

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

TESE DE DOUTORADO

**Sobrecarga de alfa-tocoferol durante o período pré-natal afeta
a função renal de ratos e induz elevação da pressão arterial**

VALDILENE DA SILVA RIBEIRO

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

Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto Ramon Vieyra

Recife - PE

2015

VALDILENE DA SILVA RIBEIRO

**Sobrecarga de alfa-tocoferol durante o período pré-natal afeta a
função renal de ratos e induz elevação da pressão arterial**

Tese apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de doutor
em Bioquímica e Fisiologia,
Universidade Federal de
Pernambuco.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Durce
Oliveira da Paixão

Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto
Ramon Vieyra

Recife - PE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Ribeiro, Valdilene da Silva

Sobrecarga de alfa-tocoferol durante o período pré-natal afeta a função renal de ratos e induz elevação da pressão arterial / Recife: O Autor, 2015.

116 folhas : fig., tab.

Orientadora: Ana Durce Oliveira da Paixão

Coorientador: Adalberto Ramon Vieyra

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências

- 1. Vitamina E 2. Hipertensão 3. Rins I. Paixão, Ana Durce Oliveira da (orientador) II. Vieyra, Adalberto Ramon (coorient.) III. Título**

572.58

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 452

VALDILENE DA SILVA RIBEIRO

**Sobrecarga de alfa-tocoferol durante o período pré-natal afeta a
função renal de ratos e induz elevação da pressão arterial**

Tese apresentada para o
cumprimento parcial das exigências
para obtenção do título de doutor
em Bioquímica e Fisiologia,
Universidade Federal de
Pernambuco.

Aprovado em 30/09/2015 por:

Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão
Orientadora

Profa. Dra. Gloria Isolina Boente Pinto Duarte
Títular interno

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier
Títular interno

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva
Títular externo

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes
Títular externo

Com muito amor aos meus queridos
pais Maria e Manoel Ribeiro, pela
compreensão e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor Deus, autor e consumidor da minha fé, porque sem Ele nada poderia fazer.

A orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Durce Oliveira da Paixão pelos ensinamentos e confiança em mim depositada para realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Adalberto Ramon Vieyra pela co-orientação, colaboração e acessibilidade ao seu laboratório onde foram feitos experimentos fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao professor Dr. Leucio Duarte Vieira Filho por sempre estar disposto a me ajudar nos momentos que precisei do seu auxílio.

Aos amigos do laboratório de Fisico-Química Biológica Aída Hassón Voloch em especial ao Humberto Muzi Filho e o Paulo André da Silva por partilhar seus conhecimentos nos experimentos realizados na UFRJ.

Ao amigo de todas as horas Edjair Vicente Cabral pelo apoio em tudo, experimentos, conselhos, cumplicidade e pelos momentos agradáveis que passamos juntos durante toda a jornada do doutorado.

Aos integrantes LFFR e LFPR pelo apoio e amizade em especial a Juliane Farias e Regina Aires pela ajuda nos experimentos e um bom convívio no laboratório.

Aos técnicos Nielson Mello e André Pastor pelo apoio nos experimentos e um bom convívio no laboratório.

Aos meus familiares e amigos queridos pelo apoio incondicional para realização deste trabalho.

Ao Tiago da Silva pelo companheirismo, amor e apoio durante todo esse processo, e por compreender a minha ausência sempre.

Aos professores da banca pela contribuição na elaboração deste trabalho.

Aos órgãos de fomento FACEPE, CAPES e CNPq sem eles não seria possível a execução dos experimentos.

Em fim a todos que de alguma forma tenham contribuído para realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

Posso todas as coisas naquele que me fortalece.

Filipenses 4.13

RESUMO

O alfa-tocoferol, uma das formas ativas de vitamina E, pode ser usado como suplementação durante a gravidez. Porém, algumas evidências indicam que a sobrecarga deste antioxidante durante fases precoces do desenvolvimento induz elevação da pressão arterial na idade adulta. Neste trabalho, foi avaliada a hipótese de que o tratamento com antioxidantes, alfa-tocoferol e tempol, durante a organogênese pode afetar componentes do sistema renina angiotensina no rim e no coração e assim elevar a pressão arterial. Ratas Wistar foram tratadas com uma sobrecarga de alfa-tocoferol (0,5 g/kg/dia) ou tempol (0,03 g/kg/dia) durante a prenhez. Os receptores de angiotensina II, algumas isoformas de PKC e transportadores de sódio dependentes de ATP, assim como indicadores do estresse oxidativo, foram avaliados nos rins de ratos neonatos e adultos e no ventrículo esquerdo de ratos adultos. A expressão do receptor AT₂R da angiotensina, o qual está relacionado com apoptose, foi aumentada pelo alfa-tocoferol no rim do neonato, e por ambos antioxidantes no rim adulto. Ambos antioxidantes aumentaram os níveis de ânions superóxidos no rim de ratos neonatos. Os marcadores de desenvolvimento renal indicaram que ambos antioxidantes retardaram o desenvolvimento renal. O alfa-tocoferol induziu elevação na expressão das isoformas ϵ , ζ e λ de PKC no rim do neonato e também do adulto. Em geral, o aumento da expressão das isoformas de PKC foi revertido pela associação do alfa-tocoferol com o tempol. O tratamento com o tempol reduziu a expressão de AT₂R e de receptores β 1-adrenérgicos no ventrículo esquerdo na idade adulta, mas não afetou a frequência cardíaca. Ambos, alfa-tocoferol e tempol, aumentaram a expressão ou a atividade dos transportadores de Na⁺ dependentes de ATP, a Na⁺-K⁺-ATPase e Na⁺-ATPase, na idade adulta e elevaram a pressão arterial sistólica. A elevação da pressão arterial sistólica induzida pelo alfa-tocoferol ou tempol pode ser devida ao retardo do desenvolvimento renal que pode resultar em menor número de néfrons. Ademais, as alterações nos transportadores de sódio no túbulo proximal também parecem contribuir com a elevação da pressão arterial promovida por ambos antioxidantes. No que diz respeito às alterações cardíacas observadas, suas repercussões ainda não estão claras, porém elas são indicadoras de que antioxidantes afetam a cardiogênese, o que abre novas perspectivas de estudos.

Palavras-chaves: Alfa-tocoferol. Tempol. Função renal. Desenvolvimento renal. Hipertensão.

ABSTRACT

Alpha-tocopherol, one of the active forms of vitamin E, may be used as supplementation during pregnancy. However, there is some evidence that alpha-tocopherol overload during early development leads to elevation of blood pressure at adult life. We hypothesized that overload of alpha-tocopherol and tempol, both anti-oxidants, during organogenesis may affect the renin angiotensin system components in kidney and heart and elevate blood pressure. Pregnant Wistar rats were treated with alpha-tocopherol (0.5 g/kg/day) or tempol (0.03 g/kg/day) throughout pregnancy. Their offspring was submitted to evaluation of components of the renin angiotensin system, from the angiotensin II receptors and their downstream, such as PKC, up to the ATPase-dependent transporters of Na^+ , as well as oxidative stress markers in neonate and adult kidneys and in the left ventricle of adult rats. The expression of AT_2R , which is related to apoptosis, was increased by alpha-tocopherol in the neonate and by both anti-oxidants in the adult kidney. Both agents increased the superoxide anion production in the neonate kidney. The kidney development markers indicated that both anti-oxidants delayed renal development. Alpha-tocopherol elevated the expression of ϵ , ζ and λ isoforms of PKC in neonate and adult kidney. In general, PKC expression augmentation was prevented by associating tempol to alpha-tocopherol treatment. Tempol reduced AT_2R and β_1 -adrenoreceptors in the left ventricle at adult age, but it did not change the heart rate. Both anti-oxidants augmented the expression or activity of ATP dependent Na^+ transporters, the $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, at adult life and elevated systolic blood pressure. The elevation of systolic blood pressure induced by overload of alpha-tocopherol and tempol could be due to impairment of renal development that could result in lowered number of nephrons. Furthermore, programmed alterations in Na^+ transporters in the proximal tubules also seem to account for blood pressure elevation determined by both anti-oxidants. Regarding cardiac alterations, their repercussion are not yet clear, but they indicate that anti-oxidant affects the cardiomyogenesis, leading to new perspective of investigations.

Keywords: Alpha-tocopherol. Tempol. Renal Function. Renal Development. Hypertension.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP- trifosfato de adenosina

AVC- acidente vascular cerebral

COX-2- ciclo-oxigenase 2

CTGF- fator de crescimento do tecido conjuntivo

DCV- doença cardiovascular

DNA- ácido desoxirribonucléico

ERK- proteína quinase ativada por sinal extracelular

ICAM-1- Molécula de adesão intercelular 1

IGF- fator de crescimento semelhante à insulina

IL-2- interleucina 2

LDL- lipoproteína de baixa densidade

LPL- lipoproteína lípase

MAPK- proteína quinase ativada por mitógenos

MMP-1- Metaloproteinase de matriz-1

MMP-19- Metaloproteinase de matriz-19

NaCl- cloreto de sódio

NADPH- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NOX-2- isoforma 2 da NADPH oxidase

PAS- pressão arterial sistólica

PKC- proteína quinase C

PPAR- receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma

RNA- ácido ribonucléico

SHR- ratos espontaneamente hipertensos

SOD- superóxido dismutase

SRAA- sistema renina angiotensina aldosterona

TGF- β - fator beta de transformação do crescimento

TIMP-1- inibidor tecidual de metaloproteinase 1

TSH- hormônio estimulante da tireoide

VCAM-1- molécula de adesão célula vascular 1

VLDL- lipoproteína de muito baixa densidade

α -TPP- proteína de transferência do alfa-tocoferol

LISTA DE SÍMBOLOS

$\cdot\text{OH}$ - radical hidroxila

$^1\text{O}_2^*$ - oxigênio singlete

H_2O_2 - peróxido de hidrogênio

K^+ - potássio

Na^+ - sódio

$\text{NO}\cdot$ - óxido nítrico

$\text{NO}_2\cdot$ - dióxido de nitrogênio

$\text{O}_2^{\cdot-}$ - radical ânion superóxido

O_3 - ozônio

ONOO^- - peroxinitrito

$\text{RO}\cdot$ - radical alcóxila

$\text{RO}_2\cdot$ - radical peróxila

α - alfa

β - beta

γ - gamma

δ - delta

ϵ - épsilon

λ - lambda

ζ - zeta

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 PROGRAMAÇÃO INTRAUTERINA	16
2.2 DESENVOLVIMENTO RENAL	18
2.2.1 SRAA e o desenvolvimento renal	20
2.3 DESENVOLVIMENTO CARDIACO	22
2.4 REABSORÇÃO PRÓXIMAL DE SÓDIO	24
2.4.1 Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	24
2.4.2 Na ⁺ -ATPase	26
2.5 ESTRESSE OXIDATIVO	27
2.6 VITAMINA E: ASPECTOS GERAIS	28
2.6.1 Fontes	30
2.6.2 Classificação	31
2.7 ALFA-TOCOFEROL: ABSORÇÃO, METABOLISMO E EXCREÇÃO	32
2.8 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ALFA-TOCOFEROL	34
2.8.1 Ação antioxidante do alfa-tocoferol	34
2.8.1.1 <i>Alfa-tocoferol e doenças cardiovasculares</i>	35
2.8.2 Mecanismos moleculares não antioxidantes do alfa-tocoferol	37
2.8.2.1 <i>Sinalização celular e expressão gênica</i>	37
2.9 A SUPLEMENTAÇÃO DE ALFA-TOCOFEROL DURANTE A GESTAÇÃO E SUA REPERCUSÃO NA PROLE	42
2.10 TEMPOL	44
3 OBJETIVOS	47
3.1 Gerais	47
3.2 Específicos	47
4 ARTIGO	48
5 SUPPLEMENTARY MATERIAL	77
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A vitamina E é de ocorrência natural e tem oito compostos lipossolúveis: as isoformas α , β , γ e δ tanto de tocoferóis quanto de tocotrienóis. O alfa-tocoferol representa a forma mais comum de vitamina E nos tecidos animais (DEBIER & LARONDELLE, 2004). Entre os compostos da vitamina E, o alfa-tocoferol se destaca por ter ação antioxidante mais potente (YOSHIDA *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2005) e, também, por ser o mais encontrado (WANG *et al.*, 1999). Esses compostos essenciais estão envolvidos em vários processos biológicos importantes tais como, imunidade, proteção contra danos no tecido, reprodução, crescimento e desenvolvimento. Eles são fundamentais durante as fases iniciais da vida e devem ser transferidos de forma adequada durante a gestação e lactação (DEBIER & LARONDELLE, 2004).

O ambiente intra-uterino adverso altera o metabolismo fetal, resultando em adaptações no desenvolvimento para garantir a sobrevivência do feto. Tais alterações podem ter seqüelas significativas para a saúde da prole na vida adulta (VICKERS *et al.*, 2000). A qualidade da dieta materna, como potencial estressor, pode perturbar o desenvolvimento normal do feto, levando a um retardo do crescimento intrauterino e aumentando o risco de desenvolvimento de doenças renais (HOY *et al.*, 1999; ZANDI-NEJAD *et al.*, 2006), metabólicas (DESAI & HALES, 1997) e cardiovasculares (BARKER *et al.*, 1993) na vida adulta.

A vitamina E tem sido usada como suplemento nutricional materno para diminuir o risco de má formação (BÜHLING E GRAJECKI, 2013), e também como uma tentativa de evitar a pré-eclâmpsia e outros resultados adversos maternos e perinatais (CONDE-AGUDELO *et al.*, 2011). No entanto, a suplementação com altas doses de alfa-tocoferol aumenta a pressão arterial em ratos hipertensos propensos a acidente vascular cerebral (MIYAMOTO *et al.*, 2009) e também em pacientes diabéticos tipo 2 (WARD *et al.*, 2007). Além disso, dados do nosso laboratório mostram que o tratamento materno com doses elevadas de alfa-tocoferol durante a lactação leva a elevação da pressão sanguínea na prole na vida adulta (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2014). Alguns

mecanismos têm sido apontados como responsáveis por hipertensão induzida pelo alfa-tocoferol, tais como aumento da atividade Na^+ -ATPase no túbulo proximal (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2014) e alterações estruturais no sistema nervoso central (MIYAMOTO *et al.*, 2009).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROGRAMAÇÃO INTRAUTERINA

O ambiente encontrado durante a vida fetal e na primeira infância está fortemente relacionado ao risco de doenças não transmissíveis na vida adulta. A hipótese de programação intrauterina propõe que alterações permanentes nas características do crescimento, metabolismo e fisiologia pós-natal correlacionadas com doenças no adulto, são oriundas de alterações do desenvolvimento fetal sob condições precárias do ambiente intrauterino (FOWDEN *et al.*, 2006; ZANDI-NEJAD *et al.*, 2006). Nas últimas décadas tem emergido a relação do desenvolvimento fetal em um ambiente adverso com a programação de doenças crônicas na idade adulta (BARKER *et al.*, 1993; BARKER, 2004 ZANDI-NEJAD *et al.*, 2006; PISANESCHI *et al.*, 2013), como o surgimento de hipertensão, isquemia cardíaca, intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperlipidemia, doença pulmonar e desordens reprodutivas (FOWDEN *et al.*, 2006). O ambiente intra-uterino adverso altera o metabolismo fetal e resulta em adaptações no desenvolvimento para garantir a sobrevivência do feto. Tais alterações podem ter seqüelas significativas para a saúde da prole a longo prazo, na vida adulta (VICKERS *et al.*, 2000).

A qualidade da dieta materna, como potencial estressor, pode perturbar o desenvolvimento fetal normal. A má-nutrição intrauterina, em particular, está relacionada com retardo do crescimento intrauterino e aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (BARKER *et al.*, 1993), renais (HOY *et al.*, 1999; ZANDI-NEJAD *et al.*, 2006) e metabólicas (DESAI & HALES, 1997). Além da nutrição materna, o oxigênio é um dos principais substratos para a geração de energia e crucial para o crescimento fetal e placentário. Insuficiência no oxigênio conduz à cessação do crescimento fetal em favor da sobrevivência de células do cérebro e coração (ILLSLEY *et al.*, 2010). A hipóxia induzida pela restrição do crescimento intrauterino é também a causa de anormalidades na função cardiovascular na prole adulta (FOWDEN *et al.*, 2006). Hormônios que normalmente influenciam o desenvolvimento fetal são glicocorticóides (GCs), insulina, IGF e TSH (FOWDEN *et al.*, 2004;

SFERRUZZI-PERRI *et al.*, 2013; FOWDEN & FORHEAD, 2015; SEDAGHAT *et al.*, 2015). Estes hormônios atuam sobre o crescimento fetal diretamente através de genes e, indiretamente, por alterações no crescimento placentário, metabolismo fetal, ou produção de fatores de crescimento (EBERLE & AMENT, 2012). As concentrações hormonais na circulação fetal sofrem mudanças durante o desenvolvimento em resposta a outros estímulos, tais como, a subnutrição, a hipoxemia e o estresse (FOWDEN *et al.*, 2006).

Além da nutrição, aporte de oxigênio e influências hormonais, existem outros fatores que afetam o desenvolvimento fetal. Altitudes elevadas, toxinas, temperatura, abuso de substâncias como álcool, nicotina, e alguns medicamentos, também estão envolvidos na programação intrauterina na idade adulta (FOWDEN *et al.*, 2006).

A vitamina E é um nutriente essencial na fisiologia normal da reprodução. Ratas alimentadas com uma dieta isenta em vitamina E são estéreis. O comprometimento da fertilidade foi observado em animais sem a proteína de transferência do alfa-tocoferol (α -TTP) (MULLER-SCHMEHL *et al.*, 2004), sugerindo que a vitamina E pode desempenhar um papel importante na reprodução humana. A vitamina E é indispensável na fertilidade de animais, inclusive na implantação do zigoto (KAEMPF-ROTZOLL *et al.*, 2002), maturação da placenta (JISHAGE *et al.*, 2005) e na embriogênese (MILLER *et al.*, 2012).

O papel da vitamina E durante as diferentes fases da gravidez, especialmente durante a implantação e o desenvolvimento da placenta, não é bem compreendido. O alfa-tocoferol é provavelmente importante na variabilidade das células do sincitiotrofoblasto no labirinto, uma região da placenta de rato (JISHAGE *et al.*, 2005).

Estudos mostram que peixes-zebra alimentados com uma dieta pobre em alfa-tocoferol produzem embriões com aumento do número de anormalidades morfológicas e mortalidade. O peixe-zebra é um organismo vertebrado frequentemente utilizado como modelo estabelecido em estudos de desenvolvimento (MILLER *et al.*, 2012), porque o seu processo de

desenvolvimento é semelhante aos outros vertebrados inclusive os humanos. Além do mais o desenvolvimento do peixe-zebra é bem rápido e ocorre fora do corpo materno (MILLER *et al.*, 2014).

A suplementação oral diária com 500mg/dia de alfa-tocoferol e 1000mg/dia de gama-tocoferol produz aumento da angiogênese placentária em ovelhas prenhes. O aumento da angiogênese placentária pode fornecer nutrientes necessários para o desenvolvimento e crescimento do feto durante a gravidez tardia (KASIMANICKAM *et al.*, 2010).

Dados do nosso laboratório mostram que o tratamento materno com (350mg/kg/dia) de alfa-tocoferol, em fêmeas submetidas à desnutrição durante a gestação, previne a elevação do estresse oxidativo placentário (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011a,b) e reprograma alterações renais e hipertensão arterial na vida adulta programadas pelo estresse oxidativo materno (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2014).

Por outro lado, estudos *in vitro* mostram que o tempol, que é um agente redox que pode metabolizar o anion superóxido e inibe a peroxidação lipídica, também está relacionado com efeitos sobre a fertilidade (MARA *et al.*, 2005). e embriogênese, quando em cultura em meio hiperglicêmico impede a má formação de embriões proporcionando proteção contra teratogenicidade diabética (RYU *et al.*, 2007).

Com os estudos acima, vemos que tanto o alfa-tocoferol quanto o tempol mostram estar envolvidos na embriogênese, período onde ocorre o desenvolvimento dos sistemas e órgãos, como o rim.

2.2 DESENVOLVIMENTO RENAL

O desenvolvimento do rim ocorre em três fases morfolologicamente distintas, todas derivadas do mesoderma intermediário: o pronefro, sem função óbvia nos mamíferos; o mesonefro, o qual funciona como um órgão excretor em toda a embriogênese e o metanefro ou rim permanente. Durante a embriogênese o rim deriva do cume néfrico no mesoderma intermediário isso ocorre no 8º dia pós-concepção no rato. O duto pronefrico dá origem ao

pronefro que se alonga formando o duto de Wolff que se desenvolve em broto ureteral, o qual é induzido pelo blastema metanéfrico a sair do duto mesonéfrico, isso ocorre no 10,5º dia pós-concepção no rato. A invasão do ureter induz o blastema metanéfrico a sofrer nefrogênese e prepara o ambiente para o evento chave da nefrogênese, isso ocorre no 11,5º dia pós-concepção aproximadamente, quando o mesênquima mesonéfrico é estimulado a provocar a condensação de células que resultam em epitélio mesenquimal de transição e formação do epitélio néfrico (BRENNER, 2000; RAMOS *et al.*, 2006; SCHEDL & HASTIE, 2000). O blastema nefrogênico passa ainda por várias modificações celulares até formar o complexo tridimensional do arranjo do nefro: o glomérulo com seus três tipos de células (endoteliais, mesangiais e podócitos), o aparelho justaglomerular e os túbulos proximal e distal e todas essas modificações vão até 14 dias pós-nascimento (SCHEDL & HASTIE, 2000).

Em humanos, o desenvolvimento do rim metanéfrico ou rim permanente ocorre entre a quarta e quinta semanas de gestação e se conclui antes do término da 36ª semana de gestação, enquanto no rato vai do 12º dia pós-concepção até ao término da segunda semana de vida pós-natal (NIGAM *et al.*, 1996).

O risco cardiovascular aumenta em animais expostos a desnutrição proteica nos 2/3 finais da gestação, período em que há nefrogênese (ALEXANDER, 2007). A manipulação do estado nutricional no período pré-natal é crítico para a nefrogênese e pode levar à hipertensão arterial, redução no número de nefros (ALEXANDER, 2006, 2007).

Além do estado nutricional materno, outros fatores, como o Sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) também está envolvido no desenvolvimento renal.

2.2.1 SRAA e o desenvolvimento renal

Várias linhas de evidências clínicas e experimentais mostram que o SRAA participa do desenvolvimento renal (BALBI *et al.*, 2009). Todos os componentes do SRAA são expressos no tecido renal fetal (angiotensinogênio,

enzima conversora de angiotensina, angiotensina II e seus receptores AT₁ e AT₂) (BURNS *et al.*, 1993). A expressão de todos os componentes do SRAA nos rins pode ser detectada a partir de 12-17 dias de gestação e está aumentada em fetos e ratos neonatos em comparação aos ratos adultos (MILLAN *et al.*, 1989; GOMEZ & NORWOOD, 1995). As atividades plasmáticas da renina e da enzima conversora de angiotensina II aumentam durante a gestação e são maiores nos recém-nascidos quando comparados com as dos adultos (GOMEZ *et al.*, 1989, GOMEZ *et al.*, 1993). O RNAm para o receptor AT₁ foi detectado nos glomérulos renais de ratos recém-nascidos durante a proliferação e diferenciação celular, enquanto a expressão renal do receptor AT₂ é elevada durante a vida fetal e diminui após o nascimento (TUFRO-MCREDDIE *et al.*, 1993).

A angiotensina II induz crescimento e proliferação celular. Esta ação tem sido demonstrada em várias células e tecidos (CHEN *et al.*, 2004), inclusive células musculares lisas vasculares, células mesangiais e células epiteliais tubulares (OLIVERIO *et al.*, 1997). O crescimento renal, durante a nefrogênese, é caracterizado por proliferação celular ativa, acompanhada por uma ampla cascata apoptótica para eliminar as células não utilizadas. Além do seu clássico papel na regulação da pressão arterial, a angiotensina II é também conhecida por ser um fator de crescimento e a ausência da estimulação promovida por sua ligação com seu receptor AT₁ poderia interferir no balanço entre proliferação celular e apoptose (CHEN *et al.*, 2004).

Além dos efeitos de estimulação direta do crescimento e de proliferação celular, a angiotensina II também pode regular a síntese de outros fatores de crescimento que desempenham importantes funções no desenvolvimento renal normal, como o fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-I) (NILSSON *et al.*, 2000, 2003).

Animais geneticamente modificados que não expressam angiotensinogênio ou enzima conversora de angiotensina (ECA) (ESTHER *et al.*, 1996; KAKINUMA *et al.*, 1999) ou ainda o bloqueio farmacológico do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) têm reforçado a importância

da integridade do SRAA no desenvolvimento dos rins (FRIBERG, *et al.*, 1994; NILSSON *et al.*, 2000; LASAITIENE *et al.*, 2004; MACHADO *et al.*, 2008; FANELLI *et al.*, 2011; MARIN *et al.*, 2011).

Camundongos com deleção de angiotensinogênio (NIIMURA *et al.*, 1995), ECA (ESTHER *et al.*, 1996), ou ambos os receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1a e 1b) (TSUCHIDA *et al.*, 1998) mostram um fenótipo patológico comum no rim, por exemplo, atrofia papilar e hidronefrose. Estes modelos demonstram que SRAA, através da via clássica, desempenha um papel crítico na nefrogênese neonatal.

O bloqueio do SRAA com inibidores da ECA ou bloqueador de receptor AT₁ nos primeiros dias pós-nascimento em ratos e porcos induz anomalias renais que persistem após o tratamento. As lesões histológicas são caracterizadas pela atrofia papilar associadas à dilatação pélvica; um aumento no volume intersticial acompanhados de fibrose, infiltrado inflamatório celular; atrofia tubular e dilatação (GURON *et al.*, 1997; 1998). A vasculatura renal também é afetada, resultando em arquitetura renal alterada caracterizado por arteríolas aferentes mais grossas e curtas e em menor quantidade, redução do número e tamanho glomerular e dilatação tubular (TUFRO-MCREDDIE *et al.*, 1995).

Machado e cols. 2008 mostram que a prole de ratas tratadas com losartan, bloqueador do receptor AT₁, durante a lactação apresentaram após três meses de vida, redução do numero de néfrons e da taxa de filtração glomerular, diminuição da expressão da proteína zona ocludens-1, modesta glomerulosclerose, significativa expansão intersticial e inflamação e baixa osmolaridade da urina, e ainda aos dez meses de vida esses animais exibiram hipertensão arterial sistêmica, uma severa albuminúria, glomerulosclerose e expansão intersticial renal grave.

O tratamento em ratos com candesartan, antagonista do receptor AT₁ da angiotensina II, por duas semanas após o nascimento, reduziu o comprimento, volume e a área de superfície total de capilares, tanto no córtex, como na medula e inibiu a organização da formação da vasa recta. Além disso,

inibiu a transcrição de factores angiogénicos de crescimento, factor de crescimento endotelial vascular, angiopoietina-1, angiopoietina-2, e o receptor de angiopoietina Tie-2 no córtex e na medula (MADSEN *et al.*, 2010).

Marin e Cols 2011 mostraram que ratos expostos ao tratamento com losartan durante a lactação apresentaram alterações funcionais renais como: albuminúria, e aumento da excreção urinária de sódio e potássio.

Relatos mostram que autópsia feita em rins de fetos que foram expostos durante toda a gravidez a antagonistas de receptor da angiotensina II do tipo 1, revelou lesões renais graves, incluindo disgenesia tubular, hipertrofia das células endoteliais e medial que revestem as paredes arteriais e arteriolas, hiperplasia do aparelho justaglomerular e atraso no desenvolvimento da vasa recta (DAÏKHA-DAHMANE *et al.*, 2006).

O SRAA, além de estar envolvido no desenvolvimento renal, também esta envolvido no desenvolvimento do coração, pois estudos mostram que a grande quantidade de receptores AT₁ e AT₂ no coração em desenvolvimento sugere um papel potencial para angiotensina II na regulação do crescimento normal do coração e possivelmente também no seu desenvolvimento (SADOSHIMA *et al.*, 1993).

2.3 DESENVOLVIMENTO CARDÍACO

O coração é o primeiro órgão a ser formado no período embrionário, e todos os eventos seguintes na vida do organismo dependem da habilidade do coração de equivaler seu rendimento às exigências do organismo por oxigênio e nutrientes (OLSON, 2004).

Os cardiomiócitos são células altamente especializadas que formam o tecido cardíaco: células de trabalho, gênese e condução da atividade elétrica do coração. Estas células se desenvolvem inicialmente na estrutura primitiva cardíaca – tubo cardíaco, durante a vida intra-uterina e vai até os primeiros dias de vida pós natal (LI *et al.*, 1996). Os cardiomiócitos apresentam durante as etapas embrionária, fetal e pós-natal características que podem ser divididas em hiperplasia, binucleação e hipertrofia (LI *et al.*, 1996). Os cardiomiócitos

apresentam durante os últimos dias de desenvolvimento intra-uterino até aproximadamente o 3º dia de vida pós-natal, uma alta taxa de proliferação celular e síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) (citocinese). Logo após o nascimento, aproximadamente no 3º ou 4º dias de vida pós-natal, ocorre cariocinese, resultando em cardiomiócitos binucleados e, diferente do que é observado no ambiente intrauterino, não ocorre a citocinese e essa binucleação segue até o 12º dia após o nascimento (LI *et al.*, 1996; SOONPAA *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1997). Estes por sua vez serão a população de células que constituirão o tecido cardíaco adulto, uma vez que a partir desse ponto os cardiomiócitos não irão mais se duplicar e sim terão o seu volume aumentado (hipertrofia). Em humanos, as células binucleadas representam 25–50% (SCHMID *et al.*, 1985; OLIVETTI *et al.*, 1996) e em ratos cerca de 90% dos CMs são binucleados (SOONPAA *et al.*, 1996).

Estudos mostram que o número de ambos os receptores da angiotensina II o AT₁ e AT₂ estão elevados no coração fetal e neonatal de ratos do que no adulto (SECHI *et al.*, 1992). A maior quantidade de receptores no coração em desenvolvimento sugere um papel potencial para angiotensina II através dos receptores AT₁ e AT₂ na regulação do crescimento normal do coração e possivelmente também no desenvolvimento. Além disso, cardiomiócitos de rato no período neonatal sintetizam e liberam a angiotensina II em resposta ao estiramento mecânico, o que sugere um papel importante para a liberação autócrina de angiotensina II em hipertrofia cardíaca (SADOSHIMA *et al.*, 1993).

O tratamento com losartan, antagonista do receptor AT₁, durante 3 semanas começando aos 21 dias de vida no rato resultou numa diminuição significativa no peso do coração. Esse resultado sugere que a angiotensina II, atuando através do receptor AT₁, é um factor importante e necessário para o desenvolvimento normal do coração (EVERETT *et al.*, 1997).

O SRAA, através da angiotensina II, além de estar envolvido no desenvolvimento normal de órgãos como coração e rim, também parece alterar a reabsorção proximal de sódio através da modulação de transportadores de

sódio, como as bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (GILDEA *et al.*, 2012) e $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ (GOMES *et al.*, 2008).

2.4 REABSORÇÃO PROXIMAL DE SÓDIO

Os rins realizam várias funções no organismo. Todas essenciais para a vida. Eles são responsáveis pela manutenção do volume e da composição do fluido extracelular, mantendo o equilíbrio hídrico e eletrolítico do corpo (BONNY *et al.*, 2013). Outra função do rim consiste em excretar produtos metabólicos e substâncias bioativas, como hormônios e fármacos, entre outros. Os rins também regulam o equilíbrio ácido-básico (LAYTON, 2012), a pressão arterial (IVY & BAILEY, 2014), a gliconeogênese, a produção de eritropoetina (NAGAI *et al.*, 2014) e da vitamina D (WHITE, 2012).

O túbulo proximal é o segmento do rim com maior capacidade transporte: reabsorve 2/3 da água, sódio, potássio e cloro; 100% da glicose, aminoácidos e bicarbonato; secreta ânions e cátions endógenos e exógenos; e, metaboliza substâncias. As microvilosidades de suas células formam a estrutura chamada borda-em-escova luminal, cuja função é aumentar a área de contato. Esse segmento contém transportadores específicos, que proporcionam ao epitélio uma alta capacidade de transporte. Os mecanismos de reabsorção transcelular de Na^+ ao longo do néfron dependem do gradiente eletroquímico favorável a sua entrada pela membrana luminal. Este gradiente é gerado e mantido pela $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e pela $\text{Na}^+\text{-ATPase}$, localizadas na membrana basolateral das células epiteliais renais (AIRES, 2008).

2.4.1 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$

A $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ é uma proteína complexa de membrana que pertence à família das ATPases do tipo P. Esta enzima usa a energia derivada da hidrólise de ATP para gerar gradiente eletroquímico para Na^+ e K^+ em todas as membranas plasmáticas de células animais. Ela transporta três íons de Na^+ para fora das células e dois íons K^+ para o interior da célula, contra os seus gradientes de concentração (MORTH *et al.*, 2007; LINGREL, 2010).

A Na⁺-K⁺-ATPase é composta por três subunidades: α , β , e um membro da família FXYD. Existem quatro isoformas da subunidade α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, e $\alpha 4$) e três para a subunidade β ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$). A família das FXYD é composta por sete membros (FXYD1–7). Esta diversidade de subunidades contribui para a diversidade de funções da Na⁺-K⁺-ATPase. A forma predominante nas células epiteliais renais é a isoforma $\alpha 1$ (SUMMA *et al.*, 2004). Cada uma destas subunidades é codificada por genes próprios. A combinação de várias isoformas de α e β subunidades com uma das proteínas FXYD fornece ampla diversidade das propriedades da Na⁺-K⁺-ATPase (BLANCO & MERCER, 1998; MIJATOVIK *et al.*, 2007; LINGREL, 2010; KRIVOI, 2014). A subunidade α é uma proteína integral, composta por 10 domínios transmembranares. Esta subunidade possui propriedades catalíticas e de transporte da Na⁺-K⁺-ATPase e contém sítios de ligação com o ATP, Na⁺ e K⁺ (MIJATOVIK *et al.* 2007; LINGREL, 2010). A subunidade β é responsável pela maturação e inserção da Na⁺-K⁺-ATPase na membrana plasmática e também participa nas atividades da Na⁺-K⁺-ATPase (LINGREL, 2010). A proteína da família FXYD tem um domínio transmembranar, mas distinto da subunidade β e se expressa de maneira tecido-específica, mas não é um componente necessário para a formação estrutural e funcional da Na⁺-K⁺-ATPase. (FALLER, 2008; KRIVOI, 2014). A ouabaína é um glicosídeo cardiotônico que inibe especificamente a atividade catalítica e o transporte de íons da Na⁺-K⁺-ATPase (CROYLE *et al.*, 1997).

Fatores hormonais, como dopamina, epinefrina, norepinefrina, angiotensina II e aldosterona modulam a Na⁺-K⁺-ATPase (FERAILLE & DOUCET, 2001). A angiotensina II modula a atividade da Na⁺-K⁺-ATPase, através da sua ligação com os seus receptores, que vão promover modificações opostas na atividade da enzima. Quando ligada ao AT₁, a angiotensina II vai promover um aumento da atividade da Na⁺-K⁺-ATPase via fosforilação da ATPase causada pela PKC. Quando a angiotensina II se liga ao AT₂ promove uma diminuição da atividade da Na⁺-K⁺-ATPase (GILDEA *et al.*, 2012). Em baixas concentrações, a angiotensina II aumenta a atividade dessa bomba no túbulo proximal (GARVIN, 1991; YINGST *et al.*, 2004). Em altas concentrações tem efeito oposto (HARRIS *et al.*, 1977). Assim, em

concentrações fisiológicas, a angiotensina II aumenta a reabsorção tubular proximal de sódio.

2.4.2 Na⁺-ATPase

A bomba Na⁺-ATPase, é insensível à ouabaina e sensível à furosemida. Esta enzima foi descrita através da mensuração da sua atividade em diferentes tecidos em vários organismos (CARUSO-NEVES *et al.*, 2001; DE ALMEIDA-AMARAL *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2007; REYES *et al.*, 2009). Ela transporta sódio contra o seu gradiente eletroquímico e não é estimulada por K⁺. Em células do túbulo proximal esta enzima está localizada na membrana basolateral e está envolvida na extrusão de sódio, juntamente com cloreto e água (PROVERBIO *et al.*, 1989). Em 2011, esta enzima foi clonada e purificada, confirmando de vez sua existência (ROCAFULL *et al.*, 2011). A Na⁺-ATPase está envolvida na regulação do volume extracelular (ARENSTEIN *et al.*, 1995; PROVERBIO *et al.*, 1989) e com o ajuste fino da reabsorção de sódio no túbulo proximal (CARUSO-NEVES *et al.*, 1995, RANGEL *et al.*, 1999). A angiotensina II e seus metabólitos biologicamente ativos como a angiotensina 3-4 e a angiotensina 1-7 regulam a atividade da Na⁺-ATPase pela ativação da PKC (CARUSO-NEVES *et al.*, 2001; RANGEL *et al.*, 2002, 2005). A angiotensina II parece promover efeitos antagônicos de acordo com a sua ligação aos seus receptores, quando se liga ao receptor AT₂ parece fosforilar a Na⁺-ATPase inibindo a sua ativação por intermédio da ativação de PKA (GOMES *et al.*, 2008).

Além da angiotensina II, o estresse oxidativo também parece modular a reabsorção de sódio. Níveis elevados O₂^{•-} estimulam a reabsorção de NaCl no ramo ascendente espesso da alça de Henle, através da ativação da proteína quinase C, mecanismo que parece importante para deflagrar hipertensão sensível ao sal (GARVIN *et al.*, 2003). SILVA *et al.* (2010) mostraram que com o envelhecimento ratos Wistar Kyoto apresentam um aumento da produção de H₂O₂ no rim que foi associada a diminuição na atividade da Na⁺-K⁺-ATPase no córtex renal. Além do mais, outros estudos mostram que a administração crônica de leptina aumenta a atividade da Na⁺-ATPase e este efeito foi

prevenido pela co-administração de tempol, ou a apocinina. Este último, um inibidor de NADPH-oxidase, o que sugere que o estresse oxidativo está envolvido (BELTOWSKI *et al.*, 2007).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a defesa antioxidante (LOBO *et al.*, 2010, SHOJI; KOLETZKO, 2007).

Radicais livres são definidos como substâncias químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, o que lhes confere alta reatividade química (ALZOGHAIBI, 2013). Os radicais livres podem ser derivados do oxigênio: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $^{\cdot}OH$, $RO_2^{\cdot}$, $RO^{\cdot}$, $^1O_2^*$, O_3 ; derivados do Nitrogênio: $NO^{\cdot}$, $NO_2^{\cdot}$, $ONOO^{\cdot-}$, e derivados do enxofre: $RS^{\cdot}$ (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Na condição de equilíbrio entre a produção desses radicais e a sua neutralização estas moléculas têm papel benéfico nas funções fisiológicas. Elas são fundamentais na proteção celular de infecções por patógenos invasores, na regulação da função de células cardíacas e vasculares, e também, na regulação intracelular da concentração de cálcio (SALIM *et al.*, 2014). Entretanto, o seu excesso pode causar danos em várias moléculas biológicas e em tecidos vitais. Os principais alvos são ácidos graxos insaturados presentes na membrana, processo conhecido como peroxidação lipídica. Porém, também podem danificar a estrutura e a função protéica, assim como os ácidos nucleicos (ALZOGHAIBI, 2013). A formação desses radicais no corpo ocorre por vários mecanismos, que envolve fatores endógenos, como mitocôndria, peroxissoma, lipoxigenases, NADPH oxidase, citocromo P450 e citocinas inflamatórias, e fatores ambientais, como fumaça de cigarro, radiação UV, radiação ionizante, xenobióticos e poluentes (YOUNG & WOODSIDE, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Os radicais livres têm a capacidade de reagir de uma forma indiscriminada causando danos em vários componentes celulares. Por outro lado, existem defesas antioxidantes, tanto endógenas como exógena, que estão presentes para proteger os componentes celulares de danos induzidos

pelos radicais livres, e esses podem ser divididos em três grandes grupos: antioxidantes enzimáticos que são: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase; os não enzimáticos que são: glutathione, carotenóides, tocoferóis, vitamina C, flavonoides e proteínas de ligação a metais de transição a transferrina, ferritina e lactoferrina (YOUNG & WOODSIDE, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo elevado está relacionado com a patogênese de diversas doenças, inclusive patologias programadas no ambiente intrauterino, como hipertensão (FRANCO *et al.*, 2007), diabetes (HORIE *et al.*, 1997) e alterações renais, como redução do número de néfrons (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011a) e alteração da reabsorção de sódio no túbulo proximal (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011b) em estudos do nosso laboratório. Nossos estudos mostram que o tratamento perinatal com alfa-tocoferol é capaz de prevenir essas alterações renais programadas pelo estresse oxidativo (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011a, b).

Tendo em vista a importância do estresse oxidativo na geração das patologias programadas, a vitamina E, pela sua capacidade antioxidante, pode ser uma ferramenta promissora na reversão dessas patologias.

2.6 VITAMINA E: ASPECTOS GERAIS

Estudando infertilidade em ratas, Evans & Bishop descobriram a vitamina E em 1922, ao observarem que os animais com dieta à base de gordura suína apresentavam reabsorção fetal e, quando o germe de trigo era incluído na dieta, a reabsorção fetal não ocorria. A síndrome de reabsorção fetal foi atribuída à deficiência de um componente ativo, chamado então de fator X (EVANS & BISHOP, 1922). Em meados de 1926, realizando experimentos semelhantes, SURE (1926) passou a chamar o fator X de vitamina E.

Os compostos de vitamina E são lipossolúveis, insolúveis em água e solúvel em óleos, bem como em álcool e outros solventes orgânicos como éter dietílico, acetona e clorofórmio (DEBIER & LARONDELLE, 2004). A vitamina E é de ocorrência natural e composta por nutrientes essenciais que estão

envolvidos em vários processos biológicos importantes tais como, imunidade, proteção contra danos no tecido, reprodução, crescimento e desenvolvimento. Eles são fundamentais durante as fases iniciais da vida e devem ser transferidos de forma adequada durante a gestação e lactação (DEBIER & LARONDELLE, 2004).

A vitamina E tem sido extensivamente estudada em diversas áreas do conhecimento, uma vez que tem função na reprodução normal e nos mecanismos antioxidantes de tecidos animais e vegetais (AZZI & STOCKER, 2000). Embora a deficiência desta vitamina não represente um problema de significância nutricional, a ingestão de vitamina E tem despertado interesse e preocupação, uma vez que evidências epidemiológicas indicam que os antioxidantes derivados de dieta, por exemplo, vitaminas A, C e E, podem ser importantes na manutenção da saúde humana e animal. Este grupo e, principalmente, a vitamina E têm sido freqüentemente associada à prevenção de doenças neuro-degenerativas, aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce (BONI *et al.*, 2010, DONG *et al.*, 2010).

Os valores recomendados são baseados em grande parte na indução de deficiência de vitamina E em seres humanos e a sua correlação com a lise de eritrócitos induzida pelo peróxido de hidrogênio e por concentrações plasmáticas de alfa-tocoferol. A ingestão recomendada para homens e mulheres é de 15 mg/dia de alfa-tocoferol (Tabela 1).

Tabela 1: Recomendações dietéticas diárias (DRIs) para a Vitamina E (Alfa-Tocoferol).

Idade	Homens	Mulheres	Gravidez	Lactação
0–6 meses*	4 mg (6 IU)	4 mg (6 IU)		
7–12 meses*	5 mg (7.5 IU)	5 mg (7.5 IU)		
1–3 anos	6 mg (9 IU)	6 mg (9 IU)		
4–8 anos	7 mg (10.4 IU)	7 mg (10.4 IU)		
9–13 anos	11 mg (16.4 IU)	11 mg (16.4 IU)		
>14 anos	15 mg (22.4 IU)	15 mg (22.4 IU)	15 mg (22.4 IU)	19 mg (28.4 IU)

DRI = recomendações dietéticas diárias ou ingestão dietética de referência em humanos; UI = unidades internacionais. * Ingestão Adequada. Fonte: Institute of Medicine. Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.

2.6.1 Fontes

A vitamina E ocorre naturalmente em alimentos de origem vegetal, principalmente nos óleos vegetais (WANG *et al.*, 1993; COLOMBO *et al.*, 2010), vegetais folhosos verde-escuros, sementes oleaginosas, gérmen de trigo (BATISTA *et al.*, 2007; DEBIER & LARONDELLE, 2004) abacate e azeitonas (ZING *et al.*, 2007, COLOMBO *et al.*, 2010).

Além de estar presente em alimentos vegetais, a vitamina E também é encontrada em alimentos de origem animal, como gema de ovo e fígado.

(BATISTA *et al.*, 2007), peixes gordos e produtos lácteos (DEBIER & LARONDELLE, 2004).

Os óleos vegetais comestíveis possuem altas concentrações de tocoferóis e alguns tocotrienóis, são de grande consumo mundial, e constituem, portanto, os alimentos de maior contribuição na ingestão de vitamina E para a população (GUINAZI, 2009).

Alguns estudos descrevem os efeitos da ingestão de doses de vitamina E acima das estabelecidas pela atual recomendação, como suplementos para prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis e no estímulo do sistema imune (YE, 2008; EANGLER, 2003).

2.6.2 Classificação

Vitamina E é um termo empregado para designar oito compostos lipossolúveis: as isoformas α , β , γ e δ tanto de tocoferóis quanto de tocotrienóis. Os tocoferóis e tocotrienóis possuem estruturas cromanol similares: trimetil a isoforma (α), dimetil as isoformas (β ou γ) e monometil a isoforma (δ), (ver Figura 3). Os tocotrienóis têm uma cadeia lateral insaturada, contendo duplas ligações nas posições 3', 7' e 11'. Enquanto os tocoferóis têm uma cadeia saturada, sem duplas ligações e um terminal fitil. O alfa-tocoferol representa a forma mais comum de vitamina E nos tecidos animais (DEBIER & LARONDELLE, 2004).

Entre os compostos da vitamina E, o alfa-tocoferol é apontado como tendo a ação antioxidante mais potente (YOSHIDA *et al.*, 2003; SINGH *et al.*, 2005) e, também, o mais encontrado (WANG *et al.*, 1999).

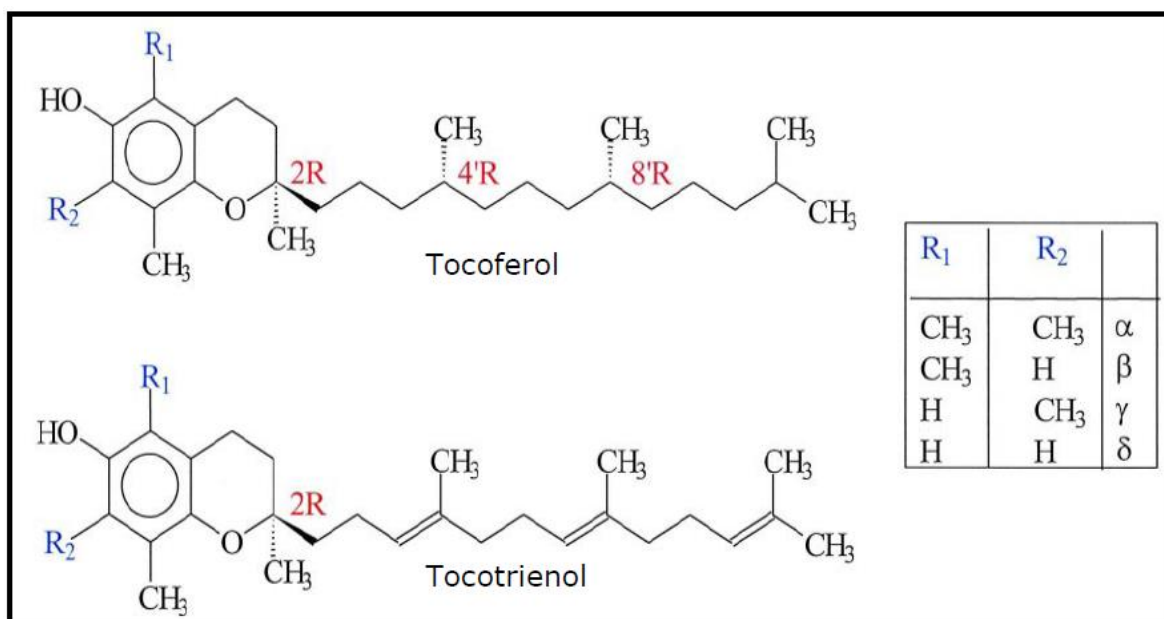


Figura 3. Estrutura química dos tocoferóis e tocotrienóis. Fonte: AZZI & STOCKER, 2000.

2.7 ALFA-TOCOFEROL: ABSORÇÃO, METABOLISMO E EXCREÇÃO

Devido a sua característica hidrofóbica, a vitamina E requer mecanismos especiais de transporte no meio aquoso do plasma, fluídos corporais e células. Desse modo, o alfa-tocoferol proveniente da dieta é hidrolisado no lúmen intestinal, pela ação das estearases pancreáticas, ácidos biliares e enzimas intestinais, que formam micelas, nas quais não só o alfa-tocoferol como também outras moléculas hidrofóbicas se tornam solubilizadas (BRIGELIUS-FLOHÉ *et al.*, 2002; TRABER *et al.*, 1996; BRAMLEY *et al.*, 2000; STAHL *et al.*, 2002). A absorção do alfa-tocoferol pelos enterócitos ocorre por difusão passiva (BJORNEBOE *et al.*, 1990; TRABER *et al.*, 1996; BRAMLEY *et al.*, 2000; STAHL *et al.*, 2002). O alfa-tocoferol é incorporado nos quilomicrons no enterócito e, os quais ao longo da via linfática são segregados para a circulação sistêmica. (BRAMLEY *et al.*, 2000; HERERA & BARBAS, 2001;

BRIGELIUS-FLOHÉ *et al.*, 2002). Pela ação da lipoproteína lipase (LPL), parte dos tocoferóis transportados em quilomícrons é absorvida por tecidos extra-hepáticos, e os quilomícrons remanescentes transportam os tocoferóis restantes para o fígado (HERERA & BARBAS, 2001). Independentemente da fonte plasmática de vitamina E, o fígado é o principal local de armazenamento de alfa-tocoferol, sendo responsável por um terço da quantidade total de desta vitamina. Através da ação da proteína de transferência de alfa-tocoferol (α -TTP), uma percentagem significativa de alfa-tocoferol é incorporada em lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Uma vez secretadas para a circulação a VLDL é convertida em IDL e LDL pela ação das LPL e logo, é transferida para o HDL, enquanto o excesso de alfa-tocoferol além de outras formas de vitamina E são secretadas na bile (HERERA & BARBAS, 2001).

Uma proporção considerável, mas variável (normalmente $30 \pm 70\%$) de vitamina E é ingerida e não absorvida, portanto excretada nas fezes, tornando esta a principal rota de eliminação (KAYDEN, 1993). Outro contribuinte para o tocoferol fecal é a sua secreção na bile (HERERA & BARBAS, 2001), além do mais há eliminação pela urina (BRAMLEY, 2000; BRIGELIUS-FLOHÉ *et al.*, 2002).

2.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ALFA-TOCOFEROL

2.8.1 Ação antioxidante do alfa-tocoferol

A ação antioxidante da vitamina E envolve a inibição da lipoperoxidação das membranas celulares, o que impede a deterioração de ácidos graxos indispensáveis para o organismo. Devido à sua capacidade antioxidante, além dos benefícios para a saúde, a vitamina E tem ações benéficas sobre o alimento, minimizando a formação de radicais livres (BATISTA *et al.*, 2007). O mecanismo principal da sua ação antioxidante inclui a inativação de um radical livre ($R^\bullet$), por uma molécula de alfa-tocoferol (TocH),



Com a subsequente limpeza de outro radical formado, pelo radical alfa-tocoferoxil ($\text{Toc}^\bullet$)



A inativação de dois radicais por uma molécula de alfa-tocoferol constitui a base da atividade clássica deste antioxidante. Este mecanismo torna-se operante quando os radicais livres são formados a uma taxa relativamente elevada, isto é, em condições oxidantes fortes (BOWRY & STOCKER, 1993; BOWRY, 1995).

A atividade pró-oxidante do alfa-tocoferol é atribuída à propagação do radical tocoferoxil formado na reação 1 (BOWRY, 1995; KONTUSH *et al.*,

1996). Quando um radical alfa-tocoferoxil reage com as partículas de ácidos graxos poliinsaturados do LDL, pode oxidar diretamente essas frações:



Após a sua oxidação, a vitamina E pode ser reciclada para a sua forma nativa não oxidada por antioxidantes solúveis, tais como a vitamina C e ubiquinol. Este processo evita a acumulação de radicais de vitamina E, e a subsequente peroxidação de lípidos (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009).

O alfa-tocoferol aumenta a estabilidade da membrana celular. Howard *et al.* (2011), mostraram que a vitamina E é necessária para a manutenção da homeostase adequada do músculo esquelético e que a suplementação em cultura de miócitos com alfa-tocoferol promove reparo da membrana plasmática. Isto ocorre porque os fosfolípidios de membrana são alvos importantes de oxidantes e a vitamina E previne eficientemente a peroxidação lipídica. Ao impedir dano tecidual mediado por radicais livres, em lípidios celulares, acredita-se que a vitamina E desempenhe um papel-chave no retardo da patogênese de uma variedade de doenças degenerativas tais como doenças cardiovasculares (DCV), câncer, doenças inflamatórias, desordens neurológicas, catarata e degeneração celular relacionada com a idade (PACKER, 1991; BOREK, 1992; BRAMLEY *et al.*, 2000).

2.8.1.1 Alfa-tocoferol e doenças cardiovasculares

A oxidação do LDL e seu consequente processo inflamatório vascular podem levar a complicações cardiovasculares (RISVI *et al.*, 2014). A vitamina E pode exercer benefício nas DCV, através da inibição da oxidação do LDL no

plasma (VARDI *et al.*, 2013), como também preveniu a formação de trombos sanguíneos que poderiam levar a isquemia coronariana, tromboembolia venosa ou AVC (GLYNN *et al.*, 2007). Alguns estudos mostram que a vitamina E está associada à redução dos níveis pressóricos e da viscosidade sanguínea em ratos SHR suplementados com 500 UI/kg de acetato de alfa-tocoferol por 2 semanas (COSTA *et al.*, 2005). Indivíduos que consomem quantidades elevadas de vitamina E na dieta ou por suplementos têm redução das taxas de DCV (RIMM *et al.*, 1993; BURING & HENNEKENS, 1997; VARDI *et al.*, 2013). Entretanto outros grandes ensaios clínicos intervencionistas não demonstraram efeitos cardiovasculares benéficos da suplementação com vitamina E e, pelo contrário, relatam que o uso de vitamina E está associado a aumento do risco de AVC hemorrágico (SESSA *et al.*, 2008). Myamoto e cols. 2009 mostraram que altas doses de alfa-tocoferol estão relacionadas ao aumento da pressão arterial em ratos espontaneamente hipertensos com propensão a AVC (SHRSP).

Ainda nesse contexto, outros estudos com suplementação de alfa-tocoferol propõem que esta vitamina afeta negativamente a progressão da DCV e aumenta a mortalidade. MILLER e cols. 2005 e relatam o aumento do risco com doses maiores que 150 UI/dia. Bjelakovic e cols. (2007) também relatam uma associação significativa entre alfa-tocoferol e mortalidade, de forma não-dependente da dose da vitamina.

Myung e cols. (2013), através de uma revisão sistemática associada a estudo de meta-análise, sobre a eficácia da suplementação de vitaminas e antioxidantes na prevenção de doenças cardiovasculares, concluem que não

existem evidências suficientes que suportem o uso da suplementação de vitaminas e antioxidantes para prevenção de doenças cardiovasculares.

2.8.2 Mecanismos moleculares não antioxidantes do alfa-tocoferol

A atividade principal destas diferentes formas de vitamina E foi identificada como de natureza antioxidante, mais tem sido demonstrado que a vitamina E, em especial o α -tocoferol, tem também ação gênica, principalmente quando altera a expressão da PKC (Azzi *et al.*, 2004). Então, além da sua ação antioxidante conhecida, o alfa-tocoferol também está envolvido em mecanismos moleculares de sinalização celular e expressão gênica constituindo assim suas ações não antioxidantes.

2.8.2.1 Sinalização celular e expressão gênica

Alguns grupos têm estudado o comportamento e a localização da vitamina E em bicamadas lipídicas de membranas. No modelo de mosaico fluido, pensava-se que os lipídios e as proteínas estavam dispostos livremente na bicamada lipídica, mas presume-se agora que os lipídios e a vitamina E não estão homogeneamente dispersos na membrana. É mais provável que o alfa-tocoferol esteja localizado em domínios que são enriquecidos com fosfolipídios poliinsaturados, local onde esta molécula é mais necessária (ATKINSON, 2008). Dentro da célula, o alfa-tocoferol tem efeitos moleculares e bioquímicos bem definidos que indicam a existência de eventos de sinalização específicos associados com sua função (GALLI & AZZI, 2010). Por isso, para a vitamina E, o velho paradigma antioxidante parece ser inadequado. O alfa-tocoferol é uma molécula de sinalização responsável pela transferência de informação em

células e na regulação da expressão de genes (ZINGG & AZZI, 2004; AZZI *et al.*, 2005; GALLI & AZZI, 2010).

Dentre as atividades não antioxidantes envolvidas na sinalização celular, o alfa-tocoferol modula a atividade da proteína quinase C (PKC) (AZZI *et al.*, 1998; VIEIRA-FILHO *et al.*, 2014), a proliferação de células musculares lisas (BOSCOBOINIK *et al.*, 1995), inibe a agregação plaquetária (FREEDMAN *et al.*, 199; LIU *et al.*, 2003), aumenta a expressão e atividade da fosfolipase A₂ (TRAN *et al.*, 1996; TRANK *et al.*, 1997; WU *et al.*, 2005), modula a atividade da NADPH oxidase (CACHIA *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2001; CALVISI *et al.*, 2004), aumenta a expressão da ciclo-oxigenase-1 (CHAN *et al.*, 1998) e diminui a ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2014).

Vários estudos mostram que a PKC parece ser regulada a nível celular, pelo alfa-tocoferol (AZZI *et al.*, 1993; AZZI *et al.*, 2000; ZINGG & AZZI, 2004; BETTI *et al.*, 2011; VIERA-FILHO *et al.*, 2014). O efeito do alfa-tocoferol sobre a inibição da PKC é relatado em diferentes tipos de células como, plaquetas humanas (FREEDMAN *et al.*, 1996), monócitos humanos, células neurais dentre outras (BETTI *et al.*, 2011). O alfa-tocoferol é capaz de ativar uma proteína fosfatase tipo 2A, que faz com que haja desfosforilação de PKC (RICCIARELLI *et al.*, 1998; AZZI *et al.*, 2002). Além disso, a translocação de PKC para a membrana, necessária para a sua atividade, é impedida (BRIGELIUS-FLOHÉ, 2009).

O alfa-tocoferol nas células endoteliais inibe a agregação plaquetária e aumenta a liberação de prostaciclina no endotélio. Sugere-se que este efeito ocorre por causa da *down-regulation* da molécula de adesão célula intracelular

(ICAM-1) e da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1), o que leva a diminuição da adesão dos componentes celulares do endotélio ao sangue (ZAPOLSKA-DOWNAR *et al.*, 2000). Além disso, devido a uma ativação na cascata do ácido araquidônico, a um aumento da expressão de fosfolipase citosólica A2 (TRAN *et al.*, 1996) , e da ciclo-oxigenase-1 (CHAN *et al.*, 1998), ocorre também um aumento da liberação de prostaciclina, que é um vasodilatador potente e inibidor da agregação de plaquetas em humanos (BRIGELIUS & TRABER,. 1999). Além disso, o alfa-tocoferol inibe a geração da trombina no plasma, um potente fator de coagulação (ROTA, *et al.*,1998). Alguns outros estudos sugerem que os tocoferóis parecem inibir a agregação de plaquetas através da inibição de PKC (FREEDMAN *et al.*,1996; LIU *et al.*, 2003) e do aumento da ação da óxido nítrico sintase (LIU *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2001).

Sobre a modulação da NADPH oxidase pelo alfa-tocoferol, um estudo com monócitos humanos mostra que o alfa-tocoferol inibe a NADPH oxidase (CACHIA *et al.*, 1998). Quanto ao mecanismo responsável pela modulação, o alfa-tocoferol age através da inibição da translocação e da fosforilação da subunidade p47^{phox} da NADPH oxidase e esse efeito parece ser via PKC (CACHIA *et al.*, 1998), uma vez que a atividade da PKC também é modulada pelo alfa-tocoferol e a PKC está envolvida na translocação e da fosforilação da subunidade p47^{phox} (EL BENNA *et al.*, 1996). CHEN *et al.*, (2001) realizaram um estudo com ratos SHR tratados com alfa-tocoferol e mostraram que o tratamento com alfa-tocoferol influencia a função e a estrutura vascular na hipertensão por modular a atividade da NADPH oxidase.

A regulação da expressão gênica exige a transcrição de fatores. O alfa-tocoferol pode modular enzimas e alterar a atividade de fatores de transcrição e de vias de transdução de sinal. Também, podem ser metabolizados em compostos bioativos que podem se ligar a fatores de transcrição e modular a atividade de enzima (ZINGG & AZZI, 2004). Thompson & wilding, (2003) mostraram que um metabólito da vitamina E, o 2,2,5,7,8-pentametil-6-cromanol (PMCol), inibe o crescimento de células sensíveis a andrógeno de carcinoma prostático, sendo esse efeito devido à potente atividade anti-androgênica deste composto. Suplementação com alfa-tocoferol, em ratos, diminui seletivamente em cerca de 70% a expressão de RNAm para colágeno no fígado (CHOJKIER *et al.*, 1998). Da mesma forma, o tratamento crônico de ratos com tetracloreto de carbono aumenta a expressão do TGF- β 1; o alfa-tocoferol inibe esta expressão e inibe, também, a expressão do RNAm para pró-colágeno do tipo 1 (PAROLA *et al.*, 1992). Por outro lado, o alfa-tocoferol induz aumento de 2-3 vezes na expressão do fator de crescimento do tecido conjuntivo em células de músculo liso vascular humano (VILLACORTA *et al.*, 2003).

O Alfa-tocoferol é capaz de diminuir a transcrição do gene da collagenase sem alterar o nível do seu inibidor natural, o TIMP-1, com o envelhecimento a expressão de collagenase na pele aumenta e o alfa-tocoferol a protege contra o envelhecimento, reduzindo a expressão de collagenase via inibição da PKC (RICCIARELLI *et al.*, 1999).

Vários outros genes têm sido descritos como sendo modulados pelo alfa-tocoferol, que segundo AZZI *et al.*, (2004) podem ser classificados, com base na sua função, em cinco grupos: no grupo 1 estão os genes envolvidos na

absorção e degradação de tocoferóis, a proteína de transferência de alfa-tocoferol (α -TTP) e o citocromo P450 (CYP3A) (FECHNER *et al.*, 1998; LANDES *et al.*, 2003); no grupo 2 estão os genes associados com a absorção de lipídios e aterosclerose, são estes: CD36, SR-BI e SR-AI / II (RICCIARELLI *et al.*, 2000; DEVARAJ *et al.*, 2001; KOLLECK *et al.*, 1999); no grupo 3 estão os genes que modulam a expressão de proteínas extracelulares, a tropomiosina, o colágeno α 1, MMP-1, MMP-19 e o CTGF (RICCIARELLI *et al.*, 1999; MAUCH *et al.*, 2002; VILLACORTA *et al.*, 2003); no grupo 4 estão os genes relacionados com a inflamação, adesão celular e agregação de plaquetas, são eles: E-selectina, ICAM-1, integrinas, glicoproteína IIb, IL-2, IL-4 e IL-1 β (ADOLFSSON *et al.*, 2001; CHANG *et al.*, 2000; FISCHER *et al.*, 2001; YOSHIKAWA *et al.*, 1998) e o grupo 5 compreende os genes que codificam proteínas envolvidas na sinalização celular e regulação do ciclo celular e consiste de PPAR γ , ciclina D1, ciclina E, Bcl2-L1, p27 e CD95 (Apo-1/Fas) (WU *et al.*, 1997, 1998; FISCHER *et al.*, 2001a; SCHWARTZ *et al.*, 1993; GYSIN *et al.*, 2002; VENKATESWARAN *et al.*, 2002; TREJO-SOLIS *et al.*, 2003).

No entanto, a forma como o tocoferol pode modular a expressão dos genes ainda não está claramente compreendida. Na verdade, vários fatores e mecanismos podem estar envolvidos.

2.9 A SUPLEMENTAÇÃO DE ALFA-TOCOFEROL DURANTE A GESTAÇÃO E SUA REPERCUSÃO NA PROLE

A vitamina E é de extrema importância durante a fase inicial de vida, chega à prole por transferência placentária durante a gestação bem como pela ingestão de leite materno durante o período neonatal. (LARONDELLE & DEBIER, 2005). O alfa-tocoferol durante a vida fetal e pós-natal precoce, desempenha papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo. Os radicais livres têm sido apontados como agentes causadores de doenças relacionadas com a gravidez, tais como pré-eclâmpsia e diabetes gestacional, e induzem complicações graves em ambos, mães e fetos. (ERIKSSON *et al.*, 1993; MIKHAIL *et al.*, 1994).

Em gravidez de risco, as concentrações de alfa-tocoferol no sangue materno estão reduzidas (MIKHAIL *et al.*, 1994; GUPTA *et al.*, 2009). Estudo mostra que concentrações reduzidas de alfa-tocoferol no sangue materno aumentam o risco de aborto recorrente (SHAMIM *et al.*, 2015). Já foi visto que uma suplementação com 500mg/dia de vitamina E durante a gestação produz efeitos benéficos sobre a angiogênese placentária (KASIMANICKAM *et al.*, 2012). A suplementação materna com 350mg/kg/dia previniu a elevação do estresse oxidativo placentário (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011a,b). Outros estudos mostram que a suplementação materna com 400IU/dia (268mg/dia) reduziu o risco de pré-eclâmpsia e baixo peso fetal (CHAPPELL *et al.*, 1999; GAGNÉ *et al.*, 2009). Essas evidências apontam para um papel potencial terapêutico da vitamina E durante a gravidez para evitar danos causados pelos radicais livres no feto (RUMBOLD *et al.*, 2005; 2008).

No entanto, efeitos benéficos da vitamina E em gravidez de risco estão atualmente em discussão. A atividade anti-mitótica e a inibição da atividade da PKC produzida pelo alfa-tocoferol levanta advertências contra o uso indiscriminado desta vitamina. Através de inibição da atividade da PKC, o alfa-tocoferol diminui a formação de sinapses e compromete o desenvolvimento neural (KANO *et al.*, 1995; HAMA *et al.*, 2009). Estudos mostram que a prole adulta provenientes de mães que foram alimentadas com altas doses de alfa-tocoferol (15g/kg de ração) durante a gestação e a lactação exibem permanente alterações do hipocampo, na densidade de sinapses, alterações na morfologia das células da glia, em conjunto com um deficit da memória espacial (SALUCCI *et al.*, 2014). Neste mesmo contexto a suplementação materna com a mesma dose acima de alfa-tocoferol durante a gestação e lactação pode influenciar a sinalização celular e a plasticidade sináptica no hipocampo em desenvolvimento promovendo efeitos adversos permanentes na prole adulta (BETTI *et al.*, 2011). Smedts *et al.*, (2008), mostra que a ingestão de vitamina E em doses acima de 12,6mg/dia esta associada com defeitos congênitos no coração dos filhos. Dados de nosso laboratório mostram que a prole de ratas suplementadas com alfa-tocoferol (350mg/kg/dia) durante a lactação apresentou elevação da pressão arterial sistólica desde os 60 dias de vida até o fim do estudo aos 150 dias de vida (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2014).

2.10 TEMPOL

O tempol é um nitróxido permeável à membrana celular. É um agente redox que pode metabolizar o anion superóxido e inibe a peroxidação lipídica. O tempol está entre os nitróxidos mais potentes no que diz respeito à proteção de células e tecidos (KRISHNA *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2006). Nitróxidos metabolizam anion superóxido a peróxido de hidrogênio por uma ação catalítica e por esta razão são designados por "miméticos da superoxido dismutase (SOD)" (SAMAI *et al.*, 2007).

O Tempol protege os lipídios (SAMUNI *et al.*, 2000), e o DNA (DAMIANI *et al.*, 1999) contra danos oxidativos. Os nitróxidos impedem danos oxidativos em muitos sistemas celulares e órgãos, por exemplo, na pele depois da radiação UV (DAMIANI *et al.*, 2006), em células submetidas à radiação (HAHN *et al.*, 2000), ou em tecidos após incubação em meio com concentrações elevadas de glicose (XIA *et al.*, 2006).

Em elevadas concentrações (5mM) em meio de cultura, o tempol pode ter efeitos pró-oxidantes no músculo liso vascular e em células endoteliais da aorta (ALPERT *et al.*, 2004; MAY *et al.*, 2005). A ação pró-oxidante do tempol nas células endoteliais tem sido inconsistente e pode ser prevenida pela co-incubação com antioxidantes, por exemplo, ascorbato (MAY *et al.*, 2005).

O tratamento com (3mM/L ou 516,6mg/L) de tempol na água de beber, protege os rins da glomerulosclerose em modelos de hipertensão induzidos por angiotensina ou sal (NISHIYAMA & ABE, 2004) bem como, protege o coração de hipertrofia em ratos infundidos por via intravenosa (i.v.) durante 30 min,

com isoproterenol nas seguintes doses (10, 100, 1000 ng/kg/min), e foram tratados com tempol na dose de 30mg/kg de tempol i.v. associado a uma infusão contínua de 0,5mg/kg/min por 30min (ZHANG *et al.*, 2005). O efeito do tempol na proteção do tecido cardíaco está relacionado à diminuição da fosforilação da MAPK, ERK1 e 2 que está aumentada na hipertensão causada pela angiotensina (ZHANG *et al.*, 2004;. NISHIYAMA & ABE, 2004; ZHANG *et al.*, 2005).

O tempol na dose de (172,2mg/L na água de beber) impede disfunção diastólica induzida pelo cloreto de sódio, assim como previne fibrose perivascular, e induz “upregulation” de sinais de receptores mineralocorticóides em SHR ou em NDmcr-cps, uma linhagem de ratos geneticamente modificados para apresentar a síndrome metabólica (MATSUI *et al.*, 2008).

Na hipertensão induzida por NaCl e mineralocorticoides (DOCA-sal), o tempol na dose de (172,2 mg/L na água de beber) impede danos nos podócitos, assim como impede glomerulosclerose, proteinúria e a perda progressiva da função renal (NAGASE *et al.*, 2007).

O tempol na dose de (15mg/kg/dia por gavagem) impede a hipertensão e a ativação da Nox-4, subunidade da NADPH-oxidase em maior concentração no rim. Além disso, o tempol reduz os níveis de angiotensina II, os danos pré-glomerulares e mantém a pressão capilar glomerular em ratos com insuficiência renal crônica (SANCHEZ-LOZADA *et al.*, 2008). Adicionalmente, o tempol na dose de (100mg/kg/dia) tem papel potencial na inibição da nefrotoxicidade induzida pela cisplatina. Este efeito é devido à diminuição do estresse oxidativo e a melhora na disfunção mitocondrial (AHMED *et al.*, 2014).

No presente estudo nós hipotetizamos que a sobrecarga durante a organogênese afeta os componentes do sistema renina angiotensina aldosterona no rim e o manuseio renal de Na^+ , que culmina com elevação tardia da pressão arterial.

Tendo em vista as evidências de que a suplementação materna com alfa-tocoferol nos períodos precoces do desenvolvimento programa elevação da pressão arterial na prole, neste estudo, propomos investigar os efeitos da sobrecarga de α -tocoferol durante o período pré-natal em componentes do sistema renina angiotensina (SRAA), comparando-o com tempol, para compreender os mecanismos que subjazem à hipertensão induzida por α -tocoferol.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os efeitos da sobrecarga de alfa-tocoferol e tempol sobre componentes do sistema renina angiotensina, isoformas de proteína quinase C (PKC) que constitui sinalizador intracelular da angiotensina II e transportadores de sódio, em rins de ratos neonatos e adultos, bem como no coração de ratos adultos.

3.2 Específicos

Investigar na prole de mães tratadas durante a gestação com sobrecarga de alfa-tocoferol ou tempol, os seguintes parâmetros:

- a) marcadores do desenvolvimento renal;
- b) marcadores de espécies reativas de oxigênio no rim e ventrículo esquerdo;
- c) expressão de componentes do sistema renina angiotensina, das isoformas α , ε , ζ e λ da PKC no rim e ventrículo esquerdo e β 1-adrenoreceptores no ventrículo esquerdo;
- d) atividade das bombas $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ e $\text{Na}^+\text{-ATPase}$ em membranas dos túbulos proximais;
- e) pressão arterial sistólica;
- f) alguns parâmetros funcionais do rim

4 ARTIGO

PARA SUBMISSÃO NO BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY

Components of the renin angiotensin system account for elevation of blood pressure in rats prenatally treated with alpha-tocopherol or tempol overload

V S Ribeiro¹, E V Cabral¹, L D Vieira-Filho¹, R S Aires¹, J S Farias¹, H Muzi^{2,3}, P A Silva^{2,3}, A Vieyra^{2,3}, A D Paixão¹

¹Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Av Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil ²National Institute of Science and Technology for Structural Biology and Bioimaging, Rio de Janeiro, Brazil

³Carlos Chagas Filho Institute of Biophysics, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence: A D Paixão, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Pernambuco, Av Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife 50670-901, Brazil, E-mail: adpaixao@ufpe.br

Abstract

BACKGROUND AND PURPOSE

Alpha-tocopherol overload during early development leads to elevation of blood pressure at adult life. We hypothesized that anti-oxidant overload during organogenesis may affect the renin angiotensin system components in kidney and heart and elevate blood pressure.

EXPERIMENTAL APPROACH

Pregnant Wistar rats were treated with alpha-tocopherol or tempol overload throughout pregnancy. Their offspring was submitted to evaluation of components of the renin angiotensin system, from the angiotensin II receptors and their downstream, such as PKC, up to the ATPase-dependent transporters of Na⁺, in neonate and adult kidneys as well as in the left ventricle of adult rats.

KEY RESULTS

The expression of AT₂R was increased by alpha-tocopherol in the neonate and by both anti-oxidants in the adult kidney. Expression of ϵ , ζ and λ isoforms of PKC, were consistently augmented by alpha-tocopherol in neonate and adult kidney. In general, PKC expression augmentation was prevented by associating tempol to alpha-tocopherol treatment. Tempol reduced AT₂R and β_1 -adrenoreceptors in the left ventricle. Both anti-oxidants delayed the offspring kidney development, affected Na⁺ transporters at adult life and elevated systolic blood pressure.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The elevation of systolic blood pressure induced by overload of alpha-tocopherol and tempol could be due to changes in the SRA components and the impairment of renal development. Furthermore, programmed alterations induced by both anti-oxidants in ATP-dependent Na⁺ transporters expression or activity in the plasma membrane of proximal tubules may account for elevation of blood pressure. The repercussion of the observed cardiac alterations is not yet clear, but they open perspectives for new studies.

Introduction

Chronic high dose α -tocopherol supplementation increases blood pressure in stroke prone hypertensive rats (Miyamoto *et al.*, 2009) and also in type 2 diabetic patients (Ward *et al.*, 2007). Furthermore, maternal treatment with high dose α -tocopherol during lactation leads to elevation of blood pressure in the rat offspring at adult life (Vieira-Filho *et al.*, 2014). Some mechanisms have been pointed out as accountable for α -tocopherol-induced hypertension, such as structural changes in the central nervous system (Miyamoto *et al.* 2009) and increment in proximal tubule ouabain-insensitive Na^+ -ATPase activity (Vieira-Filho *et al.*, 2014). However, vitamin E has been used as a maternal nutritional supplement to lower malformation risks (Buhling and Grajecki, 2013), and also as an attempt to prevent preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes (Conde-Agudelo *et al.* 2011). Thus, further investigations are necessary to address its possible side effects.

Angiotensin II (Ang II), acting via the AT_1R , plays a critical role in ureteric bud branching and kidney morphogenesis (Yosypiv *et al.*, 2006; Yosypiv *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2010). Acting via AT_2R , Ang II regulates paired homeobox 2 gene (Zhang *et al.* 2004), and is also needed for ureteric bud branching (Zhang *et al.* 2007). Nevertheless, the ureteric bud formation does not necessarily end with nephron formation, as it is shown when increased oxidative stress leads to increased expression of paired homeobox 2 gene and increased ureteric bud formation, but no increase in the number of nephrons (Zhang *et al.* 2007).

Protein kinase C (PKC) is a key enzyme in signal transduction that mediates several biological processes, including kidney development. Different isoforms of PKC are expressed during kidney development according to fetal and neonatal age (Serlachius *et al.*, 1997). Inhibition of PKC leads to apoptosis and interferes with nephron formation and growth (Serlachius *et al.*, 1997, Araki *et al.*, 2003).

Increased reactive oxygen species (ROS) impair renal (Zhang *et al.* 2007, Vieira-Filho, 2011a, b) and cardiac (Hom *et al.*, 2011) organogenesis, representing at least two possible ways of hypertension development later in life. Even if there is no clear evidence that α -tocopherol overload has pro-oxidative action, some findings indicate that its overload does not cause

beneficial effects and can even cause harmful effects (Frenoux *et al.* 2002; Ikemoto *et al.*, 2002; Ward *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2009). Besides the anti-oxidant action, α -tocopherol also has genic effects. For instance, it reduces PKC activity (Stäuble *et al.*, 1992, Betti *et al.*, 2011; Rimbach *et al.*, 2002). Ordinary standard diets for rats warrant an average of 10 mg/100 g of BW per day of vitamin E. α -Tocopherol maternal supplementation with 35 mg/100 g of BW, daily during lactation, leads to elevation of blood pressure in the rat offspring at adult life (Vieira-Filho *et al.*, 2014). α -Tocopherol placental transfer to fetuses is limited in some animal species, including humans and rats (Debier and Larondelle, 2005; Debier, 2007). Thus, 50 mg/100 g per day was employed in the present study to warrant α -tocopherol overload. Differently from α -tocopherol, the tempol, a nitrooxide mimetic of superoxide dismutase, has limited effects on the oxy-redox chain, showing pro-oxidative effects at high levels (Offer *et al.*, 2000; Głębska *et al.*, 2003).

This study investigated the effects of α -tocopherol overload during the prenatal period on components of the renin angiotensin system (RAS) and compared it to tempol. Ang II receptors and their downstream, such as PKC and ATPase-dependent transporters of Na^+ , were studied in neonate and adult kidneys, as well as in the adult hearts, to understand the mechanisms that underlie α -tocopherol-induced hypertension.

Methods

Materials

DL-all-rac- α -tocopherol (TOC), 4-Hydroxy-TEMPO (tempol, T), furosemide, N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate (lucigenin), β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (β -NADPH), 2-thiobarbituric acid (TBA), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, trizma, bovine serum albumin, ouabain, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), protease inhibitor cocktail, trypsin inhibitor (type II-S), HEPES, EDTA, monoclonal anti-NOX-2 antibody, monoclonal anti- Na^+ - K^+ -ATPase (α subunit) antibody, monoclonal anti- β -actin and 3-3'-Diaminobenzidine tetra-hydrochloride hydrate (DAB) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pentobarbital was obtained from Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, SP,

Brazil). Rabbit polyclonal antibodies for angiotensin II receptors type I (AT₁R, sc-1173) and type II (AT₂R, sc-9040), p47-phox (sc-14015), protein kinase A (PKA, sc-903), protein kinase C (PKC) isoforms α (sc-208), ϵ (sc-214), ζ (sc-1091) and λ (sc-1091) GAPDH (sc-25778) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Polyclonal antibody for β_1 -adrenoreceptor (ab-64996) was obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA). The polyclonal rabbit anti-Ang II was purchased from Peninsula Laboratories (San Carlos, CA). Biotinylated antibody anti-rabbit IgG and avidin-biotin-peroxidase (Vectastain kit ABC) were obtained from Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, USA). Peroxidase labeled anti-mouse antibody (NIF825) and Peroxidase labeled anti-rabbit (NIF824) were purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Luminata™ HRP reagent for chemiluminescence detection was purchased from Millipore Corporation (Billerica, MA, USA). Radioactive orthophosphate (³²Pi) was obtained from the Brazilian Institute of Energy and Nuclear Research. [γ -³²P] ATP was prepared according Maia *et al.* (1983).

Procedures with animals

All procedures using animals were carried out in accordance with the Brazilian Society of Laboratory Animal Sciences (SBCAL) and underwent ethical review by the Committee for Experimental and Animal Ethics at the Federal University of Pernambuco.

Female Wistar rats, weighting 200 – 250 g, maintained in a 12h cycle light/dark and at 23°C, were mated. The presence of spermatozooids in the vaginal smear indicated the first pregnancy day. Treatment with corn oil, α -tocopherol vehicle (V, 2 ml/kg/day, by gavage), α -tocopherol (TOC 0.5 g/kg/day, by gavage), tempol (T, 0.03 g/kg/day, dissolved in drinking water) or with both TOC + T, was proceeded throughout the pregnancy. The number of dams treated in each groups was: V (14), TOC (14), T (11) and TOC+T (10). The number of pups used in each experiment is stated in the figure captions. On the parturition day, part of the dams was selected for the studies of neonate offspring, while another part was selected for the studies of adult offspring. Only male offspring were studied and independently of age, two male pups from

each dam were employed for evaluation of each parameter. Within 24 hrs after birth, both kidneys from neonates were harvested. Mothers of neonates were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg), intraperitoneally administered, to harvest the liver for evaluation of oxidative stress markers. Litters maintained until adult age were limited to eight pups at the day of birth.

Rats maintained to be studied at adult life had systolic blood pressure (SBP), evaluated at ages of 30, 60 and 90 days by tail-cuff plethysmography (IITC Life Science B60-7/16", Life Science Instruments, Woodland Hills, CA). When the animals were acclimated to appropriate conditions of blood pressure measurement, five measurements were performed to get an average. At age of 90 days, blood samples were withdrawn from the tail, after they were submitted to 24h-urine collection in a metabolic cage (Tecniplast Gazzada Sarl, Buguggiate, Italy). Afterward, animals were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg), intraperitoneally administered, to harvest the liver, kidneys and the heart. Creatinine was measured by using a commercial kit in serum and urine to calculate the clearance, while urinary sodium was measured by using an electrolyte analyzer (AVL 9180, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Creatinine clearance was calculated as the ratio between urinary excreted creatinine and plasma creatinine concentration.

Ang II immunohistochemistry and nephrogenic area in neonatal kidney

Kidneys from 1-day old pups were fixed in Methacarn (methanol:chloroform:glacial acetic acid, 6:3:1) for 24 h. 6 μm slices were routinely prepared for histological evaluation. After rehydration, slides were incubated for 30 min with 2% goat serum, prepared in phosphate buffer saline to prevent nonspecific bindings. The antibody anti-Ang II (1:200) was incubated overnight, at 4°C. After the slides were exposed to the secondary antibody (1:400), the reaction was detected with avidin-biotin-peroxidase and visualized using DAB. The slices were counter-stained with 0.5% methyl green and then dehydrated to mount the cover slip. The number of positive cells to Ang II was counted in 30 glomeruli and in 30 grid fields measuring 20,000 μm^2 .

The nephrogenic zone was measured by computerized morphometry (AxioVision version 4.8.1.0) and indexed by cortical area. The nephrogenic

zone was identified as the subcapsular zone containing nephrogenic mesenchyme and immature forms of renal developmental stages, which includes cell condensates, renal vesicles, and comma shaped and S shaped nephrons.

Homogenate and plasma membrane preparation

Tissues were homogenized into ice bath by using a tissue grinder, coupled to a rotor IKA RW20, at 1,200 rpm for 2 min. Immediately after harvesting, adult kidneys had the *cortex corticis* (the outer cortex) removed, over ice pad, to obtain purified plasma membranes (Vieyra *et al.*, 1986, Vieira-Filho *et al.*, 2009). The *cortex corticis*, whole kidneys from neonate rats and the left ventricles from adult rats were homogenized in a solution containing 250 mM sucrose, 10 mM HEPES-Tris (pH 7.4), 2 mM EDTA, 0.15 mg/l trypsin inhibitor (type IIS) and 1 mM PMSF, in a proportion of 1g tissue to 4 ml solution. Whole kidneys and left ventricle homogenates were used for Western blotting investigations, while the *cortex corticis*, after separation of plasma membranes, was used for Western blotting investigations as well as for investigation of ATPase activities.

Whole kidneys and left ventricles from both neonate and adult rats were also quickly frozen into nitrogen and stored in -80°C until evaluation of anion superoxide. Before the assays, the tissues were thawed into ice bath and homogenized into RIPA buffer with addition of protease inhibitor cocktail, in a proportion of 7 ml solution to 1g tissue. Protein concentration in homogenate and purified plasma membrane was measured by using the Folin phenol reagent method (Lowry *et al.* 1951).

Expression of Ang II receptors, PKC isoforms, PKA, NADPH oxidase subunits, α subunit of Na⁺-K⁺-ATPase and β_1 -adrenoreceptor

Protein aliquots of 80 μ g, from plasma membranes of adult kidneys or from tissue homogenate obtained from neonate kidneys and adult left ventricles were used. The separation was proceeded by electrophoresis in 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Non-specific binding was prevented by incubating the membranes in 5% skim milk. The membranes were

immunoblotted with antibodies to AT₁R (1:500), AT₂R (1:500), PKC (α , ϵ , ζ and λ , 1:500), NOX-2 (1:1000), p47-phox (1:200), α subunit of Na⁺-K⁺-ATPase (1:1000) and β_1 -adrenoreceptor (1:500). Only cardiac proteins were probed with antibody to β_1 -adrenoreceptor, as well as with anti-GADPH as referential. One stripper was proceeded after the primary antibody revelation to a sequential immunoblotting with antibody to β -actin (1:1000 dilution) or to GADPH (1:1000 dilution). After membranes were exposed to the corresponding secondary antibodies, the blots were visualized in pictures obtained by chemiluminescence imaging system (ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) after incubation with an enhanced chemiluminescence kit (Luminata™ HRP).

Activity of Na⁺-K⁺-ATPase and ouabain-insensitive Na⁺-ATPase in purified membranes of proximal tubules

ATPase activities were assessed by the levels of inorganic phosphate (P_i) produced in ATP hydrolysis (Grubmeyer and Penefsky, 1981), as detailed previously (Vieira-Filho et al., 2009). In short, to assess Na⁺-K⁺-ATPase aliquots of 0.05 mg protein per ml were incubated with 5 mM ATP and 24 mM KCl for 10 min, in the presence and absence of 2 mM ouabain. The reaction with ATP was stopped with 0.1 M HCl-activated charcoal. The P_i was spectrophotometrically measured at 620 nm.

Na⁺-ATPase activity was measured in a reaction containing 0.2 mg protein per ml and 5 mM [γ -³²P] ATP (specific activity of 1.7×10^6 cpm.nmol ATP⁻¹) in the presence and absence of 2 mM furosemide, always in the presence of 1mM ouabain. The reaction was performed for 10 min and stopped with 0.1 M HCl-activated charcoal. A liquid scintillation counter was used to measure the liberated ³²P_i.

Superoxide anion, malondialdehyde and reduced glutathione assessment

Superoxide anion (O₂⁻) was assessed by the lucigenin enhanced chemiluminescence. Tissue homogenates were centrifuged at 12,000 g (Micro High Refrigerated Centrifuge VS-15000 CFNII, Vision Scientific, Daejeon, South Korea), 4°C, for 12 min. The supernatant was added to the phosphate buffer

saline, pH of 7.4, in a proportion of 0.1 ml to 1 ml. The chemiluminescence was measured in a luminometer (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finland) each 30 s for 5 min, at 37°C, before and after adding 10µM lucigenin and 100µM NADPH. The assays were performed in triplicates.

The levels of malondialdehyde (MDA) were measured according to a previous report (Ohkawa *et al.*, 1979) with some modifications. For the standard curve, 1,1,3,3-tetraethoxy-propane was used. Levels of reduced glutathione (GSH) were assessed as non-protein sulfhydryl groups (Sedlak *et al.*, 1968). L-cysteine was used for the standard curve. The assays were performed in duplicate. O₂⁻, MDA and GSH results were corrected for protein concentration.

Collagen measurement in adult renal tissue

Kidneys were fixed in Methacarn and after the routine preparation for histological evaluation, 6 µm slices were stained with hematoxylin for 8 min, followed by Picro Sirius red counter-stain for 1h. Afterwards, the slides were washed in acidified water, 2 times, for 2 min. Sequentially, the slides were vigorously stirred to remove water excess and submitted to dehydration and diafanization. Images were obtained using a trinocular microscope (Nikon, Eclipse Ni-U, Shanghai, China) coupled to a Nikon camera (DS-i1C). Images were obtained from thirty cortical fields measuring 70,700 µm². Collagen was identified by an unaware researcher and counted using the Image Pro Plus 4.5.1 software (Media Cybernetics, Bethesda, MD).

Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM. The Kolmogorov-Smirnov test was employed to evaluate sample normality. One-way ANOVA followed by Dunnett's test was used to analyze Western blotting results and one-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keulswas was employed for the remaining experiments.

Results

SRA components and Ang II downstream in the developing kidney

The TOC group presented elevated levels of both AT₁R ($P < 0.5$) and AT₂R ($P < 0.01$) (Figure 1A), but the increment in AT₂R was higher than that in AT₁R, as shown by the ratio AT₂R/AT₁R (Figure 1B). The TOC+T group also showed elevated AT₁R ($P < 0.05$) and AT₂R ($P < 0.01$), and again the AT₂R/AT₁R ratio was higher ($P < 0.01$) in this group than that in the V group. On the other hand, the V+T group presented elevation only in AT₁R.

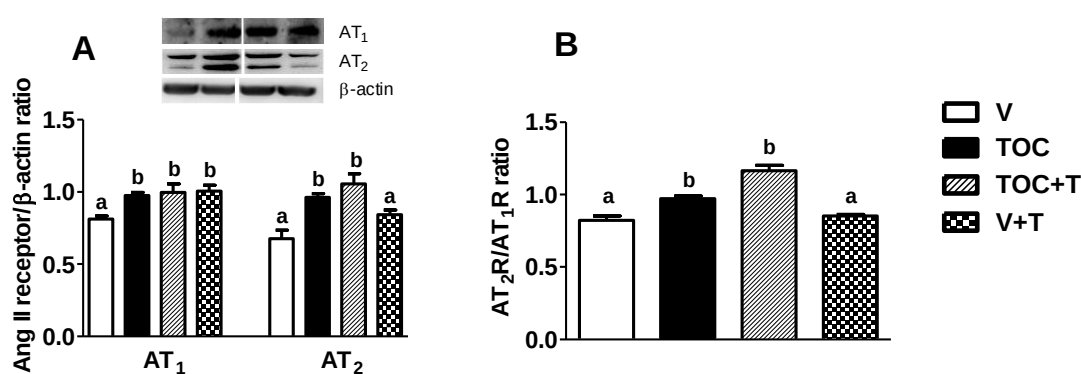


Figure 1

AT₁R and AT₂R levels in kidneys of 1-day-old rats in response to prenatal treatment with α -tocopherol (TOC) or tempol (T) in (A), and the AT₂R/AT₁R increment ratio in (B). The inset in pannel A shows representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. V, TOC, TOC+T and V+T are 1-day-old male rats, offspring of dams treated, respectively, with vehicle (V, corn oil, 2 ml.kg⁻¹), α -tocopherol (0.5 g.kg⁻¹), α -tocopherol and tempol (0.03 g.kg⁻¹) simultaneously, and vehicle + tempol simultaneously. The number of assays (5 to 6) corresponds to the number of mothers. From each mother, the kidneys from 3 to 5 male pups were harvested. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

Positive cells to Ang II, accessed by immunohistochemistry in the developing kidney, were unaltered in the tubulointerstitial area in the three groups (Figure 2A), while it was reduced in the glomeruli in the three groups (Figure 2B, $P < 0.01$). Furthermore, the nephrogenic area (developing nephrons) was increased in the three groups (Figure 2C, $P < 0.01$) and kidney weight diminished in the three groups (Figure 2D).

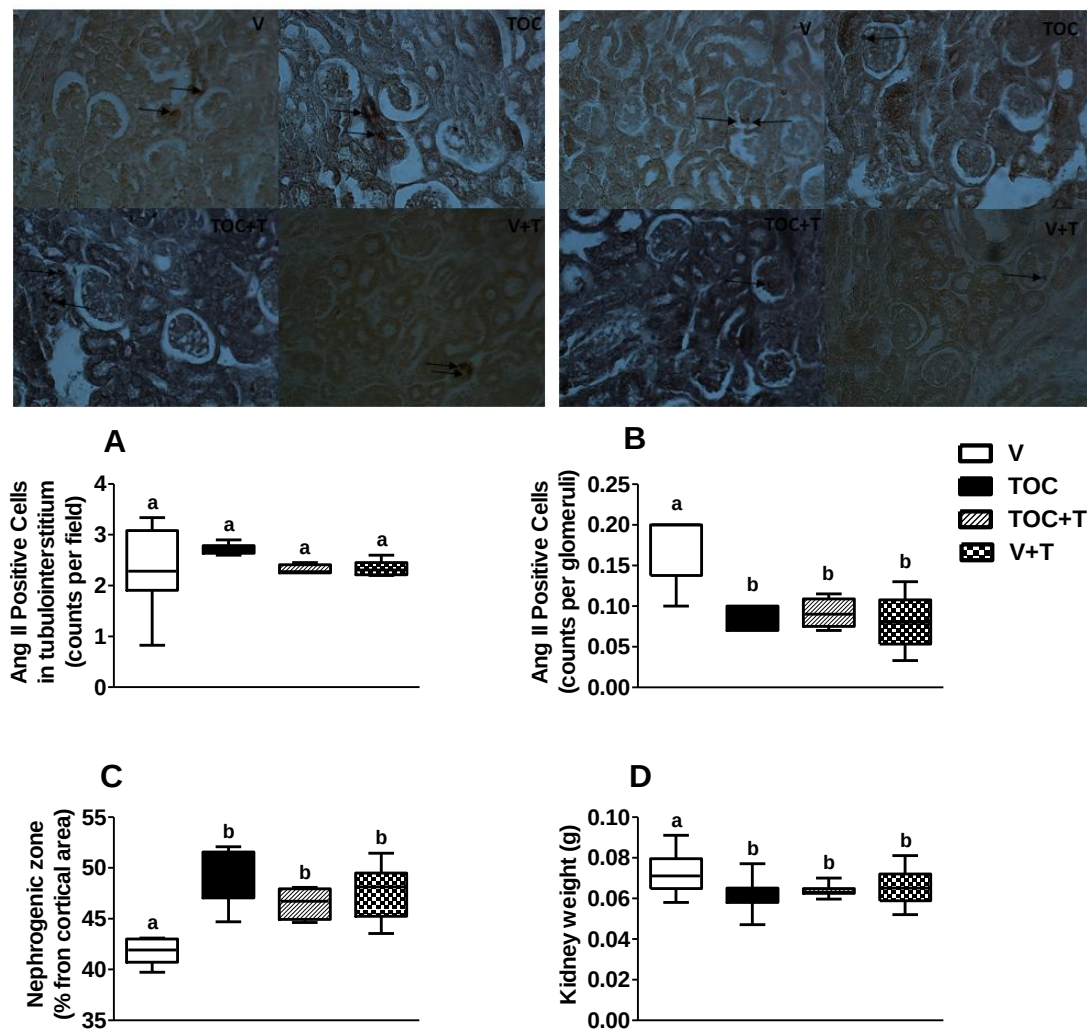


Figure 2

Markers of kidney development: number of positive cells to Ang II in tubulointerstitial area (A) and in glomeruli (B), the nephrogenic zone (C) and the kidney weight (D) in kidneys of 1-day-old pups in response to α -tocopherol (TOC) or tempol (T), prenatally administered. The insets above panels are representative immunolocalization of Ang II. See group descriptions in Figure 1. Positive cells to Ang II were investigated by immunohistochemistry in kidneys from 5 to 6 rats. Nephrogenic zone comprises the subcapsular zone containing immature forms of renal developmental stages, such as cell condensates, renal vesicles, and comma shaped and S shaped nephrons, measured in kidneys from 5 to 6 rats. Kidney weights were obtained from 10 to 14 rats. Pups were obtained from 5 to 7 mothers (2 rats/ mother). Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls).

As depicted in Figure 3A, O_2^- increased in the developing kidneys of groups TOC ($P < 0.05$), TOC+T ($P < 0.05$) and V+T ($P < 0.01$). However, mature NOX-2, the 91 kDa form, was not detected in the neonate kidney, and the immature form, the 65 kDa form, increased only in the TOC+T group (Figure 3B, $P < 0.001$), while the p47-phox subunit did not change with any treatment.

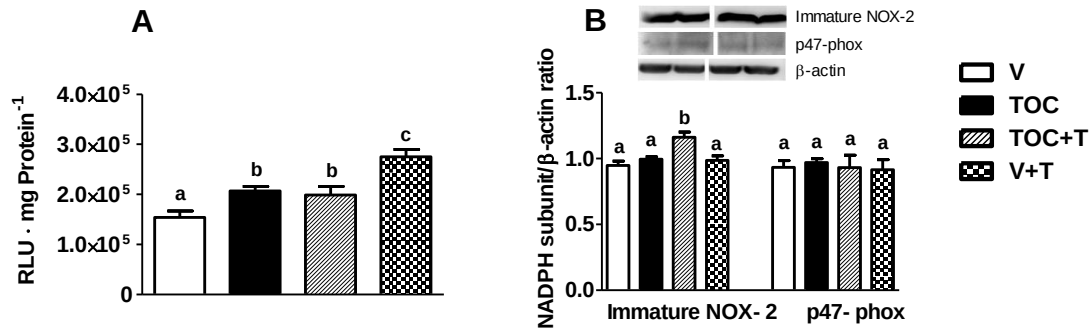


Figure 3

Superoxide anion in kidneys of 1-day-old rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T) in (A), and expression of immature NOX-2 and p47-phox in (B). The inset in pannel B shows representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. See group descriptions in Figure 1. The number of assays (5 to 6) corresponds to the number of mothers. From each mother, the kidneys from 3 to 5 male pups were harvested. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Student-Newman Keuls in panel A, Dunnett's multiple comparison test in panel B).

The developing kidneys from the TOC group showed increased levels of PKC α ($P < 0.05$), PKC ϵ ($P < 0.01$), PKC ζ ($P < 0.05$) and PKC λ ($P < 0.001$, Figure 4). In the TOC + T group, PKC α ($P < 0.01$) and PKC λ ($P < 0.001$) increased. In the V+T group, only PKC α increased ($P < 0.01$).

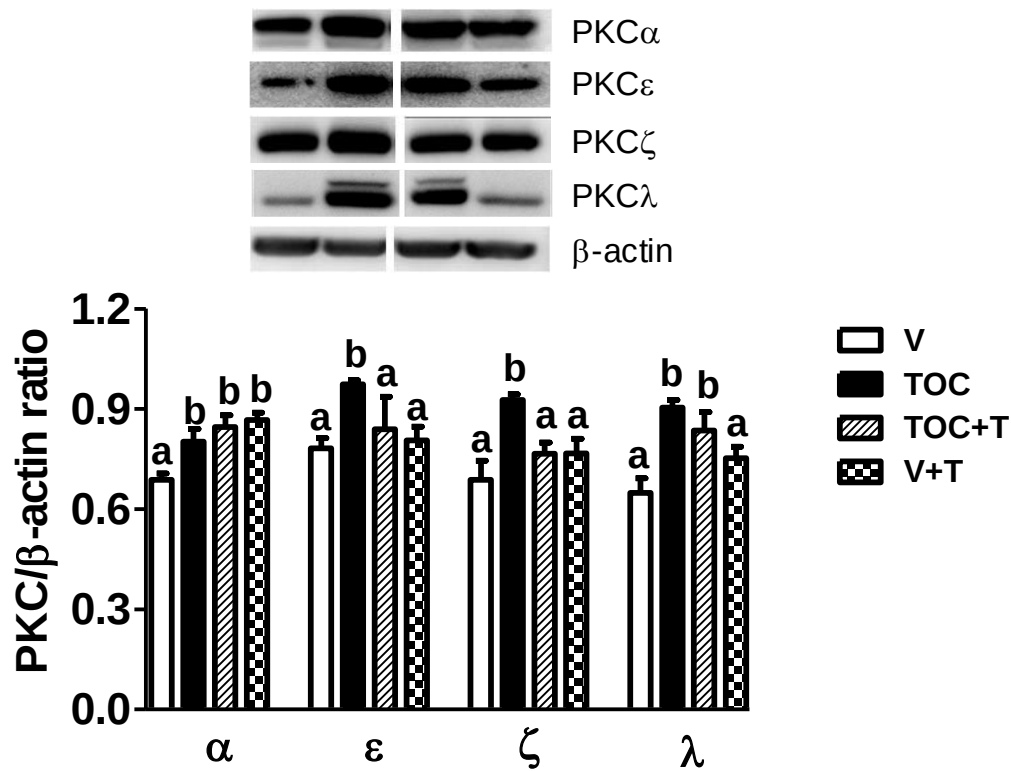


Figure 4

Different PKC isoforms in kidneys of 1-day-old rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). The inset shows representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. See group descriptions in Figure 1. The number of assays (5 to 6) corresponds to the number of mothers. From each mother, the kidneys from 3 to 5 male pups were harvested. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

The α subunit of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ was reduced in the TOC group ($P < 0.001$) and also in the V+T group ($P < 0.01$), but it was unaltered in the TOC+T group (Figure 5A). On the other hand, the expression of PKA was unaltered in the three groups (Figure 5B).

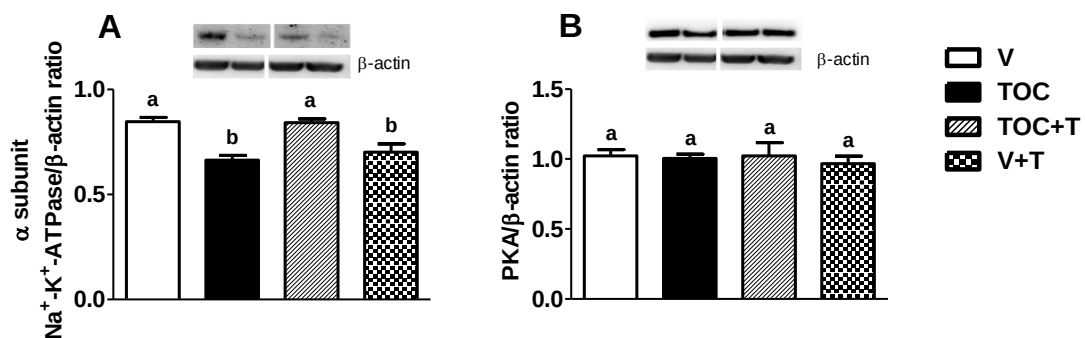


Figure 5

Expression of α subunit/ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in kidneys from 1-day-old rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T) in (A), and PKA expression in (B). The insets in panels A e B show representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. See group descriptions in Figure 1. The number of assays (5 to 6) corresponds to the number of mothers. From each mother, the kidneys from 3 to 5 male pups were harvested. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

SRA components, Ang II downstream and ATPases in plasma membrane of proximal tubules in adult rats

Purified plasma membrane of proximal tubules from the adult TOC group showed increased levels of AT_1R ($P < 0.01$) and also of AT_2R ($P < 0.001$, Figure 6A), but the $\text{AT}_2\text{R}/\text{AT}_1\text{R}$ ratio was higher ($P < 0.05$, Figure 6B) in the TOC group than in the V group. On the other hand, the TOC+T and V+T groups exhibited reduction in AT_1R ($P < 0.05$) and no change in the levels of AT_2R , thus the $\text{AT}_2\text{R}/\text{AT}_1\text{R}$ ratio was also higher ($P < 0.05$) in these groups.

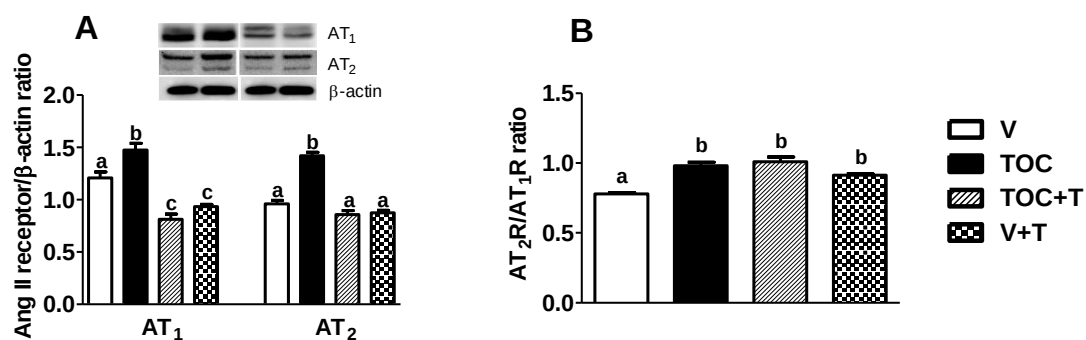


Figure 6

Ang II receptors in plasma membrane of proximal tubules at adult life in rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T) in (A), and the AT₂R/AT₁R increment ratio in (B). The inset in panel A shows representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. Groups V, TOC, TOC+T and V+T are adult male rats that were born from mothers respectively treated with vehicle (V, corn oil, 2 ml.kg⁻¹), α -tocopherol (0.5 g.kg⁻¹), α -tocopherol plus tempol (0.03 g.kg⁻¹) simultaneously, and vehicle plus tempol simultaneously. The number of assays (5 to 6) corresponds to the number of mothers, from which 3 to 5 male rats were obtained to isolate plasma membrane from *cortex corticis*. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

Aside from being subcellular signaling of other hormones, PKCs are subcellular signaling of Ang II through the AT₁R. Figure 7 depicts the levels of PKC in plasma membrane of proximal tubules from adult rats. The levels of PKC α were not changed by any treatment, while the levels of PKC ϵ , PKC ζ and PKC λ increased ($P < 0.01$) only in the TOC group.

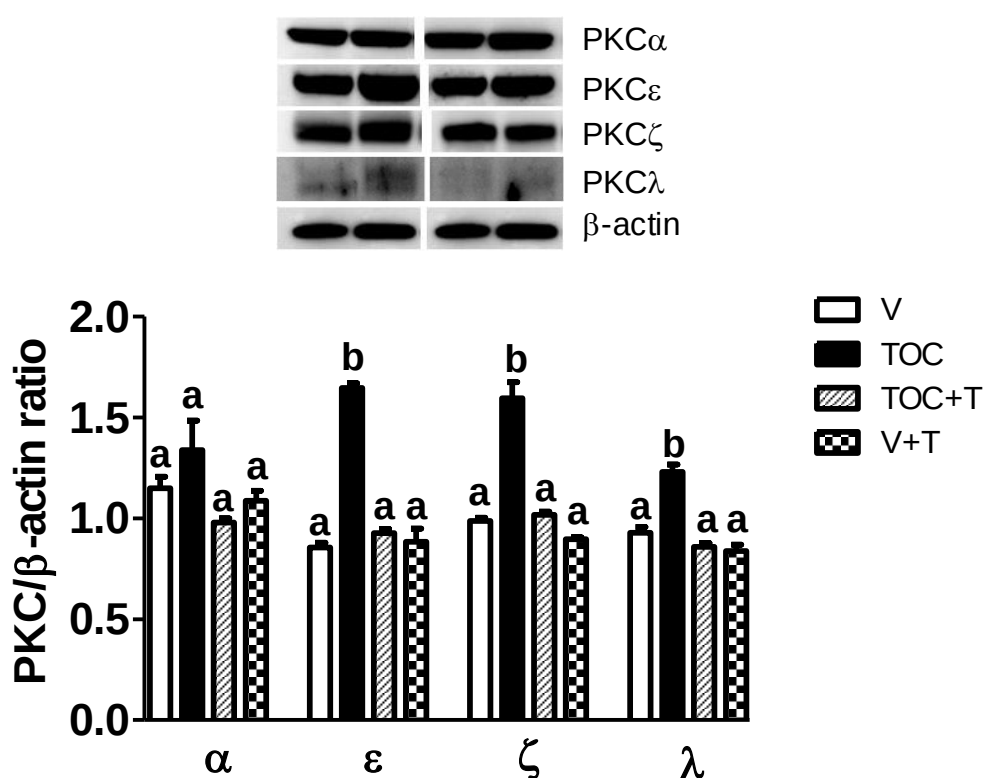


Figure 7

Some PKC isoforms in plasma membrane of proximal tubules at adult life in rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). The inset shows representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. See group descriptions in Figure 5. The number of assays in each group (5 to 6) corresponds to the number of mothers, from which 3 to 5 male rats were obtained to isolate plasma membrane from *cortex corticis*. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

The levels of MDA, one indicator of oxidative stress, decreased ($P < 0.05$) in the kidney of the TOC group, but not in the TOC+T or V+T groups, nor in the liver from any of the groups (Supplementary material, Figure 1A). The levels of GSH, an anti-oxidant indicator, increased ($P < 0.01$) in the kidney and liver from the V+T group (Supplementary material, Figure 1B). The groups treated with tempol, TOC+T and V+T, presented lowered levels of mature NOX-2 in the plasma membrane of proximal tubules (Supplementary material, Figure 1C).

The expression of PKA increased ($P < 0.001$) in plasma membrane from proximal tubules of the TOC group (Figure 8A). Likewise, the expression of the α subunit from $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ also increased ($P < 0.01$, Figure 8B).

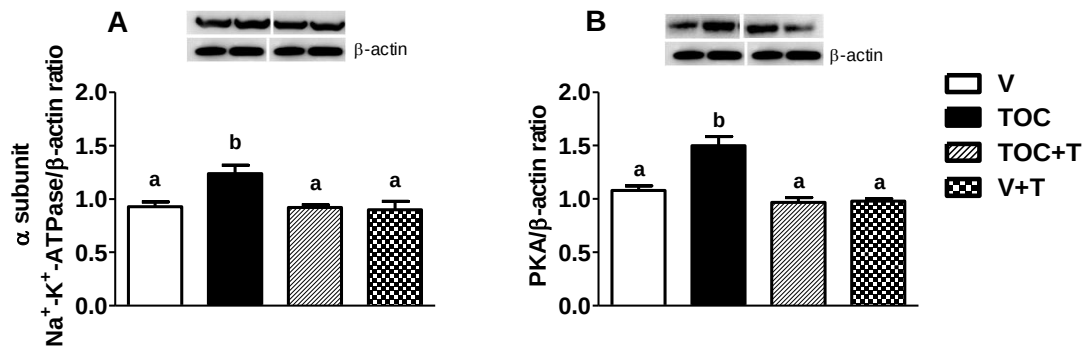


Figure 8

Expression of α subunit/Na⁺-K⁺-ATPase in (A) and PKA in (B), in plasma membrane of proximal tubules from adult rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). The insets in panels A and B show representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. See group descriptions in Figure 5. The number of assays in each group (5 to 6) corresponds to the number of mothers, from which 3 to 5 male rats were obtained to isolate plasma membrane from *cortex corticis*. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

The activity of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase, one of the effectors of PKA, was increased in groups TOC ($P < 0.05$) and TOC+T ($P < 0.001$, Figure 9A). The activity of ouabain-sensitive Na⁺-K⁺-ATPase was increased in groups TOC ($P < 0.01$) and V+T ($P < 0.01$, Figure 9B).

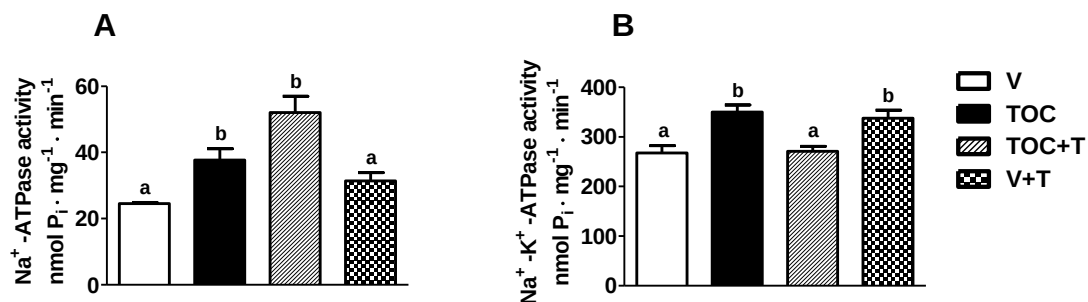


Figure 9

Activities of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase (A) and ouabain-sensitive Na⁺-K⁺-ATPase in the proximal tubules of adult rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). See group descriptions in Figure 5. The number of assays in each group (5 to 6) corresponds to the number of mothers, from which 3 to 5

male rats were obtained to isolate plasma membrane from *cortex corticis*. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls for multiple comparisons).

SBP, creatinine clearance, collagen in the renal cortical area and sodium excretion

Systolic blood pressure (SBP) was higher ($P < 0.001$) in the TOC group at age of 30, 60 and 90 days than in the other groups. In the TOC+C and V+T groups an increment ($P < 0.05$) in SBP was observed at age of 90 days, albeit SBP was lower ($P < 0.01$) than in the TOC group (Figure 10).

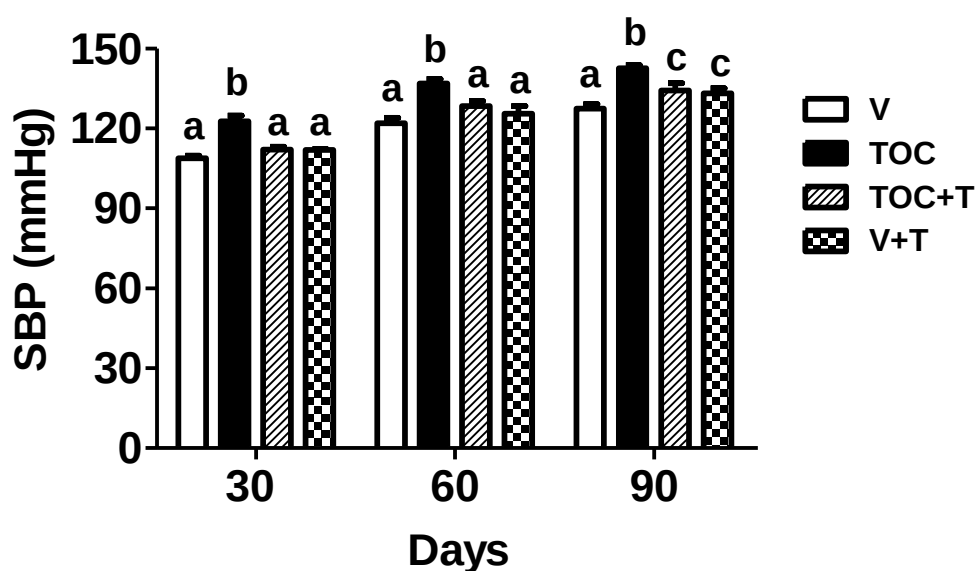


Figure 10

Systolic blood pressure (SBP), assessed by tail-cuff plethysmography, in rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T), from age of 30 to 90 days. The groups V, TOC, TOC+T and V+T are adult male rats that were born from mothers respectively treated with vehicle (V, corn oil, 2 ml.kg⁻¹), α -tocopherol (0.5 g.kg⁻¹), α -tocopherol plus tempol (0.03 g.kg⁻¹) simultaneously, and vehicle plus tempol simultaneously. Rats in each group (6 to 10) were obtained from three to five mothers (2 rats per mother). Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls).

Glomerular filtration rate (GFR), measured as creatinine clearance was not altered at age of 90 days (Supplementary material, Figure 2A). On the other hand, the level of collagen in the cortical renal area, a factor that can reduce GFR when increased, was reduced in the TOC ($P < 0.001$, Supplementary material, Figure 2B), TOC+T ($P < 0.01$) and V+T groups ($P < 0.05$). Other

functional parameters, namely the urinary sodium excretion (U_{Na^+} , Supplementary material, Figure 3A) and urinary flow (UF, Supplementary material, Figure 3B) were respectively reduced ($P < 0.05$) and increased ($P < 0.01$) in the TOC group and unchanged in the remaining groups.

SRA components, Ang II downstream and β_1 -adrenoreceptor in the left ventricle of adult rats

Only tempol, but not α -tocopherol induced changes in Ang II receptors and β_1 -adrenoreceptor in the left ventricle. The expression of AT_1R was diminished ($P < 0.01$) in V+T group, while the expression of AT_2R was diminished ($P < 0.05$) in the TOC+T group (Supplementary material, Figure 4A). The expression of β_1 -adrenoreceptor was decreased in groups TOC+T ($P < 0.01$) and V+T ($P < 0.01$, Supplementary material, Figure 4B).

Regarding Ang II downstream, the expression of $PKC\alpha$ was decreased ($P < 0.5$) in the left ventricle from the V+T group, while the $PKC\epsilon$ was increased ($P < 0.05$) in the the TOC+T group. The remaining PKCs were unchanged by tempol and α -tocopherol treatments (Supplementary material, Figure 5). The levels of O_2^- were also unaltered in the left ventricle of the three groups (Supplementary material, Figure 6A), although the mature NOX-2 decreased ($P < 0.01$) in the TOC group (Supplementary material, Figure 6B). The PKA expression was unchanged by the prenatal treatments with TOC or T (Supplementary material, Figure 7A), while the α subunit of $Na^+-K^+-ATPase$ diminished in groups TOC+T ($P < 0.05$) and V+T ($P < 0.05$, Supplementary material, Figure 7B).

Discussion

Investigations on effects of anti-oxidant overload are necessary, since these agents have been prescribed during the early period of development to improve maternal health and offspring growth. However, there is evidence that α -tocopherol, which has anti-oxidant and genomic effects, leads to elevation of blood pressure, while nothing is known about tempol, which as far as it is known has only an anti-oxidant action. The present study sought to investigate the mechanisms which explain tocopherol-induced hypertension, and to compare

effects with tempol. Therefore, the effects of α -tocopherol and tempol overload, administered during pregnancy, were assessed by studying components of the SRA, markers of oxidative stress, expression of PKC isoforms and expression or activity of Na^+ transporters in: i) whole neonatal kidney; ii) plasma membrane of proximal tubules at adult life; and iii) left ventricle at adult life.

Throughout nephrogenesis, the AT_1R expression predominates in nephrons at advanced stages of development, while the AT_2R expression predominates in undifferentiated mesenchymal cells that are programmed to undergo apoptosis (Kakuchi *et al.*, 1995). The predominant increment in AT_2R produced by α -tocopherol (groups TOC and TOC+T, Figure 1B), together with the indicators of impaired renal development (Figures 2B, 2C, 2D), indicate that nephrogenesis was delayed. Both α -tocopherol and tempol reduced the number of cells positive to Ang II, a marker of poor renal development (Balbi *et al.*, 2004, Vieira-Filho *et al.*, 2011a). Independently, at least $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\epsilon$ (Chen *et al.*, 2014) and $\text{PKC}\zeta$ (Frey *et al.*, 2006) may increase ROS production and the paired homeobox-2, which may accelerate ureteric bud formation, but not nephron formation (Zhang *et al.*, 2007). The expression of mature NOX-2 was not detected in the neonatal kidney. Therefore, the increased O_2^- observed with both agents was not due to NOX-2. The increased levels of $\text{PKC}\alpha$ in the three groups, associated to the increased levels of $\text{PKC}\epsilon$ and $\text{PKC}\zeta$ in the group treated with α -tocopherol (Figure 4) – and furthermore, the increased levels of GSH in the liver from the V+T group - were likely responsible for the increment of O_2^- . It seems paradoxical, but it has been shown that high levels of GSH increase mitochondrial oxidation (Zhang *et al.*, 2012). Delayed renal development is reinforced by the reduced levels of α subunit/ Na^+ - K^+ -ATPase, which might be due to a reduced number of tubules. Summarizing, both α -tocopherol and tempol seem to reduce the number of nephrons, which may explain the development of later hypertension. However, it is important to have in mind that nephrogenesis in rats continues until the second postnatal week (Tufro-McReddie *et al.*, 1995), therefore recovery of the number of nephrons may be considered.

The pathway between Ang II receptors and their signaling to Na^+ transporters in proximal tubules represent part of the mechanisms accountable

for hypertension (Kava *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015; Queiroz-Madeira *et al.*, 2010). α -Tocopherol increased the levels of AT₁R and the expression of PKC ζ , which is known to increase Na⁺/H⁺ exchanger 3 activity in the apical membrane (Karim *et al.*, 1999) and to indirectly enhance Na⁺-K⁺-ATPase activity in the basolateral membrane. Furthermore, α -tocopherol also increased the activity of ouabain-insensitive Na⁺-ATPase, despite having increased the levels of PKA which reduces activity of this Na⁺ transporter (Gomes *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014). Probably, the activity of Na⁺-ATPase increased due to the consistent increment in the expressions of PKCs ζ and λ . On the other hand, the α -tocopherol-induced increment in the expression of PKC ϵ may reduce ROS production by enhancing the haem oxygenase-1 (Myloie *et al.*, 2015), which has uncertain effect on Na⁺-K⁺-ATPase activity (Garvin and Ortiz, 2003; Panico *et al.*, 2009). In line with reduced levels of superoxide anion, α -tocopherol did not change the levels of PKC α , which is known to phosphorylate NADPH oxidase to produce superoxide anion (Thallas-Bonke *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2010). The reduced density of collagen in the cortical area of rats treated with α -tocopherol or tempol is in line with increased density of AT₂R (Sakai *et al.*, 2008, Matavelli and Siragy, 2015)

It was remarkable that tempol programmed changes in the levels of AT₁R and AT₂R in the kidney and that it prevented the action of α -tocopherol on the levels of PKC expression. Furthermore, tempol programmed reduction in the levels of mature NOX-2 in the kidney, though it did not change MDA levels. But, it did cause an increment in the levels of GSH in the adult kidney and liver. α -Tocopherol and tempol seem different in their actions: α -tocopherol increased blood pressure from the age of 30 days, while when associated to tempol, it delayed the elevation of blood pressure to the age of 90 days. α -Tocopherol decreased urinary sodium excretion, while this effect was not seen with tempol. Summarizing, prenatal treatments with α -tocopherol or tempol increased the expression or activity of Na⁺ transporters in proximal tubules of the adult rat kidney, which might explain the elevation of blood pressure; although they also increased AT₂R and reduced collagen density in the kidney which may delay kidney hypertrophy.

Low levels of reactive oxygen species stimulate proliferation of embryonic stem cells and their differentiation into cardiomyocytes, while NADPH oxidase inhibitors abolish cardiomyogenesis (Buggisch *et al.*, 2007). Furthermore, redox-dependent transcriptional factors mediate cardiomyocyte differentiation in pluripotent embryonal carcinoma cells (Murray *et al.*, 2013). On the other hand, in murine embryonic cells, cardiomyocyte differentiation was enhanced by anti-oxidant treatment (Li *et al.*, 2006; Hom *et al.*, 2011). Thus, the role of reactive oxygen species on developing cardiomyocyte is still unclear. Our results showed that prenatal treatment with tempol caused a reduction in the expression of AT₁ and AT₂ receptors, and also in the expression of the β_1 -adrenoreceptors. However, neither heart rate nor cardiac mass were affected (data not shown). The significance of these findings is not yet clear, but they open perspective to future studies.

In conclusion, prenatal overload of α -tocopherol or tempol delayed kidney development, affected Na⁺ transporters at adult life and elevated systolic blood pressure through mechanisms which involve SRA components and Ang II signaling pathways.

References

- Araki T, Hayashi M, Saruta T (2003). Cloning and characterization of a novel gene promoting ureteric bud branching in the metanephros. *Kidney Int* 64: 1968–1977.
- Balbi AP, Costa RS, Coimbra TM. (2004) Postnatal renal development of rats from mothers that received increased sodium intake. *Pediatr Nephrol*.19:1212-1218.
- Betti M, Ambrogini P, Minelli A, Floridi A, Lattanzi D, Ciuffoli S *et al.* (2011). Maternal dietary loads of α -tocopherol depress protein kinase C signaling and synaptic plasticity in rat postnatal developing hippocampus and promote permanent deficits in adult offspring. *J Nutr Biochem* 22: 60–70.

Buggisch M, Ateghang B, Ruhe C, Strobel C, Lange S, Wartenberg M *et al.* (2007). Stimulation of ES-cell-derived cardiomyogenesis and neonatal cardiac cell proliferation by reactive oxygen species and NADPH oxidase. *J Cell Sci* 120: 885–894.

Buhling KJ, Grajecki D (2013). The effect of micronutrient supplements on female fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol* 25: 173–180.

Chen F, Yu Y, Haigh S, Johnson J, Lucas R, Stepp DW *et al.* (2014). Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS One* 9: e88405.

Conde-Agudelo A, Romero R, Kusanovic JP, Hassan SS (2011). Supplementation with vitamins C and E during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes: a systematic review and meta analysis. *Am J Obstet Gynecol* 204: e1–12.

Debier C, Larondelle Y. (2005) Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr* 93:153-74.

Debier C. (2007) Vitamin E during pre- and postnatal periods. *Vitam Horm* 76:357-73.

Frenoux JM, Noirod B, Prost ED, Madani S, Blond JP, Belleville JL *et al.* (2002). Very high alpha-tocopherol diet diminishes oxidative stress and hypercoagulation in hypertensive rats but not in normotensive rats. *Med Sci Monit* 8: BR401–407.

Frey RS, Gao X, Javaid K, Siddiqui SS, Rahman A, Malik AB (2006). Phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling through protein kinase Czeta induces NADPH oxidase-mediated oxidant generation and NF-kappaB activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 281: 16128–16138.

Garvin JL, Ortiz PA. (2003) The role of reactive oxygen species in the regulation of tubular function. *Acta Physiol Scand* 179:225–32.

Głębska J, Skolimowski J, Kudzin Z, Gwoździński K, Grzelak A, Bartosz G. (2003) Pro-oxidative activity of nitroxides in their reactions with glutathione. *Free Radic Biol Med* 35:310–316.

Gomes CP, Leão-Ferreira LR, Pinheiro AA, Gomes-Quintana E, Wengert M, Lopes AG *et al.* (2008). Crosstalk between the signaling pathways triggered by angiotensin II and adenosine in the renal proximal tubules: implications for modulation of Na⁺-ATPase activity. *Peptides* 29: 2033–2038.

Grubmeyer C, Penefsky HS (1981). Cooperatively between catalytic sites in the mechanism of action of beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 256: 3728–3734.

Hom JR, Quintanilla RA, Hoffman DL, de Mesy Bentley KL, Molkentin JD, Sheu SS *et al.* (2011). The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Dev Cell* 21: 469–478.

Hong NJ, Silva GB, Garvin JL (2010). PKC- α mediates flow-stimulated superoxide production in thick ascending limbs. *Am J Physiol Renal Physiol* 298: F885–F891.

Ikemoto M, Okamura Y, Kano M, Hirasaka K, Tanaka R, Yamamoto T *et al.* (2002). A relative high dose of vitamin E does not attenuate unweighting-induced oxidative stress and ubiquitination in rat skeletal muscle. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci* 21: 257–263.

Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BL, Fogo A, Inagami T *et al.* (1995). Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. *Kidney Int* 47: 140–147.

Karim ZG, Chambrey R, Chalumeau C, Defontaine N, Warnock DG, Paillard M *et al.* (1999). Regulation by PKC isoforms of Na⁺/H⁺ exchanger in luminal membrane vesicles isolated from cortical tubules. *Am J Physiol* 277: F773–F778.

Kava L, Rossi NF, Mattingly R, Yingst DR (2012). Increased expression of Na,K-ATPase and a selective increase in phosphorylation at Ser-11 in the cortex of the 2-kidney, 1-clip hypertensive rat. *Am J Hypertens* 25: 487–491.

Li J, Stouffs M, Serrander L, Banfi B, Bettiol E, Charnay Y *et al.* (2006). The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. *Mol Biol Cell* 17: 3978–3988.

Li XC, Shull GE, Miguel-Qin E, Zhuo JL (2015). Role of the Na⁺/H⁺ Exchanger 3 in Angiotensin II-Induced Hypertension. *Physiol Genomics*. doi: 10.1152/physiolgenomics.00056.2015.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.

Maia JCC, Gomes SL & Juliani MH (1983). Preparation of (gamma-³²P)- and (alpha-³²P)-nucleoside triphosphates with high specific activity. In *Genes and Antigens of Parasites, a Laboratory Manual*, 2nd edition. ed Morel, C.M. Editora Fundação Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, pp. 146–167.

Matavelli LC, Siragy HM (2015). AT₂ receptor activities and pathophysiological implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 65: 226–232.

Miyamoto K, Shiozaki M, Shibata M, Koike M, Uchiyama Y, Gotow T (2009). Very-high-dose alpha-tocopherol supplementation increases blood pressure and causes possible adverse central nervous system effects in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Neurosci Res* 87: 556–566.

Murray TV, Smyrnias I, Shah AM, Brewer AC (2013). NADPH oxidase 4 regulates cardiomyocyte differentiation via redox activation of c-Jun protein and the cis-regulation of GATA-4 gene transcription. *J Biol Chem* 288: 15745–15759.

Myloioe H, Dumont O, Bauer A, Thornton CC, Mackey J, Calay D *et al.* (2015). PKC ϵ -CREB-Nrf2 signalling induces HO-1 in the vascular endothelium and enhances resistance to inflammation and apoptosis. *Cardiovasc Res* 106: 509–519.

Offer T, Russo A, Samuni A. (2000) The pro-oxidative activity of SOD and nitroxide SOD mimics. *FASEB J* 14:1215-223.

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351–358.

Panico C, Luo Z, Damiano S, Artigiano F, Gill P, Welch WJ (2009). Renal proximal tubular reabsorption is reduced in adult spontaneously hypertensive rats: roles of superoxide and Na⁺/H⁺ exchanger 3. *Hypertension* 54: 1291–1297.

Queiroz-Madeira EP, Lara LS, Wengert M, Landgraf SS, Líbano-Soares JD, Zapata-Sudo G *et al.* (2010). Na⁺-ATPase in spontaneous hypertensive rats: possible AT(1) receptor target in the development of hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1798: 360–366.

Rimbach G, Minihane AM, Majewicz J, Fischer A, Pallauf J, Virgli F *et al.* (2002). Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc Nutr Soc* 61: 415–425.

Sakai N, Wada T, Matsushima K, Bucala R, Iwai M, Horiuchi M *et al.* (2008). The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. *J Hypertens* 26: 780–790.

Sedlak J, Lindsay RH (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 25: 192–205.

Serlachius E, Svennilson J, Schalling M, Aperia A (1997). Protein kinase C in the developing kidney: isoform expression and effects of ceramide and PKC inhibitors. *Kidney Int* 52: 901–910.

Silva PA, Monnerat-Cahli G, Pereira-Acácio A, Luzardo R, Sampaio LS, Luna-Leite MA *et al.* (2014). Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition. *PLoS One*. 9: e100410.

Song R, Spera M, Garrett C, Yosypiv IV (2010). Angiotensin II-induced activation of c-Ret signaling is critical in ureteric bud branching morphogenesis. *Mech Dev* 127: 21–27.

Stäubli B, Boscoboinik D, Tasinato A, Azzi A (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.

Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC *et al.* (2008). Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C- α -dependent pathway. *Diabetes* 57: 460–469.

Tufro-McReddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA (1995). Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol* 269: F110–F115.

Vieira-Filho LD, Cabral EV, Farias JS, Silva PA, Muzi-Filho H, Vieyra A *et al.* (2014). Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br J Nutr* 24: 1–13.

Vieira-Filho LD, Cabral EV, Santos FT, Coimbra TM, Paixão AD (2011a). Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. *Pediatr Nephrol* 26: 2019–2029.

Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, Luzardo R, Einicker-Lamas M, Cardoso HD *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.

Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, Santos FT, Luzardo R, Oliveira FS *et al.* (2011b). 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.

Vieyra A, Nachbin L, de Dios-Abad E, Goldfeld M, Meyer-Fernandes JR, de Moraes L (1986). Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem* 261: 4247–4255.

Ward NC, Wu JH, Clarke MW, Puddey IB, Burke V, Croft KD *et al.* (2007). The effect of vitamin E on blood pressure in individuals with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Hypertens* 25: 227–234.

Yang J, Lane PH, Pollock JS, Carmines PK (2009). PKC-dependent superoxide production by the renal medullary thick ascending limb from diabetic rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 297: F1220–F1228.

Yosypiv IV, Boh MK, Spera MA, El-Dahr SS (2008). Downregulation of Spry-1, an inhibitor of GDNF/Ret, causes angiotensin II-induced ureteric bud branching. *Kidney Int* 74: 1287–1293.

Yosypiv IV, Schroeder M, El-Dahr SS (2006). Angiotensin II type 1 receptor-EGF receptor cross-talk regulates ureteric bud branching morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 17: 1005–1014.

Zhang H, Limphong P, Pieper J, Liu Q, Rodesch CK, Christians E *et al.* (2012). Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB J* 26: 1442–1451.

Zhang SL, Chen YW, Tran S, Chenier I, Hébert MJ, Ingelfinger JR (2007). Reactive oxygen species in the presence of high glucose alter ureteric bud morphogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18: 2105–2115.

Zhang SL, Moini B, Ingelfinger JR (2004). Angiotensin II increases Pax-2 expression in fetal kidney cells via the AT2 receptor. *J Am Soc Nephrol* 15: 1452–1465.

5 SUPPLEMENTARY MATERIAL

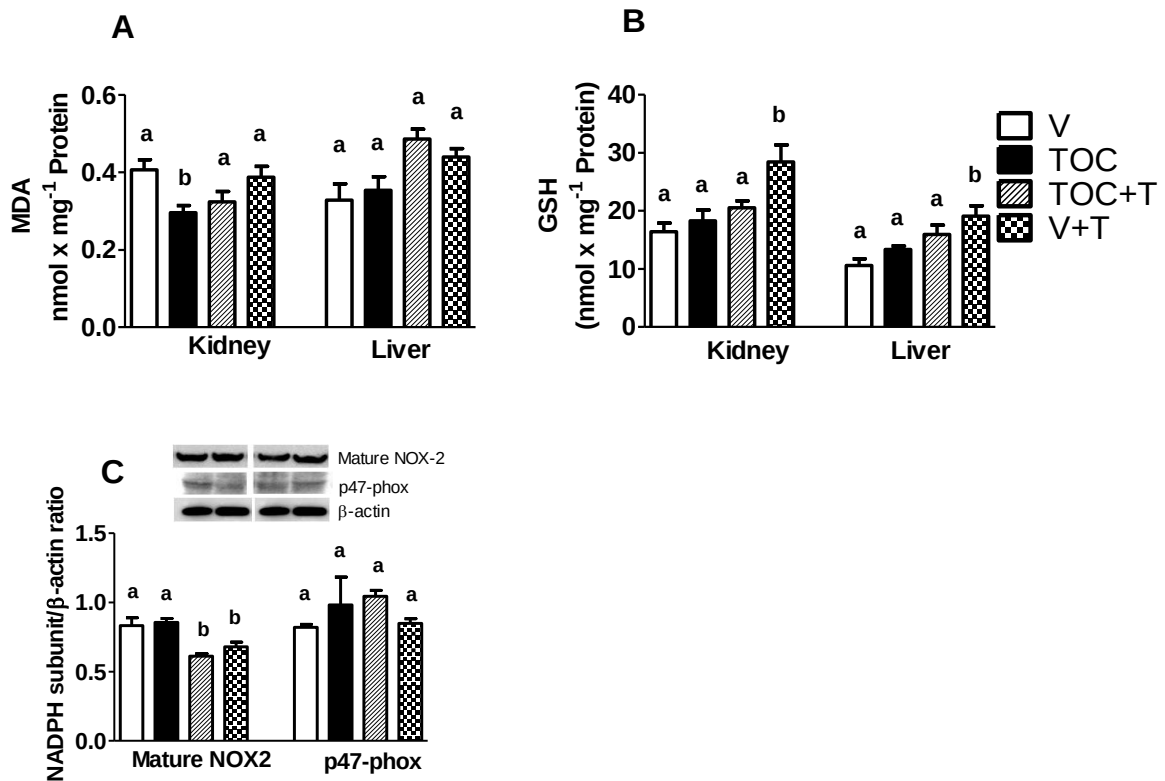


Figure 1

Levels of malondialdehyde (MDA) in (A) and reduced glutathione (GSH) in (B) in kidneys and liver, and mature NOX-2 and p47-phox in kidneys in (C) from adult rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). The inset in panel C shows representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. Groups V, TOC, TOC+T and V+T are adult male rats that were born from mothers respectively treated with vehicle (V, corn oil, 2 ml.kg⁻¹), α -tocopherol (0.5 g.kg⁻¹), α -tocopherol plus tempol (0.03 g.kg⁻¹) simultaneously, and vehicle plus tempol simultaneously. The number of assays in each group, in panels A and B, is 7 to 9, which corresponds to 4 to 8 mothers (1 or 2 rats/mother). The number of assays in panel C is 5 to 6, which corresponds to the number of mothers, from which 3 to 5 male rats were obtained to isolate plasma membrane from *cortex corticis*. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls in A and B and one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test in panel C).

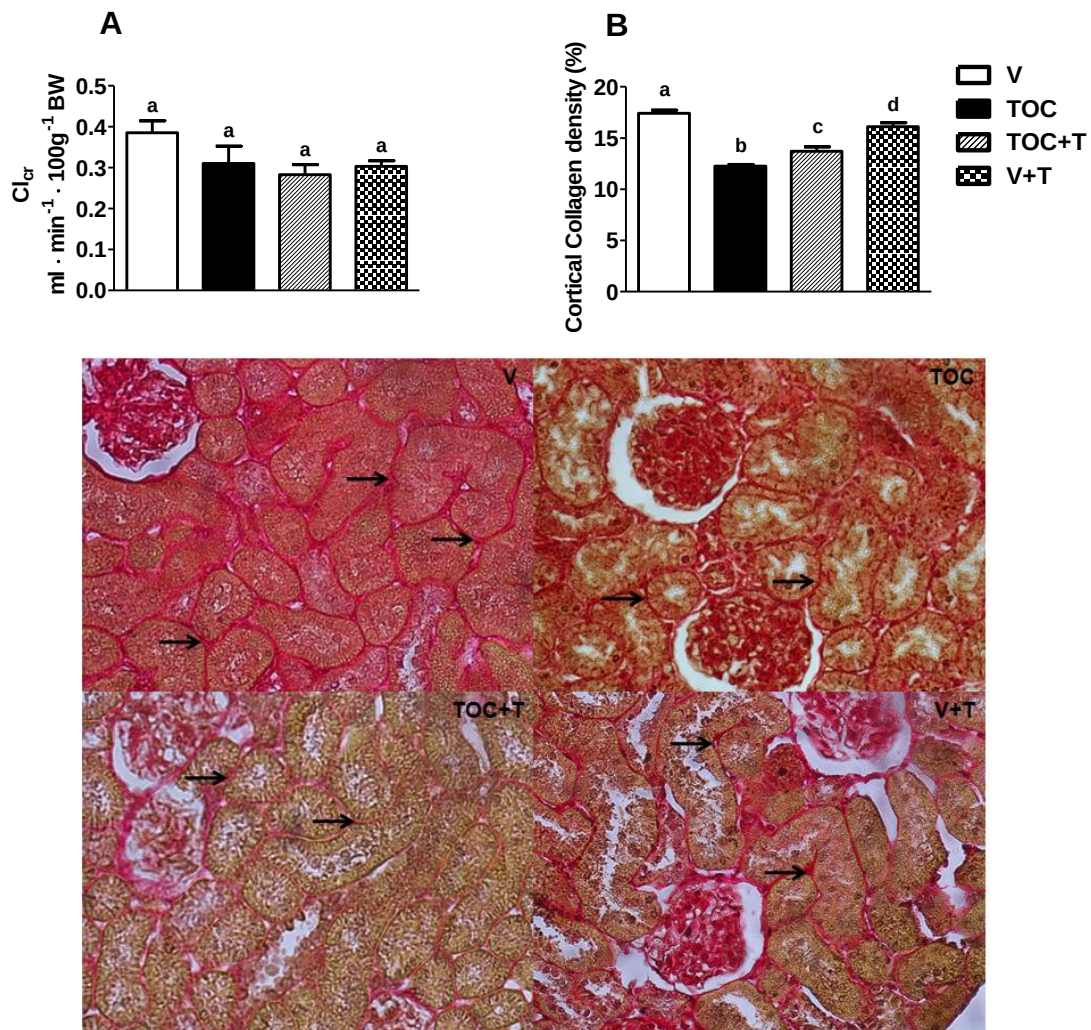


Figure 2 - Creatinine clearance (A) and collagen density in the cortical renal area (B) from rats prenatally treated with tocopherol (TOC) or tempol (T). Below panels A and B is a representative image of collagen detection. See group description in Figure 1. Rats in each group (6 to 10) were obtained from three to five mothers (2 rats per mother). Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls).

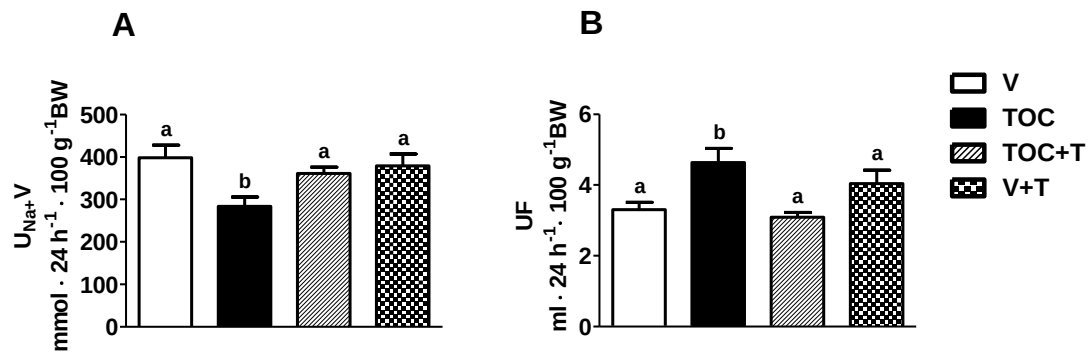


Figure 3 - Urinary sodium excretion (U_{Na^+}) in (A) and urinary flow (UF) in (B) in adult rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). See group descriptions in Figure 1. Rats in each group (6 to 10) were obtained from three to five mothers (2 rats per mother). Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls).

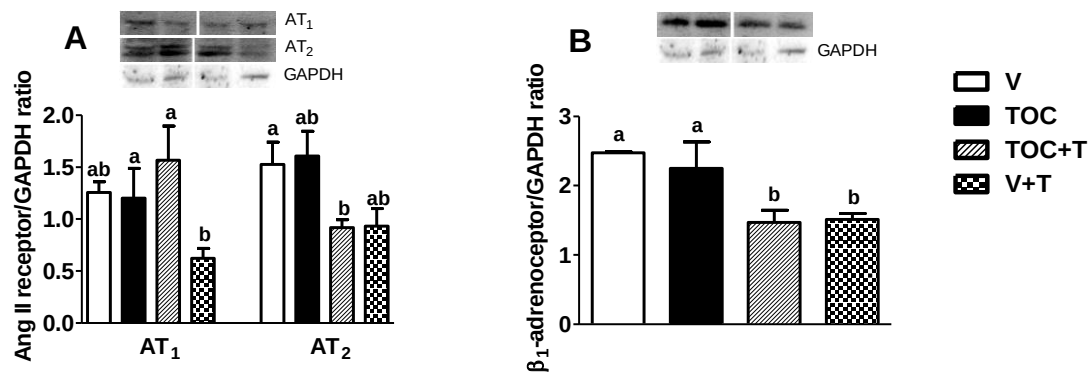


Figure 4 - AT₁R and AT₂R (A) and β₁-adrenoceptor (B) in the left ventricle of rats prenatally treated with α-tocopherol (TOC) or tempol (T). The insets in panels A and B show representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. Groups V, TOC, TOC+T and V+T are adult male rats that were born from mothers respectively treated with vehicle (V, corn oil, 2 ml.kg⁻¹), α-tocopherol (0.5 g.kg⁻¹), α-tocopherol plus tempol (0.03 g.kg⁻¹) simultaneously, and vehicle plus tempol simultaneously. Six assays were performed in each group, which correspond to the number of rats obtained from six different mothers. Results are mean ± EPM. Bars not showing the same letter are different (Two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

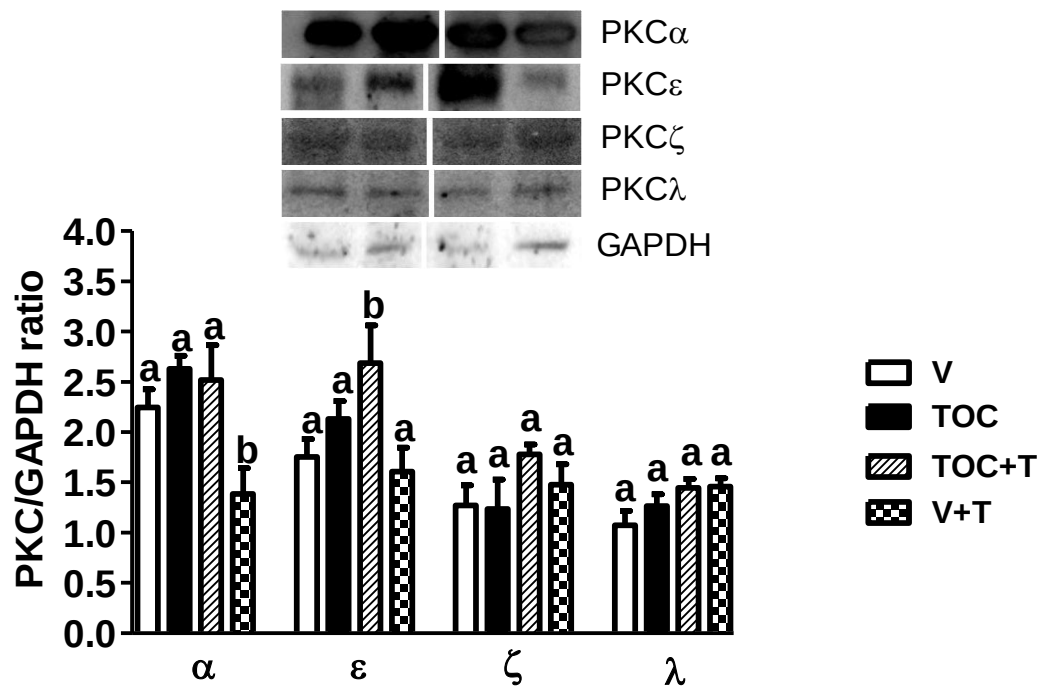


Figure 5 - Some PKC isoforms in the left ventricle of adult rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). The inset shows representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. See group descriptions in Figure 4. Five or six assays were performed in each group which correspond to the number of rats obtained from five or six different mothers. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (One-way ANOVA followed by Bonferroni test).

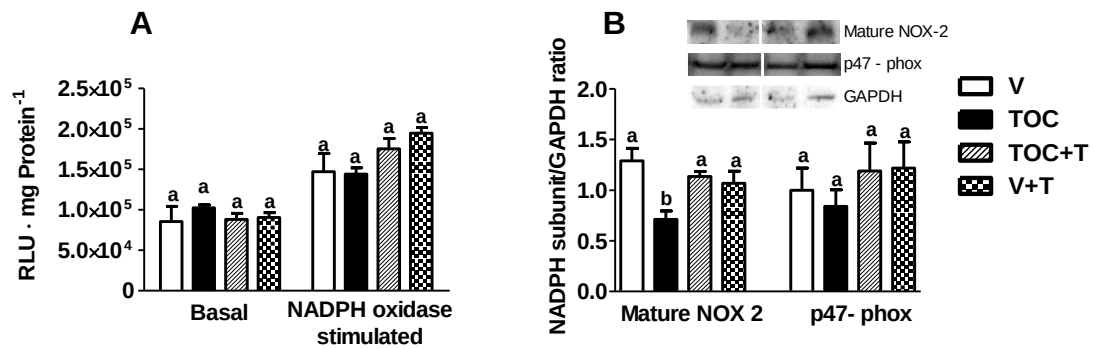


Figure 6 - Superoxide anion production (A), mature NOX-2 and p47-phox expressions (B) in the left ventricle of adult rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). The inset in panel B shows representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. See group descriptions in Figure 4. Five or six assays were performed in each group which correspond to the number of rats obtained from five or six different mothers. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (ANOVA followed by Student-Newman-Keuls in panel A and ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test in panel B).

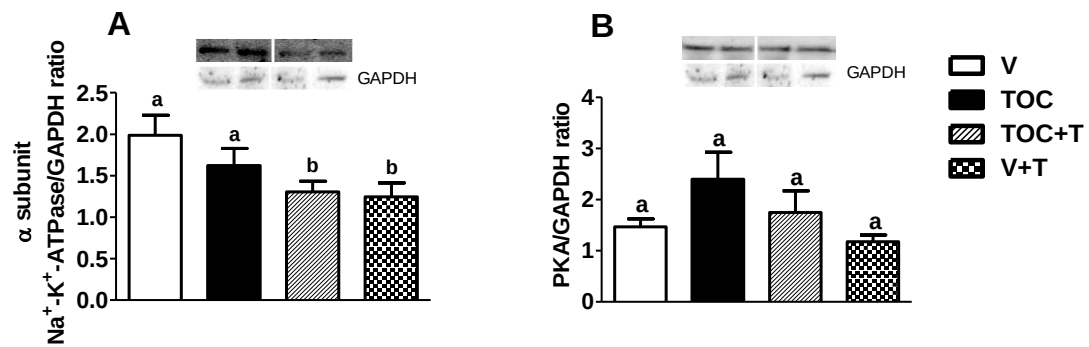


Figure 7 - α Subunit/ $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (A) and PKA (B) expressions in the left ventricle of adult rats prenatally treated with α -tocopherol (TOC) or tempol (T). The insets in panels A and B show representative immunodetection obtained from different parts of the same gel. See group descriptions in Figure 4. Five or six assays were performed in each group which correspond to the number of rats obtained from five or six different mothers. Results are mean $\pm$ EPM. Bars not showing the same letter are different (ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test).

6 CONCLUSÕES

A elevação da pressão arterial sistólica induzida pelo alfa-tocoferol ou tempol pode ser devida ao retardo do desenvolvimento renal que pode resultar em menor número de néfrons. Ademais, as alterações nos transportadores de sódio no túbulo proximal também parecem contribuir com a elevação da pressão arterial promovida por ambos antioxidantes. No que diz respeito às alterações cardíacas observadas, suas repercussões ainda não estão claras, porém elas são indicadoras de que antioxidantes afetam a cardiogênese, o que abre novas perspectivas de estudos.

REFERÊNCIAS

ABU-ISSA, R.; KIRBY, M.L. Heart field: from mesoderm to heart tube. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**. v. 23, p. 45–68, 2007.

ADOLFSSON, O.; HUBER, B.T.; MEYDANI, S.N. Vitamin E enhanced IL-2 production in old mice: naive but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2-producing capacity. **Austin Journal of Clinical Immunology**. v. 167, p. 3809–3817, 2001.

AHMED, L.A.; SHEHATA, N.I.; ABDELKADER, N.F.; KHATTAB, M.M. Tempol, a Superoxide Dismutase Mimetic Agent, Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity through Alleviation of Mitochondrial Dysfunction in Mice. **PLoS ONE**. v. 9, p. e108889, 2014.

AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan S.A**, 2008

AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.16, p.3–13, 2010.

ALEXANDER, B.T. Divergent pathways of programming: Prenatal vs. Postnatal Protein Undernutrition. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 293, p.1257-1258, 2007.

ALEXANDER, B.T. Fetal programming of hypertension. **American Journal of Physiology. Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. v. 290, p. 1-10, 2006.

ALLAN, K.; CRAIG, L. C. A.; MCNEILL, G.; TURNER, S. W.; PRABHU, N.; CUTTS, R.; HELMS, P. J. ; SEATON, A.; DEVEREUX, G. Maternal vitamins E and D intakes during pregnancy are associated with childhood asthma up to the age of 10 years, In Joint Irish Section and American Society for Nutrition Meeting, **Proceedings of the Nutrition Society**. v. 70, p. 15–17, 2011.

ALPERT, E.; ALTMAN, H.; TOTARY, H.; GRUZMAN, A.; BARNEA, D.; BARASH, V.; SASSON, S. 4-Hydroxy tempol-induced impairment of mitochondrial function and augmentation of glucose transport in vascular endothelial and smooth muscle cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 67, p. 1985–1995, 2004.

ALZOGHAIBI, M.A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterol**, v. 19, p. 6540–6547, 2013.

ARENSTEIN, I.R.; CARUSO-NEVES, C.; ONUCHIC, L. F.; LOPES, A. G. Mechanisms of cell volume regulation in the proximal segment of the Malpighian tubule of *Rhodnius neglectus*. **Journal of Membrane Biology**. v. 146, p. 47-57, 1995.

ATKINSON, J.; EPAND, R.F., EPAND, R.M. Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 44, p. 739–764, 2008.

AZZI, A.; BOSCOBOINIK, D.; CHATELAIN, E.; OZER, N.K.; STÄUBLE, B. d-alpha-tocopherol control of cell proliferation. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 14, p. 265-71, 1993.

AZZI, A.; GYSIN, R.; KEMPNA, P.; RICCIARELLI, R.; VILLACORTA, L.; VISARIUS, T.; ZINGG, J. M. Regulation of gene and protein expression by vitamin E, **Free Radical Research**. v. 36, p. 30–36, 2002.

AZZI, A.; STOCKER, A.; Vitamin E: no- antioxidant roles. **Progress in Lipid Research**. v. 39, p. 231, 2000.

AZZI, A.; GYSIN, R.; KEMPNA, P.; MUNTEANU, L.; VILLACORTA, L.; VISARIUS, T.; ZINGG, J. M. Regulation of gene expression by a-tocopherol. **Biological Chemistry**. v. 385, p. 585–591, 2004.

AZZI, A.; ZINGG, J.M. Vitamin E. **Biochemistry and Molecular Biology Education**. v. 33, p. 184–187, 2005.

BALBI, A.P.; FRANCESCATO, H.D.; MARIN, E.C.; COSTA, R.S.; COIMBRA, T. M. Roles of mitogen-activated protein kinases and angiotensin II in renal development. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 42, p. 38–43, 2009.

BARKER, D.J.; GLUCKMAN, P.D.; GODFREY, K.M.; HARDING, J.E.; OWENS J.A.; ROBINSON, J.S. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet**. v. 341, p. 938–941, 1993.

BATISTA, E.S.; COSTA, A. G. V.; 1 PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Adding vitamin E to foods: implications for the foods and for human health. **Revista de Nutrição**. v.20, n. 5, p. 525-535, 2007.

BELTOWSKI, J.; BORKOWSKA, E.; WÓJCICKA, G.; MARCINIAK, A. Regulation of renal ouabain-resistant Na⁺-ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**. v. 29, p. 189-207, 2007.

BETTI, M.; AMBROGINI, P.; MINELLI, A.; FLORIDI, A.; LATTANZI, D.; CIUFFOLI, S.; BUCHERELLI, C.; PROSPERO, E.; FRONTINI, A.; SANTARELLI, L.; BALDI, E.; BENETTI, F.; GALLI, F.; CUPPINI, R. Maternal dietary loads of α -tocopherol depress protein kinase C signaling and synaptic plasticity in rat postnatal developing hippocampus and promote permanent deficits in adult offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 22, p. 60–70, 2011.

BJELAKOVIC, G.; NIKOLOVA, D.; GLUUD, L.L.; SIMONETTI, R.G.; GLUUD, C. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention Systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Medical Association**. v. 297, p. 842–857, 2007.

BJÛRNEBOE, A.; BJÛRNEBOE, G.E.; DREVON, C.A., Absorption, transport and distribution of vitamin E. **The Journal of Nutrition**. v.120p. 233-242,1990.

BLACK, B.L. Transcriptional pathways in second heart field development. **Seminars in Cell & Developmental Biology**. v. 18, p. 67-76, 2007.

BLANCO, G.; MERCER, R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. **The American Journal of Physiology**. v. 275, p. 633-50, 1998.

BONI, A.; PUGLIESE, C.; CHIANTELLI C.C.; PATIN, VEGA R. F.; OLIVEIRA, L. C. Antioxidant vitamins and prevention of atherosclerosis in childhood. **Revista Paulista de Pediatria**. v. 28, p. 373-80, 2010.

BONNY, O.; VINCIGUERRA, M.; GUMZ, M. L.; MAZZOCCOLI, G. Molecular bases of circadian rhythmicity in renal physiology and pathology. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 28, p. 2421–2431, 2013.

BOSCOBOINIK, D.; ÖZER, N.K.; MOSER, U.; AZZI, A. Tocopherols and 6-hydroxy-chroman-2-carbonitrile derivatives inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by a nonantioxidant mechanism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, p. 241–246, 1995.

BOWRY, V. M.; MOHR, D.; CLEARY, J.; STOCKER, R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**. V. 270, p. 5756-5763, 1995.

BOWRY, V. W.; STOCKER, R. Tocopherol-mediated peroxidation. The prooxidant effect of vitamin E on the radical-initiated oxidation of human low-density lipoprotein. **Journal of the American Chemical Society**. v. 115, p. 6029-6044, 1993.

BRAMLEY, P.M. ELMADFA, I., KAFATOS, A.; KELLY, F.J.; MANIOS, Y. et al. Review Vitamin E, **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, p. 913-938, 2000.

BRENNER, B.M. Brenner & Rector's The Kidney, Sixth Edition, **Philadelphia: W.B. Saunders Company**, 2000.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; KELLY, F. J.; SALONEN, J. T.; NEUZIL, J.; ZINGG, M.; AZZI, A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p.703-16, 2002.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: Function and metabolism. **The FASEB Journal**. v. 13, p. 1145–55, 1999.

BRIGELIUS-FLOHÉ R. Vitamin E: the shrew waiting to be tamed. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 46, p. 543-54, 2009.

BUCKINGHAM.M; MEILHAC,S.; ZAFFRAN,S.Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. **Nature Reviews Genetics**. v. 6, p. 826-35, 2005.

BUHLING, K.J.; GRAJECKI, D. The effect of micronutrient supplements on female fertility. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**. v. 25, p.173–180, 2013.

BURING, J.E.; HENNEKENS. C.H. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. **Nutrition Reviews**. v. 55, p. 53-8, 1997.

BURNS, K.D.; HOMMA, T.; HARRIS, R.C. The intrarenal renin-angiotensin system. **Seminars in Nephrology**, v. 13, n. 1, p. 13–30, 1993.

BURTON, G.J. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function. **Journal of Anatomy**, v. 215, p. 27–35, 2009.

CACHIA, O.; EL BENNA, J.; PEDRUZZI, E.; DESCOMPS, B.; GOUGEROT-POCIDALO, M.; LEGER, C. α -Tocopherol Inhibits the Respiratory Burst in Human Monocytes. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 273, p. 32801–32805, 1998.

CALVISI, D. F.; LADU, S.; HIRONAKA, K.; FACTOR, V. M.; THORGEIRSSON, S. S. Vitamin E down-modulates iNOS and NADPH oxidase in c-Myc/TGF- α

transgenic mouse model of liver cancer. **Journal of Hepatology**. v. 41, p. 815–822, 2004.

CARUSO-NEVES C, SIQUEIRA, A.; ISO-COHEN, G.; LOPES, A. G. Bradykinin modulates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity from basolateral membrane of the proximal tubule. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1431, p. 483-491, 1999.

CARUSO-NEVES, C.; RANGEL, L.B.; LARA, L.S.; LOPES, A.G. Regulation of the renal proximal tubule second sodium pump by angiotensins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 34, p.1079-84, 2001.

CHAN, A.C.; WAGNER, M.; KENNEDY, C.; MROSKE, C.; PROULX, P.; LANEUVILLE, O.; TRAN, K.; CHOY, P.C. Vitamin E up-regulates phospholipase A2, arachidonic acid release and cyclooxygenase in endothelial cells. **Aktuelle Ernährungsmedizin Klinik und Praxis**. v. 23, p. 1–8, 1998.

CHANG, S.J.; LIN, J.S.; CHEN, H.H. α-Tocopherol downregulates the expression of GPIIb promoter in HEL cells. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 28, p. 202–207, 2000.

CHAPPELL, L.C.; SEED, P.T.; BRILEY, A.L.; KELLY, F.J.; LEE, R.; HUNT, B.J.; PARMAR, K.; BEWLEY, S.J.; SHENNAN, A.H.; STEER, P.J.; POSTON, L. Effect of antioxidants on the occurrence of preeclampsia in women at increased risk: a randomised trial. **Lancet**. v. 354, p. 810–6, 1999.

CHEN, Y.; LASAITIENE, D.; FRIBERG, P. The renin-angiotensin system in kidney development. **Acta physiologica Scandinavica**. v. 181, p. 529-35, 2004.

CHAUDIERE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, p. 949 – 962, 1999.

CHOJKIER, M.; HOUGLUM, K.; LEE, K.S.; BUCK, M. Long- and short-term D-alpha-tocopherol supplementation inhibits liver collagen alpha1(I) gene expression. **The American Journal of Physiology**. v. 275, p. 1480-5, 1998.

COLOMBO, M.L. An Update on Vitamin E, Tocopherol and Tocotrienol—Perspectives. **Molecules**. v. 15, p. 2103-2113, 2010.

CONDE-AGUDELO, A.; ROMERO, R.; KUSANOVIC, J.P.; HASSAN, S.S. Supplementation with vitamins C and E during pregnancy for the prevention of preeclampsia and other adverse maternal and perinatal outcomes: a systematic review and meta analysis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 204, p.1–12, 2011.

COSTA,V.A.; VIANNA, L.M.; AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Alpha-tocopherol supplementation favorable effects on blood pressure blood viscosity and cardiac remodeling of spontaneously hypertensive rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v.16, p. 251–256, 2005.

CROYLE, M.L.; WOO, A.L.; LINGREL, J.B. Extensive Random Mutagenesis Analysis of the Na⁺/K⁺-ATPase α Subunit Identifies Known and Previously Unidentified Amino Acid Residues that Alter Ouabain Sensitivity Implications for Ouabain Binding, **European Journal of Biochemistry**. v. 248, p. 488–495, 1997.

DAÏKHA-DAHMANE, F.; LEVY-BEFF, E.; JUGIE, M.; LENCLÉN, R. Foetal kidney maldevelopment in maternal use of angiotensin II type I receptor antagonists. **Pediatric Nephrology**. v. 2, p. 729-32, 2006.

DAMIANI, E.; ASTOLFI, P.; CIONNA, L.; IPPOLITI, F.; GRECI, L. Synthesis and application of a novel sunscreen-antioxidant. **Free Radical Research**. v. 40, p. 485–494, 2006.

DAMIANI, E.; GRECI, L.; PARSONS, R.; KNOWLAND, J. Nitroxide radicals protect DNA from damage when illuminated in vitro in the presence of

dibenzoylmethane and a common sunscreen ingredient. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 26, p. 809–816, 1999.

DE ALMEIDA-AMARAL, E.E.; CARUSO-NEVES, C.; PIRES, V.M.; MEYER-FERNANDES, J. R. Leishmania amazonensis: characterization of an ouabain-insensitive Na⁺-ATPase activity. **Experimental Parasitology**. v. 118, p. 165-71, 2008.

DE SOUZA, A.M.; BATISTA, E.J.; PINHEIRO, A.A.; CARVALHAES, M., LOPES, A.G., DE SOUZA, W.; CARUSO-NEVES, C. Entamoeba histolytica: ouabain-insensitive Na⁽⁺⁾-ATPase activity. **Experimental Parasitology**. v. 117, p. 195-200, 2007.

DEBIER, C.; LARONDELLE, Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 93, p. 153–174, 2005.

DESAI, M. & HALES, C.N. (1997) Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, 72, 329–348.

DEVARAJ, S., HUGOU, I., AND JIALAL, I. α-Tocopherol decreases CD36 expression in human monocyte-derived macrophages. **Journal of Lipid Research**. v. 42, p. 521–527, 2001.

DONG, L.F., JAMESON, V.J.A., TILLY, D., CERNY, J., AHDAVIAN, E. et al Mitochondrial Targeting of Vitamin E Succinate Enhances Its Pro-apoptotic and Anti-cancer Activity via Mitochondrial Complex II. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 286, n. 5, p. 3717–3728, 2010.

EL BENNA, J.; FAUST, L.R.; JENNIFER, P.; JOHNSON, L.; BERNARD, M. Babior Phosphorylation of the Respiratory Burst Oxidase Subunit p47phox as Determined by Two-dimensional Phosphopeptide Mapping. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 6374 –6378, 1996.

ENGLER, M.M.; ENGLER, M.B.; MALLOY, M.J.; CHIU, E.Y.; SCHOLOETTER, M.C.; PAUL, S.M. *et al.* Antioxidant vitamins C and E improve endothelial function in children with hyperlipidemia: Endothelial Assessment of Risk from Lipids in Youth (EARLY). **Circulation**, v. 108, p. 1059-63, 2003.

ERIKSSON, U. J.; BORG, L. A. Diabetes and embryonic malformations: role of substrateinduced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos. **Diabetes**. v. 42, p. 411-9, 1993.

ESTHER, C. R. J.; HOWARD, T. E.; MARINO, E. M.; GODDARD, J. M.; CAPECCHI, M. R.; BERNSTEIN, K. E. Mice lacking angiotensin-converting enzyme have low blood pressure, renal pathology, and reduced male fertility. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, v. 74, p. 953–965, 1996.

EVANS, H.M.; BISHOP, K.S. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. **Science**. v.56, p. 650– 651, 1922.

EVERETT, A.D.; FISHER, A.; TUFRO-MCREDDIE, A.; HARRIS, M. Developmental regulation of angiotensin type 1 and 2 receptor geneexpression and heart growth. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**. v. 29, p. 141–8, 1997.

FALLER, L.D. Mechanistic studies of sodium pump, **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 476, p. 12–21, 2008.

FANELLI, C.; FERNANDES, B.H.V.; MACHADO, F.G.; OKABE, C.D.; MALHEIROS, M.A.C.; FUJIHARA, C.K.; ZATZ, R. Effects of losartan, in monotherapy or in association with hydrochlorothiazide, in chronic nephropathy resulting from losartan treatment during lactation. **American Journal of Physiology. Renal physiology**, v. 301, p. 580–587, 2011.

FE´RAILLE, E.; DOUCET, A. Sodium-Potassium-Adenosinetriphosphatase-Dependent Sodium Transport in the Kidney: Hormonal Control, **Physiological Reviews**. v. 81, p. 345-418, 2001.

FECHNER, H., SCHLAME, M., GUTHMANN, F., STEVENS, P.A.; RUSTOW, B. α - and δ -tocopherol induce expression of hepatic α -tocopherol-transfer-protein mRNA. **The Biochemical journal**. v. 331, p. 577–581, 1998.

FISCHER, A.; PALLAUF, J.; GOHIL, K.; WEBER, S.U.; PACKER, L.; RIMBACH, G. Effect of selenium and vitamin E deficiency on differential gene expression in rat liver. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 285, p. 470–475, 2001.

Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: **National Academy Press**, 2000.

FOWDEN, A. L.; FORHEAD, A. J. Glucocorticoids as regulatory signals during intrauterine development. **Experimental Physiology**. v. 00, p.1-11, 2015.

FOWDEN, A.L.; FORHEAD, A.J. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. **Reproduction**, v. 127, p. 515–526, 2004.

FOWDEN, A.L.; GIUSSANI, D.A.; FORHEAD, A.J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. **Physiology**. v. 21, p. 29–37, 2006.

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 Sciences**., v. 80, p. 709–715, 2007.

FREEDMAN, J.E.; FARHAT, J.H.; LOSCALZO, J.; KEANEY, J.F.Jr. α -tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. **Circulation**. v. 94, p. 2434–40, 1996.

FRIBERG, P.; SUNDELIN, B.; BOHMAN, S. O.; BOBIK, A.; NILSSON, H.; WICKMAN, A.; GUSTAFSSON, H.; PETERSEN, J.; ADAMS, M. A. Renin-angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in

response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. **Kidney International**, v. 45, p. 485–492, 1994.

GAGNÉ, A.; WEI, S. Q.; FRASER, W. D.; JULIEN, P. Absorption, transport, and bioavailability of vitamin e and its role in pregnant women. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada**. v. 31, p. 210-7, 2009.

GALLI, F.; AZZI, A. Present trends in vitamin E research. **Biofactors**. v. 36, p. 33-42, 2010.

GALLO, C.; RENZI, P.; LOIZZO, A.; PIACENTE, S.; FESTA, M.; CAPUTO, M. et al. Potential therapeutic effects of vitamin E and C on placental oxidative stress induced by nicotine: an in vitro evidence. **The Open Biochemistry Journal**. v. 4, p. 77-82, 2010.

GARVIN JL. Angiotensin stimulates bicarbonate transport and Na/K ATPase in at proximal straight tubules. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 1, p. 1146–1152, 1991.

GILDEA, J.J.; WANG, X.; SHAH, N.; TRAN, H.; SPINOSA, M.; VAN SCIVER, R.; SASAKI, M.; YATABE, J.; CAREY, R.M.; JOSE, P.A.; FELDER, R.A. Dopamine and angiotensin type 2 receptors cooperatively inhibit sodium transport in human renal proximal tubule cells. **Hypertension**, v. 60, p. 396-403, 2012.

GLYNN, R.J.; RIDKER, P.M.; GOLDHABER, S.Z.; ZEE, R.Y.; BURING, J.E. Effects of Random Allocation to Vitamin E Supplementation on the Occurrence of Venous Thromboembolism: report from the Women's Health Study. **Circulation**. V. 116, p. 1497-1503, 2007.

GOMES, C. P.; LEO-FERREIRA, L. R.; PINHEIRO, A. A.; GOMES-QUINTANA, E.; WENGERT, M.; LOPES, A. G.; CARUSO-NEVES, C. Crosstalk between the signaling pathways triggered by angiotensin II and adenosine in the renal proximal tubules: implications for modulation of Na⁺-ATPase activity. **Peptides**. v. 29, p. 2033-38, 2008.

GOMEZ, R.A.; LYNCH, K.R.; STURGILL, B.C.; ELWOOD, J.P.; CHEVALIER, R.L.; CAREY RM, et al. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. **The American Journal of Physiology**. v. 257, p. 850-858, 1989.

GOMEZ, R.A.; TUFRO-MCREDDIE, A.; EVERETT, A. D., PENTZ, E. S. Ontogeny of renin and AT1 receptor in the rat. **Pediatric Nephrology**. v. 7, p. 635-638, 1993.

GOMEZ, R.A.; NORWOOD, V.F. Developmental consequences of the renin-angiotensin system. **American Journal of Kidney Diseases**. v. 26, p. 409-31, 1995.

GUINAZI, M.; MILAGRES, R.C.R.M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H.M.; CHAVES, J. B. P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos, **Química Nova**, v. 32, p. 2098-2103, 2009.

GUPTA, S.; AZIZ, N.; SEKHON, L.; AGARWAL, R.; MANSOUR, G.; LI, J. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. **Obstetrical & Gynecological Survey**. v. 64, p. 750-9, 2009.

GURON, G., ADAMS, M.A., SUNDELIN, B. & FRIBERG, P. Neonatal angiotensin-converting enzyme inhibition in the rat induces persistent abnormalities in renal function and histology. **Hypertension**. v. 29, p. 91–97, 1997.

GURON, G., SUNDELIN, B., WICKMAN, A. & FRIBERG, P. Angiotensin-converting enzyme inhibition in piglets induces persistent renal abnormalities. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**. v. 25, p. 88–91, 1998.

GYSIN, R.; AZZI, A.; VISARIUS, T. g-Tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. **The FASEB Journal**. v. 16, p. 1952–1954, 2002.

HAHN, S. M.; KRISHNA, M. C.; DELUCA, A. M.; COFFIN, D.; MITCHELL, J. B. Evaluation of the hydroxylamine Tempol-H as an in vivo radioprotector. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 28, p. 953–958, 2000.

HARRIS, P.J.; YOUNG, J.A. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, v. 367, p. 295–297, 1977.

HERRERA, E.; BARBAS, C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives **Journal of Physiology and Biochemistry**. v. 57, p. 43-56, 2001.

HORIE, K.; MIYATA, T.; MAEDA, K.; MIYATA, S.; SUGIYAMA, S.; SAKAI, H.; VAN YPERSOLE DE STRIHO, C.; MONNIER, V.M.; WITZTUM, J.L.; KUROKAWA, K. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 100, p. 2995–3004, 1997.

HOY, W.E.; REES, M.; KILE, E.; MATHEWS, J.D.; WANG, Z. A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. **Kidney International**. v. 56, p. 1072-1077, 1999.

HOWARD, A. C.; ANNA, K.; MCNEIL, A. K.; MCNEIL, P. L. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. **Nature Communications**. v. 20, p. 597, 2011.

ILLSLEY, N.P.; CANIGGIA, I.; ZAMUDIO, S. Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth? **The International Journal of Developmental Biology**. v. 54, p. 409-419, 2010.

ISERMANN, B.; BIERHAUS, A.; TRITSCHLER, H.; ZIEGLER, R.; NAWROTH, P.P. alpha-Tocopherol induces leptin expression in healthy individuals and in vitro. **Diabetes Care**. V. 22, p. 1227-8, 1999.

IVY, J. R.; BAILEY, M.A. Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. **Journal Physiology**, v. 592, p. 3955–3967, 2014.

JAUNIAUX, E.; WATSON, A. L.; HEMPSTOCK, J.; BAO, Y. P.; SKEPPER, J. N.; BURTON, G. J. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure. **The American Journal of Pathology**, v. 157, p. 2111–2122, 2000.

JISHAGE, K.; ARITA, M.; IGARASHI, K.; IWATA, T. WATANABE, M. OGAWA, M., UEDA, O.; KAMADA, N., INOUE, K., ARAI, H. et al. Alpha-tocopherol transfer protein is important for the normal development of placental labyrinthine trophoblasts in mice. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p.1669–72, 2001.

KAEMPF-ROTZOLL, D.E.; IGARASHI, K.; AOKI, J.; JISHAGE, K. SUZUKI, H. TAMAI, H. et al. a-Tocopherol transfer protein is specifically localized at the implantation site of pregnant mouse uterus. **Reproductive Biology**. v. 67, p. 599–604, 2002.

KAKINUMA, Y.; SUGIYAMA, F.; TANIGUCHI, K.; HORIGUCHI, H.; OGATA, T.; MURAKAMI, K.; YAGAMI, K.; FUKAMIZU, A. Developmental stage-specific involvement of angiotensin in murine nephrogenesis. **Pediatric Nephrology**, v. 13, p. 792–799, 1999.

KASIMANICKAM, R.K, KASIMANICKAM, V. R.; RODRIGUEZ, J. S.; PELZER, K. D.; SPONENBER, P. D. G.; THATCHER, C. D. Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 1-11, 2010.

KAYDEN, H.J.; TRABERM, G. Absorption lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. **Journal of Lipid Research**. v. 34, p. 343-358, 1993.

KOLLECK, I.; SCHLAME, M.; FECHNER, H.; LOOMAN, A.C.; WISSEL, H.; RUSTOW, B. HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 27, p. 882–890, 1999.

KONTUSH, A.; FINCKH B.; KARTEN, B.; KOHLSCHITTER, A.; BEISIEGEL, U. Antioxidant and prooxidant activity of α -tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. **Journal of Lipid Research**. v. 37, p. 1436–1448, 1996.

KRISHNA, M. C.; DEGRAFF, W.; HANKOVSKY, O.; SA´ R, C. P.; KA´ LAI, T.; JEKO, J.; RUSSO, A.; MITCHELL, J. B. Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 41, p. 3477–3492, 1998.

KRIVOI, I. I. Functional Interactions of Na,K-ATPase with Molecular Environment. **Biophysics**. v. 59, p. 708–717, 2014.

LANDES, N.; PFLUGER, P.; KLUTH, D.; BIRRINGER, M.; RUHL, R.; BOL, G. F.; GLATT, H.; BRIGELIUS-FLOHE´, R. Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. **Biochemical Pharmacology**. v. 65, p. 269–73, 2003.

LASAITIENE, D.; FRIBERG, P.; SUNDELIN, B.; CHEN, Y. Neonatal RAS inhibition changes the phenotype of the developing thick ascending limb of Henle. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 286, n.6, p. 1144–1153, 2004.

LAYTON, A.T. Modeling Transport and Flow Regulatory Mechanisms of the Kidney. **ISRN Biomathematics**, v.12, p.1–18, 2012.

LI, F.; WANG, X.; CAPASSO, J.M.; GERDES, A.M. Rapid Transition of Cardiac Myocytes from Hyperplasia to Hypertrophy During Postnatal Development. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 28, n. 8, p.1737–1746, 1996.

LI, F.; WANG, X.; BUNGER P.C.; GERDES, A.M. Formation of Binucleated Cardiac Myocytes in Rat Heart: I. Role of Actin–myosin Contractile Ring. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, p. 1541–1551, 1997.

LI, D.; SALDEEN, T.; ROMEO, F.; MEHTA, J.L. Different isoforms of tocopherols enhance nitric oxide synthase phosphorylation and inhibit human platelet aggregation and lipid peroxidation: Implications in therapy with vitamin E. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**. v. 6, p. 155–61, 2001.

LI, W. G.; ZHANG, X. Y.; WU, Y. J.; GAO, M. T.; ZHENG, R. L. The relationship between structure and antioxidative activity of piperidine nitroxides. **Journal of Pharmaceutics & Pharmacology** v. 58, p. 941–949, 2006.

LINGREL, J.B. The Physiological Significance of the Cardiotonic Steroid/Ouabain-Binding Site of the Na,K-ATPase, **Annual Review of Physiology**. v. 72, p. 395–412, 2010.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. v. 4, p. 118–126, 2010.

MACHADO, F.G.; POPPI, E.P.; FANELLI, C.; MALHEIROS, D.M.; ZATZ, R.; FUJIHARA, C. K. AT1 blockade during lactation as a model of chronic nephropathy: mechanisms of renal injury. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**. v. 294, p. 1345–1353, 2008.

MADSEN, K.; MARCUSSEN, N.; PEDERSEN, M.; KJAERGAARD, G.; FACEMIRE, C.; COFFMAN, T.M.; JENSEN, B.L. Angiotensin II promotes development of the renal microcirculation through AT1 receptors. **Journal of the American Society of Nephrology**. v. 21, p. 448–59, 2010.

MÄNNER, J.; PÉREZ-POMARES, J. M.; MACÍAS, D.; MUÑOZ-CHÁPULI, R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. **Cells Tissues Organs**. v. 169, p. 89–103, 2001.

MARA, L.; ACCARDO, C.; PILICHI, S.; DATTENA, M.; CHESSA, F.; CHESSA, B. Benefits of TEMPOL on ram semen motility and in vitro fertility: a preliminary study. **Theriogenology**. v. 63, p. 2243–2253, 2005.

MARIN, E.C.; FRANCESCATO, H.D.; SILVA, C.G.; COSTA, R.S.; COIMBRA, T.M. Postnatal Renal Abnormalities in Rats Exposed to Losartan during Lactation. **Nephron. Experimental Nephrology [electronic resource]**. v. 119, p. 49–57, 2011.

MATILL, H. A. Antioxidants. **Annual Review of Biochemistry**. v. 16, p. 177–92, 1947.

MATSUI, H.; ANDO, K.; KAWARAZAKI, H.; NAGAE, A.; FUJITA, M.; SHIMOSAWA, T. et al. Salt excess causes left ventricular diastolic dysfunction in rats with metabolic disorder. **Hypertension**. v. 52, p. 287–294, 2008.

MAUCH, S.; KOLB, C.; KOLB, B.; SADOWSKI, T.; SEDLACEK, R. Matrix metalloproteinase-19 is expressed in myeloid cells in an adhesion-dependent manner and associates with the cell surface. **The Journal of Immunology**. v.168, p. 1244–1251, 2002.

MAY, J. M., QU, Z. C., JULIAO, S.; COBB, C.E. Ascorbic acid decreases oxidant stress in endothelial cells caused by the nitroxide tempol. **Free Radical Research**. v. 39, p. 195–202, 2005.

MIYAMOTO, K.; SHIOZAKI, M.; SHIBATA, M.; KOIKE, M.; UCHIYAMA, Y.; GOTOW, T. Very-high-dose alpha-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, p. 556–66, 2009.

MIJATOVIC, T. A.; QUAQUEBEKE, E.V.A.; DELEST, R.A.; DEBEIR, O.B.; DARRO, F.A.; KISS, R.C.D. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy, **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1776, p. 32–57, 2007.

MIKHAIL, M. S.; ANYAEGBUNAM, A.; GARFINKEL, D.; PALAN, P. R.; BASU, J.; ROMNEY, S. L. Preeclampsia and antioxidant nutrients: decreased plasma levels of reduced ascorbic acid, α -tocopherol and beta-carotene in women with preeclampsia. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 171, p. 150–7, 1994.

MILLAN, M. A.; CARVALLO, P.; IZUMI, S.; ZEMEL, S.; CATT, K. J.; AGUILERA G. Novel sites of expression of functional angiotensin II receptors in the late gestation fetus. **Science** v. 244, p. 1340–1342, 1989.

MILLER, E.R.; PASTOR-BARRIUSO, R.; DALAL, D.; RIEMERSMA, R.A.; APPEL, L.J.; GUALLAR, E. Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. **Annals of Internal Medicine**. v. 142, p. 37–46, 2005.

MILLER, G.W.; LABUT, E.M.; LEBOLD, K.M.; FLOETER, A.; TANGUAY, R.L.; TRABER, M.G. Zebrafish (*Danio rerio*) fed vitamin E-deficient diets produce embryos with increased morphologic abnormalities and mortality. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 23, p. 478–86, 2012.

MILLER, G.W.; TRUONG, L.; BARTON, C.L.; LABUT, E.M.; LEBOLD, K.M.; TRABER, M.G.; TANGUAY, R.L. The influences of parental diet and vitamin E intake on the embryonic zebrafish transcriptome. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part D, Genomics & proteomics**. v. 10, p. 22–9, 2014.

MOORMAN, A.; WEBB, S.; BROWN, N.A.; LAMERS, W.; ANDERSON, R.H. Development of the heart: (1) formation of the cardiac chambers and arterial trunk s. **Heart**. v. 89, p. 806–14, 2003.

MORTH, J.P.; PEDERSEN, B.P.; TOUSTRUP-JENSEN, M.S.; SORENSEN, T.L.; PETERSEN, J.; ANDERSEN, J.P.; VILSEN, B.; NISSEN, P. Crystal structure of the sodiumpotassium pump. **Nature**. v. 13, p. 1043–9, 2007.

MULLER-SCHMEHL, K.; BENINDE, J.; FINCKH, B.; FLORIAN, S.; DUDENHAUSEN, J. W.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. et al. Localization of α -tocopherol transfer protein in trophoblast, fetal capillaries endothelium and amnion epithelium of human term placenta. **Free Radical Research**. v. 38, p. 413–20, 2004.

MYUNG, S.K.; JU, W.; CHO, B.; OH, S.W.; PARK, S.M.; KOO, B.K.; PARK, B.J. Efficacy of vitamin and antioxidant supplements in prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. **British Medical Journal**. v. 346, p. 1–22, 2013.

NAGAI, T, YASUOKA, Y.; IZUMI, Y.; HORIKAWA, K., KIMURA, M. et al. Reevaluation of erythropoietin production by the nephron. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 449, p. 222–228, 2011.

NAGASE, M.; MATSUI, H.; SHIBATA, S.; GOTODA, T.; FUJITA, T. Salt-induced nephropathy in obese spontaneously hypertensive rats via paradoxical activation of the mineralocorticoid receptor: role of oxidative stress. **Hypertension**. v. 50, p. 877–883, 2007.

NIIMURA, F.; LABOSKY, P.A.; KAKUCHI, J.; OKUBO, S.; YOSHIDA, H.; OIKAWA, T.; ICHIKI, T.; NAFTILAN, A.J.; FOGO, A.; INAGAMI, T.; ICHIKAWA, I. Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensin in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 96, p. 2947–2954, 1995.

NIGAM, S.K.; APERIA, A.C.; BRENNER, B.M. Development and maturation of the kidney. In: Brenner BM, Rector FC (Editors), *The kidney: physiology and pathology*. 5th edn. **Philadelphia: WB Saunders**; p 72–98, 1996.

NILSSON, A. B.; NITESCU, N.; CHEN, Y.; GURON, G. S.; MARCUSSEN, N.; MATEJKA, G.L.; FRIBERG, P. IGF-I treatment attenuates renal abnormalities induced by neonatal ACE inhibition. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 279, p. 1050–1060, 2000.

NISHIYAMA, A.; ABE, Y. Aldosterone and renal injury. **Nippon Yakurigaku Zasshi**. v. 124, p. 101–109, 2004.

OLIVERIO, M.I.; BEST, C.F.; KIM, H.S.; ARENDSHORST, W.J.; SMITHIES, O.; COFFMAN, T.M. Angiotensin II responses in AT1A receptor-deficient mice: a role for AT1B receptors in blood pressure regulation. **The American Journal of Physiology**. v. 272, p.515–20, 1997.

OLIVETTI, G.; CIGOLA, E.; MAESTRI, R.; CORRADI, D.; LAGRASTA, C.; GAMBERT, S.R.; ANVERSA, P. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 28, n. 7, p. 1463–1477, 1996.

OLSON, E.N. A decade of discoveries in cardiac biology. **Nature Medicine**. v. 10, p. 467–474, 2004.

PAROLA, M.; MURACA, R.; DIANZANI, I.; BARRERA, G.; LEONARDUZZI, G.; BENDINELLI, P.; PICCOLETTI, R.; POLI, G. Vitamin E dietary supplementation inhibits transforming growth factor beta 1 gene expression in the rat liver. **FEBS Lett**. V. 24, p. 267–70, 1992.

PEUCHANT, E.; BRUN, J. L.; RIGALLEAU, V.; DUBOURG, L.; THOMAS, M. J.; DANIEL, J. Y.; LENG, J. J.; GIN, H. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 293–298, 2004.

PISANESCHI, S.; BOLDRINI, A.; GENAZZANI, A.R.; COCEANI, F.; IMONCINI T. Feto-placental vascular dysfunction as a prenatal determinant of adult cardiovascular disease. **Internal and Emergency Medicine**, v. 8, p. 41–45, 2013.

POSTON, L.; IGOSHEVA, N.; MISTRY, H. D.; SEED, P. T.; SHENNAN, A. H.; RANA, S.; KARUMANCHI, S. A.; CHAPPELL, L. C. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, p.1980–1985, 2011.

PROVERBIO, F.; MARÍN, R.; PROVERBIO, T. The "second" sodium pump and cell volume. **Current Topics in Membranes and Transport**, v. 34, p. 105–119, 1989.

RANGEL, L.B.A.; CARUSO-NEVES, C.; LARA, L. S.; BRASIL, F. L.; LOPES, A. G. Angiotensin II activates the ouabain-insensitive Na⁺-ATPase from renal proximal tubules through a G-protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1416, p. 309–319, 1999.

RANGEL, L. B.; LOPES, A. G.; LARA, L. S.; CARVALHO, T. L.; SILVA, I. V.; OLIVEIRA, M.M.; EINICKER-LAMAS, M.; VIEYRA, A.; NOGAROLI, L.; CARUSO-NEVES, C. PI-PLC β is involved in the modulation of the proximal tubule Na⁺-ATPase by angiotensin II. **Regulatory Peptides**, v. 127, p. 177–182, 2005.

RANGEL, L.B.; CARUSO-NEVES, C.; LARA, L.S.; LOPES, A.G. Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na(+)-ATPase activity through the activation of protein kinase C, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1564, p. 310–316, 2002.

RAMOS, K.S.; FALAHATPISHEH, M. H.; NANEZ, A.; HE, Q. Modulation of biological regulatory networks during nephrogenesis. **Drug Metabolism Reviews**, v. 38, p. 677–683, 2006.

REYES, A.; GALINDO, M. M.; GARCÍA, L.; SEGURA-PENA, D.; CARUSO-NEVES, C.; EBLEN-ZAJJUR, A.; PROVERBIO, T.; MARÍN, R.; PROVERBIO, F. Ouabain-Insensitive, Na^+ -Stimulated ATPase of Several Rat Tissues: Activity during a 24 h. **Physiological Research** v. 58, p. 693–9, 2009.

RICCIARELLI, R., ZINGG, J.M., AND AZZI, A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. **Circulation**. v. 102, p. 82–87, 2000.

RICCIARELLI, R.; TASINATO, A.; CLÉMENT, S.; OZER, N.K.; BOSCOBOINIK, D.; AZZI, A. alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. **The Biochemical Journal**. v. 15, p. 243–9, 1998.

RICCIARELLI, R.; MARONI, P.; OZER, N.; ZINGG, J.M.; AZZI, A. Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by alpha-tocopherol via protein kinase C inhibition. **Free Radical Biology & Medicine** v. 27, p. 729–37, 1999.

RIMBACH, G.; MINIHANE, A. M.; MAJEWICZ, J.; FISCHER, A.; PALLAUF, J. et al. Regulation of cell signaling by vitamin E. **The Proceedings of the Nutrition Society**. v. 61, p. 415, 2002.

RIMM E.B.; STAMPFER, M. J.; ASCHERIO, A.; GIOVANNUCC, E. I; COLDITZ, G. A., WILLETT, W. C. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. **The New England journal of medicine**. v. 328, p.1450–6, 1993.

RIZVI, S.; RAZA, S.T.; AHMED, F.; AHMAD, A.; ABBAS, S.; MAHDI, F. The Role of Vitamin E in Human Health and Some Diseases. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v. 14, p. 157–165, 2014.

ROCAFULL, M. A.; ROMERO, F. J.; THOMAS, L. E.; DEL CASTILLO, J. R. Isolation and cloning of the K^+ -independent, ouabain-insensitive Na^+ -ATPase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1808, p. 1684–700, 2011.

ROTA, S.; MCWILLIAM, N. A.; BAGLIN, T. P.; BYRNE, C. D. Atherogenic Lipoproteins Support Assembly of the Prothrombinase Complex and Thrombin Generation: Modulation by Oxidation and Vitamin E. **Blood**. V. 91, p. 508–515, 1998.

RUMBOLD A. R.; DULEY, L.; CROWTHER, C. A., HASIAM, R. R. Antioxidants for preventing pre-eclampsia. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 23, p. 422–7, 2008.

RUMBOLD, A.R.; CROWTHER, C. A. Vitamin E supplementation in pregnancy. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**. v. 18, p. 406–9, 2005.

RYU, S.; KOHEN, R.; SAMUNI, A.; ORNOY, A. Nitroxide radicals protect cultured rat embryos and yolk sacs from diabetic-induced damage. **Birth Defects Research. Part A, Clinical and molecular teratology**. v. 79, p. 604–611, 2007.

SADOSHIMA, J.; XU, Y.; SLAYTER, H.S.; IZUMO, S. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. **Cell**. v. 75, p. 977–984, 1993.

SALIM, S. Oxidative Stress and Psychological Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 12, p. 140–147, 2014.

SALUCCI, S., AMBROGINI, P.; LATTANZI, D.; BETTI, M.; GOBBI, P.; GALATI, C.; GALLI, F.; CUPPINI, R.; MINELLI, A. Maternal dietary loads of alpha-tocopherol increase synapse density and glial synaptic coverage in the hippocampus of adult offspring. **European Journal of Histochemistry**. v. 58, p. 120–126, 2014.

SAMAI, M.; SHARPE, M. A.; GARD, P. R.; CHATTERJEE, P. K. Comparison of the effects of the superoxide dismutase mimetics EUK-134 and tempol on paraquat-induced nephrotoxicity. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 43, p. 528–534, 2007.

SAMUNI, A.M.; LIPMAN, A.; BARENHOLZ, Y. Damage to liposomal lipids: protection by antioxidants and cholesterol-mediated dehydration. **Chemistry and Physics of Lipids** V. 105, p, 121–134, 2000.

SANCHEZ-LOZADA, L. G.; SOTO, V.; TAPIA, E.; VILA-CASADO, C.; SAUTIN, Y. Y.; NAKAGAWA, T. et al. Role of oxidative stress in the renal abnormalities induced by experimental hyperuricemia. **Am Journal Physiol Renal Physiol**. v. 295, p. 1134–1141, 2008.

SCHEDL, A.; HASTIE, N.D. Cross-talk in kidney development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 10, n. 5, p. 543–549, 2000.

SCHWARTZ, J.; SHKLAR, G.; TRICKLER, D. p53 in the anticancer mechanism of vitamin E. **European Journal of Cancer Part B, Oral Oncology**. v. 29, p. 313–318, 1993.

SCHMID, G.; PFITZER, P. Mitoses and binucleated cells in perinatal human hearts. **Virchows Archiv. B, Cell Pathology Including Molecular Pathology**, v. 48, n. 1, p.59–67, 1985.

SECHI, L.A.; GRIFFIN, C.A.; GRADY, E.F.; KALINYAK, J.E.; SCHAMBELAN, M. Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart. **Circulation Research**. v. 71, p. 1482–9, 1992.

SEDAGHAT, K.; ZAHEDIASL, S.; GHASEMI, A. Intrauterine programming. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**. v. 18, p. 212–220, 2015.

SFERRUZZI-PERRI, A. N., VAUGHAN, O.R.; FORHEAD, A. J.; FOWDEN, A. L. Hormonal and nutritional drivers of intrauterine Growth. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**. v. 16, p. 298–309, 2013.

SHAMIM, A.A.; SCHULZE, K.; MERRILL, R.D.; KABIR, A.; CHRISTIAN, P.; SHAIKH, S., WU, L.; ALI, H. et al. First-trimester plasma tocopherols are

associated with risk of miscarriage in rural Bangladesh^{1–4}. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 101, p. 294–301, 2015.

SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 10, p. 324–328, 2007.

SILVA, E.; PINTO, V.; SIMÃO, S.; SERRÃO, M.P.; AFONSO, J.; AMARAL, J.; PINHO, M.J.; GOMES P. ; SOARES-DA-SILVA, P. Renal aging in WKY rats: Changes in Na⁺,K⁺-ATPase function and oxidative stress. **Experimental Gerontology**. V. 45, p. 977–983, 2010.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. **Annual Review of Nutrition**. v. 25, p.151–174, 2005.

SMEDTS, H. P., DE VRIES, J. H.; RAKHSHANDEHROO, M.; WILDHAGEN, M. F.; VERKLEIJ-HAGOORT, A. C. STEEGERS,E. A.; STEEGERS-THEUNISSEN RP. High maternal vitamin E intake by diet or supplements is associated with congenital heart defects in the offspring. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**. v. 116, p. 416–423, 2009.

SOONPAA, M.H.; KIM, K.K.; PAJAK, L.; FRANKLIN, M.; FIELD, L.J. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 271, p. 2183–2189, 1996.

SUMMA, V.; CAMARGO, S.M.; BAUCH, C.; ZECEVIC, M.; VERREY, F. Isoform specificity of human Na⁺, K⁺-ATPase localization and aldosterone regulation in mouse kidney cells. **Journal of Physiology**, v. 555, p. 355–364, 2004.

SURE, S. Dietary requirements for reproduction: VII. THE EXISTENCE OF A LACTATION-PROMOTING FACTOR IN THE UNSAPONIFIABLE MATTER FROM WHEAT OIL. **Journal of Chemical Biology**. v. 69, p. 53-74, 1926.

THOMPSON T. A.; WILDING, G. Androgen Antagonist Activity by the Antioxidant Moiety of Vitamin E, 2,2,5,7,8-Pentamethyl-6-chromanol in Human Prostate Carcinoma Cells. **Molecular Cancer Therapeutics**. v. 2, p. 797–803, 2003.

TSUCHIDA, S.; MATSUSAKA, T.; CHEN, X.; OHKUBO, S.; NIIMURA, F.; NISHIMURA, H.; FOGO, A.; UTSUNOMIYA, H.; INAGAMI, T. Murine double nullizygotes of the angiotensin type 1A and 1B receptor genes duplicate severe abnormal phenotypes of angiotensinogen nullizygotes. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 101, P. 755–760, 1998.

THOMPSON L. P; AL-HASAN, Y. Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. **Journal of Pregnancy**, v. 2012, p. 8, 2012.

THOMPSON, T. A.; WILDING, G. Androgen antagonist activity by the antioxidant moiety of vitamin E, 2, 2, 5, 7, 8 pentamethyl-6-chromanol in human prostate carcinoma cells. **Molecular Tancer Therapeutics**. v. 2, p. 797–803, 2003.

TRABER, M.G. VITAMIN E IN HUMANS:Demand and Delivery. **Annual Review of Nutrition**. v. 16, p. 321–17, 1996.

TRAN, K.; WONG, J. T.; LEE, E.; CHAN, A. C.; CHOY, P. C. Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells. **The Biochemical journal**. v. 319, p. 385–391, 1996.

TREJO-SOLIS, C.; CHAGOYA DE SANCHEZ, V.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; SANCHEZ-SEVILLA, L.; GOMEZ-RUIZ, C.; HERNANDEZ-MUNOZ, R. Inhibitory effect of vitamin E administration on the progression of liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**. v. 83, p. 1669–1679, 2003.

TUFRO-MCREDDIE, A.; HARRISON, J. K.; EVERETT, A. D.; GOMEZ, R. A. Ontogeny of type 1 angiotensin II receptor gene expression in the rat. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 91, p. 530–537, 1993.

TUFRO-MCREDDIE, A., ROMANO, L.M., HARRIS, J.M., FERDER, L. & GOMEZ, R.A. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. **American Journal of Physiology**. v. 269, p. 110–115, 1995.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M.; MOURA, J.; BENFATO, V.; KUBOTA, L. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VARDI, M.; LEVY, N. S.; LEVY, A. P. Vitamin E in the prevention of cardiovascular disease: the importance of proper patient selection. **Journal of Lipid Research**. v. 54, p. 2307–14, 2013.

VENKATESWARAN, V.; FLESHNER, N. E.; KLOTZ, L. H. Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. **The Journal of Urology**. v. 168, p. 1578–1582, 2002.

VICKERS, M.H.; BREIER, B.H.; CUTFIELD, W.S.; HOFMAN, P.L.; GLUCKMAN, P.D. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v. 279, p. 83–87, 2000.

VIEIRA-FILHO, L. D.; CABRAL, E. V.; SANTOS, F. T.; COIMBRA, T. M.; PAIXÃO, A. D. Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. **Pediatric Nephrology**. v. 26, p.2019–2029, 2011b.

VIEIRA-FILHO, L. D.; LARA, L. S.; SILVA, P. A.; SANTOS, F. T.; LUZARDO, R.; OLIVEIRA, F. S.; PAIXÃO, A. D.; VIEYRA, A. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 505, p. 91–97, 2011a.

VIEIRA-FILHO, L.D.; CABRAL, E.V.; FARIAS, J.S.; SILVA, P.A.; MUZI-FILHO, H.; VIEYRA, A.; PAIXÃO, A.D. Renal molecular mechanisms underlying altered

Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **The British Journal of Nutrition**. v. 24, p. 1–13, 2014.

VILLACORTA, L.; GRAÇA-SOUZA, A.V.; RICCIARELLI, R.; ZINGG, J.M.; AZZI, A. Alpha-tocopherol induces expression of connective tissue growth factor and antagonizes tumor necrosis factor-alpha-mediated downregulation in human smooth muscle cells. **Circulation Research**. v. 92, p. 104–110, 2003.

WANG, L.; NEWMAN, R.K.; NEWMAN, C.W.; JACKSON, L.L.; HOFER, P.J. Tocotrienol and fatty acid composition of barley oil and their effects on lipid metabolism. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 43, p. 9–17, 1993.

WANG, X.; QUINN, P.J. Vitamin E and its function in membranes. **Progress in Lipid Research**. v. 38, p. 309–336, 1999.

WARD, N.C.; WU, J.H.; CLARKE, M.W.; PUDDEY, I.B.; BURKE, V.; CROFT, K.D. *et al.* The effect of vitamin E on blood pressure in individuals with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Hypertension**. v. 25, p. 227–234, 2007.

WHITE, J. H. Regulation of intracrine production of 1,25-dihydroxyvitamin D and its role in innate immune defense against infection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, p. 58–63, 2012.

WU, C.G.; HOEK, F.J.; GROENINK, M.; REITSMA, P.H.; VAN DEVENTER, S.J.; CHAMULEAU, R.A. Correlation of repressed transcription of α -tocopherol transfer protein with serum α -tocopherol during hepatocarcinogenesis. **International Journal of Cancer**. v. 71, p. 686–690, 1997.

WU, D.; LIU, L.; MEYDANI, M.; MEYDANI, S.N. Vitamin E increases production of vasodilator prostanoids in human aortic endothelial cells through opposing effects on cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. **The Journal of Nutrition**. v. 135, p. 1847–1853, 2005.

XIA, L.; WANG, H.; GOLDBERG, H. J.; MUNK, S.; FANTUS, I.G.; WHITESIDE, C.I. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein

kinase C dependent and required for collagen IV expression. **American Journal Physiol Renal Physiol.** v. 290, p. 345–356, 2006.

XIAO, D.; HU, X.Q.; HUANG, X.; ZHOU, J.; WILSON, S.M.; YANG, S.; ZHANG, L. Chronic hypoxia during gestation enhances uterine arterial myogenic tone via heightened oxidative stress. **PLoS One**, v.8, p. e73731, 2013.

YE, Z.; SONG, H. Antioxidant vitamins intake and the risk of coronary heart disease: meta-analysis of cohort studies. **European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation.** v.15, p. 26–34, 2008.

YINGST, D.R.; MASSEY, K.J.; ROSSI, N.F.; MOHANTY, M.J.; MATTINGLY, R.R. Angiotensin II directly stimulates activity and alters the phosphorylation of Na-K-ATPase in rat proximal tubule with a rapid time course. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 287, p. 713–721, 2004.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E.; NOGUCHI, N.; Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. **Chemistry and Physics of Lipids.** v. 1, p. 13, 2003.

YOSHIKAWA, T.; YOSHIDA, N.; MANABE, H.; TERASAWA, Y.; TAKEMURA, T.; KONDO, M. α -Tocopherol protects against expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. **Biofactors.** v. 7, p. 15–19, 1998.

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology.** v. 54, p. 176–186, 2001.

YUTZEY, K.E., KIRBY ML. Wherefore heart thou? Embryonic origins of cardiogenic mesoderm. **Developmental Dynamics.** v. 223, p.307–320, 2002.

ZANDI-NEJAD, K.; LUYCKX, V.A.; BRENNER, B.M. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. **Hypertension.** v. 47, p. 502–508, 2006.

ZAPOLSKA-DOWANAR, D.; ZALPOLSKI-DOWNAR, A.; MARKIEWSKI, M.; CIECHANOWICZ, A.; KACZMAREZYK, M.; NARUSZEWEZ, M. Selective inhibition by alpha-tocopherol of vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. **Biochemical and Biophysical research communications**. v. 274, p. 609–615, 2000.

ZHANG, G. X.; KIMURA, S.; NISHIYAMA, A.; SHOKOJI, T.; RAHMAN, M.; YAO, L. et al. Cardiac oxidative stress in acute and chronic isoproterenol-infused rats. **Cardiovascular Research**. v. 65, p. 230–238, 2005.

ZHANG, G. X.; KIMURA, S.; NISHIYAMA, A.; SHOKOJI, T.; RAHMAN, M.; ABE, Y. ROS during the acute phase of Ang II hypertension participates in cardiovascular MAPK activation but not vasoconstriction. **Hypertension**. v. 43, p. 117–124, 2004.

ZINGG J.M.; AZZI A. Non-Antioxidant Activities of Vitamin E. **Current Medicinal Chemistry**. v. 11, p. 1113–1133, 2004.

ZINGG, J.M. Vitamin E: An overview of major research directions. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 28, p. 400–422, 2007.