



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AMANDA CRISTINA DE SOUZA

**DIETA DE RESTRIÇÃO PROTEICA EM RATOS DURANTE A
ADOLESCÊNCIA CAUSA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA
VIDA ADULTA**

Londrina
2021

AMANDA CRISTINA DE SOUZA

**DIETA DE RESTRIÇÃO PROTEICA EM RATOS DURANTE A
ADOLESCÊNCIA CAUSA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA
VIDA ADULTA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Graziela Scianti Ceravolo.

Londrina
2021

AMANDA CRISTINA DE SOUZA

**DIETA DE RESTRIÇÃO PROTEICA EM RATOS DURANTE A
ADOLESCÊNCIA CAUSA DISFUNÇÃO ENDOTELIAL NA
VIDA ADULTA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina – UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Graziela Scialanti
Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Daniela Cristina Cecatto Gerardin
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Kesia Gemina Palma Rigo Wutzow
Faculdade Adventista Paranaense

Prof.^a Dr.^a Gislaine Garcia Pelosi Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de janeiro de 2021.

DEDICATÓRIA

*Com gratidão, dedico este
trabalho a Deus, devo a ele
tudo o que sou.
Sem ele nada seria possível.*

AGRADECIMENTOS

Está dissertação de mestrado não é apenas o fruto de um esforço pessoal, mas sim de variás pessoas que contribuíram direta ou indiretamente, tanto com apoio intelectual quanto emocional. Por isso, gostaria de registrar meus sinceros agradecimentos.

Primeiramente agradeço a Deus, pois é dele proveniente todo o conhecimento.

Aos meus pais, Sandra Aparecida Paulino de Souza e Roberto César de Souza, e aos meus irmãos, Augusto César de Souza e Murilo César de Souza, por sempre confiarem em mim e me apoiarem em todas as minhas decisões.

A minha orientadora Dr^a.Graziela Scaliante Ceravolo, pela oportunidade, paciência, apoio e por tudo que me ensinou. Agradeço pela dedicação em sua orientação e pelas valiosas sugestões.

Ao laboratório de biologia celular da secreção, da Universidade Estadual de Maringá, em especial a Dr.^a Kesia Gemina Palma Rigo Wutzow e Anna Rebecka Oliveira Ferreira, pela parceria e colaboração.

Ao laboratório de farmacologia vascular, agradeço a Camila Boracki Vidigal, Kawane Fabrício Moura, Deborah Gomes da Silva, Carolina Matias Higashi, Juliana da Silva Jezuino, Rafaella Cardoso Gravena, por todo o ensinamento, colaboração, apoio e incentivo durante todo esse período, também, pela convivência e amizade.

A todos meus amigos e colegas que me ouviram, apoiaram e torceram por mim.

A Universidade Estadual de Londrina, e aos funcionários pelo apoio sempre concedido.

A CAPES pelo auxilio financeiro.

*“Tenho a impressão de ter sido uma criança
brincando à beira-mar, divertindo-me em
descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma
concha mais bonita que as outras, enquanto o
imenso oceano da verdade continua
misterioso diante de meus olhos”.*

(Isaac Newton)

DE SOUZA, Amanda Cristina. **Dieta de restrição proteica em ratos durante a adolescência causa disfunção endotelial na vida adulta.** 2020. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A restrição de proteínas durante a adolescência em ratos pode favorecer o estabelecimento de distúrbios metabólicos e cardiovasculares na vida adulta. O sistema vascular, juntamente com a função endotelial, tem papel central no desenvolvimento dos distúrbios cardiometabólicos. No entanto, até onde sabemos, as consequências da restrição proteica durante a adolescência sobre a função endotelial de ratos adultos não foram avaliadas. Assim, nosso estudo teve como objetivo avaliar em ratos se a restrição proteica durante a adolescência causa disfunção endotelial na aorta e os possíveis mecanismos envolvidos na vida adulta. Ainda, foi o objetivo avaliar alguns parâmetros biométricos. Para tanto, ratos Wistar no dia pós-natal (DPN) 30 foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais: LP que recebeu dieta com redução de proteínas (4% de proteína) e CTR que recebeu dieta normoproteica (23% de proteína) durante a adolescência (DPN30 - 60). Após DPN 60, os ratos de ambos os grupos receberam dieta normoproteica. Na idade adulta (DPN120) foi avaliada a função endotelial através do estudo da reatividade da aorta torácica para fenilefrina (Fenil), acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS), em experimentos realizados na presença (E+) ou ausência (E-) de endotélio. Os mecanismos envolvidos com a disfunção endotelial foram investigados utilizando indometacina (inibidor da ciclooxigenase), apocinina (inibidor da NADPH oxidase) e tempol (antioxidante). Os dados de reatividade vascular foram avaliados pela resposta máxima (Rmax) e pD2 (-log da concentração de fármaco que causa 50% da Rmax) para os diferentes fármacos. Também no DPN120 foram avaliadas as massas dos tecidos adiposos retroperitoneal, perigonadal e marrom interescapular, do fígado, da adrenal esquerda e do músculo soleo, e foi aferido o comprimento naso-anal (CNA) e da tíbia. Os dados foram analisados com o teste ANOVA (de uma ou duas vias seguido por pós-teste de Tukey) ou teste t independente; os resultados expressos como média ± erro padrão da média, e as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Neste estudo foi observado que a aorta torácica de ratos LP apresentou aumento da Rmax para o vasoconstritor Fenil em anéis E+ em comparação com os anéis E+ do grupo CTR, sem alteração na pD2. Em anéis E- não houve diferença tanto na Rmax quanto na pD2 para Fenil entre LP e CTR. Em outra série de experimentos, foram avaliados os mecanismos envolvidos com o aumento da resposta para Fenil observado nos anéis LP E+. A incubação dos anéis E+ com apocinina, reduziu a Rmax para Fenil no grupo LP, sem alterar esta resposta no grupo CTR, já o tempol e a indometacina não alteraram a resposta em ambos os grupos. A Rmax e a pD2 para ACh e NPS em anéis de aorta de ratos LP foram semelhantes as do grupo CTR. Também foi observado que os ratos do grupo LP apresentaram redução no CNA, no comprimento da tíbia, e na massa corporal, sem alteração na massa dos tecidos adiposos brancos e marrom, do fígado, da adrenal esquerda e do músculo soleo. Em conclusão, a restrição de proteínas durante a adolescência causa prejuízo da modulação endotelial sobre a resposta contrátil,

caracterizando a presença de disfunção endotelial na vida adulta, o que provavelmente acontece por aumento da geração de espécies reativas de oxigênio pela enzima NADPH oxidase. Ainda, a dieta LP na adolescência causa prejuízo na massa corpórea e tamanho do rato na vida adulta. Assim, os resultados aqui apresentados destacam a adolescência como uma fase sensível a dietas carenciais, podendo a restrição proteica nesta fase favorecer o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: origens desenvolvimentistas da Saúde e da Doença; desnutrição; espécies reativas de oxigênio; endotélio vascular; aorta.

DE SOUZA, Amanda Cristina. **Low-protein diet in puberty impairs endothelial function in adult male rats.** 2020. 58 p. Dissertation (Master's Degree in Pharmaceutical Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Protein restriction during adolescence in rats may favor the establishment of metabolic and cardiovascular disorders in adulthood. The vascular system, together with endothelial function, plays a central role in the development of cardiometabolic disorders. However, as far as we know, the consequences of protein restriction during adolescence on the endothelial function of adult rats has not been evaluated. Thus, our study aimed to evaluate in rats whether protein restriction during adolescence in rats causes aortic endothelial dysfunction and the possible mechanisms involved in adulthood. Also, the objective was to evaluate some biometric parameters. Therefore, Wistar rats on the postnatal day (DPN) 30 were randomly assigned to two experimental groups: LP that received a diet with reduced protein (4% protein) and CTR that received a normoprotein diet (23% protein) during the adolescence (DPN30 - 60). After DPN 60, rats from both groups received a normoprotein diet. In the adulthood (DPN120) endothelial function was assessed by studying the thoracic aorta reactivity to phenylephrine (Phenyl), acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SPN) and the experiments were performed in the presence (E +) or absence (E-) of endothelium. The mechanisms involved with endothelial dysfunction were investigated using indomethacin (cyclooxygenase inhibitor), apocinin (NADPH oxidase inhibitor) and tempol (antioxidant). The vascular reactivity data were evaluated by the maximum response (Rmax) and pD2 (-log of the drug concentration that causes 50% of the Rmax) for the different drugs. At DPN120, the weight of retroperitoneal, perigonadal and interscapular brown tissues, of the liver, left adrenal and soleus muscle were evaluated, and the naso-anal and tibial length were measured. The data were analyzed using the ANOVA test (one or two ways followed by Tukey's post-test) or independent t test; the results expressed as mean \pm standard error of the mean, and the differences considered statistically significant when $p < 0.05$. In this study it was observed that the thoracic aorta of LP rats showed an increase in Rmax for the vasoconstrictor Fenil in E + rings in comparison with the E + rings of the CTR group, without alteration in pD2. In E- rings there was no difference in both Rmax and pD2 for Phenyl between LP and CTR. In another series of experiments, the mechanisms involved with the increased response to Phenyl observed in LP E + rings were evaluated. Incubation of the E + rings with apocinin reduced the Rmax for Phenyl in the LP group, without altering this response in the CTR group, whereas tempol and indomethacin did not alter the response in both groups. The Rmax and pD2 to ACh and NPS in aortic rings of LP rats were similar to those in the CTR group. It was also observed that body weight and naso-anal and tibia length were reduced in the LP group in comparison with CTR group. On the other hand, the masses of white and brown adipose tissues, the liver, the left adrenal and the soleus muscle were similar between the groups. In conclusion, protein restriction during adolescence causes impairment of endothelial modulation on the contractile response, probably by a mechanism involving increased generation of reactive oxygen species by the enzyme NADPH oxidase. Also, the LP diet in adolescence causes damage to the body mass and size of the rat in adulthood.

Thus, the results presented here highlight the adolescence as a sensitive phase to deficient diets, and that protein restriction in this phase may favor the development of cardiovascular diseases.

Keywords: developmental origins of health and disease; malnutrition; reactive oxygen species; vascular endothelium; aorta.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Curvas concentração-efeito cumulativas com fenilefrina em anéis de aorta de ratos adultos alimentados com dieta controle ou hipoproteica durante a adolescência.....26
- Figura 2** Mecanismos envolvidos no aumento da resposta contrátil em anéis de aorta com endotélio de animais alimentados com dieta hipoproteica durante a adolescência.....28
- Figura 3** Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratos adultos alimentados com dieta controle ou hipoproteica durante a adolescência30
- Figura 4** Curvas concentração-efeito cumulativas para nitroprussiato de sódio em anéis de aorta sem endotélio de ratos adultos alimentados com dieta controle ou hipoproteica durante a adolescência31
- Figura 5** Mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio de ratos adultos alimentados com dieta controle ou hipoproteica durante a adolescência32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das rações normoproteica e hipoproteica.....	22
Tabela 2	Avaliações biométricas realizadas em ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica e dieta controle durante a adolescência	25
Tabela 3	Resposta contrátil para fenilefrina em anéis de aorta torácica com e sem endotélio	27
Tabela 4	Efeito da incubação com apocinina, indometacina e tempol sobre as curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta com endotélio de ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica durante a adolescência	29
Tabela 5	Efeito da incubação com apocinina, indometacina e tempol sobre as curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta com endotélio de ratos adultos alimentados com dieta controle durante a adolescência.....	29
Tabela 6	Resposta relaxante para acetilcolina e nitroprussiato de sódio em anéis de aorta torácica	31
Tabela 7	Efeito da incubação com apocinina e tempol sobre a resposta relaxante dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos adultos alimentados com dieta normoproteica durante adolescência	32
Tabela 8	Efeito da incubação com apocinina e tempol sobre a resposta relaxante dependente do endotélio em anéis de aorta de ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica durante adolescência	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ADP	Disfosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ATP	Adenosina trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIF	Departamento de Ciências Fisiológicas
CNA	Comprimento Naso-Anal
COBEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CTR	Controle
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E+	Anéis de aorta com endotélio
E-	Anéis de aorta sem endotélio
EDCFs	Fatores contráteis derivados do endotélio
EDHF	Fatores hiperpolarizantes derivados do endotélio
EDRFs	Fatores relaxantes derivados do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
Fenil	Fenilefrina
GH	Hormônio do crescimento
GMPc	Fosfato de guanosina cíclico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
K ⁺	Potássio
LP	Ratos alimentados com dieta hipoproteica
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPS	Nitroprussiato de sódio
O ₂	ânion superóxido

OH*	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
pD ₂	Log da concentração do agonista, resultando em 50% da resposta máxima
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂	Prostaglandina F ₂
PGI ₂	Prostaciclina
R _{max}	Resposta máxima
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	20
3	MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1	ANIMAIS E DIETA HIPOPROTEICA	21
3.1.1	Preparo Da Ração Hipoproteica	21
3.2	PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	22
3.3	REATIVIDADE DA AORTA TORÁCICA ISOLADA.....	23
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	24
4	RESULTADOS	25
4.1	PARÂMETROS CORPÓREOS.....	25
4.2	REATIVIDADE VASCULAR.....	25
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	ANEXOS	57

1 1 INTRODUÇÃO

2 A adversidade nutricional até os dias atuais é considerada um
3 problema de saúde pública, atingindo uma parcela importante da população
4 (BECKERMAN-HSU *et al.*, 2020; HUMBWAVALI *et al.*, 2019; LOPES *et al.*, 2019).
5 Falhas nutricionais interferem em fatores físicos, fisiológicos e psicossociais
6 podendo desencadear reduções na estatura e massa corpórea, além de deficiências
7 imunológicas, anemias ferroprivas, aumento da susceptibilidade a microrganismos,
8 alterações cardiovasculares, atrasos no desenvolvimento mental e dificuldade no
9 aprendizado (BARRETO *et al.*, 2016).

10 A Organização Mundial da Saúde (OMS) refere-se à desnutrição
11 como “deficiências, excessos ou desequilíbrio na ingestão de energia e/ou de
12 nutrientes de uma pessoa” (WHO, 2020). De acordo com a Organização das Nações
13 Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, sigla do inglês *Food and Agriculture*
14 *Organization*), havia cerca de 821,6 milhões de pessoas desnutridas em 2018 (FAO
15 *et al.*, 2019). Recentemente, uma perspectiva feita por eles mostra que
16 aproximadamente 67 milhões de pessoas passarão fome na América Latina e no
17 Caribe em 2030 (FAO *et al.*, 2020). Estudos demonstram, que a deficiência
18 nutricional traz altos impactos econômicos, já que estão relacionadas com várias
19 comorbidades, além de ter um impacto cognitivo nas crianças, interferindo assim
20 com o desenvolvimento do capital humano e trazendo prejuízos econômicos
21 consideráveis (JENSEN, 2020; NJUGUNA; BERKLEY; JEMUTAI, 2020).

22 Atualmente reconhece-se que condições adversas, como restrição
23 nutricional, durante o início da vida podem afetar significativamente a saúde dos
24 adultos (MARTIN *et al.*, 2000; OSMOND; BARKER, 2000; VOHR *et al.*, 2010). Esse
25 conceito é denominado “programação do desenvolvimento” (PRIOR; ARMITAGE,
26 2009), que hoje é conhecido como “Origens Desenvolvimentista da Saúde e da
27 Doença”, se desenvolve com base em estudos epidemiológicos publicados por
28 Barker e colaboradores. Nestes estudo iniciais foi descrito, que o baixo peso ao
29 nascer e durante a infância, causado por restrição nutricional, está relacionado com
30 maior risco de doenças cardiovasculares na vida adulta (BARKER *et al.*, 1989,
31 1990; BARKER; OSMOND; GOLDING, 1990).

1 Nutrientes essenciais ao desenvolvimento fisiológico, como as
2 proteínas, quando restritos em fases iniciais do crescimento do organismo podem
3 resultar em distúrbios metabólicos e cardiovasculares na vida adulta (DE OLIVEIRA,
4 *et al.*, 2012; LANGLEY-EVANS; PHILLIPS; JACKSON, 1994) tendo o sistema
5 vascular papel central no estabelecimento dessas doenças (MOMBOULI;
6 VANHOUTTE, 1999).

7 O sistema vascular é composto por duas redes, uma arterial e outra
8 venosa. O ramo arterial possui artérias de grande calibre, também conhecidas como
9 vasos de condutância e vasos de pequeno diâmetro, conhecidas como vasos de
10 resistência, sendo estas responsáveis pelo controle da pressão arterial. Neste
11 projeto usamos como modelo experimental para estudo vascular a aorta. Este é o
12 vaso que retém mais pressão após o bombeamento do coração, impulsionando o
13 fluxo sanguíneo para as outras artérias até chegar às veias e retornar ao coração.
14 Assim como os demais vasos de condutância a aorta é constituída pela camada
15 adventícia, formada por fibroblastos, células nervosas e tecido adiposo; a camada
16 média, considerada a unidade funcional do vaso por ser formada por músculo liso; e
17 a camada íntima formada pelas células endoteliais (DEE UNGLAUB
18 SILVERTHORN, 2010).

19 As células endoteliais revestem todo o sistema circulatório modulam
20 o tônus vascular, através da produção de compostos parácrinos, como fatores
21 relaxantes derivados do endotélio (EDRF) e fatores de contração derivado do
22 endotélio (EDCF). Os EDRF são compostos como óxido nítrico (NO),
23 prostaglandinas vasodilatadoras (PGI₂ e PGE₂) e fatores hiperpolarizantes (EDHF).
24 Estes EDRF são liberados através da ação de substâncias como: acetilcolina (ACh),
25 adenosina trifosfato (ATP), difosfato de adenosina (ADP), substância P, trombina,
26 serotonina, bradicinina, histamina, além da tensão de cisalhamento estimulada pelo
27 fluxo (VANHOUTTE; EBER, 1991).

28 O NO é o principal EDRF das artérias de condutância, sendo um
29 gás é produzido pela enzima NO sintase (NOS), que se apresenta em três
30 isoformas, a endotelial (eNOS) expressa principalmente no endotélio, a neuronal
31 (nNOS) expressa em tecido nervoso e vascular, e a induzível (iNOS) cuja a
32 expressão é controlada por processos inflamatórios (EROGLU *et al.*, 2017). O NO
33 age sobre o músculo liso vascular ativando a guanilato ciclase, o que

1 conseqüentemente eleva o nível de guanosina cíclico (GMPc), acarretando o
2 relaxamento vascular. Fatores como estrógeno, exercícios físicos, e uma dieta
3 adequada podem aumentar a produção de NO pelas células endoteliais. No entanto,
4 o estresse oxidativo, a poluição, o tabagismo e lipoproteínas de baixa densidade
5 oxidadas, podem diminuir sua produção e/ou biodisponibilidade favorecendo a
6 vasoconstrição (VANHOUTTE *et al.*, 2017).

7 As prostaglandinas (PGI₂ e PGE₂) também são bem descritas por
8 causarem vasodilatação. As células endoteliais quando estimuladas por substâncias,
9 como a ACh, ou pela tensão de cisalhamento, ativam as fosfolipases que
10 conseqüentemente dão origem ao ácido araquidônico. O ácido araquidônico pode
11 ser metabolizado pelas ciclooxigenases (COX1 e COX2) em prostanóides, que
12 compreendem em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. A PGI₂ e a PGE₂
13 ao se ligarem ao receptor de prostaciclina e de prostaglandina E₂, medeiam o
14 aumento da concentração de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) nas células
15 musculares lisa, acarretando no relaxamento vascular (DRENJANČEVIĆ *et al.*,
16 2016; LÜSCHER, 1989).

17 Os EDHF complementam a ação do NO e das prostaglandinas. Eles
18 ativam canais de potássio (K⁺) e a hiperpolarização das células musculares lisa
19 vascular, contribuindo para os mecanismos que levam ao seu relaxamento
20 (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009). Primeiramente, ocorre uma despolarização
21 endotelial, um evento ativado pelo cálcio, que pode ser iniciado por ácido
22 eicosatetraenóico ou NO, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e além de outras
23 espécies reativas. Após a despolarização do endotélio, um sinal é transferido para o
24 musculo liso por K⁺ ou via junções comunicantes causando o relaxamento vascular
25 (COHEN, 2005).

26 Já os EDCF são substâncias como endotelina-1, prostanóides
27 vasoconstritores, ânion superóxido e angiotensina II (VANHOUTTE *et al.*, 2017;
28 VANHOUTTE; EBER, 1991). Destes, os primeiros fatores a serem descritos foram
29 os prostanóides vasoconstritores, que são produzidos pela ativação da
30 cicloxigenase-1 (COX-1) no endotélio vascular. Os prostanóides vasoconstritores
31 são substâncias, como PGF₂ e tromboxano A₂, que agem ativando receptores FP e
32 TP em células musculares lisa do vaso, levando à contração. Também foram
33 identificados outros compostos como ânion superóxido, que agem inativando o NO.

1 Além dos peptídeos endotelina-1 e angiotensina II que ativam receptores do subtipo
2 A da endotelina e receptor de angiotensina II do tipo 1 no músculo liso e assim
3 causam vasoconstrição (LIN *et al.*, 2014; VANHOUTTE; TANG, 2008).

4 A disfunção endotelial é a consequência de um processo
5 inflamatório crônico, acompanhada por perda de fatores antitrombóticos, além de
6 desequilíbrio na homeostase de EDCF e EDRF. Este desequilíbrio pode se dar, por
7 aumento da ação de EDCF em relação aos EDRF ou diminuição da
8 produção/biodisponibilidade de EDRF (HADI; CARR; AL SUWAIDI, 2005;
9 VATANABE *et al.*, 2017).

10 A restrição proteica durante o desenvolvimento intrauterino, pode
11 levar à redução do crescimento fetal, além de aumentar as chances de eventos
12 cardiovasculares tardios (SWALI; MCMULLEN; LANGLEY-EVANS, 2010). Observa-
13 se, que a restrição de nutrientes para o feto e hipóxia, acarretam mudanças na
14 expressão dos componentes da matriz, alterando a estrutura vascular, podendo
15 causar comprometimento da propriedade elástica dos vasos (MENENDEZ-CASTRO
16 *et al.*, 2011). Ainda se descreve em humanos, e em modelos experimentais, que a
17 restrição intrauterina de nutrientes pode causar disfunção endotelial em macro e
18 microvasos (CERAVOLO *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2009).

19 Os mecanismos envolvidos com a disfunção endotelial nestes
20 modelos de restrição global de nutrientes, se relacionam com reduzida síntese e
21 biodisponibilidade de NO, associadas à redução na atividade eNOS ou aumentada
22 oxidação do NO pelo excesso de ânion superóxido advindo da NADPH oxidase
23 (SATHISHKUMAR *et al.*, 2009). De forma semelhante, dietas com restrição de
24 proteína também favorecem o desenvolvimento de disfunção endotelial, por
25 mecanismos que envolvem as espécies reativas de oxigênio (EROs) (CHISAKA *et*
26 *al.*, 2016).

27 A produção de EROs em baixos níveis contribui para a homeostase
28 vascular, uma vez que essas moléculas atuam como sinalizadores celulares, mas
29 quando produzidas em grandes quantidades podem mediar lesões em nível celular
30 (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). Dentre as EROs mais produzidas estão o
31 ânion superóxido, ácido hipocloroso, peróxido de hidrogênio, oxigênio singleto,
32 hipoclorito, radical hidroxila e peróxido lipídico. Essas EROs em grande quantidade
33 podem desempenhar papel importante no desenvolvimento de doenças como

1 artrite, câncer, diabetes, aterosclerose, isquemia, falhas na imunidade e na função
2 endócrina (RAJENDRAN *et al.*, 2014).

3 Varias enzimas antioxidantes como superóxido dismutase (SOD),
4 catalase e peroxidases, catalisam uma cascata complexa de reações para converter
5 EROs em moléculas mais estáveis, como H₂O e O₂ (RAHAL *et al.*, 2014). Por
6 exemplo, a SOD reduz a quantidade de ânion superóxido, dismutando esta molécula
7 em peróxido de hidrogênio, que é parcialmente eliminado por catalases e
8 peroxidases (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; TOVMASYAN; REBOUCAS;
9 BENOVA, 2014). O peróxido de hidrogênio isoladamente não é uma molécula muito
10 nociva, mas pode se difundir com facilidade nas membranas celulares, e reagir com
11 metais, como o ferro, formando radical hidroxila (OH^{*}). O OH^{*} por ter meia vida-curta
12 não sofre a ação de antioxidantes, e reage rapidamente com as moléculas mais
13 proximas, tornando-se o radical livre mais danoso às células (BARREIROS; DAVID;
14 DAVID, 2006).

15 Radicais livres, como o OH^{*}, que são altamente reativos, podem
16 levar a oxidação lipídica. A oxidação lipídica aumenta o LDL oxidado, que se liga a
17 receptor-1 de lipoproteína de baixa densidade oxidada semelhante à lectina (LOX-1),
18 tendo um potencial pró-inflamatório em aterogênese, que é importante na
19 patogênese da aterosclerose (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

20 Para que exista a homeostase fisiológica, é necessário equilíbrio
21 entre os níveis de pró-oxidantes e antioxidantes celulares. O desequilíbrio destes
22 fatores resulta em estresse oxidativo (RAHAL *et al.*, 2014). Radicais livres em
23 excesso, interagem com outras moléculas nas células (proteínas, membranas e
24 genes) causando danos oxidativos (RAHAL *et al.*, 2013).

25 O estresse oxidativo pode favorecer a disfunção endotelial, o que
26 aumenta o tonus vascular, reduzindo a perfusão tecidual periférica, e podendo ter
27 como consequência o desenvolvimento de hipertensão e outras doenças
28 cardiovasculares (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015; ZHAZYKBAYEVA *et al.*, 2020).

29 Como já descrito anteriormente, a restrição nutricional em fases
30 iniciais da vida, como a fase intrauterina (CHISAKA *et al.*, 2016; SATHISHKUMAR *et*
31 *al.*, 2009) e infância (MAIA *et al.*, 2014), favorece o estabelecimento de disfunção
32 endotelial por mecanismo que envolve as EROs. Entretanto, ainda não existem

1 relatos da consequências cardiovasculares da restrição de nutrientes durante a
2 adolescência. Além disso, estudos epidemiológicos mostram que desde a década de
3 70 e até os dias atuais a restrição nutricional se relaciona com o aumento do risco
4 cardiovascular (FORSDAHL, 1978; VAN ABELEN *et al.*, 2012).

5 Assim, considerando que pouco se conhece sobre os efeitos
6 cardiometabólicos da restrição proteica durante a adolescência, este estudo teve
7 como hipótese, que a dieta restrita em proteína (4%) durante adolescência
8 acarretaria disfunção endotelial na vida adulta. A compreensão destes eventos pode
9 favorecer a aplicação de estratégias, como a conscientização da população sobre a
10 importância de uma dieta com quantidade adequada de proteína na adolescência,
11 para prevenção de doenças cardiovasculares na vida adulta.

1 2 OBJETIVOS

2 Avaliar as consequências de uma dieta hipoproteica, em animais
3 alimentos durante a adolescência, sobre parâmetros vasculares e biométricos em
4 ratos adultos.

5 Os objetivos específicos foram avaliar:

- 6 1. O crescimento, massa e composição corporal;
- 7 2. A função contrátil e relaxante da aorta;
- 8 3. O papel do endotélio sobre a resposta contrátil e relaxante da aorta;
- 9 4. Os mecanismos envolvidos na resposta vascular.

1 3 MATERIAIS E MÉTODOS

2 3.1 ANIMAIS E DIETA HIPOPROTEICA

3 Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, obtidos no Biotério
4 Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM), transportados com 100 dias de
5 idade para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) da
6 Universidade Estadual de Londrina (UEL). Em ambos os biotérios, os animais foram
7 mantidos em gaiolas coletivas, em sala com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de
8 12 horas (6:00-18:00 horas, período claro), com livre acesso à água e ração.

9 Para obtenção do modelo experimental, ratos Wistar com 30 dias de
10 idade foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais. O grupo *low*
11 *protein* (LP) recebeu dieta com 4% de proteína do 30º ao 60º dia de idade (período
12 relativo à puberdade) e o grupo controle recebeu dieta padrão (23% de proteína,
13 Nuvital®, Curitiba/PR, Brasil) do 30º ao 60º dia de idade (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).
14 A partir do 60º dia de idade (idade adulta) os animais do grupo LP passaram a
15 receber dieta padrão. Este protocolo dietético foi realizado na UEM e os animais
16 transferidos para a UEL com 100 dias de idade. Para que os animais se
17 ambientassem às novas condições de biotério, as análises experimentais foram
18 realizadas aos 120 dias de idade. Todos os protocolos experimentais estão de
19 acordo com o preconizado pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação
20 Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de animais da
21 Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL: 144/2019) e de Maringá
22 (CEUA/UEM:4833210519).

23 3.1.1 Preparo Da Ração Hipoproteica

24 A ração hipoproteica foi preparada no Laboratório de Biologia Celular
25 da Secreção da UEM, tendo seus constituintes descritos na Tabela 1.

1 **Tabela 1.** Quantidade de componentes das rações normoproteica e hipoproteica

Componentes	Dieta Normoproteica (23%)	Dieta Hipoproteica (4%)
Sacarose	12,72	20,00
Amido de Milho	52,75	64,25
Caseína (88% de proteína)	23,33	4,55
Mistura de Sais Minerais*	3,20	3,20
Mistura de Vitaminas*	1,60	1,60
Óleo de Soja	4,80	4,80
Óleo de Fígado de Peixe	1,60	1,60
Total (g)	100,0	100,0

2 As misturas de sais minerais e vitaminas que compõem as rações padrão (normoproteica) e
3 hipoproteica seguem as recomendações do *American Institute of Nutrition*, AIN 93 (REEVES; SUPPL,
4 1997).

5 3.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS

6 Ratos dos diferentes grupos foram anestesiados com tiopental
7 sódico (80 mg/kg,ip), pesados e o comprimento naso-anal (CNA) medido com auxílio
8 de uma régua (cm). Foi realizado o cálculo de índice de Lee (IL): [raiz cúbica da
9 massa corporal (g)/comprimento naso-anal(cm)x100]. Após anestesia, foi realizada
10 uma toracotomia para remoção da aorta. A seguir, foram removidos e pesados os
11 tecidos adiposos brancos (perigonadal e retroperitoneal) e marrom (interescapular).
12 Além disso, foram removidos o fígado, a adrenal esquerda e o sóleo. Os tecidos
13 adiposos, o fígado, a adrenal esquerda e o sóleo, tiveram sua massa corrigida pela
14 massa corporal do animal, sendo os valores expressos como peso do tecido por
15 100g da massa corpórea. A tíbia esquerda também foi removida, dissecada e
16 medida em relação ao seu comprimento (cm).

1 3.3 REATIVIDADE DA AORTA TORÁCICA ISOLADA

2 Os ratos dos diferentes grupos foram anestesiados com tiopental
3 sódico (80 mg/kg, i.p.), e a aorta torácica foi removida, dissecada e seccionada em
4 quatro segmentos (5mm de comprimento). Os anéis de aorta foram montados em
5 um banho de órgãos isolados, contendo solução de Krebs-Henseleit modificada
6 (concentrações em mM: 130 NaCl, 14,9 NaHCO₃; 4,7 KCl; 25 1,18 KH₂PO₄; 1,17
7 MgSO₄-7H₂O; 5,5 glicose; 1,60 CaCl₂-2H₂O e 0,026 EDTA) aerada com 95% de O₂
8 e 5% de CO₂ a 37° C e pH 7,4 (CERAVOLO *et al.*, 2013; HIGASHI *et al.*, 2018).
9 Cada aorta originou quatro anéis: em dois o endotélio foi preservado (E+) e em
10 outros dois removido (E-).

11 A remoção do endotélio foi realizada pela fricção no lúmen do vaso
12 com uma haste fina de metal envolta em algodão. Para confirmar a remoção ou a
13 presença do endotélio, após uma hora de estabilização, com trocas de solução de
14 Krebs-Henseleit a cada 20 min, e teste da viabilidade do musculo liso com solução
15 de cloreto de potássio (90 mM) por 15 min, os anéis foram novamente estabilizados
16 e contraídos com concentração submáxima de Fenilefrina (Fenil) (3μM), e após
17 estabilização o vasodilatador dependente de endotélio, acetilcolina (ACh) (3μM), foi
18 adicionado.

19 Foram considerados anéis E+ aqueles em que a ACh promoveu no
20 mínimo 60% de relaxamento em relação a contração promovida pela Fenil, e E-
21 aqueles onde o vasodilatador promoveu no máximo 5% de relaxamento. Após este
22 teste, a solução Krebs-Henseleit foi trocada a cada 10 min durante 30min para
23 remoção das drogas adicionadas. Então foram realizadas curvas concentração-
24 efeito cumulativas para o agonista alfa-1 adrenérgico, Fenil (1nM - 100μM, anéis E+
25 e E-), para o vasodilatador dependente do endotélio ACh (1nM-30μM, anéis E+), e
26 para o doador de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (NPS, 0.1nM-30μM, anéis E-).
27 As curvas para os vasodilatadores (ACh e NPS) foram construídas em anéis de
28 aorta contraídos com concentração submáxima de Fenil (concentração que causa de
29 60-80% da resposta máxima de Fenil).

30 Para investigar os mecanismos envolvidos na disfunção endotelial,
31 em outra série de experimentos, em anéis de aorta com endotélio foram realizadas
32 curvas concentração-efeito cumulativas para Fenil (1nM-300μM), após previa

1 incubação com inibidor não seletiva de cicloxigenase (COX), indometacina (10 μ M),
2 para investigar o papel dos prostanóides. Para se conhecer o papel das espécies
3 reativas de oxigênio, os anéis E+ foram incubados com o antioxidante tempol (1 μ M)
4 ou o inibidor de NADPH oxidase apocinina (1 μ M) (CERAVOLO *et al.*, 2013;
5 HIGASHI *et al.*, 2018). Também foi investigado o papel das espécies reativas na
6 resposta vasodilatadora para ACh. Para isso, os anéis E+ foram incubados, por 30
7 min, com tempol (1 μ M) ou apocinina (1 μ M) e as curvas para Fenil e ACh foram
8 construídas na presença dos inibidores.

9 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

10 A partir das curvas concentração-efeito cumulativas para Fenil, ACh
11 e NPS foram determinadas a resposta máxima (R_{max}) e o - log da concentração do
12 agonista resultando em 50% da R_{max} (pD₂) utilizando uma análise de regressão
13 não-linear (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA). Estes dados foram usados
14 nas análises estatísticas a fim de comparar as respostas entre os grupos
15 experimentais.

16 Para análise dos dados foi realizado primeiramente testes de
17 normalidade (Shapiro-Wilk) e de homogeneidade das variâncias (Levene), e logo
18 após, os dados foram analisados por: ANOVA de duas vias (usando como variáveis
19 independentes a dieta e o endotélio, e como variável dependente a R_{max} ou a pD₂),
20 apresentadas as interações foi realizado o teste ANOVA duas vias e pós-teste Tukey
21 (reatividade para Fenil) ou ANOVA uma via com pós-teste de Tukey (mecanismos
22 para Fenil e ACh). O teste T-Student foi utilizado para analisar a reatividade para
23 ACh, NPS e os dados dos parâmetros biométricos. Os resultados foram expressos
24 como média \pm e.p.m. Foram considerados valores significantes quando $p < 0.05$. As
25 análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS (IBM, SPSS
26 Statistics v20, NY, USA).

1 4 RESULTADOS

2 4.1 PARÂMETROS CORPÓREOS

3 O teste T-student demonstrou que os ratos LP apresentaram
4 redução de massa corporal, CNA e comprimento da tíbia quando comparados aos
5 animais CTR. Também, este mesmo teste apresentou que o índice de Lee, a massa
6 dos tecidos adiposos brancos e marrom, do fígado, da adrenal esquerda e do
7 músculo sóleo foram similares entre os grupos experimentais (Tabela 2).

8 **Tabela 2.** Avaliações biométricas realizadas em ratos adultos alimentados com dieta
9 hipoproteica e dieta controle durante a adolescência

Parâmetros	Grupos	
	CTR	LP
Massa Corpórea (g)	435,47±6,54	405,10±6,53*
CNA (cm)	24,70±0,28	23,80±0,19*
Índice de Lee	30,86±0,30	31,35±0,30
Tíbia (mm)	42,10±0,28	40,60±0,16*
Tecido Adiposo Retroperitoneal (g/100g)	1,30±0,10	1,53±0,10
Tecido Adiposo Perigonadal (g/100g)	1,55±0,11	1,24±0,17
Tecido Adiposo Marrom (g/100g)	0,08±0,004	0,08±0,005
Fígado (g/100g)	3,83±0,15	3,94±0,15
Adrenal E (g/100g)	0,005±0,0002	0,005±0,0002
Soleo (g/100g)	0,04±0,003	0,04±0,003

10 As massas de órgãos e tecidos foram expressas em relação a 100g de massa corpórea (g/100g). LP:
11 ratos alimentados com dieta hipoproteica durante a adolescência e CTR: ratos alimentados com dieta
12 normoproteica durante a adolescência. CNA: comprimento naso-anal; Adrenal E: adrenal esquerda.
13 Dados expressos como média ± e.p.m. n=15/grupo para peso corpóreo e n=10/grupo para demais
14 parâmetros. *p<0.05 vs CTR (teste T Student).

15

16 4.2 REATIVIDADE VASCULAR

1 Em anéis de aorta de ambos os grupos experimentais, os fármacos
2 Fenil, ACh e NPS causaram resposta do tipo concentração-dependente.

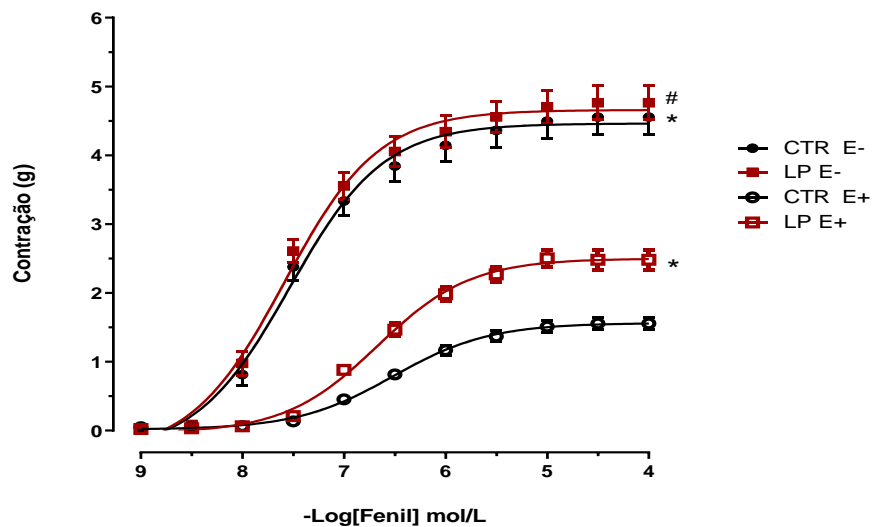
3 Como demonstrado na Tabela 3 e Figura 1, o ANOVA de duas vias
4 indicou interações entre os fatores dieta e endotélio. O ANOVA de duas vias seguido
5 do pós-teste de Tukey, demonstrou aumento da Rmax para Fenil em anéis de aorta
6 de ratos LP comparadas com a Rmax de ratos CTR ($F(1,35) = 5,087, p=0,03$) na
7 presença do endotélio (E+), já a pD2 foi semelhante entre os grupos ($p=0,501$). O
8 ANOVA de uma via também demonstrou que em anéis E-, a Rmax e a pD2 foram
9 semelhantes entre ratos CTR e LP (Tabela 3, Figura 1). Os anéis E- de ratos CTR e
10 LP apresentaram aumento da Rmax e pD2 para Fenil quando comparados com seus
11 respectivos anéis E+ (Tabela 3, Figura 1).

12 Para avaliar os mecanismos envolvidos no aumento da resposta
13 contrátil para Fenil, em anéis de aorta E+ de ratos LP, foram construídas curvas-
14 concentração-efeito cumulativas para este agonista alfa-1 adrenérgico, na presença
15 de inibidores de fatores constritores derivados do endotélio. ANOVA de uma via
16 seguido do pós-teste de Tukey demonstrou que a incubação com apocinina (inibidor
17 da NADPH oxidase) reduziu a Rmax para Fenil, em anéis E+ de ratos LP quando
18 comparados com os anéis E+ sem bloqueio de ratos LP. Ainda, que a incubação de
19 anéis E+ de ratos LP com indometacina (inibidor não seletivo da ciclooxigenase) ou
20 tempol (antioxidante), não alterou a Rmax ou pD2 para Fenil (Tabela 4, Figura 2B),
21 em comparação com anéis E+ sem bloqueio de ratos LP. Nos anéis de aorta E+ de
22 ratos CTR, as incubações com indometacina, apocinina e tempol não alteraram a
23 resposta para Fenil, quando comparados com anéis E+ sem bloqueio de ratos CTR
24 (Tabela 5, Figura 2A).

25 A resposta relaxante para ACh em anéis E+, foi similar nos animais
26 LP e CTR, na Rmax e pD2 (Tabela 6, Figura 3). Não houve diferença na Rmax e na
27 pD2 do NPS entre CTR e LP em anéis E- (Tabela 6, Figura 4).

28 A resposta de relaxamento dependente de endotélio para ACh não
29 foi alterada pela incubação com apocinina ou tempol tanto em anéis de aorta de
30 ratos LP quanto de CTR (Tabela 7 e 8, Figura 5).

31 **Figura 1.** Curvas concentração-efeito cumulativas com fenilefrina em anéis de aorta
32 de ratos adultos



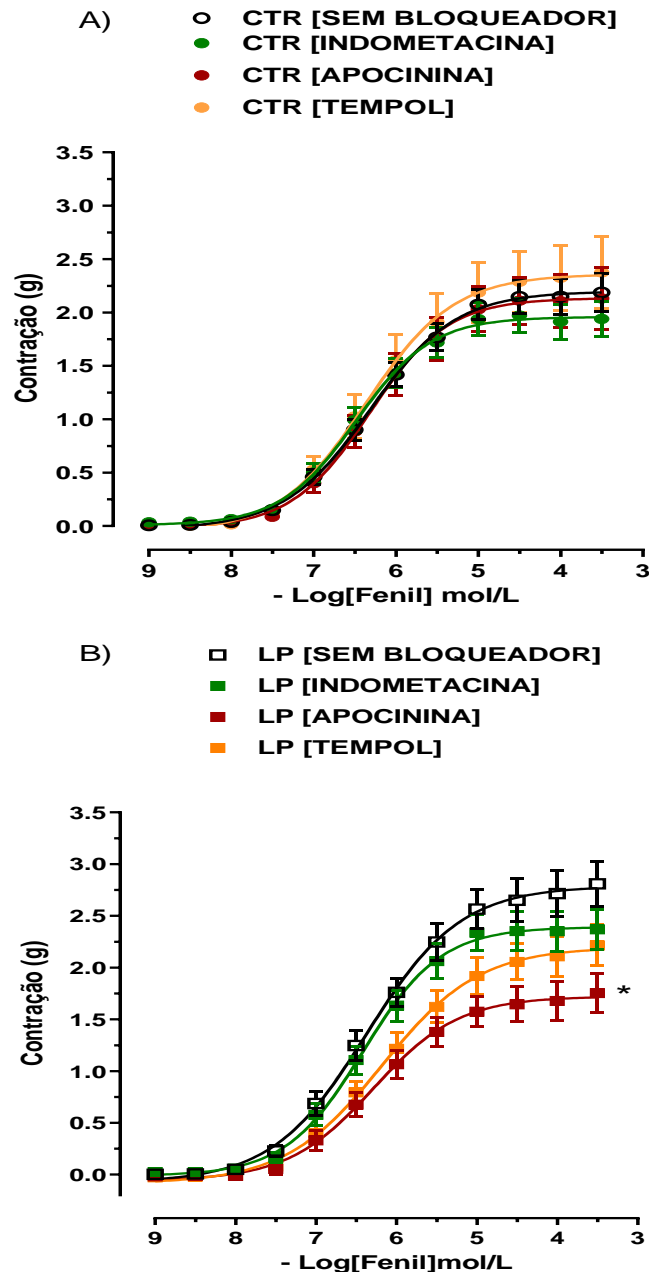
- 1 Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil) em anéis com (E+) e sem endotélio
- 2 (E-) de ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica (LP) ou normoproteica (CTR), n=9-10.
- 3 Dados foram expressos em média \pm e.p.m. #p<0.05 vs LP E+; *p<0.05: vs CTR E+ (ANOVA de duas
- 4 vias, pós-teste:Tukey, para resposta máxima).

- 5 **Tabela 3.** Resposta contrátil para fenilefrina em anéis de aorta torácica com e sem
- 6 endotélio

Grupos	Rmax (g)		pD2	
	E+	E-	E+	E-
CTR (10)	1,51 \pm 0,087	4,29 \pm 0,23*	6,52 \pm 0,066	7,55 \pm 0,055*
LP (9)	2,49 \pm 0,13*	4,47 \pm 0,21#	6,66 \pm 0,048	7,60 \pm 0,049#

- 7 Resposta máxima (Rmax) e -log da concentração do agonista que causa 50% da Rmax (pD2) para
- 8 fenilefrina em anéis com (E+) e sem endotélio (E-) de ratos adultos alimentados com dieta
- 9 hipoproteica (LP) ou normoproteica (CTR). Dados foram expressos como a média \pm e.p.m. (n)
- 10 número de ratos/grupos. #p<0.05 vs LP E+; *p<0.05 vs CTR E+ (ANOVA de duas vias, pós-teste:
- 11 Tukey).

- 1 **Figura 2.** Mecanismos envolvidos no aumento da resposta máxima para fenilefrina
 2 em anéis de aorta com endotélio de animais alimentados com dieta hipoproteica
 3 durante a adolescência



- 4 Curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina (Fenil) em anéis com endotélio (E+)
 5 incubados com apocinina, indometacina ou tempol e isolados de ratos adultos alimentados com dieta
 6 hipoproteica (LP) ou normoproteica (CTR). A) efeito dos bloqueadores em anéis de aorta de ratos
 7 CTR e B) efeito dos bloqueadores em anéis de aorta de ratos LP. Dados foram expressos em média
 8 \pm e.p.m. * $p < 0.05$ vs LP [sem bloqueador] (ANOVA de uma via, pós-teste: Tukey, para resposta
 9 máxima).

1 **Tabela 4.** Efeito da incubação com apocinina, indometacina e tempol sobre as
 2 curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta com
 3 endotélio de ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica durante a
 4 adolescência

BLOQUEIOS	LP	
	Rmax (g)	pD2
Sem bloqueador (13)	2,70± 0,22	6,35±0,07
Apocinina (8)	1,69±0,19*	6,27±0,09
Indometacina (11)	2,35±0,18	6,42±0,06
Tempol (8)	2,08±0,18	6,15±0,08

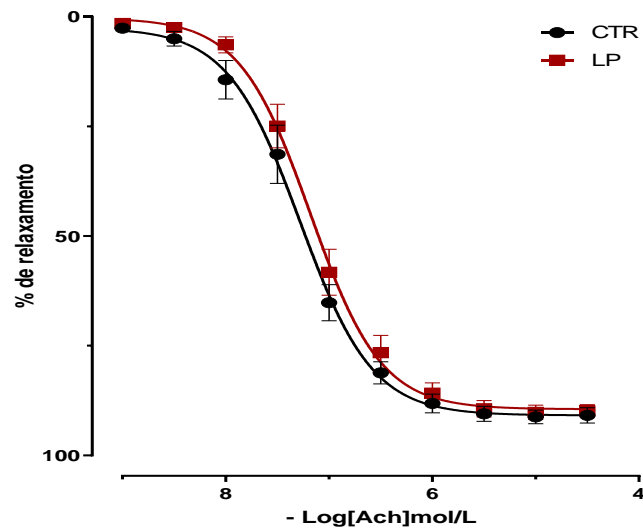
5 Resposta máxima (Rmax) e -log da concentração do fármaco que causa 50% da Rmax (pD2) em
 6 anéis de aorta com fenilefrina de ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica (LP). Dados foram
 7 expressos como a média± e.p.m. *p<0.05 vs LP [sem bloqueador] (ANOVA de uma via, pós-teste:
 8 Tukey).

9 **Tabela 5.** Efeito da incubação com apocinina, indometacina e tempol sobre as
 10 curvas concentração-efeito cumulativas para fenilefrina em anéis de aorta com
 11 endotélio de ratos adultos alimentados com dieta normoproteica durante a
 12 adolescência

BLOQUEIOS	CTR	
	Rmax(g)	pD2
Sem bloqueador (11)	2,14±0,15	6,30±0,06
Apocinina (7)	2,14±0,18	6,38±0,13
Indometacina (12)	1,95±0,15	6,42±0,08
Tempol (7)	2,28±0,28	6,40±0,14

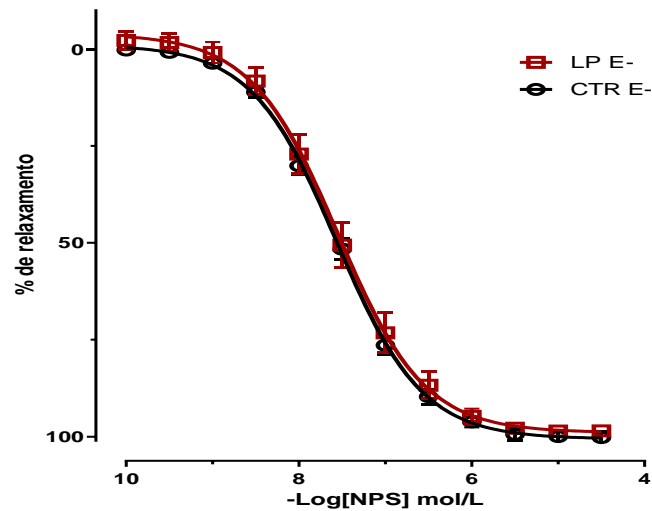
13 Resposta máxima (Rmax) e -log da concentração do fármaco que causa 50% da Rmax (pD2) em
 14 anéis de aorta com fenilefrina de ratos adultos alimentados com dieta normoproteica (CTR). Dados
 15 foram expressos como a média± e.p.m. (ANOVA de uma via).

- 1 **Figura 3.** Curvas concentração- efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de
2 aorta com endotélio de ratos adultos



- 3 Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina (ACh) em anéis com endotélio (E+) de ratos
4 adultos alimentados com dieta hipoproteica (LP) ou normoproteica (CTR), $n=8/\text{grupo}$. Dados foram
5 expressos em média \pm e.p.m. da porcentagem de relaxamento em relação à contração com fenilefrina
6 (3 μM) (teste T-Student para resposta máxima e $-\log$ da concentração do fármaco que causa 50% da
7 resposta máxima).

- 1 **Figura 4.** Curvas concentração-efeito cumulativas para nitroprussiato de sódio em
 2 anéis de aorta sem endotélio de ratos adultos



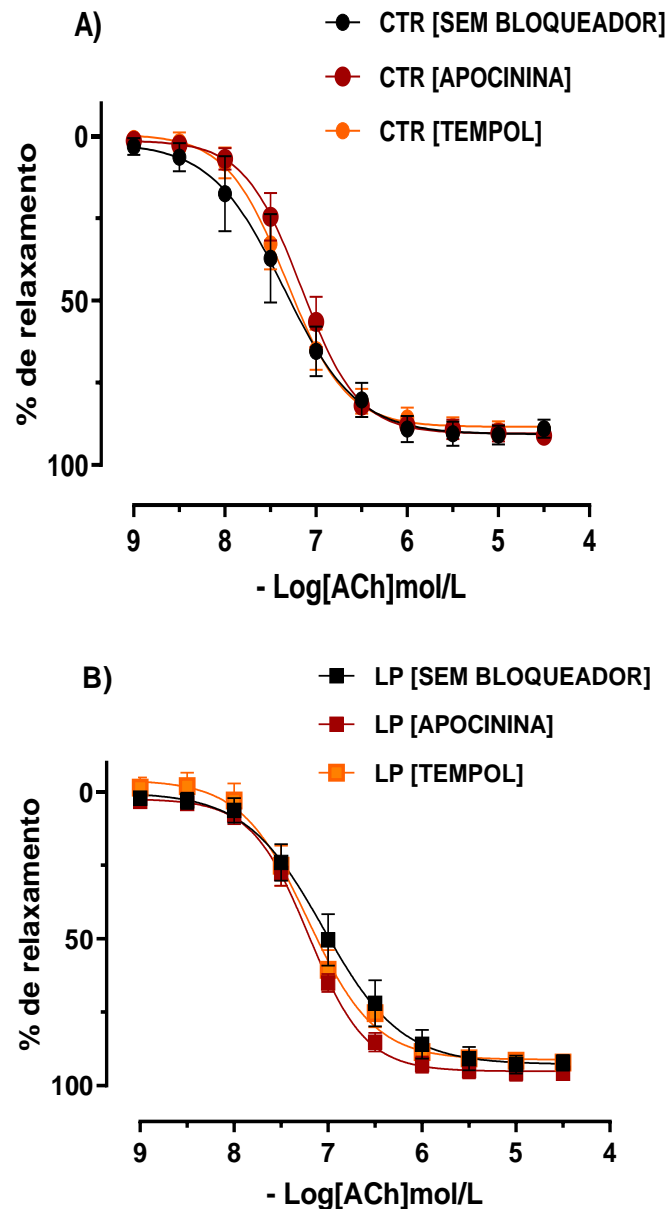
- 3 Curvas concentração-efeito cumulativas para nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis sem endotélio
 4 (E-) de ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica (LP) ou normoproteica (CTR), n=10/grupo.
 5 Dados foram expressos em média \pm e.p.m. da porcentagem de relaxamento em relação à contração
 6 com fenilefrina (3 μ M) (teste T-Student para resposta máxima e -log da concentração do fármaco que
 7 causa 50% da resposta máxima).

- 8 **Tabela 6.** Resposta relaxante para acetilcolina e nitroprussiato de sódio em anéis de
 9 aorta torácica

Grupos	CTR		LP	
	Rmax (%)	pD2	Rmax (%)	pD2
ACh (8)	88,86 \pm 1,57	7,31 \pm 0,09	86,93 \pm 1,57	7,16 \pm 0,093
NPS (10)	96,83 \pm 1,50	7,56 \pm 0,048	94,60 \pm 0,86	7,55 \pm 0,09

- 10 Resposta máxima (Rmax) e -log da concentração do fármaco que causa 50% da Rmax (pD2) para
 11 acetilcolina (ACh) ou nitroprussiato de sódio (NPS) em anéis de aorta de ratos adultos alimentados
 12 com dieta hipoproteica (LP) ou normoproteica (CTR). Dados foram expressos como a média \pm e.p.m.
 13 da % de relaxamento em relação a contração com fenilefrina (3 μ M). (n) número de ratos/grupos.
 14 *p<0.05: LP vs CTR (teste T-Student).

- 1 **Figura 5.** Mecanismos envolvidos na resposta vasodilatadora para acetilcolina em
 2 anéis de aorta com endotélio de animais alimentados com dieta hipoproteica durante
 3 a adolescência



- 4 Curvas concentração-efeito cumulativas para acetilcolina (ACh) em anéis com endotélio (E+)
 5 incubados com apocininina ou tempol e isolados de ratos adultos alimentados com dieta A)
 6 normoproteica (CTR) ou B) hipoproteica (LP), n=5/grupo. Dados foram expressos em média \pm e.p.m.
 7 da porcentagem de relaxamento em relação à contração com fenilefrina (3 μ M) (ANOVA de uma via,
 8 para resposta máxima e -log da concentração do fármaco que causa 50% da resposta máxima).
 9 **Tabela 7.** Efeito da incubação com apocininina e tempol sobre as curvas
 10 concentração-efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio
 11 de ratos adultos alimentados com dieta normoproteica durante a adolescência

BLOQUEIOS	CTR	
	Rmax	pD2
Sem bloqueador	88,46± 3,69	7,38±0,19
Apocinina	88,91±2,62	7,19±0,11
Tempol	86,82±3,09	7,33±0,11

1 Resposta máxima (Rmax) e -log da concentração do fármaco que causa 50% da Rmax (pD2) para
 2 acetilcolina em anéis de aorta de ratos adultos alimentados com dieta normoproteica (CTR),
 3 n=5/grupo. Dados foram expressos como a média± e.p.m. da porcentagem de relaxamento em
 4 relação à contração com fenilefrina (3uM) (ANOVA de uma via).

5 **Tabela 8.** Efeito da incubação com apocinina e tempol sobre as curvas
 6 concentração-efeito cumulativas para acetilcolina em anéis de aorta com endotélio
 7 de ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica durante a adolescência

BLOQUEIOS	LP	
	Rmax	pD2
Sem bloqueador	90,43±2,96	7,02±0,12
Apocinina	93,72±2,13	7,22±0,08
Tempol	85,00±4,50	7,22±0,06

8 Resposta máxima (Rmax) e -log da concentração do fármaco que causa 50% da Rmax (pD2) para
 9 acetilcolina em anéis de aorta de ratos adultos alimentados com dieta hipoproteica (LP), n=5/grupo.
 10 Dados foram expressos como a média± e.p.m. da porcentagem de relaxamento em relação à
 11 contração com fenilefrina (3uM) (ANOVA de uma via).

1 5 DISCUSSÃO

2 O presente estudo demonstrou que ratos Wistar alimentados com
3 dieta com restrição de proteínas (4% de proteína) durante a adolescência,
4 apresentaram na vida adulta diminuição no crescimento e redução no ganho de
5 massa corporal. Além disso, a restrição proteica durante a adolescência causou
6 disfunção endotelial na aorta durante a vida adulta, o que foi demonstrado pelo
7 incremento da resposta contrátil na presença do endotélio.

8 A restrição de macronutrientes na dieta, em fases iniciais do
9 desenvolvimento do organismo, pode acarretar alterações epigenéticas que tornam
10 os indivíduos mais propensos ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na
11 vida adulta (BIANCO-MIOTTO *et al.*, 2017; GOYAL.; LIMESAND; GOYAL, 2019;
12 GOYAL *et al.*, 2010; VISENTIN *et al.*, 2014). Considerando esta hipótese, nós
13 avaliamos se a restrição de proteína durante a adolescência poderia favorecer o
14 desenvolvimento de alterações na função vascular em ratos adultos.

15 No presente estudo, foi demonstrado pela primeira vez, que a
16 restrição proteica durante a adolescência causou disfunção endotelial na aorta de
17 ratos avaliados na vida adulta. Achados semelhantes sobre a função endotelial, são
18 descritos para a restrição proteica em outras fases do desenvolvimento biológico.
19 Por exemplo, foi descrito o comprometimento da modulação endotelial sobre a
20 resposta contrátil e/ou prejuízo na resposta vasodilatadora dependente do endotélio,
21 na prole adulta de ratas Sprague-Dawley, que durante a gestação receberam dieta
22 hipoproteica (6% de caseína) (SATHISHKUMAR *et al.*, 2009, 2012;
23 SATHISHKUMAR; BALAKRISHNAN; YALLAMPALLI, 2015), e de ratas Wistar
24 (TORRENS *et al.*, 2009) e Sprague-Dawley que durante a gestação recebem dieta
25 restritiva com 9% de caseína (GRANDVUILLEMIN *et al.*, 2018) ou restrição global de
26 nutrientes (CERAVOLO *et al.*, 2007; FRANCO *et al.*, 2002b, 2002a; OLIVEIRA *et*
27 *al.*, 2014). Ainda, Belchior e colaboradores (2012), demonstram a presença de
28 disfunção endotelial, com aumento da resposta contrátil para Fenil e relaxante para
29 ACh, em ratos Wistar com 120 dias de vida alimentados durante a infância com dieta
30 contendo 9% de proteína.

31 Por outro lado, estudos feitos com dieta isocalórica com restrição
32 para 9% (BRAWLEY *et al.*, 2003; RODFORD *et al.*, 2008) e 6% (MAIA *et al.*, 2014)

1 de caseína na gestação demonstram prejuízo no relaxamento para ACh sem
2 alteração na resposta contrátil em artéria mesentérica (BRAWLEY *et al.*, 2003;
3 RODFORD *et al.*, 2008) e aorta torácica da prole (MAIA *et al.*, 2014). Assim, nossos
4 resultados e os apresentados na literatura, demonstram que dietas carenciais de
5 proteínas ou com restrição global de nutrientes, causam prejuízos na resposta
6 vascular que em geral se caracterizam por disfunção endotelial. As diferenças de
7 respostas para fármacos que causam relaxamento e contração, podem estar
8 relacionadas com o momento em que as dietas são instituídas e/ou a quantidade de
9 nutrientes disponibilizados. Ainda, nossos dados demonstram pela primeira vez que
10 a restrição proteica, durante a adolescência leva à disfunção endotelial na aorta em
11 ratos adultos, sendo esta caracterizada pelo aumento da resposta contrátil na
12 presença do endotélio.

13 Sabe-se que a disfunção endotelial é um dos principais fatores que
14 predispõem ao desenvolvimento das doenças cardiovasculares, inclusive
15 antecedendo a hipertensão arterial e a aterosclerose (CAI; HARRISON, 2000;
16 FRANCO *et al.*, 2002c; LANDMESSER; HORNIG; DREXLER, 2004). Uma das
17 causas da disfunção endotelial é o desequilíbrio entre a produção de EDCF e EDRF.
18 Sendo que, o NO, o principal fator relaxante derivados do endotélio, pode ter sua
19 produção e/ou biodisponibilidade reguladas negativamente pelo estresse oxidativo,
20 comprometendo sua capacidade de modular respostas contráteis e outras funções
21 vasculares (VANHOUTTE *et al.*, 2017).

22 Em nosso estudo observamos que o aumento da resposta contrátil
23 da aorta para Fenil pode estar relacionado a produção exacerbada de ânion
24 superóxido pela enzima NADPH oxidase, uma vez que a apocinina, inibidor desta
25 enzima, recuperou a modulação endotelial na aorta de ratos LP. Por outro lado, o
26 uso do antioxidante tempol não teve o mesmo efeito.

27 Achados semelhantes aos nossos foram descritos com uso de
28 apocinina em artéria da cauda de ratos submetidos a restrição proteica (9%) pós-
29 desmame (DE BELCHIOR *et al.*, 2012). Além de que, é demonstrado que a apocinina
30 corrige a resposta vasodilatadora para ACh, tanto em arteríolas mesentéricas da
31 prole com 14 e 16 semanas de ratas alimentadas com restrição global de nutrientes
32 (FRANCO *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2002c), como em aorta torácica de ratos
33 adultos que tiveram restrição de proteína (6%) na fase pós-desmame (MAIA *et al.*,

1 2014). Confirmando que a NADPH oxidase e seus produtos podem estar envolvidos
2 em alterações vasculares observadas em animais submetidos a dieta carente em
3 diferentes fases da vida.

4 O tempol utilizado em nosso protocolo experimental, é um
5 antioxidante mimético da SOD e age dismutando a molécula de ânion superóxido
6 para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (FUKAI *et al.*, 2002). No presente estudo, sua
7 presença não corrigiu a hiper-reatividade para Fenil observada em anéis de aorta E+
8 de ratos LP. Estes resultados sugerem que a molécula ânion superóxido produzida
9 de forma acentuada pela NADPH oxidase, pode não ser a única espécie reativa
10 envolvida na disfunção vascular, podendo ser o peróxido de hidrogênio também
11 responsável por esse comprometimento.

12 Considerando que o bloqueio da NADPH oxidase corrige a resposta
13 contrátil em ratos LP, e supondo que a atividade/expressão da SOD vascular dos
14 ratos LP não esteja comprometida, é possível que na aorta exista uma quantidade
15 importante de peróxido do hidrogênio sendo gerado, e que se não eliminado pelas
16 enzimas peroxidases e catalase, pode gerar radicais hidroxila (BRIEGER *et al.*,
17 2012). As hidroxilas por sua vez, são as espécies reativas mais danosas ao
18 organismo, por terem meia-vida curta e serem dificilmente sequestrados pelos
19 antioxidantes, sendo estas deletérias para DNA, RNA, proteínas, lipídios e para
20 membranas plasmática nuclear e mitocondrial (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).
21 Dessa maneira, a disfunção endotelial encontrada em ratos LP, provavelmente não
22 está relacionada apenas ao aumento de ânion superóxido, mas também com nível
23 elevado de peróxido de hidrogênio, que pode contribuir aos danos das células
24 endoteliais através da produção de radicais hidroxilas.

25 Em concordância com nosso achado, em artérias mesentéricas da
26 prole adulta de ratas submetidas restrição de proteína (9%) durante a gestação, o
27 tempol também não melhora a resposta vascular e neste caso não existe alterações
28 na expressão da SOD (RODFORD *et al.*, 2008). Ainda, a atividade da SOD também
29 está preservada em ratas com 14 semanas de vida, cujo as mães tiveram restrição
30 global de nutrientes durante gestação (FRANCO *et al.*, 2007).

31 Em contrapartida, o tratamento crônico com tempol em ratos com 6
32 meses de vida (ABDULMAHDI *et al.*, 2018), e a incubação com SOD de arteríolas
33 mesentérica de ratos Wistar com 14 semanas (FRANCO *et al.*, 2002a), cujas mães

1 tiveram restrição global de nutrientes durante a gestação, resultaram em melhora da
2 resposta vascular. O mesmo achado é descrito com a incubação de tempol em
3 artéria carótida de camundongos com 9-12 semanas de mães que tiveram dieta
4 restrita em proteína (9%) (YZYDORCZYK *et al.*, 2006). Entretanto, os protocolos
5 descritos na literatura se diferem do utilizado pelo nosso grupo, que é o primeiro a
6 demonstrar potenciais mecanismo para disfunção endotelial ocasionada pela restrição
7 proteica na adolescência.

8 O inibidor não seletivo da COX, indometacina, também não alterou a
9 resposta da Fenil em anéis de animais LP. De fato, um dos fatores que
10 acompanham a disfunção endotelial é a inflamação (VANHOUTTE, P. M. *et al.*,
11 2017), em que o aumento das EROs induz a produção de citocinas pró-inflamatórias
12 (INCALZA *et al.*, 2018). Porém em nosso estudo, aparentemente este mecanismo
13 não contribui para a disfunção vascular em ratos LP.

14 Semelhantemente ao nosso achado, a indometacina não
15 restabelece a resposta contrátil para Fenil na artéria caudal de ratos adultos
16 submetidos a restrição proteica (9%) pós-desmame (DE BELCHIOR *et al.*, 2012).
17 Além de que, a prole adulta e com 16 semanas de vida, de mães que tiveram
18 restrição global (FRANCO *et al.*, 2003) ou de proteína (9%) (TORRENS *et al.*, 2009)
19 durante a gestação, não apresentam melhora do relaxamento para ACh em artérias
20 mesentéricas ao utilizar indometacina ou o diclofenaco (ambos inibidores não
21 seletivos da COX) (FRANCO *et al.*, 2003). Portanto, mesmo que os leitos vasculares
22 e os protocolos aplicados nos estudos sejam diferentes dos utilizados por nós, estes
23 estudos concordam que a disfunção endotelial causada por dietas carenciais,
24 envolve geração de EROs, mas que provavelmente não leva a um processo
25 inflamatório vascular.

26 Como já descrito anteriormente, estudos mostram que as restrição
27 de proteína nas fases intrauterina e infância, reduz a resposta vasodilatadora para
28 ACh tardiamente (BRAWLEY *et al.*, 2003; MAIA *et al.*, 2014; RODFORD *et al.*,
29 2008). Em nosso estudo, não encontramos nenhuma alteração na resposta
30 vasodilatadora para ACh. Além disso, demonstramos que as EROS não estão agindo
31 sobre esta resposta relaxante, já que os inibidores tempol e apocinina não alteraram
32 a vasodilatação exercida pela ACh.

1 Alguns estudos com restrição de nutrientes nas fases intrauterina e
2 infância, como já citado, demonstram redução na atividade da SOD (ABDULMAHDI *et*
3 *al.*, 2018; CHISAKA *et al.*, 2016; FRANCO *et al.*, 2002a; YZYDORCZYK *et al.*, 2006),
4 tendo como consequência o aumento exacerbado do O_2^- , que não é dismutado de
5 forma eficiente em peróxido de hidrogênio. É sabido, que o aumento da
6 concentração de O_2^- pode levar a redução da produção/biodisponibilidade de NO,
7 através do desacoplamento da eNOS e da interação com a molécula de NO
8 formando de peroxinitrito, tendo como consequência redução do relaxamento do
9 vaso (INCALZA *et al.*, 2018). Em nosso estudo, não ocorre aparentemente redução
10 da atividade da SOD, já que o tempol não altera a resposta para Fenil ou ACh,
11 fazendo com que a concentração de O_2^- não seja tão elevada a ponto de
12 comprometer a resposta relaxante do NO.

13 A resposta relaxante para NPS, um doador de NO, também não foi
14 alterada em animais que tiveram a restrição de proteína. Isso mostra a preservação
15 da viabilidade muscular. Na literatura, a restrição de proteína (6%,8% e 9%) durante
16 gestação(SATHISHKUMAR *et al.*, 2009; SKILTON *et al.*, 2006; TORRENS *et al.*,
17 2009) e lactação (SKILTON *et al.*, 2006) também não altera a resposta
18 vasodilatadora para o NPS.

19 O NO disponibilizado pelo NPS, se liga na enzima guanilato ciclase
20 aumentando a concentração de GMPc levando ao relaxamento vascular (GHIMIRE
21 *et al.*, 2017). Sendo assim, a restrição de proteína durante a adolescência, não
22 causa comprometimento na atividade da enzima guanilato ciclase no musculo liso da
23 aorta.

24 Poucos estudos até hoje avaliaram as repercussões tardias da
25 restrição proteica durante a adolescência. Os ratos submetidos à restrição proteica
26 durante a adolescência, apresentaram redução no ganho de peso corporal e
27 prejuízo no tamanho da tíbia e no CNA na vida adulta, demonstrando um
28 comprometimento do crescimento. Por alterar peso e comprimento, estes animais
29 não apresentam diferença significativa no índice de lee, pois são proporcionalmente
30 menores.

31 Na puberdade descreve-se um aumento de hormônios gonodais,
32 hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I),
33 atingindo um pico da deposição de minerais ósseos após ganho da altura. A

1 maturação óssea geralmente é consolidada no início da vida adulta (MUGHAL;
2 KHADILKAR, 2011), sendo correlatado com um aumento de IGF-1 no soro, no qual
3 sua produção é aparentemente impactada pela ingestão de caloria e proteína
4 (WEAVER *et al.*, 2016). Além disso, estudos mostram uma correlação positiva entre
5 a ingestão de proteína e formação óssea (EKBOTE *et al.*, 2011; REMER; SHI;
6 ALEXY, 2011), portanto, sua restrição pode trazer impactos ao crescimento.

7 Sabe-se que na adolescência ocorrem interações complexas
8 envolvendo a hipófise e os hormônios gonadais, que são importantes para o
9 crescimento (SAGGESE; BARONCELLI; BERTELLONI, 2002). A restrição de
10 proteínas pode levar a alterações epigenéticas, que culminam em redução na
11 produção do GH (MATAR *et al.*, 2016), IGF-I (BREEN *et al.*, 2011), e nos esteroides
12 sexuais (SAGGESE; BARONCELLI; BERTELLONI, 2002) que são importantes na
13 maturação esquelética e no crescimento púbere (BREEN *et al.*, 2011).

14 Até onde conhecemos, apenas dois estudos avaliaram os efeitos da
15 restrição proteica durante a puberdade sobre o crescimento corpóreo. Nestes dois
16 estudos, foi observado que a restrição de proteína (4% caseína) em ratos durante a
17 adolescência (30 aos 60 dias de vida), leva ao comprometimento do comprimento
18 corporal aos 60 e 120 dias de vida (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013, 2018), concordando
19 com os resultados de nosso estudo. Além disso, é denotado que a restrição de
20 proteína durante a gestação e lactação leva ao comprometimento do crescimento e
21 comprimento do fêmur aos 14 e aos 90 dias de vida da prole (FETOUI *et al.*, 2008;
22 MONTEIRO *et al.*, 2010). Este conjunto de informações sugere que a restrição
23 proteica durante a adolescência pode reduzir o crescimento corporal, o que se
24 mantém durante o restante da vida.

25 No presente estudo foi demonstrado também que aos 120 dias de
26 idade, ratos submetidos a restrição proteica durante a adolescência apresentaram
27 redução no ganho de massa corpórea. O eixo GH/IGF-I além de ser responsável
28 pela deposição óssea, também está envolvido no desenvolvimento muscular
29 (DEVESA; ALMENGLÓ; DEVESA, 2016). E como já descrito, a restrição de proteína
30 pode acarretar em redução na síntese de GH e IGF-I (BREEN *et al.*, 2011; MATAR
31 *et al.*, 2016). Conseqüentemente, com a diminuição de GH/IGF-I ocorre a redução
32 na proliferação das células musculares, e isso pode levar a redução da massa

1 corporal desses animais, já que apresentam retardo do desenvolvimento do musculo
2 esquelético.

3 Nossos resultados estão de acordo com os descritos por Oliveira e
4 colaboradores (2013), que utilizando o mesmo protocolo de dieta que o usado em
5 nosso estudo, também demonstram redução do ganho de massa corpórea aos 120
6 dias de idade. Entretanto, em outro estudo realizado pelo mesmo grupo e utilizando
7 o mesmo modelo experimental, os autores demonstram redução do ganho de massa
8 corpórea aos 60 dias de idade, mas não aos 120 dias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2018).
9 Assim, nossos resultados e as controvérsias apresentadas na literatura sugerem a
10 necessidade de mais estudos avaliando as repercussões tardias da restrição de
11 proteínas durante a adolescência sobre a massa corporal.

12 A maioria dos estudos avaliando restrição proteica são
13 desenvolvidos em períodos mais iniciais da vida, como gestação e lactação. De fato,
14 vem sendo descrito que a restrição proteica materna, durante a gestação e lactação,
15 causa na prole redução do ganho de massa corpórea ao nascer, e entre 25 e 270
16 dias de vida (ASSALIN; GONTIJO; BOER, 2018; BOUALGA; BOUCHENAK;
17 BELLEVILLE, 2000; LIRA *et al.*, 2020; LISBOA *et al.*, 2012; MALONEY *et al.*, 2006;
18 MONTEIRO *et al.*, 2010; ZAMBRANO *et al.*, 2006). Mesmo que estes estudos não
19 ocorreram na mesma faixa etária que o realizado pelo nosso grupo, observamos que
20 existe relação entre a restrição de nutrientes e a perda de peso nesses animais.

21 É importante salientar, que a dieta utilizada em nosso protocolo é
22 isocalórica, portanto, a redução de proteína é compensada com um aumento na
23 quantidade de carboidratos. Os carboidratos estão envolvidos no desenvolvimento
24 de distúrbios cardiometabólicos (MALIK; HU, 2015), podendo ser um fator
25 contribuinte nas alterações encontradas nesse estudo. Estudos experimentais
26 demonstram que ratos wistar submetidos a uma dieta rica em carboidratos com 10
27 semanas (POUDYAL *et al.*, 2012) e 30 dias (MATIAS *et al.*, 2020) de vida,
28 apresentam aumento da pressão sistólica, remodelamento cardiovascular com pré-
29 disposição a insuficiências cárdica.

30 Em resumo, a restrição proteica durante a adolescência programa o
31 desenvolvimento de disfunção endotelial na vida adulta, o que pode favorecer o
32 estabelecimento de doenças cardiovasculares nestes indivíduos. Assim,
33 considerando que as doenças cardiovasculares, são as principais causas de morte

- 1 no mundo, o entendimento dos mecanismos envolvidos com a disfunção endotelial,
- 2 apresenta possibilidades de intervenções precoces e pode contribuir para a
- 3 prevenção de mortalidade por essas doenças.

1 **6 CONCLUSÃO**

2 Os resultados aqui apresentados são consistentes com a hipótese
3 de que a dieta restrita em proteína (4%) durante adolescência acarretaria disfunção
4 endotelial na vida adulta. Ainda, que o mecanismo envolvido na disfunção endotelial
5 se relaciona com a geração de EROS pela NADPH oxidase. Com base nessas
6 informações, foi aqui demonstrado que a ingestão adequada de macronutrientes
7 durante essa fase do desenvolvimento é essencial para manutenção da função
8 vascular. Além disso, a partir dos mecanismos descritos pelo nosso grupo, podem
9 ser propostas possíveis intervenções que revertam e/ou previnam a disfunção
10 endotelial e conseqüentemente o desenvolvimento de doenças cardiovasculares,
11 como hipertensão e aterosclerose.

- 1 nutritional need among children across districts and parliamentary constituencies in
2 India, 2016. **Journal of global health**, v. 10, n. 2, p. 020424, 2020. Disponível em:
3 <https://doi.org/10.7189/jogh.10.020424>
4
- 5 BIANCO-MIOTTO, T. *et al.* Epigenetics and DOHaD: From basics to birth and
6 beyond. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 5, p.
7 513–519, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S2040174417000733>
8
- 9 BOUALGA, A.; BOUCHENAK, M.; BELLEVILLE, J. Low-protein diet prevents tissue
10 lipoprotein lipase activity increase in growing rats. **British Journal of Nutrition**, v.
11 84, n. 5, p. 663–671, 2000. Disponível em:
12 <https://doi.org/10.1017/S0007114500002002>
13
- 14 BRAWLEY, L. *et al.* Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and
15 vascular defects in rat male offspring. **Pediatric Research**, v. 54, n. 1, p. 83–90,
16 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000065731.00639.02>
17
- 18 BREEN, M. E. *et al.* 25-Hydroxyvitamin D, insulin-like growth factor-I, and bone
19 mineral accrual during growth. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**,
20 v. 96, n. 1, p. 89–98, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0595>
21
- 22 BRIEGER, K. *et al.* Reactive oxygen species: From health to disease. **Swiss**
23 **Medical Weekly**, v. 142, n. August, p. 1–14, 2012. Disponível em:
24 <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>
25
- 26 CAI, H.; HARRISON, D. G. The Role of Oxidant Stress. **Circulation Research.**, v.87,
27 n.10, p. 840–844, 2000.
28
- 29 CERAVOLO, G.S. *et al.* Conjugated equine estrogen treatment corrected the
30 exacerbated aorta oxidative stress in ovariectomized spontaneously hypertensive
31 rats. **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 341–346, 2013. Disponível em:
32 <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.11.018>
33

- 1 CERAVOLO, G.S. *et al.* Enalapril and losartan restored blood pressure and vascular
2 reactivity in intrauterine undernourished rats. **Life Sciences**, v. 80, n. 8, p. 782–787,
3 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.006>
4
- 5 CHISAKA, T. *et al.* Low-protein diet-induced fetal growth restriction leads to
6 exaggerated proliferative response to vascular injury in postnatal life. **American**
7 **Journal of Hypertension**, v. 29, n. 1, p. 54–62, 2016. Disponível em:
8 <https://doi.org/10.1093/ajh/hpv072>
9
- 10 COHEN, R.A. The endothelium-derived hyperpolarizing factor puzzle: A mechanism
11 without a mediator? **Circulation**, v. 111, n. 6, p. 724–727, 2005. Disponível em:
12 <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000156405.75257.62>
13
- 14 DE BELCHIOR, A.C.S. *et al.* Post-weaning protein malnutrition increases blood
15 pressure and induces endothelial dysfunctions in rats. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–9,
16 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034876>
17
- 18 DE OLIVEIRA, J.C. *et al.* Early postnatal low-protein nutrition, metabolic
19 programming and the autonomic nervous system in adult life. **Nutrition and**
20 **Metabolism**, v. 9, p. 1–8, 2012. Disponível em: [https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-](https://doi.org/10.1186/1743-7075-9-80)
21 80
22
- 23 DE OLIVEIRA, J.C. *et al.* Low-protein diet in puberty impairs testosterone output and
24 energy metabolism in male rats. **Journal of Endocrinology**, v.237, n.3, p. 243–254,
25 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0606>
26
- 27 DE OLIVEIRA, J.C. *et al.* Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced
28 insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to
29 increase fat accumulation. **Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. 195–206,
30 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/JOE-12-0408>
31
- 32 DEE UNGLAUB SILVERTHORN. **Fisiologia Humana - Uma Abordagem Integrada**
33 **5ªed.**, 2010.

- 1 DEVESA, J.; ALMENGLÓ, C.; DEVESA, P. Multiple effects of growth hormone in the
2 body: Is it really the hormone for growth? **Clinical Medicine Insights:**
3 **Endocrinology and Diabetes**, v. 9, p. 47–71, 2016. Disponível em:
4 <https://doi.org/10.4137/CMED.S38201>
5
- 6 DRENJANČEVIĆ, I. *et al.* The Metabolites of Arachidonic Acid in Microvascular
7 Function. **Microcirculation Revisited - From Molecules to Clinical Practice**, 2016.
8 Disponível em: <https://doi.org/10.5772/64676>
9
- 10 EKBOTE, V.H. *et al.* Determinants of bone mineral content and bone area in Indian
11 preschool children. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 334–
12 341, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00774-010-0224-x>
13
- 14 EROGLU, E. *et al.* Real-time visualization of distinct nitric oxide generation of nitric
15 oxide synthase isoforms in single cells. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v.
16 70, p. 59–67, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.09.001>
17
- 18 FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2020. **The State of Food Security and**
19 **Nutrition in the World 2020**. Transforming food systems for affordable healthy diets.
20 Rome, FAO.
- 21 FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2019. **The State of Food Security and**
22 **Nutrition in the World 2019**. Safeguarding against economic slowdowns and
23 downturns. Rome, FAO.
24
- 25 FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: An update. **Clinical Science**, v. 117, n.
26 4, p. 139–155, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/CS20090096>
27
- 28 FETOUI, H. *et al.* Maternal low-protein diet affects bone mass and mineral
29 metabolism in suckling rats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**,
30 v. 92, n. 4, p. 448–455, 2008. Disponível em: [https://doi.org/10.1111/j.1439-](https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00733.x)
31 [0396.2007.00733.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00733.x)
32

- 1 FORSDAHL, A. Living conditions in childhood and subsequent development of risk
2 factors for arteriosclerotic heart. **Journal of Epidemiology and Community Health**,
3 v. 32, n. 1, p. 34–37, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jech.32.1.34>
4
- 5 FRANCO, M. C.P. *et al.* Effects of low birth weight in 8- to 13-year-old children:
6 Implications in endothelial function and uric acid levels. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p.
7 45–50, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000223446.49596.3a>
8
- 9 FRANCO, M. C.P. *et al.* Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular
10 function in female offspring: Implications of oxidative stress. **Life Sciences**, v. 80, n.
11 8, p. 709–715, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.10.028>
12
- 13 FRANCO, M.C.P. *et al.* NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in
14 intrauterine undernourished rats: Involvement of the renin-angiotensin system.
15 **Cardiovascular Research**, v.57, n.3, p.767-775, 2003. Disponível em:
16 [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00461-9](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00461-9)
17
- 18 FRANCO, M.C. *et al.* Micronutrient prenatal supplementation prevents the
19 development of hypertension and vascular endothelial damage induced by
20 intrauterine malnutrition. **Life Sciences**, v. 85, n. 7–8, p. 327–333, 2009. Disponível
21 em: <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.06.013>
22
- 23 FRANCO, M.C.P. *et al.* Enhanced oxidative stress as a potential mechanism
24 underlying the programming of hypertension in utero. **Journal of Cardiovascular**
25 **Pharmacology**, v.40, n.4, p.501-509, 2002a. Disponível em:
26 <https://doi.org/10.1097/00005344-200210000-00002>
27
- 28 FRANCO, M.C. P. *et al.* Intrauterine undernutrition: Expression and activity of the
29 endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. **Cardiovascular**
30 **Research**, v. 56, n. 1, p. 145–153, 2002b. Disponível em:
31 [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00508-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00508-4)
32
- 33 FRANCO, M.C.P. *et al.* Severe nutritional restriction in pregnant rats aggravates

- 1 hypertension, altered vascular reactivity, and renal development in spontaneously
2 hypertensive rats offspring. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 39, n. 3,
3 p. 369–377, 2002c. Disponível em: [https://doi.org/10.1097/00005344-200203000-](https://doi.org/10.1097/00005344-200203000-00008)
4 00008
- 5
- 6 FUKAI, T. *et al.* Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease.
7 **Cardiovascular Research**, v.55, n.2, p.239-249, 2002. Disponível em:
8 [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(02\)00328-0](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(02)00328-0)
- 9
- 10 GHIMIRE, K. *et al.* Nitric oxide: What's new to NO? **American Journal of**
11 **Physiology - Cell Physiology**, v. 312, n. 3, p. C254–C262, 2017. Disponível em:
12 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00315.2016>
- 13
- 14 GOYAL, D.; LIMESAND, S.W.; GOYAL, R. Epigenetic responses and the
15 developmental origins of health and disease. **Journal of Endocrinology**, v. 242, n.
16 1, p. T105–T119, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0009>
- 17
- 18 GOYAL, R. *et al.* Brain renin-angiotensin system: Fetal epigenetic programming by
19 maternal protein restriction during pregnancy. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 3, p.
20 227–238, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1933719109351935>
- 21
- 22 GRANDVUILLEMIN, I. *et al.* Arginase upregulation and eNOS uncoupling contribute
23 to impaired endothelium-dependent vasodilation in a rat model of intrauterine growth
24 restriction. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and**
25 **comparative physiology**, v. 315, n. 3, p. R509–R520, 2018. Disponível em:
26 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00354.2017>
- 27
- 28 HADI, H.A.R.; CARR, Cornelia S.; AL SUWAIDI, Jassim. Endothelial dysfunction:
29 cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. **Vascular health and risk**
30 **management**, v. 1, n. 3, p. 183–198, 2005.
- 31
- 32 HIGASHI, C.M. *et al.* Intrauterine and lactational exposure to fluoxetine enhances
33 endothelial modulation of aortic contractile response in adult female rats. **Vascular**

- 1 **Pharmacology**, v. 108, p. 67–73, 2018. Disponível em:
2 <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.04.004>
3
- 4 HUMBWAVALI, J.B. *et al.* Malnutrition and its associated factors: A cross-sectional
5 study with children under 2 years in a suburban area in Angola. **BMC Public Health**,
6 v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12889-019-6543-5>
7
- 8 INCALZA, M.A. *et al.* Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial
9 dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular**
10 **Pharmacology**, v. 100, p. 1–19, 2018. Disponível em:
11 <https://doi.org/10.1016/j.vph.2017.05.005>
12
- 13 JENSEN, J.D. Health economic benefits from optimized meal services to older
14 adults—a literature-based synthesis. **European Journal of Clinical Nutrition**, p. 7–
15 8, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41430-020-00700-9>
16
- 17 LANDMESSER, U.; HORNIG, B.; DREXLER, H. **Endothelial function: A critical**
18 **determinant in atherosclerosis?**. 2004. Disponível em:
19 <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000129501.88485.1f>
20
- 21 LANGLEY-EVANS, S. C.; PHILLIPS, G. J.; JACKSON, A. A. In utero exposure to
22 maternal low protein diets induces hypertension in weanling rats, independently of
23 maternal blood pressure changes. **Clinical Nutrition**, v. 13, n. 5, p. 319–324, 1994.
24 Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0261-5614\(94\)90056-6](https://doi.org/10.1016/0261-5614(94)90056-6)
25
- 26 LIN, Y.J. *et al.* Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction
27 through upregulating endothelin type A receptor. **Biochemical and Biophysical**
28 **Research Communications**, v. 451, n. 2, p. 263–269, 2014. Disponível em:
29 <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.07.119>
30
- 31 LIRA, A.O. *et al.* Maternal low protein diet induces persistent expression changes in
32 metabolic genes in male rats. **World Journal of Diabetes**, v. 11, n. 5, p. 182–192,
33 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.4239/wjd.v11.i5.182>

1

2 LISBOA, P. C. *et al.* Postnatal low protein diet programs leptin signaling in the
3 hypothalamic-pituitary-thyroid axis and pituitary tsh response to leptin in adult male
4 rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 2, p. 114–122, 2012. Disponível
5 em: <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299747>

6

7 LOPES, A.F. *et al.* Nutrition profile of children in Maranhão State. **Revista Brasileira**
8 **de Epidemiologia**, v. 22, p. 1–12, 2019. Disponível em:
9 <https://doi.org/10.1590/1980-549720190008>

10

11 LÜSCHER, T. F. Endothelium-derived relaxing and contracting factors: Potential role
12 in coronary artery disease. **European Heart Journal**, v. 10, n. 9, p. 847–857, 1989.
13 Disponível em: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.eurheartj.a059580>

14

15 MAIA, A.R. *et al.* Taurine supplementation reduces blood pressure and prevents
16 endothelial dysfunction and oxidative stress in post-weaning protein-restricted rats.
17 **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal>
18 [.pone.0105851](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105851)

19

20 MALIK, V.S.; HU, F.B. Fructose and Cardiometabolic Health What the Evidence from
21 Sugar-Sweetened Beverages Tells Us. **Journal of the American College of**
22 **Cardiology**, v. 66, n. 14, p. 1615–1624, 2015. Disponível em:
23 <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.08.025>

24

25 MALONEY, C.A. *et al.* Site-specific changes in the expression of fat-partitioning
26 genes in weanling rats exposed to a low-protein diet in utero. **Obesity Research**, v.
27 11, n. 3, p. 461–468, 2006.

28

29 MARTIN, H. *et al.* Impaired endothelial function and increased carotid stiffness in 9-
30 year-old children with low birthweight. **Circulation**, v. 102, n. 22, p. 2739–2744,
31 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.22.2739>

32

33 MATAR, M. *et al.* The relationship between calciotropic hormones, IGF-1, and bone

- 1 mass across pubertal stages. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**,
2 v. 101, n. 12, p. 4860–4870, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1210/jc.2016-](https://doi.org/10.1210/jc.2016-3071)
3 3071
4
- 5 MATIAS, A.M. *et al.* Hypercaloric diet models do not develop heart failure, but the
6 excess sucrose promotes contractility dysfunction. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. 1–14,
7 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228860>
8
- 9 MENENDEZ-CASTRO, C. *et al.* Early and late postnatal myocardial and vascular
10 changes in a protein restriction rat model of intrauterine growth restriction. **PLoS**
11 **ONE**, v. 6, n. 5, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020369>
12
- 13 MOMBOULI, J. V.; VANHOUTTE, P. M. Endothelial dysfunction: From physiology to
14 therapy. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 31, n. 1, p. 61–74, 1999.
15 Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jmcc.1998.0844>
16
- 17 MONTEIRO, A.C.T. *et al.* Effects of physical exercise during pregnancy and protein
18 malnutrition during pregnancy and lactation on the development and growth of the
19 offspring's femur. **Jornal de Pediatria**, v. 86, n. 3, p. 233–238, 2010. Disponível em:
20 <https://doi.org/10.2223/JPED.1996>
21
- 22 MUGHAL, Mohamed Z.; KHADILKAR, Anuradha V. The accrual of bone mass during
23 childhood and puberty. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity**,
24 v. 18, n. 1, p. 28–32, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1097/MED.0b013e](https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3283416441)
25 3283416441
26
- 27 NJUGUNA, R.G; BERKLEY, J. A; JEMUTAI, J. Cost and cost-effectiveness analysis
28 of treatment for child undernutrition in low- and middle-income countries: A
29 systematic review. **Wellcome Open Research**, v. 5, p. 62, 2020. Disponível em:
30 <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15781.2>
31
- 32 OLIVEIRA, V. *et al.* Influence of aerobic training on the reduced vasoconstriction to
33 angiotensin ii in rats exposed to intrauterine growth restriction: Possible role of

- 1 oxidative stress and at2 receptor of angiotensin II. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–11,
2 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113035>
3
- 4 OSMOND, C.; BARKER, D.J.P. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of
5 coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women.
6 **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 3, p. 545–553, 2000.
7 Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3545>
8
- 9 PACHER, P.; BECKMAN, J.S; LIAUDET, L. [suggests cell models with genetic
10 deletion of iNOS as control experiment. Can we do this too?] Nitric oxide and
11 peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424,
12 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237348>
13 www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17237348
14
- 15 POUDYAL, Hemant *et al.* Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces
16 reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. **American Journal of**
17 **Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 12, p. 1472–1483, 2012.
18 Disponível em: <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00102.2012>
19
- 20 PRIOR, L. J.; ARMITAGE, James A. Neonatal overfeeding leads to developmental
21 programming of adult obesity: You are what you ate. **Journal of Physiology**, v. 587,
22 n. 11, p. 2419, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.174045>
23
- 24 RAHAL, A. *et al.* Clinical drug interactions: A holistic view. **Pakistan Journal of**
25 **Biological Sciences**, v.16, n.16, p.751-758, 2013. Disponível em:
26 <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.751.758>
27
- 28 RAHAL, Anu *et al.* Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: The interplay.
29 **BioMed Research International**,v. 2014, 2014. Disponível em:
30 <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
31
- 32 RAJENDRAN, P. *et al.* Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v.
33 436, p. 332–347, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>

1

2 REEVES, P.G; SUPPL, M. Symposium : Animal Diets for Nutritional and
3 Toxicological Research Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the
4 AIN-76A Diet 1 , 2. **Experimental Biology**, v. 127, p. 838–841, 1997.

5

6 REMER, T.; SHI, L.; ALEXU, U. Potential renal acid load may more strongly affect
7 bone size and mass than volumetric bone mineral density. **Bone**, v. 48, n. 2, p. 414–
8 415, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.09.003>

9

10 RODFORD, J.L. *et al.* Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in
11 an animal model of the developmental origins of cardiovascular disease. **Journal of**
12 **Physiology**, v. 586, n. 19, p. 4709–4720, 2008. Disponível em:
13 <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.156976>

14

15 SAGGESE, G.; BARONCELLI, G.I.; BERTELLONI, S. Puberty and bone
16 development. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and**
17 **Metabolism**, v. 16, n. 1, p. 53–64, 2002. Disponível em:
18 <https://doi.org/10.1053/beem.2001.0180>

19

20 SATHISHKUMAR, Kunju *et al.* Protein restriction during pregnancy induces
21 hypertension and impairs endothelium-dependent vascular function in adult female
22 offspring. **Journal of Vascular Research**, v. 46, n. 3, p. 229–239, 2009. Disponível
23 em: <https://doi.org/10.1159/000166390>

24

25 SATHISHKUMAR, K. *et al.* Temporal alterations in vascular angiotensin receptors
26 and vasomotor responses in offspring of protein-restricted rat dams. **American**
27 **Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 206, n. 6, p. 507.e1-507.e10, 2012.
28 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.04.010>

29

30 SATHISHKUMAR, K.; BALAKRISHNAN, M.P.; YALLAMPALLI, C. Enhanced
31 mesenteric arterial responsiveness to angiotensin II is androgen receptor-dependent
32 in prenatally protein-restricted adult female rat offspring. **Biology of Reproduction**,
33 v.92, n.2, p.55, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.126482>

- 1
2 SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and
3 vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular**
4 **Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/j.vph.](https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005)
5 [2015.03.005](https://doi.org/10.1016/j.vph.2015.03.005)
6
7 SKILTON, M.R. *et al.* Maternal undernutrition reduces aortic wall thickness and
8 elastin content in offspring rats without altering endothelial function. **Clinical**
9 **Science**, v. 111, n. 4, p. 281–287, 2006. Disponível em:
10 <https://doi.org/10.1042/CS20060036>
11
12 SWALI, A.; MCMULLEN, S.; LANGLEY-EVANS, S.C. Prenatal protein restriction
13 leads to a disparity between aortic and peripheral blood pressure in Wistar male
14 offspring. **Journal of Physiology**, v. 588, n. 19, p. 3809–3818, 2010. Disponível em:
15 <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.194928>
- 16 TORRENS, C. *et al.* Effects of pre- and periconceptional undernutrition on arterial
17 function in adult female sheep are vascular bed dependent. **Experimental**
18 **Physiology**, v.94, n.9, p.1024-1033, 2009. Disponível em:
19 <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.047340>
20
21 TOVMASYAN, A.; REBOUCAS, J.S.; BENOVA, L. Simple biological systems for
22 assessing the activity of superoxide dismutase mimics. **Antioxidants and Redox**
23 **Signaling**, v. 20, n. 15, p. 2416–2436, 2014. Disponível em:
24 <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5576>
25
26 VAN ABEELLEN, A.F.M. *et al.* Cardiovascular consequences of famine in the young.
27 **European Heart Journal**, v. 33, n. 4, p. 538–545, 2012. Disponível em:
28 <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr228>
29
30 VANHOUTTE, P. M. *et al.* Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th
31 anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017. Disponível em:
32 <https://doi.org/10.1111/apha.12646>

- 1
2 VANHOUTTE, P. M.; EBER, B. Endothelium-derived relaxing and contracting factors.
3 **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 103, n. 14, p. 405–411, 1991. Disponível em:
4 <https://doi.org/10.1096/fasebj.3.9.2545495>
5
- 6 VANHOUTTE, P.M.; TANG, E.H.C. Endothelium-dependent contractions: When a
7 good guy turns bad! **Journal of Physiology**, v. 586, n. 22, p. 5295–5304, 2008.
8 Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.161430>
9
- 10 VATANABE, I.P. *et al.* Complexo de rutênio melhora a função endotelial em anéis de
11 aorta de ratos hipertensos renais. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 109, n.
12 2, p. 124–131, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/abc.20170090>
13
- 14 VISENTIN, S. *et al.* Early origins of adult disease: Low birth weight and vascular
15 remodeling. **Atherosclerosis**, v. 237, n. 2, p. 391–399, 2014. Disponível em:
16 <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.027>
17
- 18 VOHR, B. R. *et al.* Early predictors of hypertension in prematurely born adolescents.
19 **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 99, n. 12, p. 1812–1818,
20 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2010.01926.x>
21
- 22 WEAVER, C. M. *et al.* The National Osteoporosis Foundation’s position statement on
23 peak bone mass development and lifestyle factors: a systematic review and
24 implementation recommendations. **Osteoporosis International**, v. 27, n. 4, p. 1281–
25 1386, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3440-3>
26
- 27 WHO. **Fact Sheets: Malnutrition**. 2020. Disponível em: [https://www.who.int/news-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition)
28 [room/fact-sheets/detail/malnutrition](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition)
- 29 ZYDORCZYK, C. *et al.* Exaggerated vasomotor response to ANG II in rats with fetal
30 programming of hypertension associated with exposure to a low-protein diet during
31 gestation. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and**
32 **Comparative Physiology**, v.291, n.4, p.1060-1068, 2006. Disponível em:
33 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00798.2005>

1

2 ZAMBRANO, E. *et al.* A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has
3 sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake,
4 glucose metabolism and serum leptin in the rat. **Journal of Physiology**, v. 571, n. 1,
5 p. 221–230, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.100313>

6

7 ZHAZYKBAYEVA, S. *et al.* The molecular mechanisms associated with the
8 physiological responses to inflammation and oxidative stress in cardiovascular
9 diseases. **Biophysical Reviews**, v. 12, n. 4, p. 947–968, 2020. Disponível em:
10 <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00742-0>


11

1

ANEXOS

2 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de
3 Londrina (CEUA nº 144/2019).

4

 UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 144/2019 Londrina, 09 de outubro de 2019.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "Avaliação dos sistemas vascular e reprodutor em ratos alimentados com dieta hipoproteica no período peripuberal" protocolo CEUA nº 13068.2019.60 sob a responsabilidade de Graziela Sacalianti Ceravolo, 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL) em reunião do dia 08/10/2019.

Este projeto tem por objetivo avaliar se a restrição proteica durante o período peripuberal (30 a 60 dias de idade) pode causar em ratos adultos alterações nos sistemas vascular e genital masculino. Também é proposto avaliar os mecanismos envolvidos nas possíveis alterações vasculares. Grau de Invasividade: 3.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	09/10/2019 a 21/08/2021
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogêneo/Wistar
Nº de animais	84
Peso/ Idade	100 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério do Central da Universidade Estadual de Maringá/UEM
Amostras a serem coletadas	Aorta, testículos e epidídimos

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

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UDEL

Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5434

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a), Graziela Sacalianti Ceravolo
Responsável pelo projeto
Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB
C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB
C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas/CCB

5

6

- 1 Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de
- 2 Maringá (CEUA nº 4833210519).



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Implicação do sistema nervoso autonômico na síndrome metabólica programada por restrição proteico-calórica na adolescência", protocolada sob o CEUA nº 4833210519 (ID 002264), sob a responsabilidade de **Paulo Cezar de Freitas Mathias e equipe; Anna Rebeka Oliveira Ferreira; Kesia Palma Rigo; Isabela Peixoto Martins; Maroly Valentin Alves Pinto; Maria Natália Chimirri Peres; Maiara Vanusa Guedes Ribeiro** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 05/07/2019.

We certify that the proposal "Implication of the autonomic nervous system in the metabolic syndrome programmed by protein-calorie restriction in adolescence", utilizing 344 Heterogenics rats (344 males), protocol number CEUA 4833210519 (ID 002264), under the responsibility of **Paulo Cezar de Freitas Mathias and team; Anna Rebeka Oliveira Ferreira; Kesia Palma Rigo; Isabela Peixoto Martins; Maroly Valentin Alves Pinto; Maria Natália Chimirri Peres; Maiara Vanusa Guedes Ribeiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 07/05/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 08/2019 a 08/2025

Área: **Dbc-Biotecnologia, Genética E Biologia Celular**

Origem: **Biotério Central da UEM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 25 dias**

N: **344**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **40 a 90 g**

Local do experimento: **Laboratório de Biologia Celular da Secreção**

Maringá, 09 de dezembro de 2019

Prof. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dra. Erika Seki Kioshima Cótica
Coordenadora Adjunta da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá