



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAYRA DIAS RODRIGUES

**SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM VITAMINA C
PRESERVA A FUNÇÃO ENDOTELIAL DA AORTA DE RATAS
ADULTAS QUE FORAM OBESAS DURANTE A INFÂNCIA
POR SUPERNUTRIÇÃO LACTACIONAL**

MAYRA DIAS RODRIGUES

**SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM VITAMINA C
PRESERVA A FUNÇÃO ENDOTELIAL DA AORTA DE RATAS
ADULTAS QUE FORAM OBESAS DURANTE A INFÂNCIA
POR SUPERNUTRIÇÃO LACTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Graziela Scialanti Ceravolo

Londrina
2026

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Rodrigues, Mayra Dias.

Suplementação materna com vitamina c preserva a função endotelial da aorta de ratas adultas que foram obesas durante a infância por supernutrição lactacional / Mayra Dias Rodrigues. - Londrina, 2026.
67 f.

Orientador: Graziela Sciantti Ceravolo.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2026.

Inclui bibliografia.

1. Antioxidante - Tese. 2. Estrógeno - Tese. 3. Ninhada Reduzida - Tese. 4. Reatividade vascular - Tese. I. Sciantti Ceravolo, Graziela . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

MAYRA DIAS RODRIGUES

**SUPLEMENTAÇÃO MATERNA COM VITAMINA C
PRESERVA A FUNÇÃO ENDOTELIAL DA AORTA DE RATAS
ADULTAS QUE FORAM OBESAS DURANTE A INFÂNCIA
POR SUPERNUTRIÇÃO LACTACIONAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Graziela Scialanti
Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Kawane Fabrício Moura
Faculdade de Medicina da Universidade
Estadual de São Paulo - FMUSP

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins-Pinge
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes
(suplente)
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Rubia Casagrande (suplente)
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 06 de abril de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e condições para fazer o meu trabalho. Agradeço por Ele me permitir levantar da cama todos os dias e por me permitir finalizar esse projeto.

Sempre serei grata aos meus pais que desde a graduação me apoiam e me ajudam de todas as maneiras possíveis para que eu siga realizando os meus sonhos e aproveitando as oportunidades. Agradeço por serem estarem ao meu lado, agradeço pelos conselhos, agradeço por reconhecerem a importância do que eu faço e por não questionarem as minhas decisões. Além dos meus pais, também sou grata aos outros membros da minha família, meus tios, minhas tias, minhas primas, que sempre me ajudam quando possível.

Gostaria de agradecer as amigades que fiz em Londrina, durante a graduação e a pós-graduação, em especial as minhas amigas Karen e Fabiane, e as minhas amigas Carolina e Beatriz, por permanecerem na minha vida depois de muitos anos, passamos por muitos momentos felizes juntas que sempre lembrarei e serei grata.

Agradeço aos meus amigos do laboratório Carol, Kaio, Julia, Elisa, Gabi, Dulce, Pedro, Dellie e Lívia porque graças a eles eu consegui finalizar esse projeto, eles participaram de todas as partes desse projeto, acompanharam, ajudaram em experimentos, e, além disso, agradeço por termos construído uma amizade para além do laboratório. Também sou grata a Polyana por ter feito a parte mais importante do projeto, e por toda a sua ajuda. Agradeço a Kawane por, junto a professora Graziela, ter me dado o conhecimento e ensinamento para desenvolver a minha pesquisa.

Agradeço aos técnicos, Fujiko e Afonso, por todo o apoio, toda a disponibilidade e disposição a ajudar quando foi preciso.

Gostaria de agradecer as pessoas que me ajudaram nas análises experimentais desse projeto, Mavi, Rayssa, Letícia, Giovanna, Maria Clara e Fabiano, por me ensinarem às técnicas e terem cedido parte do tempo deles para realizarem os experimentos. Agradeço também aos seus orientadores Gislaine, Glaura, Waldiceu e Ernane, assim como a professora Marli, por disponibilizarem os equipamentos e reagentes necessários.

Agradeço também as agências de fomento Carrefour, CAPES,

CNPQ e Fundação Araucária por financiarem esse projeto e garantir que tenhamos os equipamentos e meios necessários para a realização dos experimentos envolvidos nesse projeto.

E, por fim, gostaria de agradecer a professora Graziela que me ensinou a ser pesquisadora, agradeço por todas as orientações, todos os conselhos, e por ter confiado em mim a realização dessa pesquisa.

“A ciência, para mim, dá uma explicação parcial para a vida. Na medida em que vai, é baseada em fatos, experiências e experimentos.”
Rosalind Franklin

RODRIGUES, Mayra Dias. **Suplementação materna com vitamina c preserva a função endotelial da aorta de ratas adultas que foram obesas durante a infância por supernutrição lactacional**. 2026. (67) f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

RESUMO

A obesidade infantil está relacionada com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares tanto em crianças quanto em adultos. Mulheres obesas apresentam maior risco de desenvolver essas doenças, que pode estar associado a níveis reduzidos de estrógeno. Estratégias para a prevenção da obesidade infantil e de doenças cardiometabólicas são, portanto, de grande interesse. A vitamina C é uma molécula antioxidante que pode ser utilizada como estratégia preventiva e pode ser transferida da mãe para a prole durante a amamentação. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a exposição neonatal à vitamina C durante a lactação poderia prevenir alterações vasculares em ratas provenientes de ninhada reduzida. No terceiro dia pós-natal (DPN), as proles de ratas Wistar foram ajustadas para ninhada normal (NN), com 10 filhotes/mãe, ou ninhada reduzida (NR), com 3 filhotes/mãe, e, as mães receberam suplementação com água (NN e NR) ou vitamina C (NRVITC), na dose de 75 mg/kg/dia, por gavagem, durante o período de lactação. O ganho de peso materno e da prole foi avaliado durante todo o período de suplementação. Após o desmame, foi realizado o acompanhamento da ingestão alimentar e do ganho de peso da prole feminina até a vida adulta. No DPN 120, foram avaliados: pressão arterial e frequência cardíaca, a reatividade vascular da aorta torácica à acetilcolina (ACh) e à fenilefrina (Phe), além da resposta à ACh e ao estrógeno na presença de antagonistas dos receptores de estrógeno α e β , à ACh na presença dos antagonistas indometacina e S-metil, e a análise de marcadores de estresse oxidativo e do sistema antioxidante na aorta e no soro dos animais. As ratas dos grupos NR e NRVITC apresentaram maior ganho de peso antes e após o desmame até a vida adulta, e o grupo NR apresentou aumento da pressão arterial sistólica. A resposta aórtica a Phe não foi diferente entre os grupos, porém a resposta para ACh foi reduzida nas ratas NR, e restaurada no grupo NRVITC, sem alterações na resposta ao estrógeno, a indometacina e ao S-metil. Por fim, o grupo NRVITC apresentou menor atividade da enzima superóxido dismutase, mas aumento da capacidade antioxidante total por aumento dos níveis de glutathione reduzida e aumento do poder redutor através do método de FRAP, enquanto o grupo NR apresentou menor capacidade antioxidante pelo método ABTS. Em conjunto, esses resultados sugerem que a exposição neonatal à vitamina C é capaz de restaurar a função endotelial em ratas fêmeas advindas de ninhada reduzida, e o mecanismo envolvido nessa recuperação pode estar relacionado com a ação antioxidante da vitamina C.

Palavras-chave: Antioxidante; Estrógeno; Ninhada Reduzida; Reatividade vascular.

RODRIGUES, Mayra Dias. **Maternal supplementation with vitamin C preserves aortic endothelial function in adult female rats obese during childhood by postnatal overnutrition.** 2026. (67) pp. Dissertation (Master's degree in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

ABSTRACT

Childhood obesity is associated with the development of cardiovascular diseases in both children and adults. Obese women have a higher risk of developing these diseases, which may be associated with reduced estrogen levels. Therefore, strategies to prevent childhood obesity and cardiometabolic diseases are of great interest. Vitamin C is an antioxidant molecule that may be used as a preventive strategy and can be transferred from the mother to the offspring during lactation. Thus, the aim of this study was to evaluate if neonatal exposure to vitamin C during lactation could prevent vascular alterations in female rats from small litter. On postnatal day 3 (PND3), the offspring of Wistar rats were adjusted to a normal litter (NL), with 10 pups per dam, or to small litter (SL), with 3 pups per dam. The mothers received supplementation with water (NL and SL) or vitamin C (SLVITC) at a dose of 75 mg/kg/day by gavage during the lactation period. Maternal and offspring body weight gain were evaluated throughout the supplementation period. After weaning, food intake and body weight gain of the female offspring were monitored until adulthood. At PND120, the following parameters were evaluated: blood pressure (BP) and heart rate; vascular reactivity of the thoracic aorta to acetylcholine (ACh) and phenylephrine (Phe); as well as the response to ACh and estrogen in the presence of estrogen receptor α and β antagonists, and the response to ACh in the presence of indomethacin and S-methyl. Markers of oxidative stress and the antioxidant system were also assessed. Rats from the SL and SLVITC groups presented higher weight gain before and after weaning until adulthood, and the SL group exhibited increased systolic blood pressure. The aortic response to Phe was not different among the groups; however, the response to ACh was reduced in SL rats and restored in the SLVITC group, with no changes in the responses to estrogen, indomethacin, or S-methyl. Finally, the SLVITC group showed lower activity of the superoxide dismutase enzyme but increased total antioxidant capacity, with higher levels of reduced glutathione and increased reducing power by FRAP, whereas the SL group showed lower total antioxidant capacity by ABTS. Taken together, these results suggest that neonatal exposure to vitamin C can restore endothelial function in female rats from small litter, and the mechanism involved in this recovery may be related to the antioxidant capacity of vitamin C.

Key-words: Antioxidant; Estrogen; Small Litter; Vascular Reactivity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental.....	29
Figura 2 – Ganho de peso materno.....	37
Figura 3 – Ganho de peso corporal da prole	39
Figura 4 – Área sob a curva da ingestão alimentar	40
Figura 5 – Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina e acetilcolina.....	42
Figura 6 – Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina na presença dos antagonistas de estrógeno.....	44
Figura 7 – Curvas de resposta ao estrógeno	46
Figura 8 – Área sob a curva das respostas ao estrógeno	47
Figura 9 – Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina na presença de indometacina e S-metil	48
Figura 10 – Medidas de estresse oxidativo na aorta e no soro	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Ganho de peso materno no início e no final da suplementação.....	37
Tabela 2 – Pressão arterial e frequência cardíaca das ratas adultas dos diferentes grupos experimentais.	40
Tabela 3 – Parâmetros biométricos das ratas adultas no dia da eutanásia de todos os grupos experimentais.....	40
Tabela 4 – Parâmetros biométricos das ratas adultas de todos os grupos experimentais.	41
Tabela 5 – Contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta de ratas adultas provenientes de todos os grupos experimentais.....	42
Tabela 6 – Relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratas adultas provenientes de todos os grupos experimentais.....	43
Tabela 7 – Relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta, na presença ou ausência dos antagonistas dos receptores de estrogênio, de ratas adultas provenientes de todos os grupos experimentais.	44
Tabela 8 – Relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta, na presença ou ausência dos antagonistas indometacina e S-metil, de ratas adultas provenientes de todos os grupos experimentais.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Intervenção nos diferentes grupos experimentais	29
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACh	Acetilcolina
Ang I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
ASC	Área sob a curva
AT ₁ R	Receptor de angiotensina I
AT ₂ R	Receptor de angiotensina 2
BH ₄	Tetraidrobiopterina
CAT	Catalase
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloreto de cálcio di-hidratado
CEUA	Comitê de Ética Para Uso Animal
CNA	Comprimento nasoanal
COX	Ciclooxygenase
DL	Dia lactacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPN	Dia pós-natal
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis 20-nitrobenzóico
E-	Sem endotélio
E+	Com endotélio
E ₂	Estradiol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
ER α	Receptor de estrógeno alfa

ER β	Receptor de estrógeno beta
FC	Frequência cardíaca
FeCl ₃	Cloreto férrico
FRAP	Capacidade redutora férrica para plasma
GPGR	Receptor de estrógeno ligado a proteína G
GSH	Glutathiona Reduzida
IMC	Índice de massa corporal
INDO	Indometacina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ip	Intraperitoneal
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio
L-NAME	N ω -nitro-L-arginina metil éster
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnésio
MPP	Metil-piperidino-pirazol
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzido
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NBT	Nitroazul tetrazólio
NH ₂ OH·HCl	Cloridrato de sódio hidroxilamina
NO	Óxido nítrico
NN	Ninhada normal
NR	Ninhada reduzida
NR VITC	Ninhada reduzida exposta a vitamina C
PAS	Pressão arterial sistólica

PAD	Pressão arterial diastólica
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pD ₂	-log da concentração de um agonista que resulta em 50% da R _{max}
Phe	Fenilefrina
PHTPP	4-[2-fenil-5,7-bis(trifluorometil)pirazol[1,5-a]pirimidina-3-il]fenol
R _{max}	Resposta máxima
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
S-metil	S-metil-isotioureia
SOD	Superóxido Dismutase
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Sistema vascular no desenvolvimento da hipertensão	17
1.2	Obesidade e o modelo de ninhada reduzida.....	20
1.3	Ação do estrógeno no sistema vascular	22
1.4	Vitamina C	23
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo Geral	27
3.2	Objetivos Específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Animais e acasalamento	28
4.2	Tratamento materno.....	28
4.3	Pressão arterial indireta	30
4.4	Acompanhamento de peso e ingestão alimentar	31
4.5	Coleta de tecidos e parâmetros biométricos	31
4.6	Reatividade da aorta torácica	31
4.7	Equilíbrio redox	33
4.7.1	Lipoperoxidação.....	33
4.7.2	Superóxido dismutase	34
4.7.3	Catalase.....	34
4.7.4	Glutathione reduzida	34
4.7.5	Habilidade de redução do ferro pelo método FRAP.....	35
4.7.6	Avaliação de antioxidantes totais pelo método ABTS	35
5	ESTATÍSTICA	36
6	RESULTADOS	37
6.1	Ganho de peso materno	37
6.2	Ganho de peso e ingestão alimentar da prole	38
6.3	Pressão arterial indireta	40
6.4	Parâmetros biométricos	40
6.5	Reatividade vascular.....	41
6.6	Mecanismos envolvidos nas alterações de reatividade vascular	43
6.7	Avaliação de parâmetros relacionados ao equilíbrio redox.....	49
7	DISCUSSÃO	51
8	CONCLUSÃO.....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	ANEXOS	67
	ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 SISTEMA VASCULAR NO DESENVOLVIMENTO DA HIPERTENSÃO

O sistema vascular é composto por vasos que, junto ao coração, mantém o fluxo sanguíneo e fornecem aos tecidos nutrientes, oxigênio e hormônios. Os vasos sanguíneos são envoltos pelo tecido adiposo perivascular e compostos por diferentes camadas, sendo elas: camada adventícia, formada por fibroblastos e tecido conectivo, a camada média, formada pelas células musculares lisas, além de conter colágeno e elastina, e, por fim, a camada íntima, composta por uma monocamada de células endoteliais que fazem a interface entre o sangue e as outras camadas presentes nos vasos. Ainda, a camada íntima tem como suporte uma lâmina basal e tecido conectivo formado por colágeno e fibras elásticas (Bkaily; Jacques, 2023).

Após a formação dos vasos sanguíneos, as células que compõem os vasos alcançam o estado de quiescência que é ativamente mantido por mecanismos regulados pelo fluxo sanguíneo laminar que garante que o endotélio assuma suas funções (Augustin; Koh, 2024). O endotélio, ou camada íntima vascular, controla funções como a de permeabilidade vascular, facilitação do fluxo sanguíneo, além de ter propriedades anticoagulante e antitrombótica (Gimbrone; García-Cardena, 2016). Ainda, tem papel chave para a homeostase vascular e manutenção do tônus vascular, garantindo a perfusão sanguínea e a manutenção da pressão arterial por produzir e liberar mediadores de vasoconstrição e de vasodilatação (Augustin; Koh, 2024).

Os mediadores contráteis provenientes do endotélio incluem endotelina-1, prostanoídes produzidos e liberados por ciclooxigenases (COX), e a angiotensina II (Ang II), potente molécula vasoconstritora que participa da regulação da pressão arterial. Os mediadores de relaxamento são o óxido nítrico (NO) e prostaciclina (Vanhoutte *et al.*, 2017; Bkaily, Jacques, 2023). O NO é um gás sintetizado pelas células endoteliais fundamental para os vasos sanguíneos. Além de ser a principal substância promotora de relaxamento dos macrovasos, o NO também possui papel protetor, atuando na modulação da resposta contrátil do sistema vascular e na redução da formação de placas de ateroma (Vanhoutte *et al.*,

2017).

Junior *et al.* (2019) observaram que a supernutrição pós-natal leva a disfunção endotelial na aorta de ratos *Wistar* avaliados na vida adulta. Recentemente, nosso laboratório demonstrou que ratas *Wistar* adultas, também advindas de ninhada reduzida, apresentaram disfunção endotelial na aorta torácica, com comprometimento na capacidade de relaxamento do vaso. A disfunção endotelial caracteriza-se pela perda ou comprometimento das funções fisiológicas do endotélio, que é causada por um conjunto de fatores. O desequilíbrio entre a produção e liberação de mediadores derivados do endotélio, a presença de estresse oxidativo e alterações no fenótipo das células endoteliais que comprometem sua plasticidade são condições que favorecem um ambiente pró-trombótico, a inflamação vascular e contribuem para o remodelamento vascular e a progressão de doenças (McCarthy *et al.*, 2026). Uma das consequências da disfunção endotelial é a perda na capacidade da manutenção do tônus vascular, condição geralmente atribuída pela redução na resposta vasodilatadora, marcada por um desequilíbrio na produção e/ou biodisponibilidade de mediadores vasorrelaxantes, culminando em alterações na reatividade vascular (Gimbrone, García-Cardena, 2016; Bkaily, Jacques, 2023).

No modelo de ninhada reduzida, o mecanismo envolvido na disfunção endotelial ainda não está completamente esclarecido, mas sugere-se que em machos (Junior *et al.*, 2019) e fêmeas (Moura, 2024) exista um aumento na geração de espécies reativas ao oxigênio (EROs), uma maior ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e de mediadores inflamatórios com comprometimento da produção/biodisponibilidade de NO.

Em vasos de indivíduos com obesidade e em hipertensos há aumento da expressão da enzima COX-2, que resulta na produção de prostanoídes, que são vasoconstritores. Além disso, sabe-se que há aumento da atividade da Ang II em receptores de angiotensina 1 (AT1R), o que causa aumento do estresse oxidativo por diversos mecanismos, dentre eles: i) disfunção mitocondrial, com aumento da geração de EROs e redução da atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), ii) maior expressão/ativação da enzima NADPH oxidase, aumentando a produção de ânions superóxido, e a expressão de genes pró-inflamatórios que favorecem a inflamação vascular. Esses mecanismos podem levar ao desacoplamento da enzima NO sintase endotelial (eNOS), que deixa de

produzir NO e passa a produzir ânion superóxido, contribuindo também para o aumento da geração e liberação de EROs. Com isso, a redução da biodisponibilidade de NO se relaciona tanto com sua menor produção, quanto por aumento de sua oxidação (Ajoolabady; Pratico; Ren, 2024).

A perda da homeostase do endotélio favorece o estabelecimento e a progressão de várias doenças como a aterosclerose e hipertensão. Na obesidade, alterações tanto na função endotelial, quanto na estrutura de vasos podem resultar em hipertensão arterial. Existe uma relação bidirecional entre disfunção endotelial e hipertensão em que tanto o remodelamento vascular quanto o comprometimento da vasodilatação colaboram para o aumento da resistência vascular e, consequentemente, da pressão arterial. Como também, o aumento da pressão arterial contribui para o estresse mecânico e o estiramento da camada endotelial, o que amplifica dano estrutural e disfunção endotelial (McCarthy *et al.*, 2026).

A regulação da pressão arterial é mediada por diferentes fatores, que vão regular o débito cardíaco e a resistência periférica total, e o SRAA tem papel nessa regulação. Indivíduos obesos podem ter o aumento na atividade simpática renal que estimula a secreção de renina. A maior geração de Ang II, pela liberação de renina e angiotensinogênio, e o aumento na retenção de sódio pela liberação de aldosterona, que é estimulada pela Ang II, são alguns mecanismos que podem estar desregulados em indivíduos obesos que podem aumentar a pressão arterial por interferir no volume sistólico e na resistência periférica total (Landsberg *et al.*, 2013).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Hipertensão, a hipertensão arterial se caracteriza por elevação persistente da pressão arterial, sendo considerada hipertensão arterial, em humanos, quando a pressão arterial sistólica é maior ou igual a 140 mmHg e/ou quando a pressão diastólica é maior ou igual a 90 mmHg. Mundialmente, a hipertensão é o maior fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e morte prematura em mulheres, sendo que a partir dos 30 anos o aumento da pressão arterial é mais característico em mulheres do que em homens (Chapman *et al.*, 2023).

O ganho de peso parece ser crucial para o estabelecimento de hipertensão arterial tanto em crianças, quanto em adultos. Em um estudo de coorte, crianças com sobrepeso ou obesas aos 5 e 14 anos, ou com o índice de massa corpórea (IMC) normal aos 5 e obesas aos 14 tiveram aumento nas pressões arteriais sistólica (PAS) e diastólica (PAD), quando comparadas a crianças com IMC

normal nas duas idades. Além disso, em outro estudo, jovens adultos (idade média: 25 anos) que mantiveram IMC dentro de 2 kg/m² do peso basal em consultas durante 15 anos não apresentaram diferenças em PAS e PAD, diferentemente de quem ganhou peso. Como exemplo, mulheres que ganharam peso ao longo desses anos obtiveram aumento em PAS de 9,8 mmHg para 12,5 mmHg (Landsberg *et al.*, 2013).

1.2 OBESIDADE E O MODELO DE NINHADA REDUZIDA

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2021), a obesidade se caracteriza pelo acúmulo excessivo ou anormal de tecido adiposo que pode impactar a saúde do indivíduo. No Brasil, a porcentagem de adultos com obesidade vem aumentando progressivamente, sendo 11,6% em 2006 e passando para 24,8% em 2023, com prevalência em mulheres (Brasil, 2024), assim como a obesidade infantil. Ainda, crianças obesas ou com sobrepeso possuem mais chances de apresentar obesidade na vida adulta e de desenvolver doenças cardiovasculares precocemente (OMS, 2021).

Antigamente, a obesidade era definida com base no índice de massa corpóreo (IMC). No entanto, diretrizes mais recentes têm proposto uma abordagem mais abrangente para sua caracterização. Em 2025, foi incorporado o escore PREVENT, que permite estimar o risco cardiovascular associado à obesidade, considerando não apenas o IMC, mas também parâmetros metabólicos, como pressão arterial, glicemia, colesterol e taxa estimada de filtração glomerular (Saraiva *et al.*, 2025), compreendendo a obesidade como uma doença sistêmica que envolve múltiplos tecidos e sistemas. Assim, a obesidade clínica é definida pela presença de excesso de adiposidade associada a alterações funcionais em tecidos e órgãos (Rubino *et al.*, 2025).

Segundo o conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD), a exposição do indivíduo a determinados fatores ambientais em períodos críticos de desenvolvimento, chamados de janela de plasticidade, como a primeira infância, pode levar a adaptações no desenvolvimento corpóreo que podem torná-lo propenso a doenças ao longo da vida (Hoffman *et al.*, 2021). Isso ocorre porque insultos ocorridos no início da vida podem induzir modificações epigenéticas persistentes no genoma, contribuindo para alterações fenotípicas e em

sistemas regulatórios ao longo da vida (Lisboa *et al.*, 2021). Dentre os fatores ambientais, a alimentação é considerada um agente responsável por essas adaptações. O aumento do consumo de alimentos hipercalóricos e o favorecimento dessa ingestão logo na infância pode estar associada ao desenvolvimento da obesidade infantil.

Na obesidade, o aumento da ingesta alimentar altera o metabolismo de lipídios e carboidratos. O aumento destes nutrientes pode levar ao aumento da atividade mitocondrial e da liberação de radicais livres (Rudich; Kanety; Bashan, 2007; de Oliveira *et al.*, 2010), que, em excesso, podem levar a alterações funcionais dos tecidos, incluindo o sistema vascular. Um dos modelos animais que promove alterações cardiometabólicas, vasculares e de peso em roedores, e permite uma análise integrada das repercussões sistêmicas associadas ao fenótipo obeso é o modelo de ninhada reduzida (Habbout *et al.*, 2012; Habbout *et al.*, 2013; Junior *et al.*, 2019).

O princípio do modelo de ninhada reduzida consiste na redução do tamanho da ninhada de roedores três ou quatro dias após o nascimento, em que são mantidos de três a quatro filhotes por mãe, representando o grupo ninhada reduzida, e oito a doze filhotes por mães em ninhadas controle durante o período de amamentação. Logo, os animais de ninhada reduzida possuem menor competição e, assim, maior ingestão de leite materno do que ratos em ninhada normais, além da composição do leite da mãe ser mais lipídica e menos proteica (Cunha *et al.*, 2009). Como resultado, animais provenientes de ninhada reduzida apresentam maior ganho de peso corporal e adiposidade antes do desmame do que os criados em ninhada normal.

Autores descrevem que a aorta de ratos criados em ninhadas reduzidas possui redução na resposta à acetilcolina e não ao nitroprussiato de sódio, indicando um comprometimento na função endotelial. Já outros observaram redução na resposta dos dois fármacos, o que pode indicar alteração tanto na função endotelial, quanto nas células musculares, além de observarem aumento na resposta vasoconstritora à fenilefrina (Josse *et al.*, 2020). Além de mudanças relacionadas a reatividade vascular, também é observado em roedores desse modelo, aumento nas pressões arteriais sistólica e diastólica, e alterações morfofisiológicas como aumento da espessura e rigidez vascular como consequência do aumento na deposição de colágeno e menor densidade de fibras

elásticas (Josse *et al.*, 2020).

Convém destacar que fêmeas de ninhada reduzida apresentam distúrbios reprodutivos, como desregulação em ciclos estrais, redução de fertilidade, redução no número de folículos primordiais e redução nas concentrações plasmáticas de estradiol. Ratas *Wistar* com 90 dias exibem uma diminuição nos níveis de estrógeno quando comparadas a ratas de ninhada normal (Stopa *et al.*, 2021). De fato, existem diferenças relacionadas ao sexo no modelo de ninhada reduzida, porém, mesmo com os níveis reduzidos de estradiol, ainda se sugere que este hormônio possui um efeito protetor nas fêmeas, atenuando distúrbios metabólicos (Souza; Moura; Lisboa, 2022).

1.3 AÇÃO DO ESTRÓGENO NO SISTEMA VASCULAR

É bem descrito na literatura que o estrógeno é um hormônio sexual com atividade vasoprotetora. Mulheres antes da menopausa possuem menor chance de desenvolver doenças cardiovasculares do que homens. Contudo, de acordo com estudos, há maior propensão em mulheres de desenvolver doenças cardiovasculares associadas a obesidade após a menopausa, e o risco se iguala com os homens mesmo antes desse período, o que pode estar relacionado com a redução dos níveis de estrógeno em mulheres obesas (Faulkner *et al.*, 2019; Faulkner, 2021). Além disso, mulheres obesas são mais propensas a desenvolver hipertensão em comparação a homens obesos (Landsberg *et al.*, 2013).

A via genômica de respostas vasculares do estrógeno estão relacionadas com os receptores nucleares alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$). Estes receptores são intracelulares e, quando ativados, o complexo estrógeno com receptor interage na região promotora de genes com elementos relacionados com a resposta estrogênica, mas, também pode mediar a função de outros fatores de transcrição. O estrógeno também pode gerar respostas rápidas, chamadas de não genômicas (Meyer *et al.*, 2009).

O estrógeno possui um efeito vasodilatador, que envolve mecanismos endoteliais e do músculo liso. Dentre os mediadores da resposta do estrógeno em vasos sanguíneos o mais conhecido é o óxido nítrico (NO) (Fardoun *et al.*, 2020). O estrógeno pode aumentar a atividade da eNOS e sua expressão principalmente pela sinalização de $ER\alpha$, o que resulta em vasodilatação dependente

do endotélio. Todavia, também é possível que o estrógeno promova vasodilatação independente do endotélio pela produção de NO por células musculares lisas em artérias coronárias de porcos (Fardoun *et al.*, 2020).

O ER β também parece ser importante na resposta para este hormônio. Em meios de cultura com alta concentração de glicose e em roedores hipertensos, o estrógeno aumenta a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) em anéis de aorta, o que atenua a resposta à vasoconstrição (Aryan *et al.*, 2020; Sartoretto *et al.*, 2019). ER β também auxilia na redução da pressão arterial e na inibição da proliferação de células musculares lisas, juntamente com sua ação no receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPER). A ação do estrógeno via GPER também possui efeito anti-proliferativo e promove ativação da eNOS em vasos sanguíneos (Meyer *et al.*, 2009).

1.4 VITAMINA C

As espécies reativas ao oxigênio incluem ânions superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, entre outros, e são moléculas altamente instáveis. Os ânions superóxido podem ser gerados no desacoplamento da eNOS, pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, e ainda pela NADPH oxidase que é considerada a maior fonte de EROs no sistema vascular. Os ânions superóxido podem ser rapidamente convertidos em H₂O₂ espontaneamente ou pela enzima SOD, que, apesar de ser um composto mais estável, ainda é uma espécie reativa, e é convertida em água pela enzima catalase (CAT) ou por outros sistemas enzimáticos como a glutathione peroxidase (McCarthy *et al.*, 2026). Estes são considerados como a defesa antioxidante primária. A defesa secundária é composta pela glutathione redutase, que regenera glutathione ao reduzi-la da sua forma oxidada, permitindo que a glutathione reduzida cumpra sua função de neutralizar radicais livres (Gulcin, 2025).

Estresse oxidativo é definido como a incapacidade do sistema antioxidante endógeno superar um aumento súbito ou prolongado da geração de EROs, que contribui para o desequilíbrio redox e danos moleculares. Diferentes fatores podem estar relacionados com esse desequilíbrio como o aumento na oxidação de compostos endógenos e exógenos, inativação de enzimas antioxidantes e redução na produção de moléculas antioxidantes (Gulcin, 2025).

A vitamina C, ou ácido ascórbico, é uma molécula presente em vários alimentos, como frutas cítricas e vegetais, e é considerada um antioxidante natural não-enzimático. Crianças e adultos obesos podem apresentar deficiência deste micronutriente, o que pode favorecer a instalação da inflamação e de estresse oxidativo (Wilson *et al.*, 2024), visto que a vitamina C é considerada um composto essencial para a saúde humana, sendo obtido por meio da dieta, e suas aplicações como agente antioxidante vêm sendo estudadas. Em plantas, desempenha funções importantes como “sequestrador” de radicais livres, cofator de enzimas e comoceptor de elétrons, sendo capaz de reduzir as espécies reativas ao oxigênio e outros radicais livres ao doar elétrons para estes compostos e, assim, reduzir o estresse oxidativo e os danos causados pela oxidação (Padayatty *et al.*, 2003). As funções fisiológicas da vitamina C também se relacionam com essas, além de participar da síntese de hormônios, da transcrição e regulação da tradução gênica (Dosedel *et al.*, 2021).

Por sua ação antioxidante, esta molécula também pode ser importante para prevenção de disfunção endotelial a partir de mecanismo envolvendo a eNOS. A tetraidrobiopterina (BH₄) é utilizada como cofator pela eNOS para síntese de NO pela conversão da l-citrulina em NO. Quando há oxidação da BH₄, a eNOS pode ser desacoplada e passar a produzir ânion superóxido. A vitamina C atua como protetora neste caso por recuperar a BH₄ e por eliminar radicais que podem oxidar esse composto (Mortensen; Lykkesfeldt, 2014). A vitamina C também pode prevenir a disfunção endotelial por reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio em células endoteliais, e, assim, melhorar a biodisponibilidade do NO, como já demonstrado previamente em estudos em que a utilização da vitamina C promoveu aumento da vasodilatação em artérias braquiais de fumantes e de pacientes com doença coronariana (Gokce *et al.*, 1999; Motoyama *et al.*, 1997).

Diferentes estudos observacionais já demonstraram correlação positiva entre o conteúdo de vitamina C no leite materno e a ingestão desta vitamina por mães (Bravi *et al.*, 2016). Ainda, a ingestão materna de vitamina C influencia as concentrações de antioxidantes no leite. De fato, um estudo demonstrou que a suplementação materna com vitamina C, durante a fase lactacional, aumentou a concentração de antioxidantes na progênie exposta (Zarban *et al.*, 2015), sugerindo que há transferência de antioxidantes maternos para a mãe ou que a vitamina C

promove a produção de antioxidantes na prole exposta. Entretanto, ainda não se sabe se a suplementação materna com vitamina C durante a lactação poderia proteger a progênie contra o desenvolvimento de disfunção vascular na vida adulta.

2 JUSTIFICATIVA

Insultos ocorridos no início da vida exercem papel determinante na programação de alterações cardiovasculares ao longo da vida e, como mencionado anteriormente, a obesidade na infância se apresenta como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, e mulheres obesas tem o risco ainda maior de desenvolver essas doenças. Adicionalmente, a deficiência de estrógeno em mulheres com obesidade tem sido associada a prejuízos na função vascular e o estresse oxidativo pode ser um mecanismo central na fisiopatologia dessas alterações. A ação antioxidante da vitamina C pode ter participação na preservação da função endotelial, e, considerando ainda sua possibilidade de ser transferida da mãe para a prole, essa molécula pode ter papel como moduladora de desfechos cardiovasculares programados precocemente.

Estudos que utilizam fêmeas ainda são recentes, e, existe uma escassez de informações na literatura acerca dos efeitos da supernutrição pós-natal em ratas, bem como dos desfechos vasculares da suplementação ou exposição à vitamina C nesse modelo experimental. Este estudo pode ser relevante uma vez que pode haver diferenças sexo-dependentes dos efeitos desse modelo e da vitamina C por mecanismos hormonais, envolvendo principalmente o estrógeno que é um hormônio considerado vasoprotetor em mulheres.

Portanto, a hipótese inicial deste estudo é a de que o tratamento materno com vitamina C durante o período lactacional poderá prevenir a disfunção endotelial de ratas obesas na infância, visto que a sua atividade antioxidante pode reduzir o estresse oxidativo e o perfil inflamatório presente na obesidade. Esse estudo pretende demonstrar que o tratamento com vitamina C pode ser um novo método preventivo para as alterações vasculares presentes na obesidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar se o tratamento materno com vitamina C durante a lactação poderia interferir no desenvolvimento de disfunção endotelial em ratas adultas que foram obesas na infância por superalimentação durante a lactação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a disfunção endotelial em ratas provenientes de ninhada reduzida;
- Avaliar o papel do estrógeno, do estresse oxidativo e da inflamação na disfunção endotelial das ratas provenientes de ninhada reduzida;
- Demonstrar se o tratamento materno com vitamina C preveniria a disfunção endotelial de ratas de ninhada reduzida e investigar os mecanismos envolvidos nessa prevenção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E ACASALAMENTO

Ratos e ratas *Wistar* no dia pós-natal (DPN) 70 foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais permaneceram no Biotério de Farmacologia do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, mantidos em condições padronizadas de temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$; 12 h) e ciclo claro-escuro (luzes acesas às 6:00 da manhã) com acesso livre a ração (Nuvilab, NUVITAL) e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação da UEL (OF. CIRC. CEUA n. 050/2024, protocolo CEUA n. 026.2024).

Após o período de habituação de 7 dias, uma fêmea em pro-estro foi mantida com um macho durante a noite por um período de 12 horas para o acasalamento. Na manhã seguinte, foi realizado o esfregaço vaginal em uma lâmina através da coleta de secreção vaginal utilizando uma pipeta contendo salina, que foi observada a fresco em microscópio de luz. A prenhez foi confirmada pela presença de espermatozoides com ou sem a presença de células características da fase de estro, sendo este dia considerado o dia gestacional (DG) 0. Com a confirmação da prenhez as ratas foram mantidas em gaiolas individuais até o nascimento dos filhotes, e em gaiolas coletivas com seus filhotes até o desmame. Após acasalamento, realizou-se eutanásia dos machos por decapitação. O acompanhamento de peso materno foi realizado durante toda a gestação a cada 5 dias até o nascimento dos filhotes.

4.2 TRATAMENTO MATERNO

Três dias após o nascimento dos filhotes, no DPN 3, o tamanho das ninhadas foi ajustado e foram mantidos 3 filhotes, 2 machos e 1 fêmea, para o grupo ninhada reduzida (NR), e 10 filhotes, 5 machos e 5 fêmeas, para o grupo ninhada normal (NN) com cada mãe. Em seguida, as mães foram tratadas com água ou vitamina C (75mg/kg) por via oral durante a lactação (Quadro 1), logo, o tratamento

materno foi iniciado no dia lactacional (DL) 3 e terminou no DL 20, um dia antes do desmame. Assim, as ratas e suas ninhadas foram distribuídas em três grupos experimentais: 1) NN + água, 2) NR + água e 3) NR + vitamina C. A dose foi determinada considerando a quantidade diária de consumo de vitamina C recomendada para uma mulher adulta, de acordo com o Instituto de Medicina dos Estados Unidos (2000). Durante o período de tratamento, foram avaliados nas mães sinais de toxicidade, como mudanças comportamentais (agitação ou letargia), alterações neurológicas (convulsão, tremor, rigidez muscular e hiperreflexia) e sinais autonômicos (lacrimejamento, piloereção, alteração pupilar). As mães foram pesadas todos os dias e os filhotes foram pesados nos DPN 3, 6, 9, 12, 15, 18 e 21.

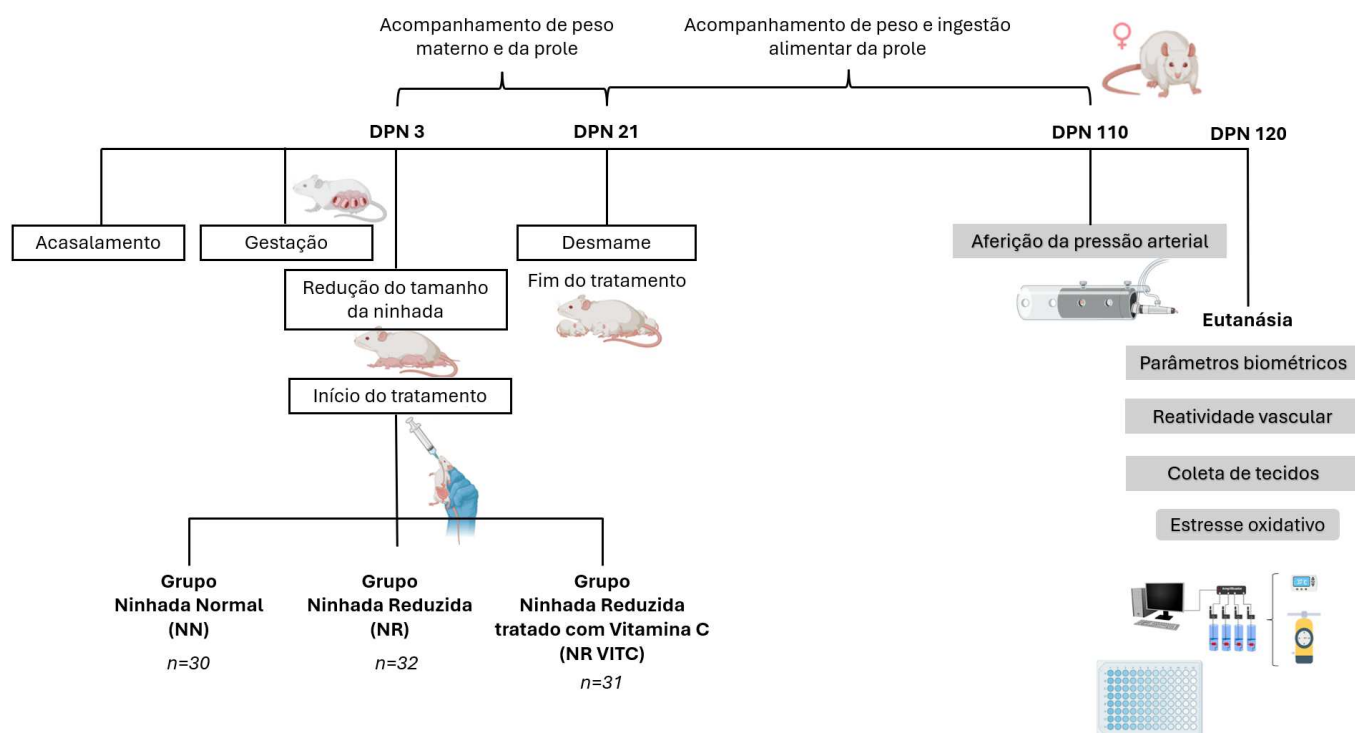
Após o desmame, a progênie feminina foi mantida em gaiolas coletivas, com 3 a 4 ratas por gaiola para os grupos NR e com 5 ratas por gaiola para o grupo NN. Também foram avaliados peso e ingestão alimentar a cada 5 dias do DPN 21 ao DPN 120 (detalhes descritos no item 5.4). Os experimentos foram realizados apenas na progênie feminina na vida adulta e em estro-fisiológico para reduzir a interferência das variações hormonais do ciclo estral sobre a função vascular (Higashi *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2023; Vidigal *et al.*, 2022). Todo o protocolo experimental está descrito na Figura 1.

Quadro 1 – Grupos experimentais.

Grupos	Intervenção
Ninhada normal (NN):	Ratas (n=17) - água administrada por gavagem.
Ninhada reduzida (NR):	Ratas (n=32) - água administrada por gavagem.
Ninhada reduzida exposta à vitamina C (NRVITC):	Ratas (n=31) – vitamina C administrada por gavagem.

Intervenção nos diferentes grupos experimentais.

Figura 1 – Delineamento experimental.



Fonte: o próprio autor.

DPN: dia pós-natal; RT-PCR: Reação em cadeia de polimerase; n: número de animais por grupo.

4.3 PRESSÃO ARTERIAL INDIRETA

No DPN 110, as pressões arteriais sistólica e diastólica, e a frequência cardíaca foram medidas pelo método indireto de pletismografia de cauda, utilizando o equipamento CODA, Kent 19 Scientific, Torrington, CT, como previamente descrito por nosso grupo (Novi *et al.*, 2021). Para isso, as ratas foram colocadas em um cilindro de acrílico para imobilização, com abertura para o focinho e a cauda, e depois foram posicionadas em uma plataforma aquecida cuja temperatura foi mantida constante até o final do experimento. Após, um oclutor e um sensor de pressão foram posicionados na porção proximal da cauda da rata consciente juntamente com um manguito inflável. Ao bombear ar para o manguito e, em seguida, liberar a pressão, o sensor foi capaz de registrar a pressão arterial dos animais.

Inicialmente, os animais foram ambientados no aparelho durante 10 medições de aclimação que não foram utilizadas na computação dos resultados. A seguir, foram obtidas 20 leituras para cada animal, sendo os valores obtidos como

resultado provenientes das médias de 10 leituras estáveis e homogêneas.

4.4 ACOMPANHAMENTO DE PESO E INGESTÃO ALIMENTAR

A progênie feminina de todos os grupos teve o consumo alimentar e o ganho de peso corporal monitorados a cada 5 dias, do DPN 21 até o DPN 110. Para tanto, as ratas receberam uma quantidade conhecida de ração e 24h depois essa ração foi pesada. O cálculo da ingestão alimentar foi realizado utilizando a seguinte fórmula: $(\text{peso inicial da ração} - \text{peso da ração após 24 h}) / \text{número de animais por gaiola}$.

4.5 COLETA DE TECIDOS E PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

A partir do DPN 120, as ratas foram pesadas e anestesiadas (tiopental sódico, 40 mg/kg, i.p.) para a eutanásia e coleta de tecidos. Após anestesia, o comprimento nasoanal (cm) foi medido com o auxílio de uma régua. Em seguida, os tecidos adiposos perigonadal e retroperitoneal, o útero e os ovários direito e esquerdo foram removidos e pesados. Além disso, o sangue foi coletado e centrifugado a 3500 rpm, por 20 min a 4°C para obtenção do soro dos animais. Segmentos da aorta torácica foram coletados, dissecados e armazenados a -80°C para as análises de estresse oxidativo. Os pesos dos órgãos e tecidos foram normalizados pelo peso corporal de cada animal. O índice de Lee foi calculado utilizando-se a raiz cúbica do peso corporal, em gramas, dividida pelo comprimento nasoanal, multiplicado por 100 (Bernardis; Patterson, 1968).

4.6 REATIVIDADE DA AORTA TORÁCICA

A partir do DPN 120, as fêmeas dos diferentes grupos experimentais foram anestesiadas com tiopental sódico (40mg/kg, i.p) para a remoção da aorta torácica, como previamente descrito pelo nosso grupo (Higashi *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2023). Para avaliação da reatividade *ex vivo*, a aorta foi seccionada em quatro segmentos (3mm de comprimento) e, para analisar a influência do endotélio sobre a resposta vascular, em alguns anéis a monocamada de células endoteliais foi removida mecanicamente utilizando um gancho de metal e algodão (anéis de aorta

E-), e em outros, a camada endotelial foi preservada (anéis de aorta E+). Esses anéis de aorta foram montados em um banho de órgãos isolados, contendo solução de Krebs-Henseleit modificada (em mM: 118 NaCl, 4.7 KCl, 25 NaHCO₃, 2.5 CaCl₂.2H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄.7H₂O, 11 glucose, e 0.01 EDTA), aerados com 95% de O₂ e 5% de CO₂ a 37 °C e pH 7,4. A integridade das células musculares lisas foi verificada por meio da adição de KCl (cloreto de sódio: 90mM) e a integridade do endotélio por meio do relaxamento causado pela acetilcolina (ACh: 3 µM, #A6625, Sigma-Aldrich®, EUA) em anéis contraídos com concentração submáxima de fenilefrina (Phe: 3 µM, #P6126, Sigma-Aldrich®, EUA). O endotélio foi considerado removido se o relaxamento induzido por ACh foi menor que 5% em relação à contração com Phe. Posteriormente, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para Phe (1nM-300µM) ou ACh (1nM-30µM). As respostas vasoconstritoras estão expressas como gramas (g) de tensão e as de relaxamento expressas como porcentagem (%) de relaxamento em relação a contração induzida por Phe. A resposta máxima (R_{máx}) e o log da concentração do agonista que resultou em 50% da R_{máx} (pD₂) foram obtidos a partir das curvas e calculados utilizando uma análise de regressão não-linear (GraphPad Prism software, EUA).

Em uma outra série de experimentos, para avaliar os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial, curvas concentração-efeito cumulativas foram performadas para ACh, na presença dos antagonistas de ERα e ERβ) metil-piperidino-pirazol (MPP: 1 µmol/L, #M7068, Sigma-Aldrich®, EUA) e 4-[2-fenil-5,7-bis(trifluorometil)pirazol[1,5-a]pirimidin-3-il]fenol (PHTPP: 1 µmol/L, #SML1355, Sigma-Aldrich®, EUA), respectivamente; da indometacina (INDO: 0,1 µmol/L, #I7378, Sigma-Aldrich®, EUA), inibidora não seletiva da COX; e do S-metil-isotioureia (S-metil: 1 µmol/L, #M84445, Sigma-Aldrich®, EUA), inibidor mais seletivo da iNOS. A partir dessas curvas, a R_{máx} e o pD₂ foram obtidas e novamente calculadas através da análise de regressão não-linear (GraphPad Prism software, EUA).

Além disso, para avaliar o papel do estrógeno na função vascular, curvas para este hormônio (E₂: 30 µmol/L, #E2758, Sigma-Aldrich®, EUA) foram realizadas em anéis E- e E+ na presença ou não dos seguintes antagonistas ou inibidores: MPP, PHTPP, e, L-NAME (Nω-nitro-L-arginina metil éster: 10 µmol/L,

#N5501, Sigma-Aldrich®, EUA), um inibidor não seletivo da eNOS. A análise das curvas para o estrógeno foi realizada através da área sob a curva.

4.7 EQUILÍBRIO REDOX

A aorta torácica foi homogeneizada em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos na temperatura de 4°C. O sobrenadante resultante foi separado e armazenado sob refrigeração. A quantificação de proteínas foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, sendo a absorbância medida a 595 nm. Para a curva de calibração, uma solução de BSA 1mg/ml foi diluída em soluções nas concentrações de 0,06 mg/mL, 0,12 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL e 1 mg/mL, e estas submetidas à reação de Bradford.

A partir das leituras obtidas e da curva de calibração, foram realizados cálculos para a diluição das amostras de modo que a concentração final de proteínas de cada amostra fosse 1 mg de proteína/ml.

4.7.1 Lipoperoxidação

As medidas dos produtos de lipoperoxidação de membrana foram determinadas pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com Federici *et al.* (2007), que quantifica o malonaldeído (MDA), principal subproduto da peroxidação lipídica celular. Para o preparo do teste, 50 µL de cada amostra normalizada foram pipetados em duplicata em uma microplaca, seguido da adição de 5 µL de cloreto férrico (FeCl₃), 5 µL de ácido ascórbico, 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) e 50 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) e colocado em banho-maria a 90° C por 15 minutos. A placa foi imediatamente resfriada em gelo para interromper a reação e, em seguida, lida a 535 e 572 nm. A lipoperoxidação (LPO) foi estimada corrigindo a quantidade de proteína, e os resultados estão expressos em nmol de TBARS por mg de proteína.

4.7.2 Superóxido dismutase

A atividade da enzima SOD foi determinada de acordo com o descrito por Senthilkumar e colaboradores (2021) com algumas alterações. A avaliação ocorreu através da quantificação de complexos formados por ânions superóxido com a adição de azul de nitrotetrazólio (NBT) e cloridrato de sódio hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) de coloração amarelada com a redução do NBT, formando coloração azulada.

Portanto, foi preparada uma mistura reacional contendo tampão carbonato de sódio (50mM, pH 10,2), NBT (96 μM) e Triton X-100 (0,6%), que foi incubado por 2 minutos com $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (20 mM, pH 6,0). O volume final foi ajustado para 200 μL . Os resultados estão expressos em U/mg de proteína, sendo U a quantidade de enzima necessária para inibir a redução do cromogênio em 50%.

4.7.3 Catalase

A atividade enzimática da CAT foi determinada pela degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Aebi, 1984). Foram pipetados 3 μL do branco (PBS) ou 3 μL das amostras em triplicata e 297 μL de meio de reação, contendo Tris-HCl e peróxido de hidrogênio, em uma microplaca de UV e lido a 240nm em intervalos de 15 segundos por 1 minuto (Aebi, 1984). Os dados estão expressos em $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$.

4.7.4 Glutathiona reduzida

Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) foram determinados de acordo com o método proposto por Rahman e colaboradores (2006), com algumas modificações, utilizando ácido 5,5'-ditiobis 20-nitrobenzóico (DTNB) no homogenato, evidenciado pela formação da cor amarela. DTNB, nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e glutathiona redutase foram adicionados no homogenato e os níveis de GSH foram medidos a 412 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia), com os resultados expressos em $\mu\text{mol/mg}$ de proteína.

4.7.5 Habilidade de redução do ferro pelo método FRAP

O ensaio de FRAP (capacidade redutora férrica para plasma) foi realizado no soro dos animais para medir a capacidade antioxidante das amostras em reduzir o complexo de íons férricos (Fe^{3+})-ligante para o complexo ferroso (Fe^{2+}). As amostras foram centrifugadas a 200g por 10 minutos na temperatura de 4°C. Uma alíquota das amostras reagiu com o reagente FRAP, composto por cloreto férrico (20 mM) e 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ, 10 mM) em tampão acetato (0,3 mM, pH 3,6), e absorbância foi medida a 595nm após 15 minutos de incubação (Multiskan GO, ThermoScientific). A capacidade redutora do soro foi comparada com uma curva padrão de Trolox (0,4–400 nmol) e os resultados expressos como nmol de equivalentes de Trolox por mL de soro.

4.7.6 Avaliação de antioxidantes totais pelo método ABTS

O ensaio de ABTS consiste na medição da capacidade das amostras em neutralizar o radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ($\text{ABTS}^{\bullet+}$), cuja intensidade da coloração diminui na presença de antioxidantes. O teste também foi realizado no soro e as amostras inicialmente centrifugadas a 200g por 10 minutos a 4°C. Uma alíquota de amostra reagiu com a solução diluída de ABTS (7 mM em persulfato de potássio), e a absorbância foi medida a 730 nm (Multiskan GO, ThermoScientific) após incubação de 6 minutos. Os resultados obtidos também foram comparados com uma curva padrão de Trolox (0,4–400 nmol) e expressos como Trolox (nmol) por mL de soro.

5 ESTATÍSTICA

Inicialmente, foi realizada uma análise exploratória com o objetivo de avaliar a distribuição e homogeneidade de variância de cada variável (testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov). Foram conduzidas análises paramétricas seguidas de pós-teste de Tukey ou Bonferroni em variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade e os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade, os dados foram submetidos aos testes não-paramétricos, apresentados como mediana (1º e 3º quartil) seguidos de pós-teste de Dunn. Os testes estatísticos empregados neste estudo foram:

- ANOVA de efeitos mistos: ganho de peso materno e da prole antes e após o desmame;

- ANOVA de uma via: áreas sob a curva das curvas de estrógeno; pressão arterial diastólica; peso no dia da eutanásia, CNA e índice de Lee; peso do útero; R_{máx} e pD₂ das curvas de reatividade vascular; análises de estresse oxidativo (SOD, CAT, LPO e ABTS);

- Kruskal-Wallis: áreas sob a curva do ganho de peso materno e da ingestão alimentar; pressão arterial sistólica e frequência cardíaca; pesos dos tecidos adiposos e ovários; GSH e FRAP.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e as análises realizadas utilizando o Software Prism 8 (GraphPad Prism® Software, Inc., San Diego, CA).

6 RESULTADOS

6.1 GANHO DE PESO MATERNO

Durante o período de suplementação, as mães de todos os grupos apresentaram ganho de peso [interação ao longo do tempo: $F(4,716, 362,1) = 52,63$; $p < 0,0001$] (Figura 1A), sem interação entre os grupos experimentais [$F(2, 77) = 1,068$; $p = 0,3487$], portanto a suplementação não interferiu no ganho de peso materno. Esse resultado também é evidenciado pela análise da área sob a curva (ASC), apresentada na Figura 1B. Além disso, o peso corporal no início do tratamento, no terceiro dia de lactação (DL 3), e ao final do período de intervenção (DL 20) permaneceu semelhante entre as mães de todos os grupos. No entanto, o grupo NN apresentou maior delta de ganho de peso em comparação as mães dos grupos NR e NR VITC (Tabela 1).

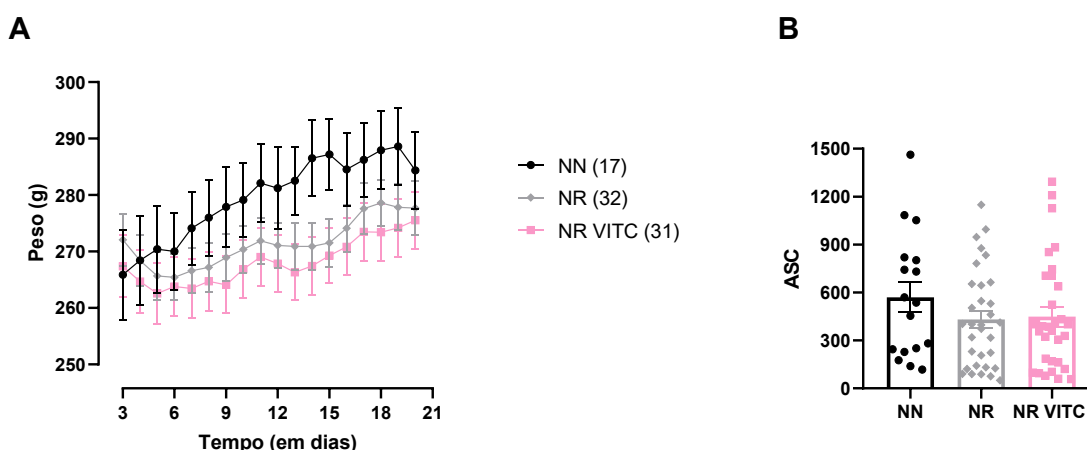


Figura 2. Ganho de peso materno (A) e área sob a curva (ASC) (B) do ganho de peso materno de mães suplementadas com água [ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR)] ou vitamina C [ninhada reduzida (NR VITC)], do terceiro dia de lactação (DL 3) até o vigésimo dia de lactação (DL 20). Os dados estão expressos como mediana (1^o–3^o quartis), ANOVA de efeitos mistos e Kruskal-Wallis, $n = 17$ –32 ratas/grupo.

Tabela 1. Ganho de peso materno no início e no final da suplementação.

Grupos	Peso corporal (g)		
	NN (17)	NR (32)	NR VITC (31)
DL 3	265,9±7,9	272,1±4,5	267,4±5,5
DL 20	284,4±6,8	279,9±4,4	275,5±5,0
Δ	18,4±3,9	7,8±2,1*	8,1±2,3*

Mães suplementadas com água [ninhada normal (NN) e ninhada reduzida (NR)] ou vitamina C [ninhada reduzida (NR VITC)]. Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via, seguido de pós-teste de Tukey. * $p < 0,05$ vs. NN.

6.2 GANHO DE PESO E INGESTÃO ALIMENTAR DA PROLE

A partir do DPN 6 (Figura 3A) [interação ao longo do tempo: $F(1,564, 140,5) = 4207$; $p < 0,0001$; interação entre os grupos em relação à suplementação com vitamina C: $F(2, 90) = 45,17$; $p < 0,0001$], até os dias pós-natais 80 e 85 [interação ao longo do tempo: $F(2,098, 182,4) = 3165$; $p < 0,0001$; interação entre os grupos em relação à suplementação com vitamina C $F(2, 90) = 6,850$; $p < 0,0017$] (Figura 3B), as ratas dos grupos NR e NR VIT C, respectivamente, apresentaram maior ganho de peso corporal em comparação ao grupo NN. Após essas idades, os valores de ganho de peso corporal se igualaram entre as ratas dos diferentes grupos, e a suplementação materna com vitamina C não interferiu no ganho de peso da prole. A ingestão alimentar, avaliada após o desmame até a vida adulta, também foi semelhante entre os grupos experimentais (Figura 4).

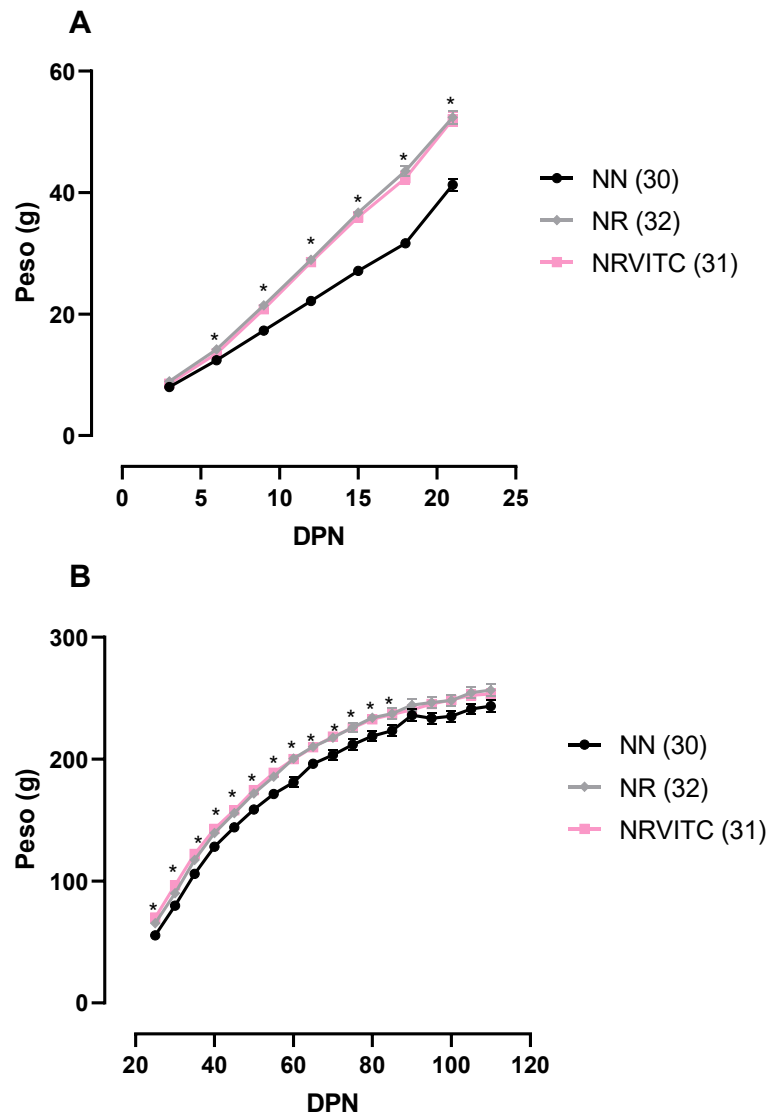


Figura 3. Ganho de peso corporal de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VITC): (A) antes do desmame, e (B) após o desmame do dia pós-natal 21 (DPN 21) até o dia pós-natal 110 (DPN 110). Os dados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), ANOVA de efeitos mistos seguida de pós-teste de Tukey, $n = 30$ -32 ratas/grupo. * $p < 0,05$ vs. NN.

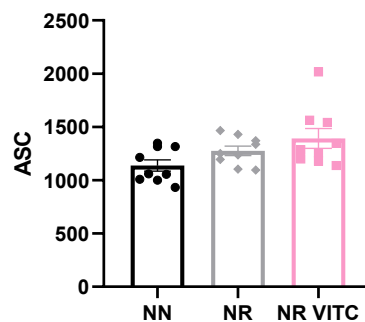


Figura 4. Área sob a curva da ingestão alimentar de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VITC). O consumo de ração foi avaliado do dia pós-natal 21 ao dia pós-natal 110. Os dados estão expressos como mediana (1º–3º quartis), Kruskal-Wallis, $n = 30\text{-}32$ ratas/grupo. $p > 0,05$.

6.3 PRESSÃO ARTERIAL INDIRETA

Na vida adulta, a pressão arterial sistólica estava aumentada nas ratas do grupo NR em comparação ao grupo NN (Tabela 2), sem interferência da suplementação com vitamina C nesse parâmetro. Não houve diferenças na pressão arterial diastólica e na frequência cardíaca entre os grupos experimentais.

Tabela 2. Pressão arterial e frequência cardíaca das ratas adultas dos diferentes grupos experimentais.

DPN 120			
Grupos	NN (14)	NR (17)	NR VITC (14)
PAS (mmHg)	118 (111-122)	125 (122-131)*	120 (112-134)
PAD (mmHg)	82,8±2,4	88,5±1,7	85,6±3,1
FC (bpm)	354 (339-390)	362 (341-385)	355 (344-399)

Pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD) e frequência cardíaca (FC) de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VITC), avaliadas no dia pós-natal 110. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e mediana (1º–3º quartis), ANOVA de uma via e Kruskal-Wallis. ($n = 14\text{-}17$ ratas/grupo. * $p < 0,05$ vs. NN).

6.4 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

No dia da eutanásia (DPN 120), o peso corporal das ratas dos grupos NR foi maior em comparação ao grupo NN (Tabela 3). O comprimento nasoanal e o índice de Lee, assim como os pesos dos órgãos e tecidos, foram semelhantes entre os grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros biométricos das ratas adultas no dia da eutanásia de todos os grupos experimentais.

DPN 120			
Grupos	NN (30)	NR (32)	NR VITC (31)
Peso corporal (g)	245,1±3,8	260,9±4,8*	259,0±4,1
CNA (cm)	21,4±0,1	21,9±0,1	21,9±0,1
Índice de Lee (g^{1/3}/cm)	29,1±0,1	29,1±0,1	29,0±0,1

Parâmetros biométricos de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VITC), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). CNA: comprimento naso-anal. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via. * $p < 0,05$ vs. NN. (n) = 30-32 ratas/grupo.

Tabela 4. Parâmetros biométricos das ratas adultas de todos os grupos experimentais.

DPN 120			
Grupos	NN (16)	NR (14)	NR VITC (12)
TA retroperitoneal (g/100g)	0,61 (0,52-0,78)	0,72 (0,58-1,07)	0,78 (0,62-0,99)
TA perigonadal (g/100g)	0,52 (0,38-0,71)	0,59 (0,47-0,94)	0,49 (0,37-0,74)
Útero (g/100g)	0,21±0,01	0,22±0,01	0,20±0,01
Ovário E. (g/100g)	0,023 (0,019-0,027)	0,022 (0,019-0,024)	0,021 (0,016-0,024)
Ovário D. (g/100g)	0,022 (0,018-0,024)	0,022 (0,019-0,024)	0,020 (0,019-0,022)

Parâmetros biométricos de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Ovário E.: ovário esquerdo; Ovário D.: ovário direito; TA: tecido adiposo. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM) e mediana (1^o–3^o quartis), ANOVA de uma via e Kruskal-Wallis. $p > 0,05$. (n) = 12-16 ratas/grupo.

6.5 REATIVIDADE VASCULAR

Embora a contração induzida pela Phe tenha sido maior nos anéis de aorta E– em comparação à resposta observada nos anéis E+ em todos os grupos, a resposta da aorta a esse agonista não diferiu entre os grupos experimentais NN, NR e NR VIT C (Figura 5A).

Por outro lado, na aorta das ratas do grupo NR, foi observada uma redução da resposta máxima para ACh em comparação às respostas do grupo NN (Figura 5B). No entanto, nas ratas NR VIT C, o relaxamento induzido por ACh na aorta não diferiu daquele observado no grupo NN e foi aumentado em relação ao grupo NR, demonstrando que a suplementação com vitamina C recuperou a

resposta vasodilatadora. Os valores de R_{max} e pD_2 para os agonistas estão descritos nas Tabelas 5 e 6, respectivamente.

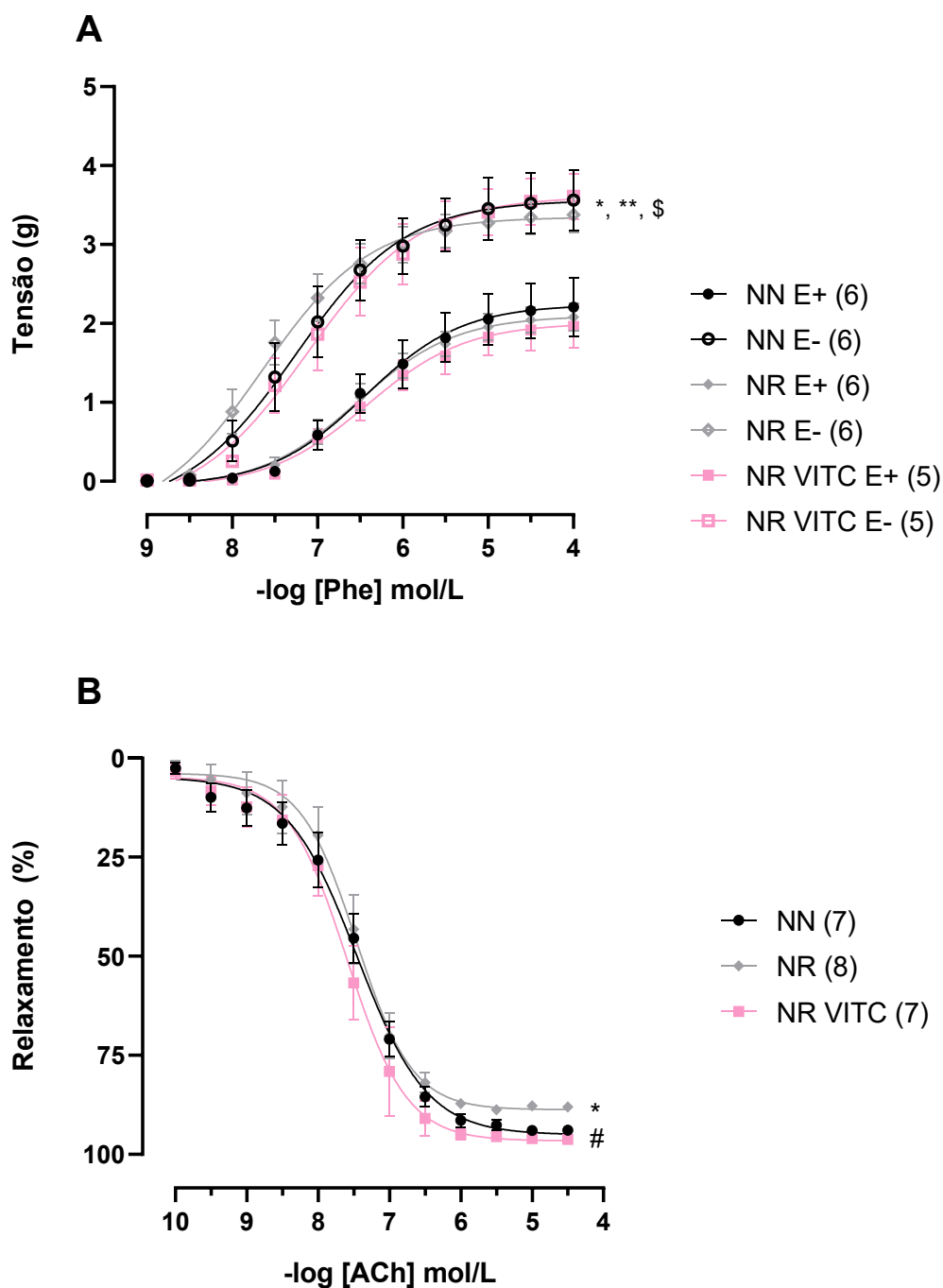


Figura 5. Curvas concentração–efeito cumulativas para fenilefrina (A) e acetilcolina (B) em anéis de aorta com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. * $p < 0.05$ vs E+ NN, ** $p < 0.05$ vs E+ NR; \$ $p < 0,05$ vs. E+ NR VITC; # $p < 0,05$ NR VITC vs NR.

Tabela 5. Contração induzida por fenilefrina em anéis de aorta de ratas adultas provenientes de todos os grupos experimentais.

DPN 120			
E+			
Grupos	NN (6)	NR (6)	NR VITC (5)
Rmax (g)	2,20±0,36	2,06±0,15	2,06±0,27
pD ₂	6,34±0,13	6,51±0,15	6,39±0,11
E-			
Rmax (g)	3,46±0,38*	3,27±0,20**	3,57±0,28\$
pD ₂	7,24±0,22*	7,59±0,17**	7,05±0,28\$

Resposta máxima (maxR) e pD₂ (-log da concentração do agonista que resulta em 50% da resposta máxima) à fenilefrina em anéis de aorta com endotélio (E+) ou sem endotélio (E-) de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. *p < 0.05 vs E+ NN, **p < 0.05 vs E+ NR; \$p < 0,05 vs. E+ NR VITC

Tabela 6. Relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta de ratas adultas provenientes de todos os grupos experimentais.

DPN 120			
Grupos	NN (7)	NR (8)	NRVITC (7)
Rmáx (%)	93,12±0,76	88,57±0,84*	95,27±1,03#
pD ₂	7,49±0,09	7,41±0,12	7,57±0,18

Resposta máxima (maxR) e pD₂ (-log da concentração do agonista que resulta em 50% da resposta máxima) à acetilcolina em ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via. *p < 0.05 vs NN, #p < 0,05 NR VITC vs NR.

6.6 MECANISMOS ENVOLVIDOS NAS ALTERAÇÕES DE REATIVIDADE VASCULAR

Para avaliar o papel do estrógeno na redução da resposta vasodilatadora dependente do endotélio observada na aorta de ratas do grupo NR, anéis de aorta foram incubados com antagonistas dos receptores de estrógeno ERα e ERβ, MPP e PHTPP, respectivamente, e o relaxamento induzido pela ACh foi avaliado (Figura 6). Como demonstrado, a resposta da aorta à ACh na presença dos antagonistas foi semelhante entre os grupos experimentais. Os valores de Rmax e pD₂ estão apresentados na Tabela 7.

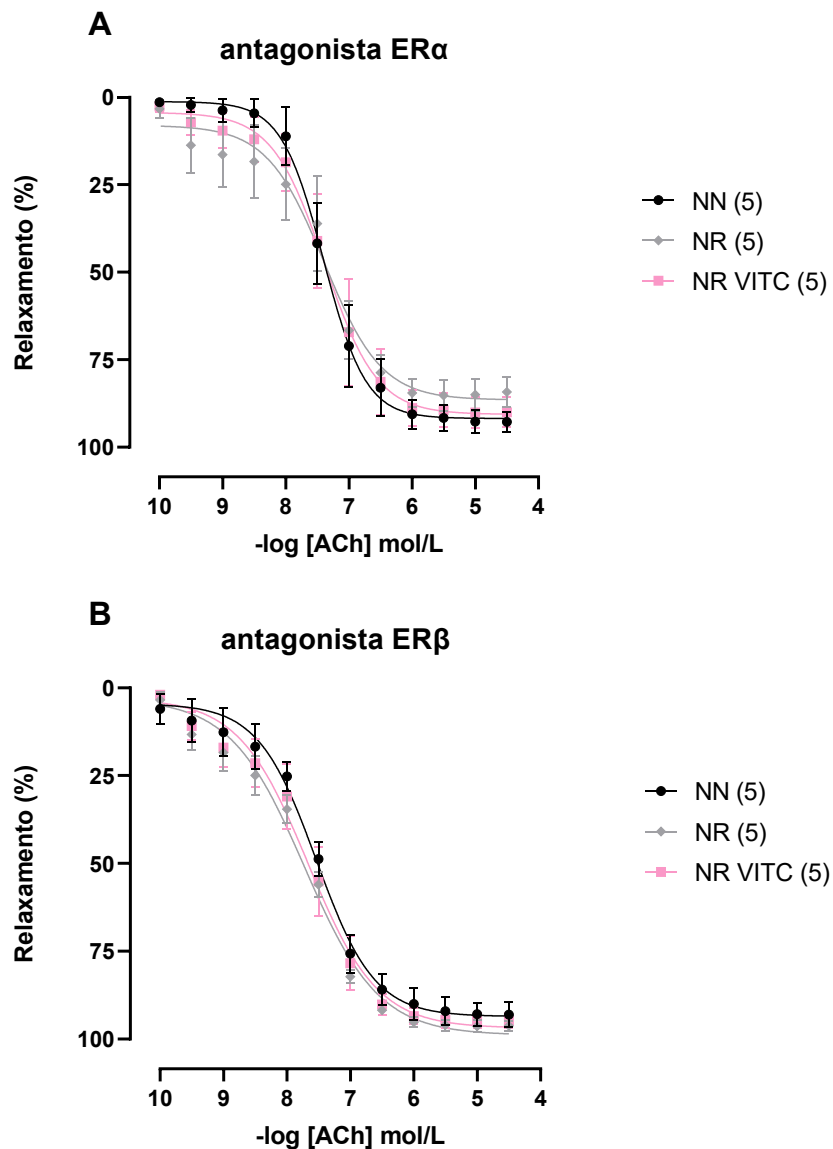


Figura 6. Curvas concentração–efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de aorta, na presença dos antagonistas dos receptores de estrógeno ER α (A) e ER β (B) de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via. $p > 0,05$.

Tabela 7. Relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta, na presença ou ausência dos antagonistas dos receptores de estrogênio, de ratas adultas provenientes de todos os grupos experimentais.

DPN 120			
antagonista ER α			
Grupos	NN (5)	NR (5)	NR VITC (5)

R_{máx} (%)	91,77±3,29	85,56±3,65	89,46±4,64
pD₂	7,37±0,18	7,57±0,31	7,37±0,21
antagonista ERβ			
Grupos	NN (5)	NR (6)	NR VITC (5)
R_{máx} (%)	91,52±3,48	95,36±1,10	93,58±2,01
pD₂	7,57±0,13	7,79±0,14	7,69±0,23

Resposta máxima (maxR) e pD₂ (-log da concentração do agonista que resulta em 50% da resposta máxima) aos antagonistas de estrógeno em ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via. $p > 0,05$.

Além disso, a resposta da aorta ao E₂ também foi avaliada em anéis com endotélio na presença ou ausência de MPP e PHTPP, L-NAME e em anéis E- (Figura 7). O estrógeno foi adicionado aos anéis de aorta contraídos com concentração submáxima de Phe e as respostas foram registradas por um período de 30 minutos e os dados apresentados como ASC (Figura 8). Não foram observadas diferenças na resposta da aorta para o relaxamento produzido pelo estrógeno nos grupos NN, NR e NR VIT C tanto na presença quanto na ausência dos antagonistas dos receptores de estrógeno, nem em anéis sem endotélio e em anéis incubados com L-NAME.

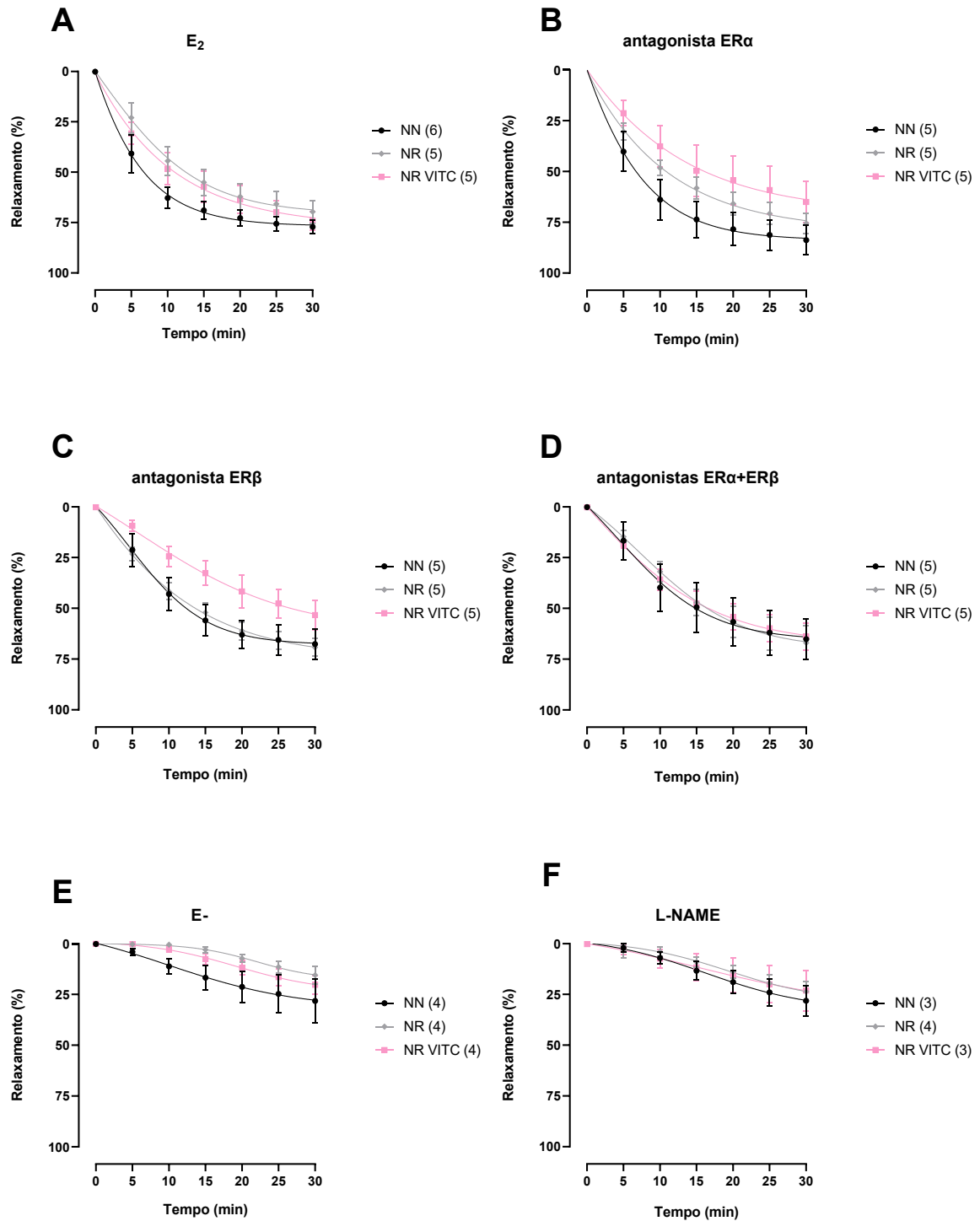


Figura 7. Curvas de resposta ao estrógeno em anéis de aorta com endotélio (A) na presença ou ausência dos antagonistas dos receptores de estrógeno $ER\alpha$ e $ER\beta$ (B, C, D), sem endotélio (E^-) (E) e na presença de *N* ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (F), de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Área sob a curva. $p > 0,05$.

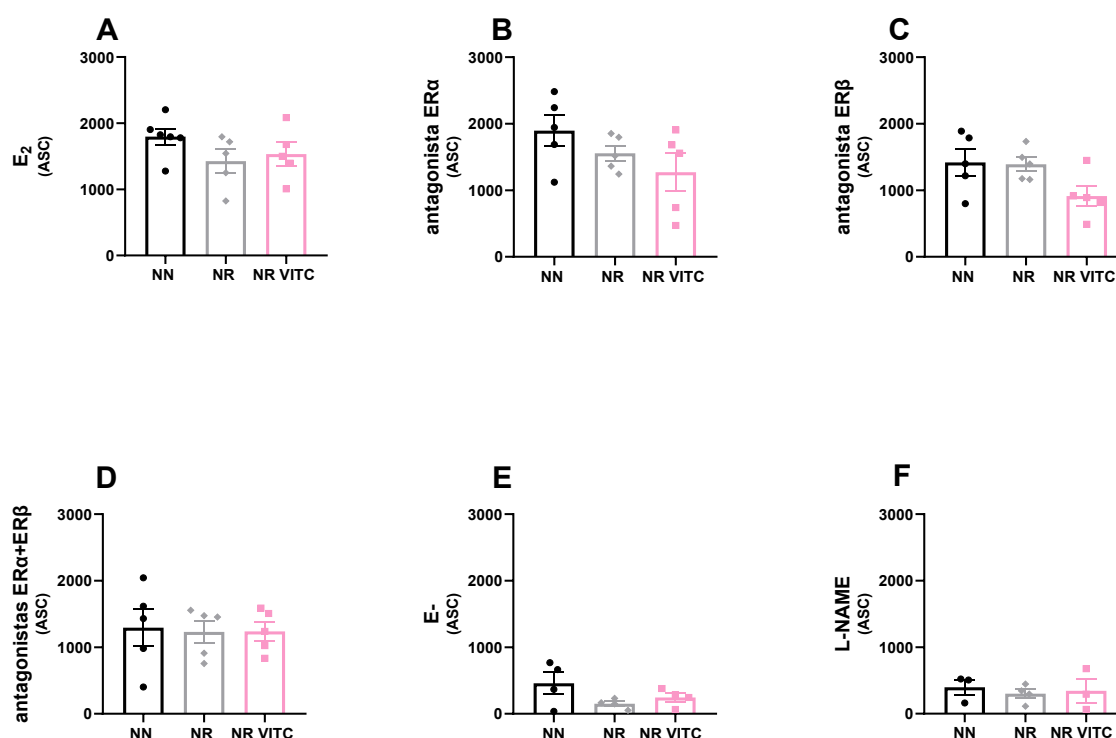


Figura 8. Área sob a curva das respostas ao estrógeno (E_2) em anéis de aorta com endotélio (A), na presença ou ausência dos antagonistas dos receptores de estrógeno $ER\alpha$ e $ER\beta$ (B, C, D), sem endotélio (E^-) (E) e na presença de *N*- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (F), de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VITC), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via. $p > 0,05$.

Por fim, foi avaliado o papel de mediadores inflamatórios no prejuízo da resposta para ACh observado em anéis de aorta de ratas NR. Para tanto, os anéis de aorta foram incubados com INDO e S-metil, porém não foram observadas diferenças entre as respostas dos grupos experimentais no relaxamento induzido por ACh na presença desses inibidores (Figura 9). Os valores de R_{max} e pD_2 estão apresentados na Tabela 8.

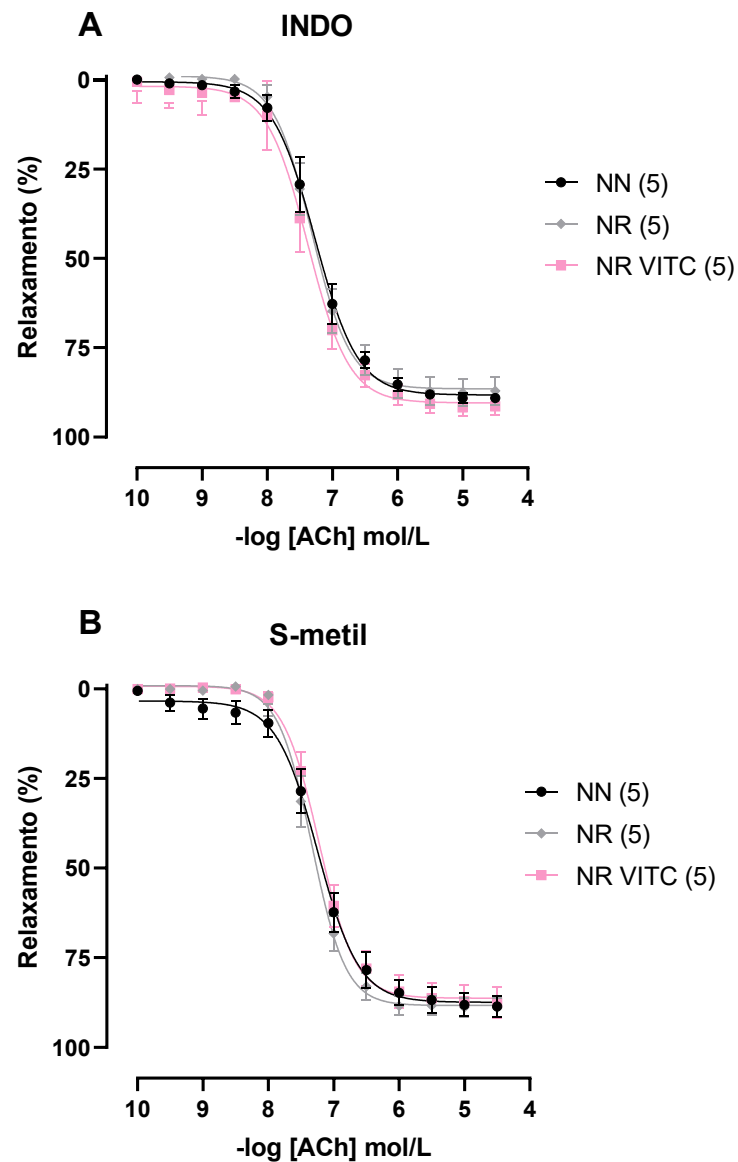


Figura 9. Curvas concentração–efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de aorta, na presença dos antagonistas indometacina (INDO) (A) e S-metil (B), respectivamente, de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via. $p > 0,05$.

Tabela 8. Relaxamento induzido por acetilcolina em anéis de aorta, na presença ou ausência dos antagonistas indometacina e S-metil, de ratas adultas provenientes de todos os grupos experimentais.

DPN 120			
INDO			
Grupos	NN (5)	NR (5)	NR VITC (5)

R_{máx} (%)	88,76±1,01	87,10±3,87	89,53±2,45
pD₂	7,28±0,09	7,31±0,08	7,43±0,12
S-metil			
Grupos	NN (5)	NR (5)	NR VITC (5)
R_{máx} (%)	86,76±3,41	88,37±2,40	86,28±4,21
pD₂	7,24±0,06	7,33±0,07	7,22±0,06

Resposta máxima (maxR) e pD₂ (-log da concentração do agonista que resulta em 50% da resposta máxima) aos antagonistas indometacina (INDO) e S-metil em ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média (EPM), ANOVA de uma via. $p > 0,05$.

6.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS RELACIONADOS AO EQUILÍBRIO REDOX

A avaliação do equilíbrio redox está demonstrada na Figura 9. Não houve alterações entre as medidas de LPO (Figura 9A) e na atividade da enzima CAT (Figura 9B) entre os grupos experimentais. No entanto, o grupo NR VITC apresentou um aumento na quantidade de GSH (Figura 9C) em relação ao grupo NR, além de apresentar redução na atividade da enzima SOD (Figura 9D) em comparação com o grupo NN. Sobre os ensaios que avaliam a capacidade antioxidante total no soro, o grupo NR VITC apresentou maior poder redutor antioxidante em comparação com o grupo NR (Figura 9E) pelo método FRAP e este grupo mostrou menor capacidade antioxidante pelo método ABTS em relação ao grupo NN (Figura 9F).

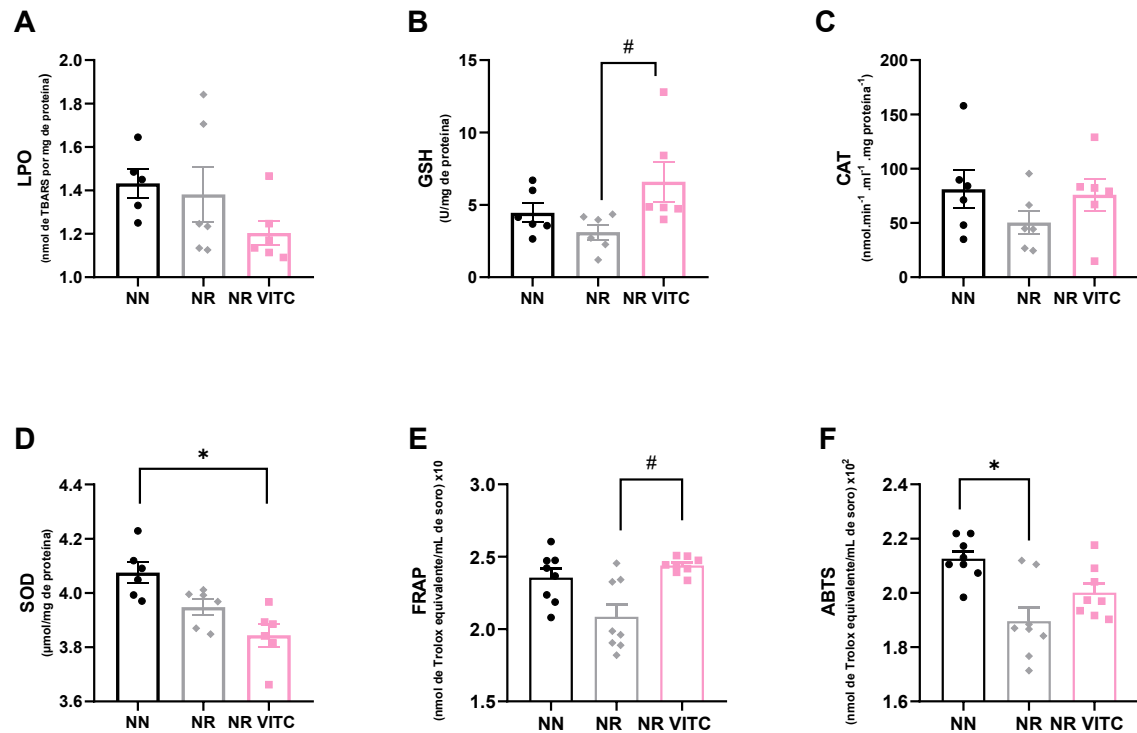


Figura 10. Medidas de lipoperoxidação (A. LPO: lipoperoxidação), oxidação (C. GSH: glutathiona reduzida) e atividade de enzimas antioxidantes (B. CAT: catalase; D. SOD: superóxido dismutase) na aorta e medidas de capacidade antioxidante total (E. FRAP e F. ABTS) no soro de ratas provenientes de ninhada normal (NN), ninhada reduzida (NR) e ninhada reduzida exposta à vitamina C (NR VIT C), avaliadas no dia pós-natal 120 (DPN 120). Os dados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) ou mediana (1^o–3^o quartis) ANOVA de uma via e Kruskal-Wallis, n=5-8 ratas/grupo. * $p < 0,05$ vs NN. # $p < 0,05$ NR VIT C vs. NR.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a supernutrição lactacional levou à uma alteração na resposta vasodilatadora dependente do endotélio da aorta e ao aumento da pressão arterial sistólica de ratas *Wistar* adultas, e que a exposição neonatal à vitamina C preservou a função endotelial dessas ratas. Ainda, os mecanismos envolvidos na recuperação da resposta vasodilatadora observada neste estudo podem estar relacionados com a capacidade antioxidante da vitamina C.

No presente estudo, a supernutrição pós-natal durante o período de lactação não afetaram o consumo alimentar nem os parâmetros biométricos da prole, no entanto, as ratas apresentaram aumento do peso corporal ao longo da vida. É descrito que ratas provenientes de ninhadas reduzidas podem apresentar maior ingestão de leite em decorrência da menor competição pelas mamas da mãe, além do leite materno possuir maior conteúdo lipídico em relação ao proteico (Cunha *et al.*, 2009). Assim, é esperado que animais NR durante o período neonatal apresentem maior massa corporal. Nosso estudo confirma que, nesse modelo experimental, ratas apresentam aumento do peso corporal desde a infância até a vida adulta, além de reforçar a eficácia do modelo de ninhada reduzida para a indução de sobrepeso ao longo prazo (Costa *et al.*, 2019). Ainda, a supernutrição pós-natal também está associada ao aumento da adiposidade e a alterações em parâmetros biométricos. No DPN 90, o tecido adiposo retroperitoneal pode permanecer inalterado, enquanto o tecido adiposo perigonadal encontra-se aumentado em ratas de ninhada reduzida (Costa *et al.*, 2019), ou ambos os tecidos podem estar aumentados (Ferreira *et al.*, 2022; Stopa *et al.*, 2021). Além disso, a hiperfagia é outra condição observada em ratos machos provenientes de ninhadas reduzidas (Cunha *et al.*, 2009; Rodrigues *et al.*, 2011), porém não em fêmeas (Stopa *et al.*, 2021), conforme observado no presente estudo.

Neste estudo, a suplementação materna com vitamina C não afetou o ganho de peso materno ou o desenvolvimento de obesidade na prole fêmea. No entanto, mães NR apresentaram menor ganho de peso em relação ao grupo NN. Já foi relatado em um estudo que mães de ninhada reduzida apesar de terem um maior cuidado parental com a prole, apresentam redução no comportamento do tipo não materno incluindo a alimentação (Enes-Marques; Giusti-Paiva, 2018), isso pode

explicar o menor ganho de peso das mães ratas NR em relação às mães de ninhada normal. Sobre o desenvolvimento de obesidade na prole, foi demonstrado, em ratos machos obesos submetidos à dieta hiperlipídica, que a administração de vitamina C não alterou o consumo alimentar nem o ganho de peso corporal, porém reduziu o tecido adiposo retroperitoneal (Camióñ *et al.*, 2008). De modo semelhante, a prole fêmea de mães expostas ao dicromato de potássio e suplementadas com vitamina C durante o período de lactação não apresentou alterações no peso corporal; entretanto, esse antioxidante foi capaz de reverter a redução do peso ovariano, sem alterar o peso do útero (Samuel *et al.*, 2012). Além disso, a exposição materna ao chumbo associada à suplementação com vitamina C durante a gestação e a lactação não afetou o ganho de peso materno nem o peso da prole masculina (Chang *et al.*, 2012). Logo, esses estudos, assim como os resultados do presente trabalho, demonstram que a vitamina C não interfere no ganho de peso corporal nem no consumo alimentar da prole exposta, embora possa influenciar outros parâmetros biométricos, e essas alterações podem estar relacionadas ao modelo experimental, à dose e ao tempo de exposição.

A obesidade é um fator contribuinte para o aumento da pressão arterial. Diversos estudos de longo prazo demonstraram que o ganho de peso é um fator importante para a elevação dos níveis pressóricos durante a infância e a idade adulta (Lloyd-Jones *et al.*, 2007; Mamun *et al.*, 2005). Em roedores, a supernutrição pós-natal pode induzir hipertensão em machos (Josse *et al.*, 2020). No presente estudo, ratas provenientes de ninhadas reduzidas não apresentaram alterações na pressão arterial diastólica nem na frequência cardíaca, porém, apresentaram aumento da pressão arterial sistólica, a qual, apesar de não haver diferença significativa, parece estar reduzida nas ratas expostas à vitamina C. Ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com vitamina C apresentaram melhora da pressão arterial sistólica e diastólica de maneira dependente da dose e da frequência de administração (Hwang *et al.*, 2022) e, em outro estudo, exibiram rápida redução da pressão arterial sistólica, a qual foi mantida por três semanas no grupo tratado (Li *et al.*, 2021). Além disso, a pressão arterial média foi atenuada em ratos obesos tratados com esse antioxidante (Lopes *et al.*, 2022).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a vitamina C é capaz de reduzir os níveis de pressão arterial em roedores, o que pode estar relacionado com a sua capacidade de reduzir a resistência vascular periférica por meio da

recuperação da função das células endoteliais, decorrente de sua atividade antioxidante (Ran *et al.*, 2020). No presente estudo, a suplementação materna com vitamina C não promoveu alterações nos níveis pressóricos. Esse achado pode indicar que, a vitamina C pode ter contribuído para a manutenção da pressão arterial por recuperar a função endotelial, embora não ter sido suficiente para reduzir significativamente esse parâmetro. Estudos adicionais que investiguem diretamente vasos envolvidos e o efeito dessa molécula na regulação da pressão arterial são necessários no modelo de ninhada reduzida.

Além do desenvolvimento de hipertensão, a supernutrição pós-natal está associada a alterações na reatividade vascular. Estudos descrevem que a aorta de ratos provenientes de ninhadas reduzidas pode apresentar redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina ou ao nitroprussiato de sódio, ou ainda aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina, como resultado de comprometimento da camada de células musculares lisas ou da função endotelial (Josse *et al.*, 2020). No presente estudo, a resposta aórtica à fenilefrina não diferiu entre os grupos tanto em anéis com endotélio quanto em anéis sem endotélio. Contudo, ratas NR apresentaram redução da resposta à acetilcolina em anéis de aorta com endotélio e a exposição neonatal com vitamina C foi capaz de restaurar essa resposta. Em ratos hipertensos com 150 dias, a resposta à acetilcolina também se mostrou reduzida, mas em anéis incubados com vitamina C, observou-se melhora dessa resposta (Ajay *et al.*, 2006). Além disso, o tratamento com vitamina C em ratos preveniu o comprometimento da resposta à acetilcolina induzido pelo etanol (Hipólito *et al.*, 2015).

Como mencionado, ratos provenientes de ninhada reduzida podem ter alterações na reatividade vascular que podem estar associadas ao comprometimento da função endotelial. A disfunção endotelial descrita nesse modelo está associada ao aumento da geração de espécies reativas ao oxigênio e de processos inflamatórios, os quais podem comprometer a função da eNOS e reduzir a biodisponibilidade de NO nos vasos (Junior *et al.*, 2019). Adicionalmente, já foi observado que os níveis de vitamina C encontram-se reduzidos em ratos NR (Habbout *et al.*, 2012), e esse composto pode ser benéfico nesse modelo experimental, uma vez que a vitamina C pode preservar e recuperar a função endotelial por neutralizar radicais livres e regular a atividade da eNOS, regular enzimas que geram radicais livres, como a NOX, e, ainda, regular a atividade de

enzimas antioxidantes. De fato, já foi descrito o aumento da atividade da eNOS e redução da atividade da NOX em machos hipertensos tratados com vitamina C (Ulker, McKeown; Bayraktutan, 2003). Esses mecanismos podem estar relacionados com a restauração da resposta vasodilatadora da aorta em ratas adultas expostas à vitamina C observada neste estudo.

Ratas adultas NR podem apresentar menores concentrações plasmáticas de estrógeno (Ferreira *et al.*, 2022; Stopa *et al.*, 2021). O estrógeno é considerado um hormônio vasoprotetor que, em mulheres na pré-menopausa, exerce atividade vasorrelaxante e efeito hipotenso por meio da modulação dos receptores de estrógeno α e β que aumentam a biodisponibilidade de NO. O ER α pode aumentar a expressão e a atividade da eNOS (Fardoun *et al.*, 2020), enquanto o ER β pode aumentar a expressão da iNOS e atenuar o aumento da vasoconstrição em ratas diabéticas e em roedores hipertensos (Aryan *et al.*, 2020; Sartoretto *et al.*, 2019). Além disso, a ativação do ER β está associada à redução da pressão arterial (Aryan *et al.*, 2020). Ratas obesas provenientes de um modelo hipoestrogênico apresentaram maior pressão arterial e redução da resposta relaxante à acetilcolina em comparação às ratas apenas obesas, indicando que níveis reduzidos de estrógeno podem desempenhar papel importante no comprometimento da função endotelial (Lima-Mendoza *et al.*, 2014). Dessa forma, o estrógeno poderia estar envolvido no comprometimento da função endotelial observada no presente estudo.

Aqui, a resposta à ACh na presença de antagonistas ER α e ER β não diferiu entre os grupos, e, a resposta da aorta ao estrógeno isoladamente, na presença de endotélio, bem como na presença de antagonistas dos ER α e ER β , também não apresentou diferenças entre ratas NR, expostas ou não à vitamina C. Porém, é possível notar que a presença dos antagonistas igualou a resposta entre todos os grupos, abolindo as diferenças observadas previamente da redução da resposta nas ratas NR e no aumento dessa resposta nas ratas em que as mães foram suplementadas com vitamina C. Portanto, ainda não é possível inferir que o estrógeno não participa da disfunção endotelial em ratas que foram obesas durante a infância através desse modelo.

Foi previamente observado que o estrógeno exerce efeito direto sobre as células musculares lisas vasculares em artérias coronárias suínas (Fardoun *et al.*, 2020), demonstrando a existência de mecanismos de relaxamento independentes do endotélio. Para avaliar se o mesmo ocorre na aorta torácica de

ratas *Wistar* e se as óxido nítrico sintases desempenham papel importante na resposta ao estrógeno, alguns anéis de aorta tiveram a camada endotelial removida, enquanto outros foram incubados na presença do inibidor não-seletivo de NOS (L-NAME). Nesses anéis, a resposta vasodilatadora foi praticamente abolida em comparação àquela observada em anéis com endotélio e sem L-NAME, o que demonstra que tanto o endotélio quanto as NOS podem ser cruciais para a resposta ao estrógeno na aorta.

Também foram explorados aqui os mecanismos envolvendo as enzimas COX e iNOS, ambas possuem papel na inflamação vascular em que seus produtos podem colaborar em conjunto para o desenvolvimento de disfunção endotelial (Lopes *et al.*, 2022). A iNOS produz NO de maneira exacerbada, em que parte pode participar na preservação da resposta vasoconstritora como já descrito em alguns modelos experimentais (Aryan *et al.*, 2020; Sartoretto *et al.*, 2019), mas o restante de NO pode favorecer ainda mais a geração de EROs e levar a consequente dano vascular. Ainda, a enzima COX pode contribuir com a disfunção endotelial de ratos hipertensos e obesos por aumentar a produção e a liberação de mediadores contráteis, reduzindo a resposta de relaxamento induzida por ACh (Mendizabal; Llorens; Nava, 2011). No entanto, neste estudo, a resposta vasodilatadora das ratas na presença dos inibidores dessas enzimas não diferiu entre os grupos experimentais, logo o mecanismo envolvido na redução da resposta a ACh pode não estar associado com a atividade dessas enzimas.

Para investigar o possível papel antioxidante da vitamina C, foram analisados marcadores de estresse oxidativo na aorta torácica e no soro dos animais. A supernutrição pós-natal pode alterar o equilíbrio redox e favorecer o aumento de estresse oxidativo. Estudos descrevem que há redução da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT no fígado, no rim e no coração de animais de ninhada reduzida, além de aumento na quantidade de produtos de lipoperoxidação e de proteínas carboniladas nos respectivos tecidos e no plasma desses animais (Conceição *et al.*, 2013; de Moura Freitas *et al.*, 2019; Pedroza *et al.*, 2018). Por outro lado, também já foi descrito o aumento da atividade da enzima SOD no coração como um mecanismo compensatório pelo aumento de estresse oxidativo nesse tecido (Junior *et al.*, 2019; Habbout *et al.*, 2012). Neste estudo, apesar de não haver dano oxidativo detectável demonstrado pelo LPO, houve alteração nos marcadores envolvendo as enzimas antioxidantes. O grupo NR apresentou menor

capacidade antioxidante total no soro pelo método ABTS, o que pode indicar que as ratas desse grupo possuem uma menor capacidade de neutralizar radicais livres e maior susceptibilidade ao estresse oxidativo. Por outro lado, a exposição das ratas NR à vitamina C aumentou os níveis de glutathiona reduzida e a capacidade antioxidante total avaliada pelo FRAP, demonstrando que a exposição com esse antioxidante aumentou o poder redutor antioxidante.

De fato, a vitamina C é capaz de recuperar as defesas antioxidantes em diferentes modelos experimentais que induzem estresse oxidativo em roedores. A vitamina C pode aumentar a atividade da SOD na aorta e no fígado (Boyacioglu *et al.*, 2014; Hipólito *et al.*, 2015), pode aumentar os níveis de GSH no plasma (Ekuni *et al.*, 2009), além de restabelecer o equilíbrio redox no fígado, rim e coração por normalizar os níveis de CAT, MDA, GSH e TBARS (Boyacioglu *et al.*, 2014; Palacios *et al.*, 2018) em ratos tratados com esse antioxidante. Além disso, assim como demonstrado aqui, a exposição à vitamina C durante a lactação também recupera a defesa antioxidante no útero e ovário de ratas em que esse antioxidante C promove o aumento da atividade das enzimas SOD, CAT e da glutathiona redutase, além de reduzir os níveis de LPO nos dois tecidos (Samuel *et al.*, 2012). A GSH é um dos principais sistemas de defesa antioxidante e é responsável por neutralizar as espécies reativas de oxigênio e a vitamina C pode ter participado na regeneração desse composto no grupo NRVITC. Além disso, apesar de não haver diferenças entre os níveis de LPO e na enzima CAT, pode ser que a defesa antioxidante celular promovida pela SOD esteja reduzida nesse grupo por ser menos requisitada, visto que, quando há estresse oxidativo, há também um aumento da expressão das enzimas antioxidantes (Gulcin, 2025). De modo geral, a vitamina C colaborou para a restauração do equilíbrio redox em ratas NR provenientes de mães suplementadas com esse antioxidante.

O presente estudo traz informações relevantes ao demonstrar os efeitos positivos da exposição à vitamina C durante a lactação sobre a função endotelial de ratas provenientes de ninhada reduzida, demonstrando que esse composto pode ser benéfico para parâmetros vasculares e antioxidantes. Apesar dos mecanismos envolvidos na recuperação da resposta vasodilatadora da aorta ainda não estarem completamente esclarecidos, é sugerido que a ação antioxidante desse composto possa ter envolvimento na preservação da função endotelial das ratas expostas à vitamina C. Estudos que avaliem marcadores moleculares são

necessários para compreender os efeitos da vitamina C em mecanismos endoteliais de ratas de ninhada reduzida.

8 CONCLUSÃO

Esses resultados sugerem que a vitamina C pode ser de fato transferida da mãe para a prole durante a amamentação, e que esse antioxidante é capaz de preservar a função endotelial, possivelmente por meio da redução do estresse oxidativo de ratas que foram obesas na infância. Ainda, apesar da recuperação da função endotelial, a vitamina C não alterou o aumento da pressão arterial observado em ratas de ninhadas reduzidas, o que pode indicar que a elevação da pressão arterial nesse modelo pode estar relacionada a outros mecanismos regulatórios.

Além disso, não foi possível inferir os mecanismos responsáveis pela recuperação da resposta vasodilatadora, ressaltando a necessidade de estudos futuros com esse modelo experimental.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- AJAY, M.; ACHIKE, F.I.; MUSTAFA, A.M.; MUSTAFA, M.R. Direct effects of quercetin on impaired reactivity of spontaneously hypertensive rat aortae: comparative study with ascorbic acid. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 33, p. 345-350, 2006.
- AJOOLABADY, A.; PRATICO, D.; REN, J. Angiotensin II: Role in oxidative stress, endothelial dysfunction, and diseases. **Molecular and Cellular Endocrinology**, out 2024.
- ARYAN, L.; YOUNESSI, D.; ZARGARI, M.; BANERJEE, S.; AGOPIAN, J.; RAHMAN, S.; BORNA, R.; RUFFENACH, G.; UMAR, S.; EGHBALI, M. The Role of Estrogen Receptors in Cardiovascular Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, jun 2020.
- AUGUSTIN, H.G.; KOH, G.Y. A systems view of the vascular endothelium in health and disease. **Cell**, v. 187, n. 18, p. 4833-4858, set 2024.
- BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**. v. 40, n. 4, p. 527-528, abr 1968.
- BKAILY, G; JACQUES D. Morphological and Functional Remodeling of Vascular Endothelium in Cardiovascular Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 1-13, jan 2023.
- BOYACIOGLU, M.; SEKKIN, S.; KUM, C.; KORKMAZ, D.; KIRAL, F.; YALINKILINC, H.S.; AK, M.O.; AKAR, F. The protective effects of vitamin C on the DNA damage, antioxidant defenses and aorta histopathology in chronic hyperhomocysteinemia induced rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, n. 9-10, p. 407-413, dez 2014.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- Brasil. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica do estado nutricional e consumo alimentar nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal entre 2006 e 2023: estado nutricional e consumo alimentar [recurso eletrônico] / **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças Não Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2024.
- BRAVI, F.; WIENS, F.; DECARLI, A.; DAL PONT, A.; AGOSTONI, C.; FERRARONI, M. Impact of maternal nutrition on breast-milk composition: a systematic review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 104, n. 3, p. 646-662, set 2016.

CAMPIÓN, J.; MILAGRO, F.I.; FERNÁNDEZ, D.; MARTÍNEZ, J.A. Vitamin C supplementation influences body fat mass and steroidogenesis-related genes when fed a high-fat diet. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 78, p. 87-95, 2008.

CHANG, B.J.; JANG, B.J.; SON, T.G.; CHO, I.H.; QUAN, F.S.; CHOE, N.H.; NAHM, S.S.; LEE, J.H. Ascorbic acid ameliorates oxidative damage induced by maternal low-level lead exposure in the hippocampus of rat pups during gestation and lactation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 104-108, 2012.

CHAPMAN, N.; CHING, S.M.; KONRADI, A.O.; NUYT, A.M.; KHAN, T.; TWUMASI-ANKRAH, B.; CHO, E.J.; SCHUTTE, A.E.; TOUYZ, R.M.; STECKELINGS UM, BREWSTER LM. Arterial Hypertension in Women: State of the Art and Knowledge Gaps. **Hypertension**, v. 80, n. 6, p. 1140-1149, jun 2023.

CONCEIÇÃO, E.P.; FRANCO, J.G.; OLIVEIRA, E.; RESENDE, A.C.; AMARAL, T.A.; PEIXOTO-SILVA, N.; PASSOS, M.C.; MOURA, E.G.; LISBOA, P.C. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 81-87, jan 2013.

COSTA, V.M.G.; ANDREAZZI, A.E.; BOLOTARI, M.; LADE, C.G.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Effect of postnatal overfeeding on the male and female Wistar rat reproductive parameters. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 10, p. 667-675, 2019.

CUNHA, A.C.; PEREIRA, R.O.; PEREIRA, M.J.; SOARES, V.D.E.M.; MARTINS, M.R.; TEIXEIRA, M.T.; SOUZA, E.P.; MOURA, A.S. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 20, p. 435-442, 2009.

De OLIVEIRA, P. R.; Da COSTA, C. A.; BEM, G. F.; CARVALHO, L. C. R. M.; SOUZA, M. A. V.; NETO, M. L.; SOUSA P.J.C; MOURA R.S.; RESENDE A.C. Effects of an extract obtained from fruits of Euterpe Oleracea Mart in the components of metabolic syndrome induced in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v.56, n. 6, p.619–626, dez 2010.

de MOURA FREITAS, C.; NASCIMENTO, L.C.P.D.; BRAZ, G.R.F.; ANDRADE-SILVA, S.C.; LIMA-JUNIOR, N.C.; de ARAUJO SILVA, T.; FERNANDES, M.P.; FERREIRA, D.J.S.; LAGRANHA, C.J. Mitochondrial impairment following neonatal overfeeding: A comparison between normal and ischemic-reperfused hearts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 120, n. 5, p. 7341-7352, maio 2019.

DOSEDĚL, M.; JIRKOVSKÝ, E.; MACÁKOVÁ, K.; KRČMOVÁ, L.K.; JAVORSKÁ, L.; POUROVÁ, J.; MERCOLINI, L.; REMIÃO, F.; NOVÁKOVÁ, L.; MLADĚNKA, P.; On Behalf Of The Oeonom. Vitamin C-Sources, Physiological Role, Kinetics, Deficiency, Use, Toxicity, and Determination. **Nutrients**, v. 13, n. 2, fev 2021.

EKUNI, D.; TOMOFUJI, T.; SANBE, T.; IRIE, K.; AZUMA, T.; MARUYAMA, T.; TAMAKI, N.; MURAKAMI, J.; KOKEGUCHI, S.; YAMAMOTO, T. Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 5, p. 495-502,

maio 2009.

ENES-MARQUES, S.; GIUSTI-PAIVA, A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. **The Journal of Physiological Sciences**, v. 68, n. 6, p. 789-798, nov 2018.

FARDOUN, M.; DEHAINI, H.; SHAITO, A.; MESMAR, J.; EL-YAZBI, A.; BADRAN, A.; BEYDOUN, E.; EID, A.H. The hypertensive potential of estrogen: An untold story. **Vascular Pharmacology**, v. 124, jan 2020.

FAULKNER, J.L.; KENNARD, S.; HUBY, A.C.; ANTONOVA, G.; LU, Q.; JAFFE, I.Z.; PATEL, V.S.; FULTON, D.J.R.; BELIN DE CHANTEMÈLE, E.J. Progesterone Predisposes Females to Obesity-Associated Leptin-Mediated Endothelial Dysfunction via Upregulating Endothelial MR (Mineralocorticoid Receptor) Expression. **Hypertension**, v. 74, n. 3, p. 678-686, set 2019.

FAULKNER, J.L. Obesity-associated cardiovascular risk in women: hypertension and heart failure. **Clinical Sciences (London)**, v. 135, n. 12, p. 1523-1544, jun 2021.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 415–430 2007,.

FERREIRA, L.A.; FERREIRA-JUNIOR, M.D.; AMARAL, K.J.V.; CAVALCANTE, K.V.N.; PONTES, C.N.R.; RIBEIRO, L.C.D.S.; Dos SANTOS, B.G.; XAVIER, C.H.; MATHIAS, P.C.F.; ANDERSEN, M.L.; PEDRINO, G.R.; de CASTRO, C.H.; MAZARO-COSTA, R.; GOMES, R.M. Maternal postnatal early overfeeding induces sex-related cardiac dysfunction and alters sexually hormones levels in young offspring. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 103, 2022.

GIMBRONE, M.A. JR.; GARCÍA-CARDEÑA, G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. **Circulation Research**, v. 118, n. 4, p. 620-636, fev 2016.

GOKCE, N.; KEANEY, J.F., JR.; FREI, B.; HOLBROOK, M.; OLESIAK, M.; ZACHARIAH, B.J.; LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J.W.; VITA, J.A. Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 99, n. 25, p. 3234–3240, jun 1999.

GULCIN, İ. Antioxidants: a comprehensive review. **Archives of Toxicology**, v. 99, n. 5, p. 1893-1997, maio 2025.

HABBOU, A.; DELEMASURE, S.; GOIRAND, F.; GUILLAND, J.C.; CHABOD, F.; SEDIKI, M.; ROCHETTE, L.; VERGELY C. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. **Biochemistry**, v. 94, n. 1, p. 117-124, jan 2012.

HABBOU, A.; GUENANCIA, C.; LORIN, J.; RIGAL, E.; FASSOT, C.; ROCHETTE, L.; VERGELY, C. Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. 1-12, fev 2013.

HIGASHI, C.M.; SARTORETTO, S.M.; ECHEM, C.; LUCCHETTI, B.F.C.; CARVALHO, M.H.C.; PELOSI, G.G.; PINGE-FILHO, P.; GERARDIN, D.C.C.; MOREIRA, E.G.; AKAMINE, E.H.; CERAVOLO, G.S. Intrauterine and lactational exposure to fluoxetine enhances endothelial modulation of aortic contractile response in adult female rats. **Vascular Pharmacology**, v. 108, p. 67-73, set 2018.

HIPÓLITO, U.V.; CALLERA, G.E.; SIMPLICIO, J.A.; de MARTINIS, B.S.; TOUYZ, R.M.; TIRAPELLI, C.R. Vitamin C prevents the endothelial dysfunction induced by acute ethanol intake. **Life Sciences** v. 141, p. 99-107, 2015.

HOFFMAN, D.J.; POWELL, T.L.; BARRETT, E.S.; HARDY D.B. Developmental origins of metabolic diseases. **Physiological Reviews**, v. 101, n. 3, p. 739-795, jul 2021.

HWANG, E.S.; CHOI, G.Y.; KIM, K.J.; KIM, M.J.; LEE, S.; LEE, J.W.; KIM, D.O.; PARK, J.H. Vitamin C Lowers Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats by Targeting Angiotensin-Converting Enzyme I Production in a Frequency-Dependent Manner. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2022.

Institute of Medicine (US) Panel on Dietary Antioxidants and Related Compounds. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids**. Washington (DC): National Academies Press (US); 2000. 5, Vitamin C.

JOSSE, M.; RIGAL, E.; ROSENBLATT-VELIN, N.; ROCHETTE, L.; ZELLER, M.; GUENANCIA, C.; VERGELY, C. Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 1121, n. 24, dez 2020.

JUNIOR, M.D.F.; CAVALCANTE, K.V.N.; FERREIRA, L.A.; LOPES, P.R.; PONTES, C.N.R.; BESSA, A.S.M.; NEVES, Â.R.; FRANCISCO, F.A.; PEDRINO, G.R.; XAVIER, C.H.; MATHIAS, P.C.F.; CASTRO, C.H.; GOMES R.M. Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats. **Life Sciences**, v. 226, p. 173-184, jun 2019.

KLEINSCHMIDT, T.L.; OLTMAN, C.L. Progression and reversal of coronary and mesenteric vascular dysfunction associated with obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 22, n. 10, p. 2193-2200, out 2014.

LANDSBERG, L.; ARONNE, L.J.; BEILIN, L.J.; BURKE, V.; IGEL, L.I.; LLOYD-JONES, D.; SOWERS, J. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment: a position paper of The Obesity Society and the American Society of Hypertension. **The Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)**, v. 15, n. 1, pg. 14-33, jan 2013.

LI, Y.; ZAFAR, S.; SALIH IBRAHIM, R.M.; CHI, H.L.; XIAO, T.; XIA, W.J.; LI, H.B.; KANG, Y.M. Exercise and food supplement of vitamin C ameliorate hypertension through improvement of gut microflora in the spontaneously hypertensive rats. **Life Sciences**, v. 269, 2021.

LIMA-MENDOZA, L.A.; COLADO-VELÁZQUEZ, J. 3RD; MAILLOUX-SALINAS, P.;

ESPINOSA-JUÁREZ, J.V.; GÓMEZ-VIQUEZ, N.L.; MOLINA-MUÑOZ, T; HUANG, F., BRAVO, G. Vascular damage in obese female rats with hypoestrogenism. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 81-91, 2014.

LISBOA, P.C.; MIRANDA, R.A.; SOUZA, L.L.; MOURA, E.G. Can breastfeeding affect the rest of our life? **Neuropharmacology**. v. 200, dez 2021.

LLOYD-JONES, D.M.; LIU, K.; COLANGELO, L.A.; YAN, L.L.; KLEIN, L.; LORIA, C.M.; LEWIS, C.E.; SAVAGE, P. Consistently stable or decreased body mass index in young adulthood and longitudinal changes in metabolic syndrome components: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. **Circulation**, v. 115, p. 1004-1011, 2007.

LOPES, F.N.C.; da CUNHA, N.V.; de CAMPOS, B.H.; FATTORI, V.; PANIS, C.; CECCHINI, R.; VERRI, W.A. JR; PINGE-FILHO, P.; MARTINS-PINGE, M.C. Antioxidant therapy reverses sympathetic dysfunction, oxidative stress, and hypertension in male hyperadipose rats. **Life Sciences**, v. 295, 2022.

LOPES, P.D.D.; de ASSIS, N.; de ARAÚJO, N.F.; MORENO, O.L.M.; JORGE, K.T.O.S.; E CASTOR, M.G.M.; TEIXEIRA, M.M.; SORIANI, F.M.; CAPETTINI, L.D.S.A.; BONAVENTURA, D.; CAU, S.B.A. COX/iNOS dependence for angiotensin-II-induced endothelial dysfunction. **Peptides**, nov 2022.

MAMUN, A.A.; LAWLOR, D.A.; O'CALLAGHAN, M.J.; WILLIAMS, G.M.; NAJMAN, J.M. Effect of Body Mass Index Changes Between Ages 5 and 14 on Blood Pressure at Age 14: Findings From a Birth Cohort Study. **Hypertension**, v. 45, p. 1083-1087, 2005.

MENDIZÁBAL, Y.; LLORENS, S.; NAVA, E. Reactivity of the aorta and mesenteric resistance arteries from the obese spontaneously hypertensive rat: effects of glitazones. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, 2011.

MCCARTHY, C.G.; AALKJÆR, C.; BAGHER, P.; BEYER, A.M.; BOEDTKJER, E.; BOMFIM, G.F.; BRESLIN, J.W.; BRIONES, A.M.; CASTORENA-GONZALEZ, J.A.; COSTA, T.J.; DAI, Z.; DAVEL, A.P.; EARLEY, S.; FREED, J.K.; GARLAND, C.; ISAKSON, B.E.; JEPPE, T.A.; KALUCKA, J.; LAVANDEROS, B.; MAKINO, A.; NORTON, C.E.; SEGAL, S.S.; TAN, W.; TRASK, A.J.; WILSON, C.; ZAWIEJA, S.D.; WENCESLAU, C.F. Guidelines for Evaluating Endothelial Function in Vascular Tissue. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. Mar 2026.

MEYER, M.R.; HAAS, E.; PROSSNITZ, E.R.; BARTON, M. Non-genomic regulation of vascular cell function and growth by estrogen. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 308, n. 1-2, p. 9-16, set 2009.

MORTENSEN, A.; LYKKESFELDT, J. Does vitamin C enhance nitric oxide bioavailability in a tetrahydrobiopterin-dependent manner? In vitro, in vivo and clinical studies. **Nitric Oxide**. v. 36, p. 51-57, jan 2014.

MOURA, KF. **Papel do sistema renina angiotensina aldosterona sobre a disfunção vascular em ratos e ratas obesos durante a infância por modelo de ninhada reduzida.** 2024. 93 fls. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

MOTOYAMA, T.; KAWANO, H.; KUGIYAMA, K.; HIRASHIMA, O.; OHGUSHI, M.; YOSHIMURA, M.; OGAWA, H.; YASUE, H. Endothelium dependent vasodilation in the brachial artery is impaired in smokers: Effect of vitamin C. **American Journal of Physiology**, v. 273,n. 4, p. 1644–1650, out 1997.

NOVI, D. R. B. S.; VIDIGAL, C. B.; MOURA, K. F.; da SILVA, D. G.; SERAFIM, A. F. L.; KLEIN, R. M.; MOREIRA, E. G.; GERARDIN, D. C. C. P; CERAVOLO, G. S. Intrauterine and Lactational Exposure to Paracetamol: Cardiometabolic Evaluation in Adult Female and Male Offspring. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 78, n. 6, p. 858-866, dez 2021.

OBESITY. **World Health Organization**, 2021. Disponível em: <[Obesity \(who.int\)](https://www.who.int/obesity)>. Acesso em: 24 de jun. de 2024.

PADAYATTY, S.J.; KATZ, A.; WANG, Y.; ECK, P.; KWON, O.; LEE, J.H.; CHEN, S.; CORPE, C.; DUTTA, A.; DUTTA, S.K.; LEVINE M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 18-35, fev 2003.

PALACIOS, J.; FONSECA, J.M.; AYAVIRE, F.; SALAS, F.; ORTIZ, M.; SANDOVAL, J.M.; BENITES, J.; NWOKOCHA, C.R.; ZAVALA, E.; PAREDES, A.; BARRÍA, I.; VEGA, J.L.; CIFUENTES, F. Ascorbate Attenuates Oxidative Stress and Increased Blood Pressure Induced by 2-(4-Hydroxyphenyl) Amino-1,4-naphthoquinone in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 26, jul 2018.

PEDROZA, A.; FERREIRA, D.S.; SANTANA, D.F.; da SILVA, P.T.; de AGUIAR JÚNIOR, F.C.A.; SELLITTI, D.F.; LAGRANHA, C.J. A maternal low-protein diet and neonatal overnutrition result in similar changes to glomerular morphology and renal cortical oxidative stress measures in male Wistar rats. **Applied Physiology Nutrition and Metabolism**, v. 44, n. 2, p. 164-171, fev 2019.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols** 1, p. 3159–3165, 2006.

RAN, L.; ZHAO, W.; TAN, X.; WANG, H.; MIZUNO, K.; TAKAGI, K.; ZHAO, Y.; BU, H. Association between Serum Vitamin C and the Blood Pressure: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. **Cardiovascular Therapeutics**, 2020.

RODRIGUES, A.L.; de MOURA, E.G.; PASSOS, M.C.; TREVENZOLI, I.H.; da CONCEIÇÃO, E.P.; BONONO, I.T.; NETO, J.F.; LISBOA, P.C. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, p. 109-117, 2011.

RUBINO, F.; CUMMINGS, D.E.; ECKEL, R.H.; COHEN, R.V.; WILDING, J.P.H.; BROWN, W.A.; STANFORD, F.C.; BATTERHAM, R.L.; FAROOQI, I.S.; FARPOUR-LAMBERT, N.J.; LE ROUX, C.W.; SATTAR, N.; BAUR, L.A.; MORRISON, K.M.; MISRA, A.; KADOWAKI, T.; THAM, K.W.; SUMITHRAN, P.; GARVEY, W.T.; KIRWAN, J.P.; FERNÁNDEZ-REAL, J.M.; CORKEY, B.E.; TOPLAK, H.; KOKKINOS, A.; KUSHNER, R.F.; BRANCA, F.; VALABHJI, J.; BLÜHER, M.; BORNSTEIN, S.R.; GRILL, H.J.; RAVUSSIN, E.; GREGG, E.; AL BUSAIDI, N.B.; ALFARIS, N.F.; AL OZAIRI, E.; CARLSSON, L.M.S.; CLÉMENT, K.; DESPRÉS, J.P.; DIXON, J.B.; GALEA, G.; KAPLAN, L.M.; LAFERRÈRE, B.; LAVILLE, M.; LIM, S.; LUNA FUENTES, J.R.; MOONEY, V.M.; NADGLOWSKI, J. JR; URUDINACHI, A.; OLSZANECKA-GLINIANOWICZ, M.; PAN, A.; PATTOU, F.; SCHAUER, P.R.; TSCHÖP, M.H.; VAN DER MERWE, M.T.; VETTOR, R.; MINGRONE, G. Definition and diagnostic criteria of clinical obesity. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 13, n. 3, p. 221-262, mar 2025.

RUDICH, A.; KANETY, H.; BASHAN, N. Adipose stress-sensing kinases: linking obesity to malfunction. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, n. 8, p. 291–299, out 2007.

SAMUEL, J.B.; STANLEY, J.A.; VENGATESH, G.; PRINCESS, R.A.; MUTHUSAMI, S.; ROOPHA, D.P.; SUTHAGAR, E.; KUMAR, K.M, SEBASTIAN MS, ARULDHAS MM. Ameliorative effect of vitamin C on hexavalent chromium-induced delay in sexual maturation and oxidative stress in developing Wistar rat ovary and uterus. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, p. 720-733, 2012.

SARAIVA, J.F.K.; VALERIO, C.M.; RACHED, F.H.; VAN DE SANDE-LEE, S.; GIRALDEZ, V.Z.R.; VALENTE, F.; DRAGER, L.F.; HALPERN, B.; SILVA JUNIOR W.S.D.; TRUJILHO, F.R.; DORNELLAS, N.; SILVA FILHO, R.L.D.; SALLES, J.E.N.; ASSAD, M.H.V.; MANCINI, M.C.; MIRANDA, P.A.C.; MOREIRA, R.O.; LAMOUNIER, R.N.; KAISER, S.E.; BERTOLUCI, M.C. Diretriz Brasileira Baseada em Evidências de 2025 para o Manejo da Obesidade e Prevenção de Doenças Cardiovasculares e Complicações Associadas à Obesidade: Uma Declaração de Posicionamento de Cinco Sociedades Médicas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 122, n. 9, dez 2025.

SARTORETTO, S.M.; SANTOS, F.F.; COSTA, B.P.; CERAVOLO, G.S.; SANTOS-EICHLER, R.; CARVALHO, M.H.C.; FORTES, Z.B.; AKAMINE, E.H. Involvement of inducible nitric oxide synthase and estrogen receptor ESR2 (ER β) in the vascular dysfunction in female type 1 diabetic rats. **Life Sciences**, v. 216, p. 279-286, jan 2019.

SENTHILKUMAR, M.; AMARESAN, N.; SANKARANARAYANAN, A. Plant-Microbe Interactions. **Springer US**. 2021

SILVA, D.G.D.; MOURA, K.F.; SOUZA, A.C.; SILVA, K.G.N.D.; VIDIGAL, C.B.; da SILVA JEZUÍNO, J.; GRAVENA, R.C.; PELOSI, G.G.; GERARDIN, D.C.C.; do CARMO FRANCO, M.; CERAVOLO, G.S. Topiramate treatment during the peripubertal period does not alter aortic endothelial function in female Wistar rats. **Life Sciences**, ago 2023.

SOUZA, L.L.; MOURA, E.G.; LISBOA, P.C. Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring. **Nutrients**, v. 14, n. 10, maio 2022.

STOPA, L.R.S.; de SOUZA, C.F.; MARTINS, A.B.; LOPES, G.M.; COSTA, N.O.; GERARDIN, D.C.C.; de CARVALHO, G.G.; ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; UCHOA, E.T.; LEITE, C.M. Neonatal overfeeding reduces estradiol plasma levels and disrupts noradrenergic-kisspeptin-GnRH pathway and fertility in adult female rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, mar 2021.

ULKER, S.; MCKEOWN, P.P.; BAYRAKTUTAN, U. Vitamins reverse endothelial dysfunction through regulation of eNOS and NAD(P)H oxidase activities. **Hypertension**, v. 41, n. 3, p. 534-539, mar 2003.

VANHOUTTE, P.M.; SHIMOKAWA, H.; FELETOU, M.; TANG, E.H. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. **Acta Physiologica (Oxf)**, v. 219, n. 1, p. 22-96, jan 2017.

VIDIGAL, C.B.; NOVI, D.R.B.S.; MOURA, K.F.; PICININ, R.; MONTAGNINI, B.G.; SILVA, R.N.O.D.; da SILVA, M.D.V.; de ANDRADE, F.G.; AKAMINE, E.H.; GERARDIN, D.C.C.; CERAVOLO, G.S. Intrauterine exposure to metformin: Evaluation of endothelial and perivascular adipose tissue function in abdominal aorta of adult offspring. **Life Sciences**, v. 207, p. 72-79, ago 2018.

WILSON, R.B.; LIANG, Y.; KAUSHAL, D.; CARR, A. Molecular Pharmacology of Vitamin C and Relevance to Health and Obesity-A Narrative Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 14, jul 2024.

ZARBAN, A.; TOROGHI, M.M.; ASLI, M.; JAFARI, M.; VEJDAN, M.; SHARIFZADEH, G. Effect of vitamin C and E supplementation on total antioxidant content of human breastmilk and infant urine. **Breastfeeding Medicine**, v.10, n. 4, p. 214-217, maio 2015.

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 050/2024

Londrina, 22 de maio de 2024.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: **“Tratamento materno com Vitamina C como estratégia para prevenção de alterações cardiometabólicas, reprodutivas, renais e inflamatórias na prole com obesidade infantil induzida por supernutrição lactacional”** protocolo CEUA nº 026.2024 sob a responsabilidade de **Ernane Torres Uchôa** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em **21/05/2024**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os efeitos do tratamento materno com Vitamina C, durante a lactação, na homeostase energética, sistemas cardiovascular, renal, reprodutor e imunológico de ratos e ratas com obesidade infantil devido à redução do tamanho da ninhada, na infância (21 dias) e na vida adulta (120 dias). **Grau de invasividade: G3.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/07/2024 a 30/06/2027
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogênico/Swiss Rato heterogênico/Wistar
Nº de animais	8360 , sendo: Camundongo adulto – 173 Prole camundongo estimada - 1150 Rato adulto – 987 Prole rato estimada - 6050
Peso/ Idade	Camundongo – 60 dias Prole camundongo – 21 dias Rato – 90 dias Prole rato – 21 dias
Sexo	Camundongo adulto – 58 machos e 115 fêmeas Prole camundongo – 575 machos e 575 fêmeas Rato adulto – 342 machos e 654 fêmeas Prole rato – 3025 machos e 3025 fêmeas
Origem	Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Tecido adiposo branco retroperitoneal, perigonadal e mesentérico, fígado, músculo gastrocnêmio, músculo sóleo, músculo EDL, encéfalo, sangue, rim, coração, aorta, carótidas, artéria mesentérica, lavado peritoneal, pulmão

Cumpre orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.