma série de órgãos e tecidos, incluindo o sistema cardiovascular, urinário e o controle do sistema nervoso autônomo (CICOGNA *et al.*, 1999; MAGALHÃES *et al.*, 2006; VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011^a; FRASCH *et al.*, 2007).

A desnutrição pode ocorrer em qualquer etapa da vida, pois está na dependência do estilo de vida que se adota e da situação socioeconômica apresentada pelos indivíduos. Nas últimas décadas, a desnutrição no início da vida, tanto na fase *in útero* como durante o aleitamento, considerados períodos críticos do desenvolvimento, vem sendo relacionada com o aumento na incidência de acometimentos crônico-degenerativos na vida adulta (BARKER, 1998; IJZERMAN *et al.*, 2003; LEOTTA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

1.2 DESNUTRIÇÃO MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO

Durante a gravidez normal um grande número de ajustes fisiológicos toma conta do organismo materno no intuito de garantir uma taxa normal de crescimento do feto. Assim, se a mãe não tem um adequado suprimento de nutrientes essenciais, o equilíbrio entre a necessidade do organismo materno e a do feto é quebrado. O resultado é um estado de competição biológica entre mãe e feto no qual o bem-estar de ambos fica seriamente comprometido, resultando em retardo de crescimento placentário e fetal (ROSSO, 1981).

Rosso & Kava (1980), em seu estudo sobre fluxo sanguíneo útero-placentário no 21º dia de gestação em ratas que sofreram restrição dietética de 50% a partir do 5º dia, verificaram que, de fato, há uma marcada redução no débito cardíaco e no fluxo de sanguíneo no ovário, placenta e útero total. Essa redução no fluxo sanguíneo foi encontrada em conjunto com fetos menores a partir das mães desnutridas. Além disso, como a porcentagem de distribuição do débito cardíaco não mostrou diferença nos órgãos mencionados, os autores sugerem que ocorre vasoconstrição que resulta em diminuição do fluxo sanguíneo útero-placentário. Além da redução do fluxo sanguíneo que leva a fetos menores no grupo desnutrido, os autores também apontam a falta de micronutrientes específicos como responsável pelo comprometimento do desenvolvimento fetal. Suzuki *et al.* (2010), também provocando uma restrição dietética de 50% em mães durante a gestação verificaram que os filhotes machos quando alcançam a idade adulta, 280 dias, tem um aumento significativo no tecido adiposo intra-abdominal junto com uma diminuição da massa corporal magra. Portanto, este se trata de um estudo que demonstra a ocorrência de síndrome metabólica como resultado da desnutrição intrauterina.

Já é sabido que a desnutrição materna durante a gestação gera prole com número reduzido de néfrons e hipertensão arterial (SAHAJPAL & ASHTON, 2003). Assim, Brennan *et al.* (2008), procurando encontrar uma associação entre número de néfrons reduzido, hipertensão arterial e alteração na síntese de prostaglandinas e seus receptores, estudaram a prole de machos de mães que passaram a gestação com restrição alimentar de 50%. Esses autores verificaram que, embora a prole desnutrida, avaliada na décima semana de idade, não apresentasse alterações nos níveis pressóricos, avaliado através de telemetria, a mesma exibiu número de néfrons reduzido já a partir do sétimo dia pós-parto sendo acompanhado da redução dos níveis de prostaglandinas e restrição do crescimento e desenvolvimento renal.

Partindo do pressuposto que a respiração mitocondrial é a principal fonte das espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, das lesões celulares e teciduais que são verificadas na prole de ratas gestantes malnutridas, Engehan *et al.* (2012) estudaram o rim de ratos com 4 e 13 semanas de idade. Chama atenção o fato de que esses autores observaram redução da atividade respiratória mitocondrial, porém sem alterações nos marcadores das espécies reativas de oxigênio e expressão da cadeia transportadora de elétrons. Contudo, os autores concluem que isso pode resultar numa habilidade limitada para efetivamente ajustar a função respiratória, com o declínio da massa celular durante o envelhecimento.

1.3 DESNUTRIÇÃO E ESTRESSE OXIDATIVO

Segundo Forbes *et al.* (2008), estresse oxidativo, ou lesão tecidual derivada de oxidantes, acontece quando oxidantes ou espécies reativas de oxigênio (ROS) excedem a capacidade antioxidante tecidual. Quando isto ocorre há oxidação de macromoléculas, como proteínas, lipídios, carboidratos e do DNA. Ainda segundo o autor, há várias origens para ROS, incluindo a auto-oxidação da glicose, deficiência na cadeia respiratória mitocondrial, atividade da xantina oxidase, peroxidases, óxido-nítrico sintase (NOS) e NADPH oxidase. ROS incluem radicais livres tais como superóxido (O_2^-), hidroxilas (OH), peróxilas (RO_2) e espécies não-radicais, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hidroclórico (HOCl).

Entre as enzimas que originam ROS, a NADPH oxidase vem ganhando bastante destaque e sendo considerada a principal fonte de estresse oxidativo tecidual, sendo responsável por lesões e alterações funcionais (FRANCO *et al.*, 2003; CAMPESE & SHAOHUA, 2007; NAGAE *et al.*, 2009).

Franco *et al.* (2002, 2003, 2007) estudando a prole de ratas desnutridas com um modelo de restrição alimentar de 50% verificaram que a desnutrição intrauterina pode promover aumento do estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da geração de ânions superóxido decorrentes do aumento de atividade da NADPH oxidase e da redução das defesas antioxidantes. Esses autores enfatizam o papel dessa enzima nas alterações da função vascular, e conseqüentemente no desenvolvimento de hipertensão e outras doenças crônico-degenerativas. Alguns trabalhos apontam a NADPH oxidase como sendo responsável por mediar os efeitos pró-oxidativos da angiotensina II (Ang II), indo desde a geração de superóxido até aumento da atividade simpática (FRANCO *et al.*, 2003; HAN *et al.*, 2011). Adicionalmente, se tem demonstrado que a desnutrição materna durante a gestação leva à

prole com expressão aumentada do receptor AT₁ ainda em idade juvenil, animais com 4 semanas de idade (SAHAJPAL & ASHTON, 2003). Embora a via de sinalização pela qual Ang II ativa NADPH oxidase e aumenta a produção de ânions superóxido ainda não seja muito clara, se tem sido sugerido que isso possa ocorrer através da proteína quinase C (PKC) (SILVA *et al.*, 2010). Tomados juntos, esses dados sugerem haver uma relação entre Ang II, AT₁, estresse oxidativo aumentado e hipertensão.

1.4 SISTEMA CARDIOVASCULAR, RIM E ESTRESSE OXIDATIVO

A desnutrição na vida intrauterina e o baixo peso ao nascer estão correlacionados com níveis elevados de pressão sanguínea arterial na idade adulta, tanto em humanos (IJZERMAN *et al.*, 2003) como em animais experimentais (FRANCO *et al.*, 2003; 2007; PÉREZ *et al.*, 2010). De acordo com Langley-Evans (2009) e Sahajpal & Ashton (2003), a hipertensão induzida pela desnutrição materna durante a gestação ocorre a partir do período juvenil, já na quarta semana de idade.

Para Franco *et al.* (2002) a desnutrição intrauterina aumenta o estresse oxidativo da prole e está relacionada com o comprometimento da vasodilatação dependente do endotélio, favorecendo o desenvolvimento de hipertensão arterial. Por outro lado, para Sahajpal & Ashton (2003), a hipertensão consequente a desnutrição intrauterina pode também ocorrer como forma compensatória para se manter a taxa de filtração glomerular contra um *background* de poucos néfrons, uma vez que isso gera diminuição da área de filtração glomerular e resistência vascular renal aumentada. Adicionalmente, o estudo de Frasch *et al.* (2007) sugere que o baixo peso ao nascer é associado com alteração do controle da atividade do sistema nervoso autônomo, o qual tem influência direta sobre os níveis de pressão arterial e frequência cardíaca. Portanto, é provável que haja associação de tais fatores (estresse oxidativo, redução do número de néfrons e desequilíbrio autonômico) na gênese do processo hipertensivo.

Estudos realizados em nosso laboratório mostram que ratos em idade juvenil, 70 dias (Magalhães *et al.*, 2006) submetidos à desnutrição no período pré-natal apresentam volume plasmático aumentado, bem como, pressão arterial sanguínea e estresse oxidativo renal também aumentados. Ademais, a má-nutrição gestacional leva ao aumento do estresse oxidativo placentário (VIEIRA- FILHO *et al.*, 2009) e que este é transferido da mãe para prole, havendo associação entre o estresse oxidativo aumentado com uma diminuição do

número de néfrons (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011a) e alteração na cascata de sinalização acoplada aos receptores de angiotensina II nos rins da prole (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011b).

A atividade nervosa simpática aumentada foi apontada como uma das causas de elevação da pressão arterial em adolescentes com baixo peso no nascimento (IJZERMAN *et al.*, 2003). O estresse oxidativo, decorrente da expressão aumentada da NADPH oxidase, em núcleos hipotalâmicos específicos como o núcleo hipotalâmico posterior, núcleo paraventricular e *locus coeruleus*, tem sido indicado como uma das causas de ativação simpática (SHAOHUA *et al.*, 2006). Este achado é endossado por evidências de que vitamina E (CAMPESE Y SHAOHUA, 2007) e o tempol (OLIVEIRA-SALES *et al.*, 2009) diminuem simultaneamente o estresse oxidativo nestes núcleos e a atividade simpática, bem como previne a hipertensão (OLIVEIRA-SALES *et al.*, 2009). Por outro lado, a administração de antioxidantes tem sido correlacionada com reversão do estresse oxidativo e prevenção das alterações estruturais e funcionais da célula, fato que vem sendo constatado em diversos tecidos de animais (BANDAY *et al.*, 2007; NAGAE *et al.*, 2009; VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011b).

Agentes antioxidantes, como a vitamina E e o tempol constituem ferramentas terapêuticas úteis para investigar o papel da desnutrição materna, sobre o estresse oxidativo em órgãos específicos da prole e por conseguinte sobre os níveis pressóricos da prole. A vitamina E é uma família de moléculas, entre as quais o alfa-tocoferol é quantitativamente e fisiologicamente a mais importante, atuando como um seqüestrador de radicais livres nas membranas biológicas (FERRI *et al.*, 2003). Contudo, vem sendo mostrado que o alfa-tocoferol exibe também efeitos não-antioxidantes e pode atuar em níveis de expressão de proteínas específicas como as isoformas ϵ e λ da PKC e atividade catalítica da PKA. Estas quinases, podem ser os mediadoras da sinalização da Ang II na cascata que se inicia com os receptores AT₁ que culmina com aumento da atividade da bomba de Na⁺-ATPase insensível a ouabaína, localizada na membrana basolateral do néfron (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011b).

O tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina-N-oxil) é um radical nitroxil paramagnético e estável quando solúvel em água. O tempol é um mimético da enzima superóxido dismutase (SOD) e, portanto, um seqüestrador de radicais livres catalisando a dismutação do O₂⁻ em H₂O₂. A taxa de reação constante do tempol com superóxido é determinada como sendo $3,4 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, sendo esta taxa determinada em solução de baixa resistência iônica (10mM HEPES), pH 7,0 e 22 °C (MITCHELL *et al.*, 1990). A SOD endógena é um antioxidante muito mais eficiente que as vitaminas, sendo sua taxa de interação constante com o superóxido cerca de $1,6\text{-}2,4 \times 10^9 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$, enquanto que a da

vitamina E com o superóxido é aproximadamente $0,59 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$. De modo que o tempol não é tão poderoso quanto a SOD endógena, mas é muito mais potente que a vitamina E, ver revisão (SIMONSEN *et al.*, 2009).

Como abordado em parágrafos anteriores, há evidências de que a desnutrição no período pré-natal pode programar aumento do estresse oxidativo e dos níveis pressóricos na prole, ainda em idade juvenil. Tal informação já se encontra estabelecida para animais adultos. Contudo, os estudos acerca dos efeitos da desnutrição intra-uterina na prole juvenil ainda não são conclusivos. De modo que este trabalho visa buscar conhecimentos adicionais sobre os indicadores de estresse oxidativo e pressão sanguínea arterial em ratos, em idade juvenil, cujas mães foram submetidas à restrição dietética durante todo período de gestação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a restrição dietética materna ou o tratamento com antioxidantes, durante a gestação, alteram o perfil de estresse oxidativo no rim da prole e se induzem hipertensão em idade juvenil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos de 30 dias de idade, que foram submetidos à restrição dietética materna da ordem de 50% e tratados com alfa-tocoferol ou tempol, os seguintes parâmetros:

- Pressão arterial média (PAM);
- Estresse oxidativo no rim, através dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), dos níveis de glutathione reduzida (GSH) e da subunidade da NADPH oxidase gp91^{phox};
- Número de células positivas para angiotensina II no rim;
- Número de néfrons;

REFERÊNCIAS

- ABDELAZIZ, S. B; HEGAZY, R. Socioeconomic risk factors of malnutrition among egyptian children between 6 months and years of age, Cairo, Egypt. **J Eegypt Public Health Assoc**, vol. 87, pp. 124-130, december 2012.
- BARKER, D. J. P. *In utero* programming of chronic disease. **Clin Sci**, vol. 95, pp. 115-128, 1998.
- BELIK, W; SILVA, J. G; TAKAGI, M. Políticas de combate à fome no Brasil. **São Paulo em Perspectiva**, vol. 15, nº 4, 2001.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde Brasil 2008: 20 anos de Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil**. 1º Ed, 2009.
- BRENNAN, K. A; KAUFMAN, S; REYNOLDS, S. W; McCOOK, B. T; KAN, G; CHRISTIAENS, I; SYMONDS, M. E; OLSON, D. M. Differential effects of maternal nutrient restriction through pregnancy on kidney development and later blood pressure control in the resulting offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, vol. 295, pp. 197-205, 2008.
- CAMPESE, V. M; SHAOHUA, Y. A vitamin-E-fortified diet reduces oidative stress, sympathetic nerve activity, and hypertension in the phenol-renal injury model in rats. **J Am Soc Hypertens**, vol. 1, nº 4, pp. 242-250, 2007.
- CICOGNA, A. C; PADOVANI, C. R; GEORGETTE, J. C; ARAGON, F. F.; OKOSHI, M. P. Effects of Protein-Calorie Restriction on Mechanical Function of Hypertrophied Cardiac Muscle. **Arq Bras Cardiol**, vol. 72, nº 4, pp. 436-440, 1999.
- ENGELHAN, S; MDAKI, K; JEWELL, K; AUSTIN, R; LEHNER, A. N; LANGLEY-EVANS, S. C. Mitochondrial respiration is decreased in rat kidney following fetal exposure to a maternal low-protein diet. **J Nutr Metab**, vol. 2012, doi: 10.1155/2012/989037, 2012.
- FAO, **Hunger at a glance: key numbers in the 2010 SOFI report**. [Online]. (2010). Disponível em: <<http://www.fao.org/fileadmin/userupload/newsroom/docs/2010hungerfacts.pdf>>. Acesso: 04 de janeiro de 2013.
- FERRI, P; CECCHINI, T; CIARONI, S; AMBROGINI, P; CUPPINI, R; SANTI, S; BENEDETTI, S; PAGLIARANI, S; GRANDE, P. del; PAPA, S. Vitamin E affects cell death in adult rat dentate gyrus. **J Neurocytol**, vol. 32, pp. 1155-1164, 2003.
- FIORETTO, J. R; QUEIROZ, S. S; PADOVANI, C. R; MATSUBARA, L. S; OKOSHI, K; MATSUBARA, B. B. Ventricular remodeling and diastolic myocardial dysfunction in rats submitted to protein-calorie malnutrition. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, vol. 282, pp 1327-1333, 2002.
- FORBES, J. M; COUGHLAN, M. T; COOPER, M. E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, vol. 57, june 2008.

FRANCO, M. C. P; DANTAS, A. P. V; AKAMINE, E. H; KAWAMOTO, E. M; FORTES, Z. B; SCAVONE, C; TOSTES, R. C. A; CARVALHO, M. H. C; NIGRO, D. Enhanced Oxidative Stress As a Potential Mechanism Underlying the Programming of Hypertension *In Utero*. **J Cardiovasc Pharmacol**, vol. 40, nº 4, pp. 501–509, 2002.

FRANCO, M. C. P; AKAMINE, E. H; DI MARCO, G. S; CASARINI, D. E; FORTES, Z. B; TOSTES, R. C. A; CARVALHO, M. H. C; NIGRO, D. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin–angiotensin system. **Cardiovasc Res**, vol. 59, pp. 767–775, 2003.

FRANCO, M. C. P; AKAMINE, E. H; REBOUÇAS, N; CARVALHO, M. H. C; TOSTES, R. C. A; NIGRO, D; FORTES, Z. B. Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: Implications of oxidative stress. **Life Sci**, vol. 80, pp. 709–715, 2007.

FRASCH, M. G; MULLER, T; WICHER, C; WEISS, C; LÖHLE, M; SCHWAB, K; SCHUBERT, H; NATHANIELSZ, P. W; WITTE, O. W; SCHWAB, M. Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep. **J Physiol**, vol. 579, nº 3, pp. 893–907, 2007.

HAN, Y; FAN, Z; YUAN, N; XIE, G; GAO, J; DE, W; GAO, X; ZHU, G. Superoxide anions in the paraventricular nucleos mediate the enhanced cardia sympathetic afferent reflex ad sympathetic acticity in renovascular hypertensive. **J Appl Physiol**, vol. 110, pp. 646-652, 2011.

HOFFMANN, R. Pobreza, insegurança alimentar e desnutrição no Brasil. **Estudos Avançados**, vol. 9, nº 24, 1995.

IJZERMAN, R. G; STEHOUWER, C. D. A; GEUS, E. J; van WEISSENBRUCH, M. M; WAAL, H. A. D; BOOMSMA, D. I. Low birth weight is associated with increased sympathetic acticity: Dependence on genetic factors. **Circulation**, vol. 108, pp. 566-571, 2003.

KRAWINKEL, M. B. Overcoming undernutrition with local resources in Africa, Asia and Latin America. **J Sci Food Agr**, vol. 92, pp. 2757-2759, 2012.

LANGLEY-EVANS, S. C; WELHAM, S. J. M; JACKSON, A. A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. **Life Sci**, vol. 64, nº 11, pp. 965-974, 1999.

LEOTTA, G; RABBIA, F; MILAN, A; MULATERO, P; VEGLIO, F. Effects of birth weight on spontaneous baroreflex sensitivity in adult life. **Nutr Metab Cardiovas**, vol. 17, pp. 303-310, 2007.

LIMA, A. L. L; SILVA, A. C. F; KONNO, S. C; CONDE, W. L; BENICIO, M. H. D; MONTEIRO, C. A. Causas do declínio acelerado da desnutrição infantil no Nordeste do Brasil (1986-1996-2006). **R Saúde Pública**, vol. 44, nº 1, pp. 17-27, 2010.

MAGALHÃES, J. C. G; SILVEIRA, A. B; MOTA, D. L; PAIXÃO, A. D. O. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. **Exp Physiol**, vol. 91, nº 3, pp. 611-619, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Criança e da Mulher – PNDS 2006**. Centro Brasileiro de Análises e Planejamento, Brasília, 2009.

MITCHELL, J. B; SAMUNI, A; KRISHNA, M. C; DEGRAFF, W. G; AHN, M. S; SAMUNI, U; RUSSO, A. Biologically Active Metal-Independent Superoxide Dismutase Mimics. **Biochemistry**, vol. 29, nº 11, pp. 2802-2807, 1990.

MONTEIRO, A. C. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. **Estudos Avançados**, vol. 17, nº 48, pp. 7-20, 2003.

NAGAE, A; FUJITA, M; KAWARAZAKI, H; MATSUI, H; ANDO, K; FUJITA, T. Sympathoexcitation by oxidative stress in the brain mediates arterial pressure elevation in obesity-induced hypertension. **Circulation**, vol. 119, pp. 978-986, 2009.

NUTTER, D. O; MURRAY, T. G; HEYMSFIELD, S. B; FULLER, E. O. The Effect of Chronic Protein-Calorie Undernutrition in the Rat on Myocardial Function and Cardiac Function. **Circ Res**, vol. 45, nº 1, pp. 144-152, July 1979.

OHKAWA, H; OHISHI, N; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Anal Biochem**, vol. 95, pp. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, J. C; SCOMPARIN, D. X; ANDREAZZI, A. E; BRANCO, R. C. S; MARTINS, A. G; GRAVENA, C; GRASSIOLI, S; RINALDI, W; BARBOSA, F. B; MATHIAS, P. C. F. Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity adult rats. **J Neuroendocrinol**, vol. 23, pp. 148-157; 2011.

OLIVEIRA-SALES, E. B; NISHI, E. E; CARILLO, B. A; BOIM, M. A; DOLNIKOFF, M. S; BERGAMASCHI, C. T; CAMPOS, R. R. Oxidative stress in the sympathetic premotor neurons contributes to sympathetic activation in renovascular hypertension. **Am J Hypertens**, vol. 22, nº 5, pp. 484-492, 2009.

PÉREZ, H; SOTO-MOYANO, R; RUIZ, S; HERNÁNDEZ, A; SIERRALTA, W; OLIVARES, R; NÚÑEZ, H; FLORES, O; MORGAN, C; VALLADARES, L; GATICA, A; FLORES, F. J. A putative role for hypothalamic glucocorticoid receptors in hypertension induced by prenatal undernutrition in the rat. **Neurosci Lett**, vol. 483, pp. 41-46, 2010.

PESSOA, D. C. N. P; LAGO, E. S; BION, F. M.; ANTUNES, N. L. M; VARELA, R. M; TEODÓSIO, N. R. Influência do teor e qualidade da proteína dietética sobre o crescimento corporal e desenvolvimento de órgãos, em três gerações sucessivas de ratos. **Nutrire: Rev Soc Bras Alim Nutr**, v. 30, pp. 31-52, dez. 2005.

PISSAIA, O; ROSSI, M. A; OLIVEIRA, J. S. M. The heart in protein-calorie malnutrition in rats: morphological, electrophysiological, and biochemical changes. **J Nutr.**, vol. 110, pp. 2035-2044, 1980.

REMACLE, C; BIESWAL, F; REUSENS B. Programming of obesity and cardiovascular disease. **Int J Obesity**, vol. 28, pp. S46-S53, 2004.

ROSSO, P. Nutrition and maternal-fetal exchange. **Am J Clin Nutr**, vol. 34, pp. 744-755, april 1981.

ROSSO, P; KAVA, R. Effects food restriction on cardiac outpu and blood flow to the uterus and placenta in the pregnant rat. **J Nutr**, vol. 110, pp. 2350-2354, 1980.

SAHAJPAL, V; ASHTON, N. Renal function and angiotensin AT1 receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. **Clin Sci** vol. 104, pp. 607-614, 2003.

SELDLAK, J; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfydryl groups in tissue with Ellmans's reagent. **Anal Biochem**, vol. 25, n° 1, pp. 192-205, oct 24, 1968.

SHAOHUA, Y; ZHONG, H; CAMPESE, V. M. Oxidative stress mediates the stimulation of sympathetic nerve activity in the phenol renal injury model of hypetension. **Hypertension**, vol. 48, pp. 309-315, 2006.

SHÖNFELDT, H. C; HALL, N. G. Dietary protein quality and malnutrition in Africa. **Brit J Nutr**, vol. 108, pp. 69-76, 2012.

SILVA, J; PASTORELLO, M; ARZOLA, J; ZAVALA, L. E; JESÚS, S. de; VARELA, M; MATOS, M. G; GARRIDO, M. del R; ISRAEL, A. AT1 receptor and NAD(P)H oxidase mediate angiotensin II-stimulated antioxidant enzymes and mitogen-activated protein kinase activity in the rat hypothalamus. **JRAAS**, vol. 11, n° 4, pp. 234-242, 2010.

SIMONSEN, U; CHRISTENSEN, F. H; BUUS, N. H. The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure. **Pharmacol Therapeut**, vol 122, pp. 109-124, 2009.

STÄUBLE B, BOSCOBOINIK D, TASINATO A, AZZI A. Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D-alpha-tocopherol in vascular smooth muscle cells. **Eur J Biochem**, vol. 226, n° 2, pp. 393-402, 1994.

SUZUKI, M; SHIBANUMA, M; KIMURA, S. Effect of severe maternal dietary restriction on growth and intra-abdominal adipose tissue weights in offspring rats. **J Nutr Sci Vitaminol**, vol. 6, pp. 293-298, 2010.

SWAMINATHAN, M. S. Combating hunger. **Science**, vol. 338, 23 of november 2012.

VIEIRA-FILHO, L. D; LARA, L. S; SILVA, P. A; LUZARDO, R; EINICKER-LAMAS, M; CARDOSO, H. D; PAIXÃO, A. D. O; VIEYRA, A. Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium. **Clin Exp Pharmacol P**, vol. 36, pp. 1157-1163, 2009.

VIEIRA-FILHO, L; CABRAL, E. V; SANTOS, F. T. J; COIMBRA, T. M; PAIXÃO, A. D. O. Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. **Pediatr Nephrol**, vol. 26, pp. 2019-2029, 2011 (a).

VIEIRA-FILHO, L; LARA, L. S; SILVA, P. A; SANTOS, F. T. J; LUZARDO, R; OLIVEIRA, F. S. T; PAIXÃO, A. D. O; VIEYRA, A. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. **Arch Biochem Biophys**, vol. 505, pp. 91-97, 2011 (b).

WHO. Protein amino acid requirements in human nutrition. **Report of a Joint. WHO/FAO/UNU Expert Consultation**, WHO Technical Report Series n° 935, 2007.

3 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO *British Journal of Nutrition*

**MATERNAL ANTIOXIDANT STATUS, DURING PREGNANCY, AND BLOOD
PRESSURE IN POST-WEANING RATS**

Luís Paulo N. C. Borges¹, Leucio D. Vieira-Filho¹, Edjair V. Cabral¹, Natalie E. Ribeiro²,
Daianna R. M. Gonçalves¹, Ana Durce O. da Paixão¹

Short title: In utero antioxidant status and blood pressure

Study performed in Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670 901, Recife, Pernambuco, Brasil.

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof.^o Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670 901, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

Main address to correspondence: Ana Durce O. da Paixão. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof.^o Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670 901, Recife, Pernambuco, Brasil. Tel.: (81) 2126 8530, Fax: (81) 2126 8976, E-mail: adpaixao@ufpe.br

Key Words: fetal development: antioxidants: gp91^{phox}: blood pressure

Abstract

It was investigated whether the maternal antioxidant status, during pregnancy, influences the expression of gp91^{phox}, one membrane subunit of NAPH oxidase, as well as, other makers of the oxidative stress in the kidney and hence the blood pressure levels in the post-weaning offspring. Pregnant Wistar dams were treated, during all pregnancy, with α -tocopherol, tempol or daily diet intake restriction to deplete antioxidant reservoir. Neither of these tools changed the expression of gp91^{phox}, although α -tocopherol programmed reduced levels of malonyldialdehyde (MDA) in control, but not in the dietary restricted post-weaning offspring. Furthermore, restricted rats showed diminished levels of reduced glutathione (GSH). Even α -tocopherol had programmed reduced levels of MDA, it and tempol diminished GSH in control offspring. Neither of prenatal treatment changed the blood pressure in the offspring, even the dietary restricted progeny, whose exhibited lowered number of nephrons and increased angiotensin II in the tubule-interstitial renal region. However, both α -tocopherol and tempol recovered the birth weight and the body weight evolution of dietary restricted progeny without ameliorate the lowered body weight gain in dietary restricted dams. In conclusion, it seems that the administered antioxidants ameliorated maternal utero-placental circulation that led to recovery of the birth weight and the body weight evolution when the rats were submitted to maternal dietary restriction. α -Tocopherol, in particular, programmed lowered levels of oxidative stress in the offspring kidney, one effect not mediated by reduction in of gp91^{phox} expression. But neither α -tocopherol, nor tempol or daily diet intake restriction changed the blood pressure levels in the post-weaning offspring.

Introduction

Increased oxidative stress⁽¹⁻³⁾ as well as alterations in the renin-angiotensin-system (RAS) components⁽⁴⁻⁶⁾ have been found in the kidney of prenatal undernourished rats, in spite of not even prenatal undernutrition to produce hypertension⁽⁷⁻⁹⁾, although the reason for hypertension to be present or not, as the primary hypertension itself, might be multiple and unclear.

One well-known subcellular pathway to angiotensin II (Ang II) comprises its action on increasing transcription of NADPH oxidase subunits, and this constitutes an important way to radical oxygen species (ROS) generation in several organs, including kidneys. One of the ubiquitous membrane NADPH oxidase subunit is the gp91^{phox}, see review⁽¹⁰⁾, this is the catalytic unit and main membrane component of NADPH oxidase. Thus, oxidative stress in the kidney of undernourished rats might be partially dependent on Ang II. The α -tocopherol, when administered during lactation is capable to reprogram Ang II subcellular signaling programmed by maternal undernutrition during pregnancy⁽¹¹⁾. Besides its antioxidant action, α -tocopherol modulates signal transduction and gene expression⁽¹²⁻¹⁴⁾, effects that may lead to placental angiogenesis⁽¹⁵⁻¹⁶⁾ and amelioration of fetal nutrition.

In this work it was investigated the hypothesis that the maternal antioxidant status, during pregnancy, influences the expression of gp91^{phox} and other makers of the oxidative stress in the kidney and hence the blood pressure levels in the post-weaning offspring. α -Tocopherol, known for its antioxidant and non-antioxidant effects, was administered and as a counterpoint the tempol, a mimetic of superoxide dismutase, known only for its antioxidant properties. To deplete maternal antioxidant defense, daily diet intake was restricted.

Material and Methods

Materials.

(+)- α -Tocopherol acetate, 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (tempol), thiobarbituric acid, L-cysteine, 1,1,3,3, - tetraethoxy-propane, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), trypsin inhibitor (type II-S), 3,3'-diaminobenzidine (DAB) were purchased from Sigma-Aldrich. Antibody against Gp91^{phox} was obtained from Santa Cruz Biotechnology. Nitrocellulose membranes and horseradish peroxidase-conjugated antibody were obtained from GE Healthcare. Antibody against Ang II was purchased from Peninsula Laboratories. Conjugated biotin-peroxidase secondary antibody against rabbit was obtained from Vectastin. All other reagents were of the highest purity available.

Rats and treatment.

Wistar rats were used throughout the study. All procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco, and carried out in accordance with the Committee guidelines. 90 d old female rats, weighing 210 to 250 g, were randomly designed to receive ad libitum standard diet (Purina Agribands, Paulinia, SP, Brazil), the control dams (C) or to receive 50% restriction of the average daily food consumption of the ad libitum-fed controls, the restricted dams (R), from the first pregnancy day, detected by vaginal plug, until the parturition. Corn oil, the α -tocopherol vehicle (V, 1 ml/kg, body weight daily by gavage), α -tocopherol (Toc, 350 mg/kg body weight daily by gavage¹¹), tempol (T, 30 mg/kg body weight daily, dissolved in drinking water¹⁷) or both antioxidant, Toc and T were administered, during all pregnancy, until parturition. On depending of the parallel treatment with anti-oxidant, C and R dams were designated CV (n = 6), RV (n = 4), CToc (n = 4), RToc (n = 4), CT (n = 4), RT (n = 5), CTocT (n = 4) and RTocT (n = 3). On day of birth, the pups were weighed and the litter was reduced to 8 animals. The number of born pups per litter was similar between all groups, ranging from 8 to 15, once mothers with litter below 8 were not included in the study. After parturition all mothers received standard diet ad libitum, either the pups after weaning at age of 21 d, when they were separated in collective cage with 4 rats. Only male offspring was designed to be in the experimental protocol.

Mean arterial pressure assessment.

At age of 30 d, two male rats of each litter were prepared under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg body weight i.p.) to have the carotid catheterized using PE 50 tubing. Immediately, the catheter was connected to a blood pressure transducer (Transpac, Abbott Laboratory, North Chicago, IL, USA) plugged into a flowmeter (Transonic Systems, Ithaca, NY). MAP was continuously assessed for 20 min after catheterization and the recordings were analyzed by a playback program in the Calc Package Windaq.

Measurement of oxidative stress markers.

The rats were decapitated to harvest the kidneys and liver. Part of the left kidney part was designed to assess subunits of NADPH oxidase. The liver and another part of the left kidney

were used to measure the lipid peroxidation, throughout the levels of malondialdehyde (MDA), and the levels of reduced glutathione (GSH).

To measure the gp91^{phox} expression, one subunit of NADPH oxidase, part of the kidney was homogenized, by using cold isotonic solution (0.25 M sucrose; 0.01 M HEPES; 0.002 M EDTA; 0.15 mg/l trypsin inhibitor, PMSF 0.001M; pH 7.6), in tissue grinder IKA RW20, at 1,200 rpm for 2 min, into ice bath. Protein, 80 µg, solubilized in a load buffer solution containing SDS 2.5% (w/v) was submitted to SDS-PAGE 10% (w/v). Separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Non-specific binding was prevented by incubating the membranes with 5% (w/v) non-fat milk diluted in phosphate buffer saline – 0.1% (v/v) tween 20 (PBS-T, pH 7.6) for 1 h. The membranes were probed with primary antibodies against gp91^{phox} (1:200 dilution), for overnight at 4°C, during gentle stirring, washed three times with PBS-T, exposed for 1h to the conjugated peroxidase secondary antibody against mouse (1:1000 dilution) at room temperature, washed and visualized using ECL.

Levels of MDA were measured according to⁽¹⁸⁾, modified. The tissues were homogenized, into ice bath, by using 1.15% (w/v) KCl solution (1g tissue/0,005 l). Briefly, the homogenate reacted with thiobarbituric acid in the presence of acetic acid and SDS, for 60 min, at 100 °C. After chilling, butanol was added to the reaction, the tubes were centrifuged and the supernatant was used to measure the color at 535 nm. The standard curve was carried out using 1,1,3,3, - tetraethoxy-propane. The results were corrected for protein concentration.

Levels of reduced glutathione (GSH) were assessed by non-protein sulfhydryl groups⁽¹⁹⁾. TCA 5% (w/v) was used to precipitate protein in tissue homogenates (1g tissue/0,005 l KCl 1.1% w/v). The protein-free supernatant was used to react to 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) into a Tris-EDTA buffer solution, pH 8.9, for 5 min, at room temperature. The standard curve was carried out using L-cysteine and the absorbance was read at 412 nm.

Measurement of Ang II in the kidney and number of nephrons.

Ang II in the glomeruli and tubule-interstitial region was assessed by immunohistochemistry, while the number of glomeruli was counted in cortical area. Kidney slices, around 3-mm, was fixed in Methacarn solution (methanol: chloroform: acetic acid, 6:3:1) for 24 h and subsequently maintained in 70% (v/v) ethanol. After appropriate embedment in paraffin, 6-µm sections were used for immunohistochemical and histological studies. The glomeruli were counted in kidney slices stained by using 0.5% (w/v) methyl green, in 60 fields of the renal cortex measuring 0.15 mm², by using the software AxioVision version 4.8.1.0 (Carl

Zeiss Imaging Solutions) after image capture from microscope (BX50F-3 Olympus Optical CO. Ltd, Japan) connected to camera (SHC – 10NAD Samsung Aerospace Ind. Ltd., Korea).

To immunohistochemistry, the sections were incubated with antibody against angiotensin II (1:200 dilution) overnight at 4 °C and sequentially exposed for 1h to the conjugated biotin-peroxidase secondary antibody against rabbit (1:400 dilution) in humid chamber, at room temperature and visualized by using DAB. The sections were counter-stained by using 0.5% methyl green to count angiotensin II presence in 60 fields throughout tubule-interstitial region and into 60 glomeruli.

Protein measurement.

Protein was measured by using the Folin phenol method⁽²⁰⁾.

Statistical analysis.

The results are presented as the mean $\pm$ SEM. Differences between two groups were assessed using unpaired Student “t” test and between more than three groups using one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls test. GraphPad Prism 5 software (Version 5.01, GraphPad Software) was used for all statistical analyses. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

The expression of gp91^{phox} in the kidney of the offspring was not changed by any maternal treatment, neither by antioxidant nor by dietary restriction (Table 1). However, α -tocopherol, as well as α -tocopherol plus tempol programmed lowered MDA levels in the kidney of control offspring (compare CToc vs. CV and CTocT vs. CV, Table 2), but not in restricted offspring (compare RToc vs. CV and RTocT vs. CV, Table 2). Indeed the levels of MDA were higher in RTocT than in CTocT (Table 2), this indicate that the restricted offspring was refractory to the both antioxidant administered simultaneously. The lowered levels of GSH in the kidney of the RV group compared to CV (Table 2) indicate that the restricted offspring present reduced antioxidant defense. Even α -tocopherol had reduced the levels of MDA in the kidney of control rats, this antioxidant vitamin and also the tempol reduced the levels of GSH in the kidney of control rats (compare CToc vs. CV and CT vs. CV, Table 2). In the liver, only both

antioxidants simultaneously administered were capable to program lowered levels of MDA in the control group (compare CTocT vs. CV, Table 2), but not in the restricted offspring (compare RTocT vs. CTocT). The blood pressure was either unaffected for any maternal treatment (Table 3).

Different from the pattern of action on the markers of oxidative stress, in which the antioxidant and dietary restriction had discrete effects, it may be seen in Table 4 that dietary restriction reduced severely the maternal weight gain (compare RV vs. CV), as well as neither α -tocopherol, nor tempol, not even both antioxidants administered simultaneously recovered the maternal weight gain. The birth weight of restricted pups was also lower than that in control group (RV vs. CV, Table 4). Moreover, the reduced body weight in the restricted group was maintained until the age of 30 days. Otherwise, the antioxidants were capable to recover the birth weight of restricted pups and maintain increased body weight until the age of 30 days (Table 4).

Notwithstanding restricted group had unchanged markers of oxidative stress and unchanged mean arterial pressure they showed reduced number of nephrons (Fig. 1) and elevated presence of Ang II in the tubule interstitial region (Fig. 2), though Ang II presence in glomeruli were unchanged (Fig. 3).

Discussion

This work shows for the first time that neither the antioxidants nor the dietary restriction were capable to program changes in the expression of gp91^{phox}, nor they were capable to change the blood pressure levels in the post-weaning rats. Another relevant finding is that even though the Ang II was increased in the kidney of the restricted offspring, the gp91^{phox} expression was unchanged. Though Ang II is one important stimulus for NADPH oxidase activity, this finding is in line with evidence that this peptide is correlated only to acute transcription, but not to chronic augment of this NADPH oxidase subunit⁽²¹⁾. However, there are findings showing pathophysiological role of this subunit; it is increased in preglomerular arteries when ROS is increased⁽²²⁾ and when absent, as in the gp91^{phox} gene knockout mice, it is correlated to low renal vascular resistance⁽²³⁾. It was remarkable that even Ang II was increased in the tubulointerstitial region and the number of nephrons was reduced in the rats submitted to maternal dietary restriction, they did not show increased blood pressure. The limitation of the blood pressure measurement under anesthesia may be highlighted, as well as the age of the animals, however there is evidence on basis of the same experimental model that 12-weeks old rats do not show hypertension, even when measured by telemetry⁽⁸⁾. In contrast, by employing other ways to

induce prenatal undernutrition there is several findings of programmed hypertension at adult age^(1,4,24,25). Certainly, the experimental diet and the methods used to measure blood pressure have decisive role in the diversity of result regarding the prenatal origin of hypertension⁽²⁶⁾

Although α -tocopherol did not change the gp91^{phox} expression, it was capable to program lowered levels of MDA in the kidney of control rats. Once lowered MDA levels were not programmed by tempol that has strictly antioxidant effect, it seems a gene mediated effect of α -tocopherol. It is known that this vitamin increases transcription of the gamma-glutamyl cysteinyl synthetase, a key enzyme in GSH synthesis⁽¹⁴⁾, however in the present study, α -tocopherol programmed in parallel to reduced MDA low levels of GSH. On the other hand, the refractoriness of the restricted rats to the effects of both antioxidants administered simultaneously (see kidney and liver, RTocT vs. CTocT in Table 2) indicates an increased susceptibility to elevation of oxidative stress. This is a counterpoint to one investigation regarding low protein diet during intrauterine life on mitochondrial respiration, one main source of ROS, in which the authors showed that at age of 16 weeks the rats have lowered rate of mitochondrial respiration in the kidney⁽²⁷⁾. Whether prenatal undernutrition imprints increased oxidative stress or not at later life is yet unclear. We have seen that a multideficient diet, rich in carbohydrates, leads to increased MDA levels in the kidney of juvenile and adult rats⁽¹⁻³⁾, however when this diet was maintained from intrauterine life to juvenile age, the levels of MDA was unchanged in the kidney⁽⁹⁾. On the other hand, summing up evidence that prenatal undernutrition imprints elevated oxidative stress, 50% dietary restriction as in the present study, has shown to increase superoxide production in mesenteric arterioles⁽²⁸⁾.

The efficacy of both antioxidants α -tocopherol and tempol to recover the birth weight of pups, once they were innocuous to change the dietary restricted maternal weight gain, indicates that they ameliorate nutrient supply to fetuses. Maternal dietary restriction reduces uteroplacental blood flow^(29,30). Therefore, α -tocopherol likely ameliorates fetal nutrition by increasing placental angiogenesis^(15,16), while tempol likely produces uteroplacental vasodilation, once there is evidence that it reduces ROS in the placenta and increases fetal body weight in an experimental model of pre-eclampsia⁽³¹⁾.

In conclusion, α -tocopherol, in particular, programmed lowered levels of oxidative stress in the offspring kidney, one effect not mediated by reduction in of gp91^{phox} expression. But neither α -tocopherol, nor tempol or daily diet intake restriction changed the blood pressure levels in the post-weaning offspring.

Tables

Table 1: Gp91^{phox} expression in the kidney of rats aged 30 days.

	Gp91 ^{phox} (%)	
	Mean	SEM
CV (n = 5)	100.0	0.0
RV (n = 5)	95.0	13.1
CToc (n = 4)	104.5	29.5
RToc (n = 6)	97.3	17.4
CT (n = 4)	148.3	47.3
RT (n = 6)	103.0	12.6
CTocT (n = 4)	115.0	23.3
RTocT (n = 4)	100.1	16.7

CV, CToc, CT and CTocT are offspring of control dams, treated during pregnancy, respectively, with α -tocopherol vehicle (V), α -tocopherol (Toc), tempol (T) or α -tocopherol + tempol (Toc + T); RV, RToc, RT and RTocT are offspring of dams maintained during pregnancy under 50% dietary restriction and treated in parallel with the same antioxidants as the control group.

Table 2: Levels of MDA and GSH in the offspring kidney and liver

	Kidney						Liver					
	MDA, nmol/mg protein			GSH, nmol/mg protein			MDA, nmol/mg protein			GSH, nmol/mg protein		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n
CV	0.41	0.02	10.0	22.53	2.59	6.0	0.42	0.03	12.0	16.72	0.46	4.0
RV	0.41	0.06	8.0	13.07	0.55*	4.0	0.33	0.05	8.0	11.22	0.47	4.0
CToc	0.29	0.01*	8.0	11.00	0.55*	8.0	0.33	0.05	8.0	11.30	0.50	6.0
RToc	0.31	0.02	6.0	16.56	2.52	6.0	0.31	0.03	6.0	18.94	3.26	5.0
CT	0.36	0.04	6.0	12.81	1.39	4.0	0.46	0.03	6.0	12.63	1.33	4.0
RT	0.35	0.02	8.0	15.86	1.48	6.0	0.37	0.04	8.0	19.97	1.68	10.0
CTocT	0.24	0.02*	6.0	15.73	0.95	6.0	0.24	0.02*	6.0	18.00	0.62	4.0
RTocT	0.36	0.03†	4.0	20.92	6.26	4.0	0.53	0.08†	4.0	30.74	7.11†	4.0

See description of groups in Table 1. P < 0.05: * vs. CV, † vs. respective control group.

Table 3: Mean arterial pressure (MAP) in the offspring aged 30 days

	MAP, mmHg	
	Mean	SEM
CV (n = 10)	105.0	4.0
RV (n = 8)	99.0	3.0
CToc (n = 8)	105.0	5.0
RToc (n = 4)	110.0	3.0
CT (n = 7)	99.0	2.0
RT (n = 12)	107.0	3.0
CTocT (n = 7)	107.0	4.0
RTocT (n = 5)	103.0	3.0

See description of groups in Table 1.

Table 4: Maternal weight gain during pregnancy and offspring body weight

	Maternal weight gain, g		Pup birth weights, g		Pup weights at weaning, g		Pup weights at age of 30 days, g		Pup kidney weights at 30 days, g	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
CV	106.50	9.40	6.36	0.14	42.80	2.40	81.10	5.20	0.45	0.02
RV	35.60	5.10*	5.32	0.17*	35.30	0.70*	61.10	2.00*	0.35	0.01*
CToc	106.30	7.70	5.88	0.18	41.40	2.20	72.30	1.60	0.43	0.01
RToc	11.10	2.20*	5.80	0.16	42.60	2.00†	87.30	8.60†	0.43	0.03†
CT	104.60	12.00	5.72	0.06‡	40.70	2.10	75.10	3.60	0.44	0.02
RT	24.40	5.10*	5.33	0.16	45.10	1.80†	81.30	5.90†	0.42	0.03†
CTocT	91.30	5.10	6.40	0.20	46.90	3.10	85.10	3.10	0.45	0.02
RTocT	35.70	7.00*	5.60	0.10*	40.15	3.10	63.10	5.10*	0.36	0.02*

See description of groups in Table 1. $P < 0.05$: * vs. respective control group, † vs. RV at same age, ‡ vs. CV at same age. The number of mothers per group were 4 to 6, while the number of pups were 6 to 12.

Figure Legends

Fig. 1. Effect of maternal 50% dietary restriction on the number of nephrons. Control (n = 5) and restricted (n = 5) are 30-days old rats whose mothers were maintained, respectively, under ad libitum standard diet or under 50% reduced dietary intake. Data are mean $\pm$ SEM. * P<0.05.

Fig. 2. Effect of maternal 50% dietary restriction on Ang II presence in tubulointerstitial region. Control (n = 5) and restricted (n = 4) are 30-days old rats whose mothers were maintained, respectively, under ad libitum standard diet or under 50% reduced dietary intake. Data are mean $\pm$ SEM. * P<0.05.

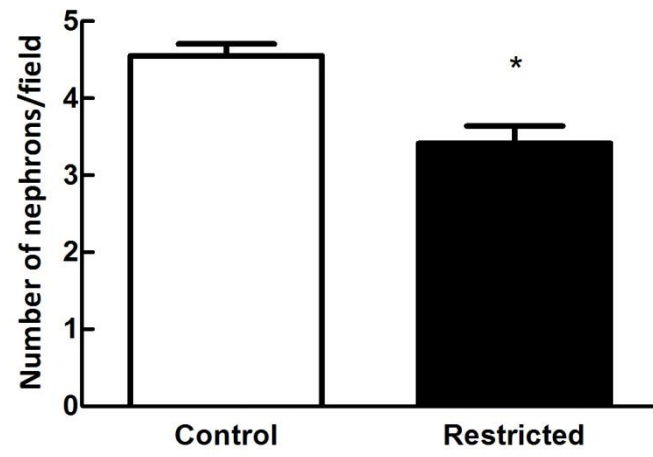
Fig. 3. Effect of maternal 50% dietary restriction on Ang II presence in glomeruli. Control (n = 5) and restricted (n = 4) are 30-days old rats whose mothers were maintained, respectively, under ad libitum standard diet or under 50% reduced dietary intake. Data are mean $\pm$ SEM.

References

1. Magalhães JC, da Silveira AB, Mota DL *et al.* (2006) Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Exp Physiol* **91**, 611–619.
2. Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA *et al.* (2009) Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**, 1157–1163.
3. Silva LA, Viera-Filho LD, Barreto IS *et al.* (2011) Prenatal undernutrition changes renovascular responses of nimesulide in rat kidneys. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **108**, 115–121.
4. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J (2001) Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* **59**, 238–245.
5. Sahajpal V, Ashton N (2003) Renal function and angiotensin AT1 receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. *Clin Sci (Lond)* **104**, 607–614.
6. Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA (2010) Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant* **25**, 380–388.
7. Hoppe CC, Evans RG, Moritz KM (2007) Combined prenatal and postnatal protein restriction influences adult kidney structure, function, and arterial pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**, R462–469.
8. Brennan KA, Kaufman S, Reynolds SW (2008) Differential effects of maternal nutrient restriction through pregnancy on kidney development and later blood pressure control in the resulting offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**, R197–205.
9. Oliveira FS, Vieira-Filho LD, Cabral EV *et al.* (2012) Reduced cholesterol levels in renal membranes of undernourished rats may account for urinary Na(+) loss. *Eur J Nutr* [Epub ahead of print].
10. Sachse A, Wolf G (2007) Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2439–2446.
11. Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA *et al.* (2011) Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys* **505**, 91–97.
12. Stäubli B, Boscoboinik D, Tasinato A *et al.* (1994) Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D-alpha-tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem* **226**, 393–402.

13. Azzi A (2007) Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. *Free Radic Biol Med* **43**, 16–21.
14. Rimbach G, Moehring J, Huebbe P *et al.* (2010) Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol. *Molecules* **15**, 1746–1761.
15. Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Rodriguez JS *et al.* (2010) Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. *Reprod Biol Endocrinol* **8**:86.
16. Zingg JM, Meydani M, Azzi A (2012) α -Tocopheryl phosphate--an activated form of vitamin E important for angiogenesis and vasculogenesis. *Biofactors* **38**, 24–33.
17. Tam Tam KB, Lamarca B, Arany M *et al.* (2011) Role of reactive oxygen species during hypertension in response to chronic antiangiogenic factor (sFlt-1) excess in pregnant rats. *Am J Hypertens* **24**, 110–113.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K *et al.* (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**, 351–358.
19. Sedlak J, Lindsay RH *et al.* (1986) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* **25**, 192–205.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL *et al.* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
21. Touyz RM, Mercure C, He Y *et al.* (2005) Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase. *Hypertension* **45**, 530–537.
22. Stegbauer J, Potthoff SA, Quack I *et al.* (2011) Chronic treatment with angiotensin-(1-7) improves renal endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Br J Pharmacol* **163**, 974–983.
23. Haque MZ, Majid DS *et al.* (2004) Assessment of renal functional phenotype in mice lacking gp91PHOX subunit of NAD(P)H oxidase. *Hypertension* **43**, 335–540.
24. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA (1999) Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci* **64**, 965–974.
25. Paixão AD, Maciel CR, Teles MB *et al.* (2001) Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. *Biol Neonate* **80**, 239–246.
26. Van Abeelen AF, Veenendaal MV, Painter RC *et al.* (2012) The fetal origins of hypertension: a systematic review and meta-analysis of the evidence from animal experiments of maternal undernutrition. *J Hypertens* **30**, 2255–2267.

27. Engeham S, Mdaki K, Jewell K *et al.* (2012) Mitochondrial Respiration Is Decreased in Rat Kidney Following Fetal Exposure to a Maternal Low-Protein Diet. *J Nutr Metab* doi: 10.1155/2012/989037.
28. Franco Mdo C, Akamine EH, Di Marco GS *et al.* (2003) NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res* **59**, 767–775.
29. Rosso P, Kava R (1980) Effects of food restriction on cardiac output and blood flow to the uterus and placenta in the pregnant rat. *J Nutr* **110**, 2350–2354.
30. Ahokas RA, Anderson GD, Lipshitz J (1983) Effect of dietary restriction, during the last week only or throughout gestation, on cardiac output and uteroplacental blood flow in pregnant rats. *J Nutr* **113**, 1766–1776.
31. Hoffmann DS, Weydert CJ, Lazartigues E *et al.* (2008) Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor feto-placental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension* **51**, 1058–1065.

Figures**FIG. 1**

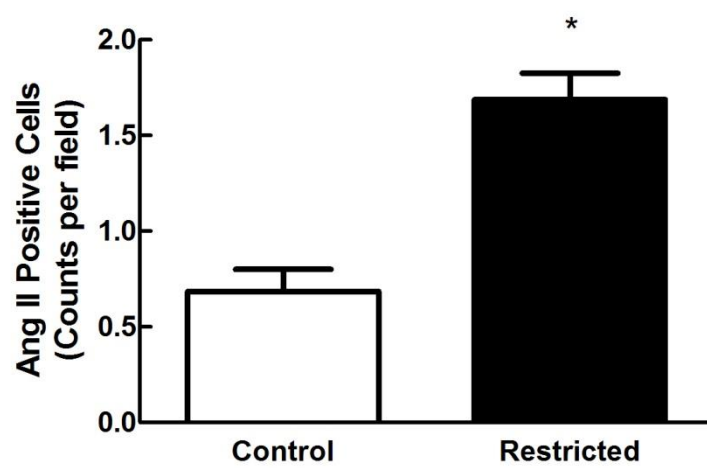


FIG. 2

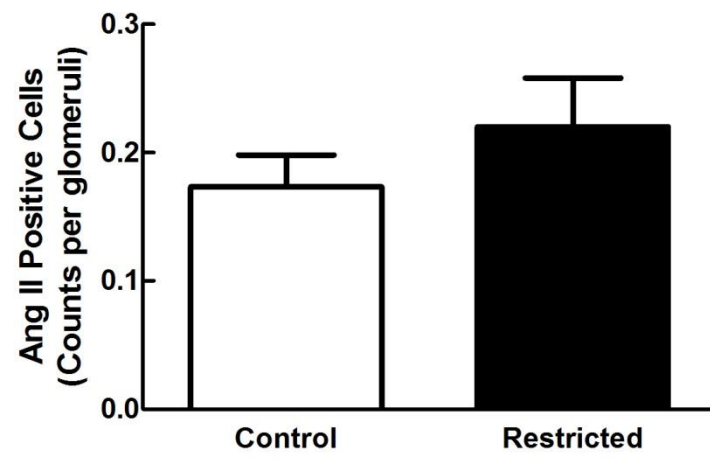


FIG. 3

4 CONCLUSÕES

I - A restrição dietética materna durante a gestação programa diminuição da defesa antioxidante no rim, aumenta a presença de angiotensina II na região túbulo-intersticial e compromete a nefrogênese, no entanto os animais não apresentam níveis pressóricos aumentados aos 30 dias de idade.

II - O tratamento materno com alfa-tocoferol recupera peso no nascimento no grupo restrição, programa, no grupo controle, diminuição do estresse oxidativo, também diminuindo a defesa antioxidante. Não exibiu influência sobre os níveis pressóricos.

III - O tratamento materno com tempol recupera peso no nascimento, programa diminuição da defesa antioxidante no grupo controle, mas também não mostrou influência sobre os níveis pressóricos.

IV - O tratamento com ambos antioxidantes programam diminuição tanto da peroxidação lipídica quanto de uma das defesas antioxidantes (GSH) no grupo controle.