

ALINE ROSA MAIA

**“SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM LEUCINA OU
TAURINA MELHORA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL DE
RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIOPROTÉICA PÓS-
DESMAME: MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR
ENVOLVIDOS”**

Campinas, 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALINE ROSA MAIA

**“SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM LEUCINA OU TAURINA
MELHORA A DISFUNÇÃO ENDOTELIAL DE RATOS
SUBMETIDOS À DIETA HIPOPROTÉICA PÓS-DESMAME:
MECANISMOS DE SINALIZAÇÃO CELULAR ENVOLVIDOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da DISSERTAÇÃO defendida pela
candidata

ALINE ROSA MAIA

e aprovada pela Comissão Examinadora.



Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia
da UNICAMP para obtenção do título de
Mestra em Biologia Funcional e Molecular, na
área de Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. ANA PAULA COUTO DAVEL

CAMPINAS, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

| | |
|------|--|
| M28s | <p>Maia, Aline Rosa, 1987- Suplementação dietética com leucina ou taurina melhora a disfunção endotelial de ratos submetidos à dieta hipoproteica pós-desmame : mecanismos de sinalização celular envolvidos / Aline Rosa Maia. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.</p> <p>Orientador: Ana Paula Couto Davel. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Disfunção endotelial. 2. Desnutrição. 3. Leucina. 4. Taurina. 5. Estresse oxidativo. I. Davel, Ana Paula, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p> |
|------|--|

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Dietary supplementation with leucine or taurine improves endothelial dysfunction of rats fed with low protein diet after weaning : cell signaling mechanisms involved

Palavras-chave em Inglês:

Endothelial dysfunction

Malnutrition

Leucine

Taurine

Oxidative stress

Área de concentração: Fisiologia

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Ana Paula Couto Davel [Orientador]

Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes

Eliana Hiromi Akamine

Data da defesa: 06-08-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 06 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel (orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes


Assinatura

Profa. Dra. Eliana Hiromi Akamine


Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassis

Assinatura

Profa. Dra. Camila de Moraes

Assinatura

"We are guilty of many errors and many faults, but our worst crime is abandoning the children, neglecting the foundation of life. Many of the things we need can wait. The child cannot. Right now is the time his bones are being formed, his blood is being made and his senses are being developed.

To him we cannot answer "Tomorrow". His name is "Today".

Gabriela Mistral, 1948

Agradecimentos

A estimada professora Dra. Ana Paula Couto Davel, pela dedicação, paciência e grande volume de conhecimentos oferecidos a mim.

A professora Dra. Maria Andréia Delbin pela disponibilidade e por ter viabilizado as medidas de nitrito e nitrato.

A professora Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes e sua aluna de doutorado Laís Viana pelos dados de Multiplex.

O professor Dr. Everardo Magalhães Carneiro, por oferecer a maior parte das dietas consumidas pelos ratos utilizados neste trabalho.

Os alunos de doutorado Celso Saragossa e Luiz Osório Leiria pela ajuda com nossa tentativa de pletismografia de cauda e pelos anticorpos de GCs- α -1 e PDE-5.

A todos os membros do Laboratório de Fisiologia da Vasomotricidade pela amizade e colaboração com os experimentos. Em especial à Jamaira A. Victório pela parceria e auxílio psicológico, ao Stefano P. Clerici por ter me ensinado algumas técnicas, pela parceria e presença palmeirense fundamental, ao Rodrigo Garcia pela assistência médica, à Carmem Peres Valgas da Silva pela ímpar gentileza e consultorias fitness e nutricional e à Nathália da Silva pela amizade e assistência estética.

Os professores membros da banca de meu exame de qualificação: Dra. Maria Cristina Cintra Gomes-Marcondes, Dra. Camila de Moraes e especialmente à Dra. Dora Maria Grassi-Kassisse, que, além da presença no exame, contribuiu também com a minha preparação para a qualificação e a defesa deste trabalho através do oferecimento de duas disciplinas excelentes.

Os ex-alunos deste programa de pós-graduação Thiago Martins Baptista e Priscila Muniz da Silva que colaboraram esclarecendo as dúvidas iniciais acerca do modelo animal utilizado.

Os funcionários do departamento, em especial a dona Cida da limpeza e o Juvenal do biotério por fazerem bem os trabalhos a eles designados.

Os amigos, em especial Fernanda Jordão e André Santiago pelo suporte afetivo e presença durante essa caminhada. E também a todos os demais amigos pelas viagens, festas e outros momentos de descontração.

Principalmente os meus pais, Dona Leonor e o Senhor Valdomiro, por serem pais excelentes e por terem propiciado a mim e ao meu irmão uma excelente educação.

O apoio financeiro da CAPES, pela bolsa, e também da FAPESP (processo 2010/50323-2) , que indiretamente possibilitou a conclusão deste trabalho.



CEUA/Unicamp

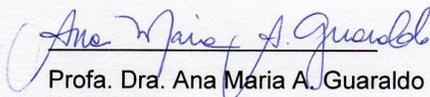
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

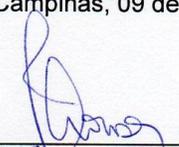
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Efeitos da suplementação dietética com os aminoácidos leucina e taurina sobre a função vascular de ratos submetidos à dieta hipoproteica e normoprotéica" (protocolo nº 2653-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel / Aline Rosa Maia, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 09 de abril de 2012.

Campinas, 09 de abril de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | x |
| ABSTRACT..... | xii |
| LISTA DE FIGURAS..... | xiv |
| LISTA DE TABELAS..... | xv |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xvi |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 1.1. Desnutrição e a saúde humana..... | 1 |
| 1.2. Desnutrição proteica e prejuízos ao sistema cardiovascular..... | 3 |
| 1.3. Suplementação dietética na desnutrição..... | 8 |
| 2. OBJETIVOS..... | 11 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 11 |
| 3.1. Grupos experimentais..... | 11 |
| 3.2. Medidas hemodinâmicas..... | 13 |
| 3.3. Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrito e nitrato (NO _x ⁻)..... | 13 |
| 3.4. Reatividade vascular..... | 14 |
| 3.5. Detecção da geração de ROS através da sonda DHE..... | 16 |
| 3.6. Análise da expressão de proteínas através da técnica de Western Blotting..... | 17 |
| 3.7. Análise da expressão de proteínas através da técnica de Multiplex..... | 19 |
| 3.8. Expressão e Análise dos Dados..... | 20 |
| 4. RESULTADOS..... | 20 |
| 4.1. Efeitos da suplementação dietética com leucina sobre as alterações vasculares causadas pela restrição proteica pós-desmame..... | 20 |
| 4.1.1. <i>Peso corporal</i> | 20 |
| 4.1.2. <i>Hemodinâmica</i> | 21 |
| 4.1.3. <i>Reatividade Vascular</i> | 22 |
| 4.1.4. <i>NO_x⁻ plasmático e tecidual</i> | 25 |
| 4.1.5. <i>Western Blotting</i> | 26 |
| 4.1.6. <i>Multiplex</i> | 28 |
| 4.2. Efeitos da suplementação dietética com taurina sobre as alterações vasculares causadas pela restrição proteica pós-desmame..... | 29 |
| 4.2.1. <i>Peso corporal</i> | 29 |
| 4.2.2. <i>Hemodinâmica</i> | 29 |
| 4.2.3. <i>Reatividade Vascular</i> | 30 |
| 4.2.4. <i>NO_x⁻ plasmático</i> | 34 |
| 4.2.5. <i>Produção de ROS em aorta</i> | 35 |
| 4.2.6. <i>Western Blotting</i> | 36 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 38 |
| 5.1. Efeitos da restrição proteica pós-desmame na função vascular..... | 38 |
| 5.2. Efeitos da suplementação com leucina..... | 46 |
| 5.3. Efeitos da suplementação com taurina..... | 49 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 52 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 53 |

RESUMO

Introdução e objetivos: A desnutrição intrauterina e infantil predispõe a distúrbios metabólicos e cardiovasculares na idade adulta. A suplementação dietética com os aminoácidos leucina, que pode estimular a síntese proteica, ou taurina, de ação antioxidante, poderiam apresentar efeitos protetores na vasculatura nestes casos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da restrição proteica pós-desmame e da suplementação com leucina ou taurina sobre a pressão arterial (PA) e função vascular, enfatizando o papel do endotélio e as vias de sinalização celular envolvidas. **Métodos e resultados:** Ratos Wistar foram divididos, após o desmame (~21 dias de vida), em dois grupos dietéticos por 90 dias: controle (C; 12% de proteínas) e de restrição proteica isocalórica (R; 6% de proteínas). Estes receberam ou não suplementação na água de beber com taurina 2,5% (CT e RT) por 90 dias ou com leucina 1,5% (CL e RL) apenas nos 30 dias finais. O grupo R apresentou baixo ganho de peso corporal e elevação da PA sistólica (PAS), diastólica e média. A reatividade vascular foi avaliada em anéis de aorta torácica. Não houve modificação na resposta contrátil ao KCl e à fenilefrina entre os grupos estudados. Entretanto, observou-se aumento da resposta de relaxamento ao nitroprussiato de sódio (NPS) e, inversamente, redução do relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) no grupo R, em comparação ao C. A resposta à ACh da aorta do grupo R foi recuperada pela incubação com superóxido dismutase (SOD; 150 U/mL) ou apocinina (30 µM). Além disso, houve redução do efeito do inibidor da fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) LY294002 (30 µM) sobre o relaxamento à ACh da aorta de R. Avaliou-se a expressão proteica por técnica de imunoblotting ou luminex em homogenato de aorta. Observou-se que a restrição proteica reduziu a expressão das proteínas: ^{Ser473}p(fosforilada)-Akt/Akt, ^{Ser1177}p-sintase de óxido nítrico endotelial (eNOS)/eNOS, fosfodiesterase 5 (PDE-5), SOD extracelular (EC-SOD); e aumentou a expressão da

subunidade p47-phox da NADPH oxidase, Mn-SOD, ^{Ser727}p-proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3)/STAT3 e ^{Thr412}p-p70S6 quinase ribossomal (S6K)/S6K. Além disso, a restrição proteica aumentou a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS), avaliada pela quantificação da fluorescência ao di-hidroetídeo. A suplementação com leucina não recuperou o ganho de peso corporal, mas normalizou a pressão arterial, o relaxamento à ACh e ao NPS, o efeito do LY294002 e o conteúdo das proteínas ^{Ser473}p-Akt/Akt, ^{Ser1177}p-eNOS/eNOS, PDE-5, ^{Ser727}p-STAT3/STAT3 e ^{Thr412}p-S6K/S6K na aorta de RL, além de aumentar a expressão de PI3K em CL e RL. A taurina também melhorou o ganho de peso, a PAS e a resposta de relaxamento à ACh no grupo RT, efeitos associados à normalização da produção de ROS, da expressão proteica de p47-phox e de EC-SOD na aorta de RT, e ao aumento de nitrito/nitrato plasmático neste grupo.

Conclusões: Os dados sugerem que a restrição proteica pós-desmame causa prejuízo do relaxamento endotélio-dependente em aorta de ratos associada a: 1) diminuição da ativação da via PI3K/Akt e consequente redução da fosforilação de eNOS, recuperada pela suplementação com leucina, e 2) estresse oxidativo vascular, normalizado pela suplementação com taurina.

ABSTRACT

Background and aim: Intrauterine and child malnutrition predisposes to metabolic and cardiovascular disorders in adulthood. Dietary supplementation with leucine or taurine, through stimulating protein synthesis or presenting antioxidant activity, respectively, could have protective effects on the vasculature in this situation. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of post-weaning protein restriction and the supplementation with leucine or with taurine on the arterial blood pressure (BP) and vascular function, emphasizing the role of endothelium and the signaling pathways involved. **Methods and results:** Male Wistar rats were divided after weaning into two groups according to diet to be received for the next 90 days: control (C, 12% protein) and isocaloric protein restriction (R; 6% of proteins). Rats were supplemented or not in the drinking water with 2.5% taurine (CT and RT) for 90 days or 1.5% leucine (RL and CL) during the final 30 days. Afterwards, protein restriction induced low body weight gain and high systolic (SBP), diastolic and mean BP values. Thoracic aortic rings were isolated for vascular reactivity study. The contractile response to KCl or phenylephrine did not change among groups. However, the relaxation response to sodium nitroprusside (NPS) was enhanced, while the acetylcholine (ACh)-induced relaxation was reduced in R aortas compared with C. Both apocynin (30 μ M) or superoxide dismutase (SOD; 150 U/mL) incubation recovered the relaxation to ACh. The effect of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) inhibitor LY294002 (30 μ M) on the ACh induced-relaxation was impaired in aorta from R. In addition, reactive oxygen species (ROS) production evaluated by fluorescence to dihydroethidium was increased in aorta from R. Immunoblotting and Luminex assay were used to evaluate protein expressions in aorta homogenates. Expression of ^{Ser473}p(phosphorylated)-Akt/Akt, ^{Ser1177}p-endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS)/eNOS, phosphodiesterase 5 (PDE-5) and extracellular (EC)-SOD were reduced by protein restriction while the expressions of p47-phox NADPH oxidase subunit, Mn-SOD, ^{Ser727}p-signal transducer and activator of

transcription protein 3 (STAT3)/STAT3 and ^{Thr412}p-ribosomal S6 kinase (S6K)/S6K were increased in aortas from R compared to C. Leucine did not change weight gain, but normalized BP values as well as the relaxation response to ACh, the effect of LY294002 and the protein expressions of ^{Ser473}p-Akt/Akt, ^{Ser1177}p-eNOS/eNOS, PDE-5, ^{Ser727}p-STAT3/STAT3 and ^{Thr412}p-S6K/S6K in RL aortas compared with R. Therefore leucine increased the expression of PI3K in both CL and RL. Taurine improved weight gain, the SBP and the ACh-induced relaxation in RT compared to R. These effects of taurine were associated with normal ROS production and p47-phox and EC-SOD protein expressions in aortas from RT, concomitant with an increase of plasma nitrite/nitrate in this group.

Conclusions: The data suggest that post-weaning protein restriction impairs endothelium-dependent relaxation in rat aorta related to: 1) decreased activation of PI3K/Akt pathway and reduction of eNOS phosphorylation, that is recovered by leucine supplementation and 2) vascular oxidative stress, which is normalized by taurine supplementation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo dos grupos experimentais deste trabalho.

Figura 2: Esquema representativo do ensaio de reatividade vascular.

Figura 3: Curvas de relaxamento em resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio da aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Figura 4: Curvas de relaxamento em resposta à acetilcolina na presença ou ausência de LY294002 da aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Figura 5: Níveis de nitrito/nitrato (NO_x^-) da aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Figura 6: Expressões proteicas de PI3K, Akt (total) e ^{Ser473}p-Akt (fosforilada), eNOS e ^{Ser1177}p-eNOS, PDE-5 e GCs- α -1 obtidas pela técnica de Western Blotting na aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Figura 7: Expressões proteicas de ^{Ser727}p-STAT3^{Ser2448}p-mTOR e ^{Thr412}p-S6K obtidas pela técnica de Multiplex na aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Figura 8: Curvas de relaxamento em resposta à acetilcolina e ao nitroprussiato de sódio da aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com taurina.

Figura 9: Curvas de relaxamento em resposta à acetilcolina na presença ou ausência de superóxido dismutase, ou de apocinina, da aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Figura 10: Níveis de nitrito/nitrato (NO_x^-) do plasma de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com taurina.

Figura 11: Fluorescência ao DHE de cortes microscópicos de aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com taurina.

Figura 12: Expressão proteica de eNOS, EC-SOD, Mn-SOD, CuZn-SOD, p47-phox, GP91-phox, GPX e catalase da aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com taurina.

Figura 13: Efeitos da restrição proteica pós-desmame e da suplementação com leucina ou com taurina sobre a função endotelial da aorta de ratos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas controle e de restrição proteica.

Tabela 2: Peso corporal inicial e final de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Tabela 3: Pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Tabela 4: Contração máxima ao KCl, E_{max} e pD_2 das curvas de concentração-resposta à acetilcolina, ao nitroprussiato de sódio e à fenilefrina na aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Tabela 5: E_{max} e pD_2 das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina na presença ou ausência de LY204002 da aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com leucina.

Tabela 6: Peso corporal inicial e final de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com taurina.

Tabela 7: Pressão arterial sistólica, diastólica, média e frequência cardíaca de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com taurina.

Tabela 8: Contração máxima ao KCl, E_{max} e pD_2 das curvas de concentração-resposta à acetilcolina, ao nitroprussiato de sódio e à fenilefrina na aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com taurina.

Tabela 9: E_{max} e pD_2 das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina na presença ou ausência de superóxido dismutase, ou de apocinina, da aorta de ratos controle e submetidos à restrição proteica pós-desmame, suplementados ou não com taurina.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh – acetilcolina

Akt – serina/treonina proteína quinase

ANOVA – análise de variância

ATP – adenosina trifosfato

BCA – ácido bicinconínico

BPM – batimentos por minuto

C – grupo de ratos Wistar que recebeu dieta controle durante três meses após o desmame

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CL – grupo de ratos Wistar que recebeu dieta controle durante três meses após o desmame e suplementação com leucina durante o mês final de protocolo dietético.

CT – grupo de ratos Wistar que recebeu dieta controle durante três meses após o desmame e concomitantemente recebeu suplementação com taurina.

cNOS – óxido nítrico sintase constitutiva

DHE – di-hidroetídeo

DMSO – dimetilsulfóxido

DTPA – ácido dietilenotriaminopentaacético

EC – extracelular

ECL – método de quimioluminescência aumentada

EDHF – fator hiperpolarizante derivado do endotélio

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

eIF – fator iniciador eucariótico

E_{max} – efeito máximo

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

e.p.m. – erro padrão da média

ET-1 – endotelina-1

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

FC – frequência cardíaca

GCs – guanilato ciclase solúvel

GMPc – Guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato

GPX – glutationa peroxidase

GSH – glutationa reduzida
GSSG – glutationa oxidada
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
M – molar
Mn – manganês
mmHg – milímetros de mercúrio
mTOR – *mammalian target of rapamicyn*
M₃ – receptor muscarínico tipo 3
N- número de ratos utilizados nos experimentos
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO – óxido nítrico
nNOS – óxido nítrico sintase neuronal
NOS – óxido nítrico sintase
NO_x⁻ – nitrito e nitrato, metabólitos do óxido nítrico
Nox – subunidades constituintes da NADPH oxidase
NPS – nitroprussiato de sódio
OMS – organização mundial de saúde
O₂⁻ – ânion superóxido
PAD – pressão arterial diastólica
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PAM – pressão arterial média
PAS – pressão arterial sistólica
PDE-5 – fosfodiesterase-5
pD₂ – logaritmo negativo da concentração de um fármaco responsável por 50% da resposta máxima provocada pelo mesmo.
PGH₂ – prostaglandina H₂
PGI₂ – prostaciclina
Phox – “phagocytic oxidase”, subunidades constituintes da NADPH oxidase
PIC – coquetel inibidor de proteases
PKA – proteína quinase A
PKB – proteína quinase B
PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil
PVDF – fluoreto de polivinilideno
S6K – proteína ribossomal S6 quinase

R – grupo de ratos Wistar que recebeu dieta de restrição proteica durante três meses após o desmame.

Rac2 – pequena proteína G regulatória, subunidade constituinte da NADPH oxidase

RCF – força centrífuga relativa (*g*)

RL – grupo de ratos Wistar que recebeu dieta de restrição proteica durante três meses após o desmame e suplementação com leucina durante o mês final de protocolo dietético.

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro

ROS – espécies reativas de oxigênio

RPM – rotações por minuto

RT – grupo de ratos Wistar que recebeu dieta de restrição proteica durante três meses após o desmame e concomitantemente recebeu suplementação com taurina.

SDS – dodecil sulfato sódico

Ser – serina

SOD – superóxido dismutase

TBARS– substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

Thr – treonina

TXA₂ – tromboxano A₂

Tyr – tirosina

U.A. – unidades arbitrárias

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

Zn – zinco

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desnutrição e a saúde humana

O aporte nutricional adequado é fundamental para a preservação das funções físicas e cognitivas e, de um modo geral, da saúde. Dessa maneira, a manutenção de dietas contendo quantidades insuficientes de energia, proteínas e de um ou múltiplos micronutrientes aumenta a predisposição a doenças e à morte (CHANDRA et al., 1997). Os prejuízos causados pelo baixo aporte nutricional acometem indivíduos de todas as idades, embora tal condição seja significativamente mais preocupante entre idosos e crianças (SHARKEY et al., 2008).

Em contraste com o crescente problema da obesidade, os índices de desnutrição global vêm caindo nas últimas décadas. Todavia, este problema de saúde pública ainda não foi extinto. Dados da organização mundial de saúde (OMS) publicados em 2010 apontaram que 1,02 bilhões de pessoas no mundo sofriam de fome, 147 milhões de pessoas a mais do que o levantamento anterior, realizado em 2006, sendo este o pior nível desde 1970, e apontaram ainda o fato de que cerca de uma pessoa em cada seis não possuía comida o suficiente para levar uma vida saudável e ativa. Este mesmo estudo ressaltou ainda a desnutrição como a causa de 53% das 9,7 milhões de mortes anuais de crianças abaixo dos cinco anos de idade registradas em países em desenvolvimento. Se não levar ao óbito, a desnutrição na fase inicial da vida pode causar danos irreversíveis à saúde que persistem até a fase adulta do indivíduo, o que justifica a necessidade de diferentes terapias para a prevenção da subnutrição e desnutrição infantil, não apenas para a sobrevivência, mas também para a qualidade de vida do indivíduo adulto (OMS 2010).

A doença de kwashiorkor, descrita em 1935 por Williams e colaboradores no periódico "*The Lancet*" (WILLIAMS et al., 1935), foi observada como sendo uma síndrome que afetava crianças entre os seis meses e os quatro anos de idade, exatamente quando o próximo bebê de suas famílias nascia e, assim, estas crianças deixavam de receber o leite materno e passavam a receber alimentação deficiente em nutrientes, quase que exclusivamente baseada em milho. Com alto índice de mortalidade das crianças acometidas, o kwashiorkor passou a ser referido como uma doença específica que apresenta como principais sintomas a interrupção do ganho de peso, irritabilidade, edema, desprendimento de córnea, lesões cutâneas escuras e, em alguns casos, esteatose hepática (WILLIAMS et al., 1935). Quanto às causas específicas do surgimento da doença de kwashiorkor, esta é constantemente associada à escassez de conteúdo proteico na dieta e, embora tal afirmação seja questionada (GOLDEN et al., 1980; GOLDEN, 1982), há consenso de que a escassez de conteúdo proteico na alimentação aumente a propensão ao desenvolvimento de kwashiorkor (LIN et al., 2007).

É importante ressaltar que a fome e a desnutrição nem sempre derivam da real escassez de alimentos. Mesmo que a ingestão calórica seja suficiente, a falta de um ou mais nutrientes (proteínas, vitaminas e minerais) essenciais para o funcionamento adequado do corpo humano indicam uma condição conhecida como "fome oculta" (OMS 2010). Sabe-se que a "fome oculta" é resultante não só da escassez da oferta de alimentos para os grupos de baixa renda, mas também da redução da qualidade dos alimentos, excessivamente industrializados, incorporando enormes quantidades de açúcar, sal e gordura e com baixa qualidade nutricional. Isto se evidencia na anemia e na obesidade como grandes problemas de saúde pública, atingindo todos os estratos sociais (BLEIL, 1998). Por este motivo, estudos que avaliem o impacto na saúde humana de dietas desequilibradas com relação a diferentes nutrientes tem sua importância reiterada.

1.2. Desnutrição proteica e prejuízos ao sistema cardiovascular

Tem sido descrito que a desnutrição proteica pós-desmame pode provocar aumento da pressão arterial média, da frequência cardíaca e de suas variabilidades, além de prejuízo do barorreflexo em ratos (OLIVEIRA et al., 2004; LOSS et al., 2007). Em somatória, alterações da função vascular também têm sido apontadas entre os prejuízos causados ao sistema cardiovascular de indivíduos desnutridos nos estágios iniciais da vida. De acordo com esta hipótese foi descrito que a subnutrição durante a metade final de gestação predispõe o feto a doenças coronárias na vida adulta (BARKER, 1995). Neste sentido, trabalhos apontam que o dano vascular de crianças e roedores expostos à desnutrição intra-uterina associa-se à ocorrência de disfunção endotelial (FRANCO et al., 2002; FRANCO et al., 2007b; FRANCO et al., 2009). De maneira similar, observou-se na aorta torácica de ratos submetidos especificamente à restrição proteica intra-uterina a redução significativa do relaxamento induzido por acetilcolina (ACh), um agonista dos receptores muscarínicos que causa vasodilatação dependente do endotélio (TORRENS et al., 2009).

Sabe-se que as células endoteliais formam uma camada única de células entre o lúmen e a camada muscular lisa dos vasos sanguíneos, sendo responsável pela secreção de fatores vasoconstritores e vasodilatadores que regulam o tônus vascular. Como fatores vasodilatadores principais estão o óxido nítrico (NO), a prostaciclina (PGI₂) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Como vasoconstritores são secretados a endotelina-1 (ET-1), a angiotensina II, e os prostanóides tromboxano A₂ (TXA₂) e prostaglandina H₂ (PGH₂). Fisiologicamente, o NO é o principal fator relaxante liberado, fisiologicamente, pelo endotélio em vasos de condutância em resposta ao estresse de cisalhamento do sangue, e assim controla de maneira importante o tônus vascular.

O NO foi descoberto como uma molécula sinalizadora do sistema cardiovascular e derivada do endotélio pelo trabalho conjunto de Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad na década de 80, motivo pelo qual estes cientistas foram agraciados pelo prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina no ano de 1998. Uma vez sintetizado pelas células endoteliais, este gás se difunde para as células da musculatura lisa vascular, ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), o que leva a formação de GMPc, que provoca redução dos níveis intracelulares de cálcio e por consequência causa relaxamento (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; IGNARRO et al., 1987; ARNOLD et al., 1977). Ocorre também a hiperpolarização das células da musculatura lisa via abertura dos canais para potássio sensíveis ao cálcio e ativação da Na⁺/K⁺-ATPase, que são mecanismos auxiliares do relaxamento vascular (RAND e GARLAND, 1992; ARCHER et al., 1994; GARCÍA-VILLAÓN et al., 1996). A ação do NO é finalizada pela ação da fosfodiesterase-5 (PDE-5), que hidrolisa o GMPc (EVORA et al., 2012).

O NO é sintetizado a partir da atividade da enzima sintase de óxido nítrico (NOS), que é responsável pela conversão de L-arginina e O₂ em L-citrulina e NO (PALMER et al., 1988). Esta enzima possui duas isoformas constitutivas, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), e uma isoforma induzível, iNOS. A principal diferença funcional entre elas é que a ativação das isoformas constitutivas depende do aumento da concentração de Ca²⁺ intracelular (causada por estresse de cisalhamento, hormônios como bradicinina e neurotransmissores como acetilcolina) enquanto a iNOS não depende desse mecanismo (FORSTERMANN e SESSA, 2012). Além dos níveis de cálcio intracelular, a atividade da eNOS é também regulada pela disponibilidade do substrato L-arginina e dos co-fatores para a produção do NO, além da fosforilação desta enzima em sítios específicos de ativação ou inativação. Quando o resíduo de serina 1177 (Ser 1177) é fosforilado a sensibilidade da enzima à ativação pelo cálcio é aumentada (CORSON et al., 1999). Várias proteínas quinases podem levar à fosforilação do resíduo Ser 1177 incluindo a

Ser/Thr proteína quinase Akt (DIMMELER et al., 1999). Desta maneira, a sinalização intracelular dependente da ativação destas quinases aumenta a síntese e liberação de NO e conseqüentemente sua ação relaxante vascular.

Em algumas doenças cardiovasculares a biodisponibilidade de NO pode estar diminuída, seja pela diminuição de sua síntese ou pelo aumento de sua degradação. Dentre os principais mecanismos hoje descritos que levam à diminuição da biodisponibilidade de NO nos vasos sanguíneos de indivíduos com doenças cardiovasculares está o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que culmina em estresse oxidativo, um fator de risco para hipertensão arterial, diabetes e aterosclerose (WARNHOLTZ et al., 1999; HINK et al., 2001; SORESCU et al., 2002; LI et al., 2006).

Já foi demonstrado o aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de isoprostanos no plasma de crianças entre 8 e 13 anos nascidas com baixo peso corporal, havendo uma correlação positiva entre os níveis de TBARS e os valores de pressão arterial sistólica, o que sugere o envolvimento do estresse oxidativo e da peroxidação lipídica no desenvolvimento de alterações do sistema cardiovascular de indivíduos submetidos à desnutrição intra-útero (FRANCO et al., 2007a). Além disso, crianças submetidas à desnutrição no período intra-uterino apresentam quantidade reduzida de NO medido na urina que é associada positivamente com os níveis de pressão arterial sistólica (FRANCO et al., 2007b). Assim, em conjunto estes dados mostram que o estresse oxidativo, a redução de NO e o aumento de pressão arterial são fatores que relacionam-se fortemente na desnutrição intra-uterina.

Existem vários sistemas enzimáticos que podem potencialmente produzir ROS nas células vasculares, sendo quatro sistemas de maior importância: NADPH oxidase, xantina oxidase, eNOS desacoplada e enzimas da cadeia respiratória mitocondrial. Além disso, ao reagir com ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o NO pode ser convertido em peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$)

(BECKMAN et al., 1990), de forma que a produção exacerbada de NO associada ao aumento de $O_2^{\cdot-}$ podem gerar estresse oxidativo. Franco e colaboradores demonstraram que o aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ na artéria mesentérica de ratos Wistar submetidos à desnutrição intra-uterina era derivado do aumento da ativação da NADPH oxidase pela angiotensina II (FRANCO et al., 2003). A NADPH oxidase, originalmente considerada uma enzima específica de fagócitos, onde foi descoberta, é um complexo de proteínas aliadas, com componentes na membrana celular e no citoplasma. Esta enzima contém domínios de ligação para FAD e para NADPH ou NADH em seu terminal C, sendo que a transferência de um elétron de NADPH para uma molécula de oxigênio forma o $O_2^{\cdot-}$. Na membrana plasmática, a subunidade p22-phox se liga à subunidade catalítica da enzima, a GP91-phox, estabilizando-a. Quando ocorre estímulo para ativação desta enzima, a p47-phox, uma subunidade citoplasmática que forma um complexo com a p67-phox, transloca-se para a membrana plasmática, onde interage com a subunidade p22-phox. O mesmo estímulo também faz com que a Rac2 se transloque para a membrana e interaja com a p67-phox. Este é o complexo responsável por estimular a atividade da unidade catalítica GP91-phox, ou Nox 2, da NADPH oxidase, que apresenta subunidades homólogas em células não fagocíticas, incluindo as subunidades Nox 1 e 4 que, assim como a Nox 2, já foram descritas no sistema cardiovascular (MANEA, 2010; AGO et al., 2011).

A disfunção do sistema de defesa antioxidante pode aliar-se ao aumento da produção das ROS no estabelecimento do quadro de estresse oxidativo, caracterizado pelo desbalanço entre a produção e a eliminação destas substâncias. O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em enzimático e não-enzimático. Deste último, participam principalmente os compostos antioxidantes de origem alimentar, como as vitaminas A, C e E, e minerais como o selênio, o magnésio e outros. O sistema de defesa enzimático tem como enzimas principais a superóxido dismutase (SOD), catalase e a

glutathione peroxidase (GPX). A SOD converte o $O_2^{\cdot-}$ em peróxido de hidrogênio, e em células de mamíferos existe sob três isoformas distintas: CuZn-SOD ou isoforma 1 citosólica, Mn-SOD ou isoforma 2 encontrada na mitocôndria e EC-SOD ou isoforma 3 extracelular (VINCENT et al., 2007). Tanto a catalase quanto a GPX atuam impedindo o acúmulo de peróxido de hidrogênio, que embora seja menos reativo do que o $O_2^{\cdot-}$, pode ser convertido no extremamente deletério radical hidroxila, contra o qual não há sistema de defesa específico (BARBOSA et al., 2010). Enquanto a catalase converte diretamente duas moléculas de peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água, a ação de GPX necessita de duas moléculas de glutathione reduzida (GSH) que, juntamente com o peróxido de hidrogênio, são convertidas em glutathione oxidada (GSSG) e água (SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004). Assim, um equilíbrio entre as fontes geradoras de ROS e os sistemas de defesa antioxidante é essencial para manter os níveis de ROS dentro de limites fisiológicos.

Apesar dos dados demonstrarem que há disfunção endotelial e estresse oxidativo na aorta de animais desnutridos submetidos à restrição alimentar durante o período intra-uterino (FRANCO et al., 2002; 2003), não estão totalmente esclarecidos os efeitos da restrição alimentar exclusivamente proteica durante o período pós-desmame sobre a função endotelial. Recentemente, de Belchior e colaboradores relataram uma alteração do controle endotelial da resposta vascular vasoconstritora na aorta e na artéria caudal de ratos submetidos à restrição proteica pós-desmame, relacionada a aumento da produção de ROS e de NO (DE BELCHIOR et al., 2012). Entretanto, a dieta oferecida ao grupo de animais desnutridos mimetizava uma dieta utilizada no sertão da região Nordeste do Brasil em períodos de escassez alimentar, com reduções de outros nutrientes além de proteínas, como lipídios, fibras e especialmente de vitaminas e minerais, que são fatores que podem influenciar a função endotelial (FRANCO et al., 2009).

Apenas recentemente, Lebreton e colaboradores investigaram o efeito da desnutrição proteica na fase adulta sobre a função endotelial da artéria mesentérica de ratos, tendo observado que esta restrição dietética, mesmo sendo isocalórica, levou a hipercontratibilidade e redução de relaxamento do músculo liso vascular, de maneira tanto dependente quanto independente do endotélio no leito vascular em questão (LEBRETON et al., 2013). De acordo com nosso conhecimento, este é o primeiro e o único trabalho publicado até o momento demonstrando a ocorrência de disfunção endotelial induzida por desnutrição proteica após o desmame, neste caso, mais especificamente, durante a fase adulta, na qual tal restrição dietética tem importância por representar um fator de risco para co-morbididades cardiovasculares com o avançar da idade. Entretanto, os mecanismos envolvidos com os efeitos da restrição proteica pós-desmame sobre a função endotelial ainda não estão esclarecidos.

1.3. Suplementação dietética na desnutrição

A suplementação dietética com pequenas moléculas que podem atuar como antioxidantes tem sido foco de estudos que visam à recuperação ou a melhoria da saúde dos indivíduos. Dentre elas, estão as vitaminas A e E, a glutatona e o aminoácido taurina (AERTS e VON ASSHE, 2002; ZOPPI et al., 2006; FRANCO et al., 2009; RAGHEB et al., 2009). A taurina, ou ácido 2-aminoetanosulfônico, é um aminoácido semi-essencial para os humanos, podendo ser derivada da metionina ou ser obtida através da alimentação. Este aminoácido existe naturalmente em frutos do mar e na carne, sendo indisponível em alimentos de origem vegetal. Os níveis plasmáticos da taurina dependem muito do conteúdo alimentar, sendo que indivíduos com regime alimentar vegânico possuem níveis plasmáticos de taurina 50% menores em comparação com os onívoros.

A taurina possui um papel crucial em diversos processos biológicos essenciais, como a estabilização de membranas e a imunidade, tendo efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (RANA e SANDERS, 1986; IKUBO et al., 2011). Existem evidências de que os níveis de taurina são reduzidos no plasma e em tecidos de animais com diabetes tipo I e, neste contexto, a suplementação com taurina pode ser um agente promissor como auxiliar do tratamento da diabetes devido às suas ações hipoglicemiante, hipolipidêmica e anti-inflamatória (TENNER et al., 2003; ALVARADO-VASQUEZ et al., 2003). Além disso, foi descrito que a suplementação dietética de ratos e camundongos submetidos à desnutrição proteica pós-desmame com taurina foi capaz de restabelecer os níveis de secreção de insulina, prejudicada nos animais submetidos a este tipo de desnutrição (RIBEIRO et al., 2009; BATISTA et al., 2012).

Outro aminoácido cujos efeitos da suplementação dietética vêm sendo investigados na busca por melhora do funcionamento do organismo de indivíduos acometidos por desnutrição proteica é a leucina, um aminoácido de cadeia ramificada. Suas duas principais propriedades descritas até então envolvem o estímulo anabólico, já que este aminoácido estimula tanto a liberação de insulina pelas ilhotas pancreáticas, onde atua como um secretagogo (NEWSHOLME et al., 2005), quanto a síntese proteica diretamente, através da ativação da mTOR (do inglês “mammalian target of rapamycin”), um “sensor” presente nas células de mamíferos que regula o crescimento celular e a síntese proteica. Interessantemente, os outros dois aminoácidos de cadeia ramificada, isoleucina e valina, não têm efeito sobre a mTOR ou sobre o “turnover” proteico muscular, indicando a especificidade estrutural da leucina nesta função de sinalização celular (SURYAWAN et al., 2008). Por esta razão, a leucina é indicada como suplemento alimentar em situações que visem tanto o aumento de massa, quanto a prevenção de sua perda, como na caquexia provocada pelo câncer (GOMES–MARCONDES et al., 2003).

A mTOR, que pode ser fosforilada em seu sítio de ativação pela Akt, consiste em 2 complexos proteicos: o complexo 1 (mTORC1), mais especificamente envolvido da função desta quinase, e o complexo 2 (mTORC2). O complexo mTORC1 é sensível à rapamicina, tendo sua atividade inibida por esta substância, e sensível também a aminoácidos (especialmente a leucina), hormônios, fatores de crescimento e sinais energéticos, tendo sua atividade aumentada pelos mesmos. Os dois efetores da quinase mTOR, que se localizam nos ribossomos, são o fator iniciador eucariótico (eIF) 4E-binding protein-1 e a proteína S6 quinase (S6K). Quando a mTOR fosforila o complexo eIF) 4E-binding protein-1 a ligação de RNAm aos ribossomos é favorecida. Então, mTOR fosforila a proteína ribossomal S6K, ativando-a, o que promove a tradução de proteínas pelos ribossomos. Consequentemente, através da fosforilação de dois efetores da mTOR, a capacidade celular de tradução de RNAm é aumentada de maneira geral (SURIAWAN et al., 2008; TEODORO et al., 2012).

Animais submetidos à desnutrição proteica pós-desmame apresentam queda da secreção de insulina, que é melhorada pela suplementação com leucina na dieta e este efeito benéfico que se deve, ao menos em parte, ao aumento da expressão proteica do receptor muscarínico tipo 3 (M_3) e da razão p(fosforilada)-Akt/Akt nas ilhotas pancreáticas e por ativação da via da mTOR (AMARAL et al., 2010). Interessantemente, o aumento da p-Akt é um dos mecanismos associados ao aumento da produção de NO, via p-eNOS em Ser1177 (DIMMELER et al., 1999).

Assim, neste estudo hipotetizamos que animais submetidos à desnutrição proteica pós-desmame poderiam desenvolver alterações cardiovasculares e que a suplementação dietética destes animais com leucina ou taurina poderia apresentar efeitos benéficos principalmente na função endotelial.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho incluíram a avaliação da pressão arterial e da função endotelial da aorta de ratos adultos submetidos à restrição proteica desde o período pós-desmame. Adicionalmente, os efeitos da suplementação com os aminoácidos leucina ou taurina sobre estes dois parâmetros foram investigados, bem como os possíveis mecanismos de sinalização celular envolvidos nos efeitos da restrição proteica e da suplementação com os aminoácidos leucina e taurina, tendo sido enfatizados os papéis da via PI3K/ Akt/ eNOS e das enzimas pró- e anti-oxidantes do sistema vascular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Grupos experimentais

Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP protocolo 2653-1). Ratos Wistar logo após o desmame, aos 21 dias de nascimento, foram obtidos no Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) e então submetidos a um protocolo dietético de 90 dias.

Primeiramente, eles foram divididos aleatoriamente em dois grupos principais: o grupo controle, ou C, que recebeu dieta normoproteica (12%, REEVES et al., 1993) e o grupo restrito, ou R, que recebeu dieta hipoproteica (6%) (Pragsoluções Biociências, São Paulo, Brasil). Vale ressaltar que as duas dietas eram isocalóricas (**Tabela 1**). Para comprovação da eficácia da dieta de restrição proteica, o peso corporal dos animais foi

averiguado semanalmente, pois como descrito previamente esta dieta causa redução significativa do ganho de massa corpórea (FILIPUTTI et al., 2010).

Tabela 1: Composição das dietas controle normoproteica (C) e de restrição proteica (R)

| Ingredientes | C | R |
|----------------------|-------|--------|
| | g/kg | |
| Caseína 84% | 140,0 | 71,4* |
| Amido de Milho | 465,7 | 511,9* |
| Dextrina | 155,0 | 178,6* |
| Sacarose | 100,0 | 100,0 |
| Óleo de Soja | 40,0 | 40,0 |
| Fibra | 50,0 | 50,0 |
| Mix Mineral | 35,0 | 35,0 |
| Mix Vitamínico | 10,0 | 10,0 |
| L-Cisteína | 1,8 | 0,6* |
| Cloridrato de Colina | 2,5 | 2,5 |

*vs. C

Em um lote de experimentos, metade dos animais de cada um dos dois grupos passou a receber leucina 1,5% na água de beber nos últimos 30 dias de protocolo dietético (FILIPUTTI et al., 2010), sendo que a outra metade dos ratos, os grupos C e R, permaneceu recebendo as dietas, porém não foi suplementada com leucina. Paralelamente, outro lote de animais C e R foi subdividido, sendo metade suplementada com taurina 2,5% na água de beber ao longo de todo o protocolo dietético de 90 dias e outra metade não (NARDELLI et al., 2010). A divisão dos grupos experimentais estudados está apresentada na **Figura 1** abaixo.

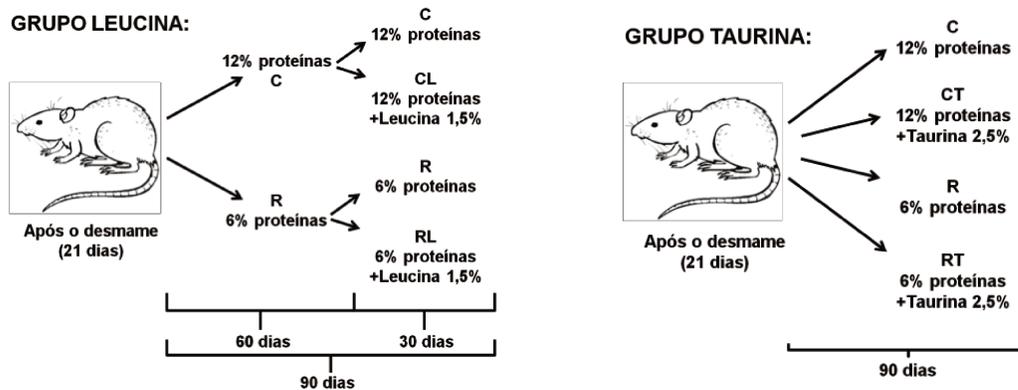


Figura 1: Representação esquemática dos grupos experimentais de ratos Wistar controles (C) e submetidos à restrição proteica (R) que foram subdivididos para suplementação com leucina (L) ou taurina (T).

3.2. Medidas hemodinâmicas

Ao final dos 90 dias de tratamentos os ratos foram anestesiados com uretana (1.2 g/Kg, *i.p.*) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e, após constatado o efeito do anestésico através da ausência de reflexo pupilar e de reflexo das patas traseiras, a carótida direita dos ratos foi canulada com um cateter de polietileno (PE-50, 8 cm, preenchido com salina 0,9%) para medida das pressões arteriais sistólica, diastólica e média (PAS, PAD e PAM, respectivamente) e também da frequência cardíaca. O cateter era conectado a um transdutor de pressão ligado ao sistema de aquisição PowerLab (ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia) para obtenção dos registros hemodinâmicos (DAVEL et al., 2008).

3.3. Determinação dos níveis plasmáticos e teciduais de nitrito e nitrato (NO_x)

Para estimar indiretamente a quantidade de NO produzida utilizou-se o método baseado na conversão enzimática do nitrato em nitrito pela enzima nitrato redutase utilizando-se um kit colorimétrico (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA) disponível comercialmente, de acordo como previamente descrito (DELBIN et al., 2011).

Para tal, após a realização das medidas hemodinâmicas, ainda sob anestesia, foi coletado o sangue dos ratos, em jejum de 12 horas, de todos os grupos experimentais pelo cateter inserido na carótida, em tubo contendo tampão anticoagulante EDTA (VACUETTE® K3E K3EDTA, Greiner Bio-One, São Paulo, Brasil) e então centrifugado (3.000 RPM, 15 minutos). Especificamente nos animais do grupo leucina (C, R, CL e RL) isolou-se um segmento de aorta torácica (de acordo como descrito para o item 3.4. abaixo) para medida do níveis de NO_x^- teciduais. O segmento de aorta coletado foi homogeneizado em tampão PBS (0,1 M; pH 7,4), seguido de centrifugação a 10.000 *g* por 20 minutos, e então foi realizada medida de concentração proteica do sobrenadante resultante utilizando-se um kit disponível comercialmente (BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA).

Em seguida, a concentração total de nitrito e nitrato ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^- = \text{NO}_x^-$, μM) foi determinada nas amostras de plasma e de tecido da aorta ultra filtradas (Microcon Centrifugal Filter Units, 10 kDa; Millipore, Bedford, MA, EUA). Os valores teciduais de NO_x^- foram normalizados pelo conteúdo proteico das amostras utilizadas para as medidas ($\mu\text{M}/\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (TANEJA et al., 2013).

3.4. Reatividade vascular

Após medidas hemodinâmicas e coleta de sangue, os ratos foram decapitados e então sua aorta torácica foi isolada e limpa de tecidos perivasculares e segmentada em “anéis” de aproximadamente 3 mm de comprimento. Cada anel foi transpassado por duas hastes metálicas opostas e mergulhado em uma cuba do banho de órgãos (Panlab Harvard Apparatus, Barcelona, Espanha) preenchida com solução Krebs-Hanseleit (NaCl 115 mM; KCl 4,6 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM; NaHCO_3 25 mM e glicose 11,1 mM) a 37°C e aerada com mistura carbogênica (95% O_2 e

5% CO₂). A haste metálica superior era conectada a um transdutor de força (Panlab Harvard Apparatus) e este, por sua vez, era conectado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab; ADInstruments) (**Figura 2**).

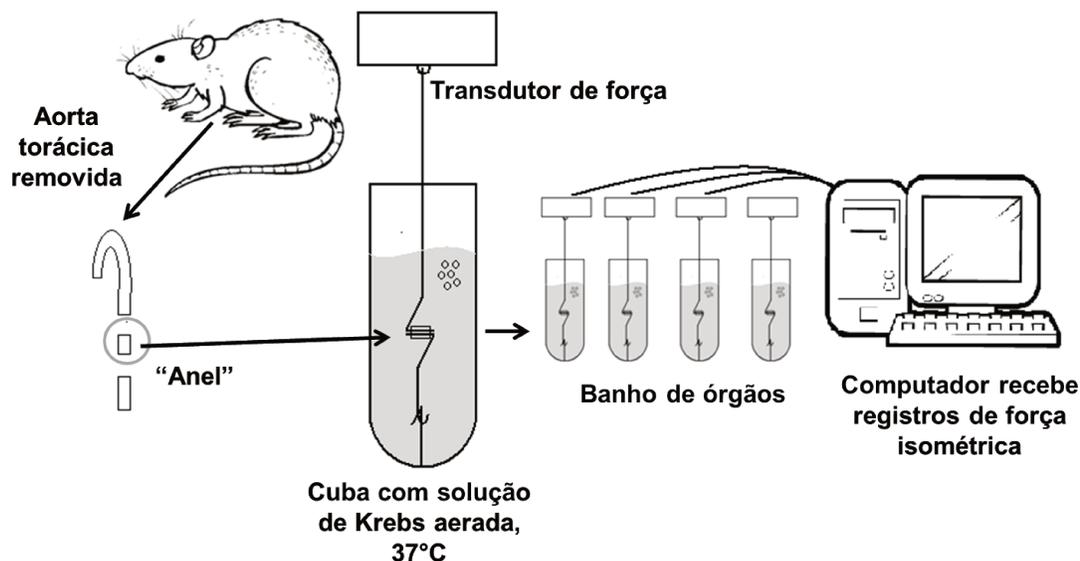


Figura 2: Esquema representativo do ensaio de reatividade vascular.

Os anéis foram mantidos a uma tensão basal de 1 g. A contração máxima de cada anel foi determinada em resposta a exposição por 30 minutos ao KCl 125 mM. Após quatro lavagens com solução de Krebs-Hanseleit e pausa de mais 30 minutos para estabilização, os mesmos foram pré-contraídos com serotonina (aproximadamente 10⁻⁶ M) até atingirem entre 50 e 70% da contração máxima ao KCl 125 mM e então foram submetidos a curvas de relaxamento em resposta a concentrações crescentes do agonista do receptor muscarínico acetilcolina (ACh, 10⁻⁹ M a 10⁻⁵ M). Em seguida, os anéis passaram por novas lavagens e período de estabilização antes de serem realizadas curvas de contração em resposta a concentrações crescentes de fenilefrina (Fe, 10⁻⁹ M a 10⁻⁵ M), um agonista de receptores α_1 -adrenérgicos, seguidas de curvas de relaxamento

em resposta ao doador de óxido nítrico nitroprussiato de sódio (NPS, 10^{-10} M a 10^{-6} M) (DAVEL et al., 2006).

Alguns anéis de aorta dos animais do grupo taurina foram incubados por 30 minutos com superóxido dismutase (SOD; 150 U/ml, Sigma-Aldrich, Germany) ou apocinina (Apo; 30 μ M, Sigma-Aldrich, Germany) e então curvas de concentração-resposta à ACh foram novamente obtidas para que fosse avaliada a participação do $O_2^{\cdot-}$ e da NADPH oxidase, respectivamente, no relaxamento induzido por ACh. Ainda, alguns anéis de aorta dos animais do grupo leucina foram incubados por 30 minutos com LY294003 (30 μ M, Sigma-Aldrich, Germany), um inibidor de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e em seguida esse anéis foram submetidos à curva de concentração em resposta à ACh, afim de se avaliar a participação da via PI3K/Akt/eNOS nesse anéis, em comparação a anéis incubados apenas com DMSO, o veículo de diluição do LY294002. Diferentemente das curvas de relaxamento à ACh anteriormente descritas, as curvas realizadas na presença de LY294002, ou apenas de DMSO, foram realizadas em anéis pré-contraídos com U-46619 (Sigma-Aldrich, Germany), um mimético de tromboxano A₂, ao invés de serotonina, para manutenção adequada do tônus de pré-contracção.

Para as curvas de concentração resposta à ACh, Fe e NPS obtidas foram calculados os valores de resposta máxima (E_{max}) e de logaritmo negativo da concentração resultante em 50% da resposta máxima (-Log EC₅₀ ou pD₂).

3.5. Detecção da geração de ROS através da sonda DHE

A produção tecidual de ROS foi avaliada utilizando-se a sonda di-hidroetídeo (DHE). O DHE atravessa a membrana celular e, quando oxidado é transformado em brometo de etídio, vermelho fluorescente, que se intercala com o DNA nuclear. Esta sonda é particularmente sensível à oxidação por superóxido, em comparação a outras

espécies reativas como o peroxinitrito, o radical hidroxila, peróxido de hidrogênio, ânion hipoclorito ou oxigênio singleto (PIECH et al., 2003). Para realização de tal ensaio, um anel de aorta de aproximadamente 3 mm foi armazenado em meio para congelamento Tissue-Tek® OCT™ (Sakura Finetek Inc., Torrance, EUA) e então criosecções de 14 µm de espessura foram obtidas em criostato a -25°C. Entre três e cinco cortes de cada amostra foram colocados sobre lâminas com silanina e sobre cada um deles foram aplicados cem microlitros de solução de DHE (D23107, Life Technologies, CA, EUA, 2×10^{-6} M) diluído em tampão fosfato 0,1M contendo DTPA (10^{-4} M). Para os controles negativos da reação, o DHE foi omitido da solução. As lâminas foram incubadas em câmara úmida (37 °C, 30 minutos) ao abrigo da luz antes da visualização da fluorescência de cada corte em microscópio Olympus BX60. As imagens foram obtidas utilizando-se objetiva 20X e analisadas com o Software ImageJ (NIH, EUA). Os dados de fluorescência ao DHE foram normalizados em função da porcentagem relativa aos dados do grupo C, para os quais foi atribuído um valor médio igual a 100%.

3.6. Análise da expressão de proteínas através da técnica de Western Blotting

O tecido aórtico remanescente dos ensaios de reatividade vascular e de DHE foi armazenado a -80 °C e posteriormente homogeneizado em tampão de lise RIPA (Upstate, Temecula, CA, EUA) diluído 1:10, acrescido de PMSF 1 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), coquetel inibidor de proteases 0,2% (PIC , Sigma-Aldrich) e os inibidores de fosfatases ortovanadato de sódio (Na_3VO_4 , 10 mM, Sigma-Aldrich), fluoreto de sódio (NaF, 100 mM, Synth, Labsynth®, São Paulo, Brasil) e pirofosfato de sódio decahidratado ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 mM, Sigma-Aldrich) de acordo com método descrito previamente (DAVEL et al., 2008). O material resultante foi então centrifugado (2500 rpm, 15 minutos, 4 °C) e o sobrenadante, que constituía o extrato proteico, reservado. Estes extratos

proteicos tiveram sua concentração de proteínas quantificada utilizando-se o kit disponível comercialmente (BCA Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA). Assim, o volume de cada amostra correspondente a 50 µg de proteína foi diluído em igual volume de Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) contendo ditiotreitol (350 µM, Amresco) e as amostras foram submetidas à eletroforese em geles de acrilamida (SDS-PAGE 7,5% ou 10%) juntamente com o marcador de peso molecular Precision Plus (10 a 250 KDa, Bio-Rad Laboratories) em uma voltagem fixa em 100 mV. As proteínas contidas no gel foram transferidas por 12 horas em amperagem fixa de 230 mA para membranas de PVDF (Hybond-P, GE Healthcare, Amersham Place, Little Chalfont, Reino Unido).

As membranas obtidas foram incubadas durante uma hora e meia em tampão de lavagem (10 mM Tris, 100 mM NaCl e Tween 20 0,1%, pH 7,4) contendo 5% de albumina de soro bovino em pó (Sigma-Aldrich) para bloqueio de ligações inespecíficas (solução de bloqueio). Em seguida, as membranas foram incubadas por 12 horas com anticorpos primários diluídos em solução de bloqueio (1:1000) contra as seguintes proteínas alvo: subunidade p85 da PI3K (#SC-423, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., EUA); Akt 1,2,3 (#SC-8312, Santa Cruz Biotechnology) total e fosforilada (p-)^{Ser473}p-Akt (#SC-7985, Santa Cruz Biotechnology); eNOS, (#BD610297, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, EUA); ^{Ser1177}p-eNOS (#9571, Cell Signaling Technology); subunidade α1 da GCs (#ab85445, Abcam Inc.); PDE-5 (#ab14672, Abcam Inc.), EC-SOD (#ADI-SOD-106, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, EUA); CuZn-SOD (#2770, Cell Signaling Technology); Mn-SOD (#ADI-SOD-110, Enzo Life Sciences); p47-phox (#SAB2500674, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA); GP91-phox (#07-024, Millipore Corporation); GPX (#ab22604, Abcam Inc.) e catalase (#C0979, Sigma-Aldrich).

Após a incubação com anticorpo primário, as membranas foram lavadas quatro vezes com tampão de lavagem e em seguida incubadas durante uma hora e meia com anticorpos secundários anti-coelho, anti-camundongo ou anti-ovelha (dependendo do

hospedeiro onde foi produzido o anticorpo primário), conjugados com peroxidase de rábano e diluídos a uma proporção de 1: 10.000 em solução de bloqueio.

Os imunocomplexos foram detectados através da aplicação do método de quimioluminescência aumentada do luminol ligável à peroxidase (ECL, GE Healthcare, Waukesha, WI, EUA) e então submetidos à autorradiografia (Hyperfilm ECL, GE Healthcare). Os sinais detectados referentes às proteínas alvo de cada amostra foram quantificados com o software ImageJ. A mesma membrana foi utilizada para determinar o conteúdo proteico de α -actina (#ab7817, Abcam, 1:10,000) para que seu conteúdo fosse utilizado para normalizar o conteúdo de proteínas totais, enquanto que as proteínas fosforiladas foram normalizadas pelo conteúdo de suas respectivas proteínas totais.

3.7. Análise da expressão de proteínas através da técnica de Multiplex

Para determinação da abundância relativa de algumas proteínas na aorta dos animais do grupo leucina foi utilizado o método do imunoensaio multiplex baseado em microesferas com a tecnologia Luminex xMAP. Para tal foram utilizados kits multiplex disponíveis comercialmente (Millipore), que continham anticorpos/beads conjugados para as proteínas de interesse: mTOR total e fosforilada (p-) ^{Ser2448}p-mTOR, S6K total e ^{Thr412}p-S6K, STAT3 total e ^{Ser727}p-STAT3.

As medidas foram realizadas em extrato proteico de aorta (obtidos como descrito no item 3.6) no equipamento Luminex 200TM (Luminex Corporation, Texas, EUA) seguindo os procedimentos técnicos do fabricante, e então os dados foram analisados pelo software xPONENT (Luminex). Os valores de fluorescência obtidos para as proteínas de interesse foram divididos pelo volume de amostra utilizado (fluorescência/ μ L) e esse valor foi então normalizado pela concentração proteica total (μ g/ μ L) de cada amostra,

obtendo-se o valor de fluorescência/ μg de proteína (VIANA e GOMES-MARCONDES, 2013).

3.8. Expressão e Análise dos Dados

Os dados foram expressos como média \pm e.p.m. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA 1- ou 2-vias utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Corp., Calif., EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. As diferenças entre os grupos analisados foram avaliadas através do teste *post-hoc* de Bonferroni.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos da suplementação dietética com leucina sobre as alterações vasculares causadas pela restrição proteica pós-desmame

4.1.1. Peso corporal

O peso corporal inicial foi semelhante entre os grupos C, R, CL e RL. No final dos tratamentos, os grupos alimentados com a dieta de restrição proteica pós-desmame apresentaram peso corporal estatisticamente inferior ao dos ratos alimentados com dieta normoproteica, o que indica que esta dieta, ainda que isocalórica, resulta em menor ganho de peso corporal. A suplementação com leucina não alterou este padrão (**Tabela 2**).

Tabela 2: Peso corporal inicial, aos 21 dias de idade, e final, após 90 dias de protocolo, dos ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos suplementados com leucina (CL e RL)

| | C (11) | R (13) | CL (9) | RL (12) |
|------------------|----------|-----------|----------|-----------|
| Peso inicial (g) | 65 ± 4 | 62 ± 3 | 61 ± 3 | 59 ± 4 |
| Peso Final (g) | 396 ± 13 | 189 ± 7 * | 392 ± 13 | 188 ± 5 # |

Valores são média ± e.p.m. Número de animais utilizados no estudo entre parênteses. ANOVA 1-via: *p<0,05 vs. C; #p<0,05 vs. CL.

4.1.2. Hemodinâmica

Observou-se que a restrição proteica pós-desmame aumentou significativamente os valores de PAS, PAD e PAM, e a suplementação com leucina normalizou ambos PAD e PAM. A PAS dos ratos RL permaneceu em um valor intermediário, sem diferença detectável estatisticamente nem com relação a R nem com relação a CL (**Tabela 3**). Os valores de frequência cardíaca foram similares entre os grupos C, R, CL e RL (**Tabela 3**).

Tabela 3: Efeitos da restrição proteica pós-desmame e da suplementação com leucina sobre a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD), média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com leucina (CL e RL)

| | C | R | CL | RL |
|------------|----------|-------------|----------|-----------|
| PAS (mmHg) | 116 ± 3 | 137 ± 4 ** | 118 ± 6 | 127 ± 2 |
| PAD (mmHg) | 64 ± 3 | 80 ± 5 ** | 61 ± 3 | 66 ± 3 + |
| PAM (mmHg) | 82 ± 2 | 103 ± 5 *** | 81 ± 3 | 88 ± 3 ** |
| FC (BPM) | 363 ± 16 | 404 ± 18 | 369 ± 11 | 383 ± 14 |

Valores são média ± e.p.m. N= 7-8 por grupo. ANOVA 2-vias: **p <0,01; ***p<0,001 vs. C; +p <0,05; ++p<0,01 vs. R.

4.1.3. Reatividade Vascular

Os anéis de aorta dos grupos experimentais C, R, CL e RL apresentaram contratilidade semelhante em resposta ao KCl e à Fe (**Tabela 4**). Já a curva de relaxamento concentração-resposta à ACh do grupo R foi deslocada para a direita em relação ao grupo C (**Figura 3A**), com diminuição da sensibilidade a este agonista (pD₂) neste grupo (**Tabela 4**). A suplementação com leucina normalizou a resposta de relaxamento à ACh nos animais sob restrição proteica, sem alterar esta resposta em controles (**Tabela 4; Figura 3A**). O E_{max} em resposta à ACh não foi modificado nem pela dieta nem pela suplementação com leucina (**Tabela 4**). O relaxamento aórtico frente a doses crescentes de NPS foi potencializado no grupo R com relação ao C, sendo também normalizado pela suplementação com leucina em RL (**Tabela 4; Figura 3B**).

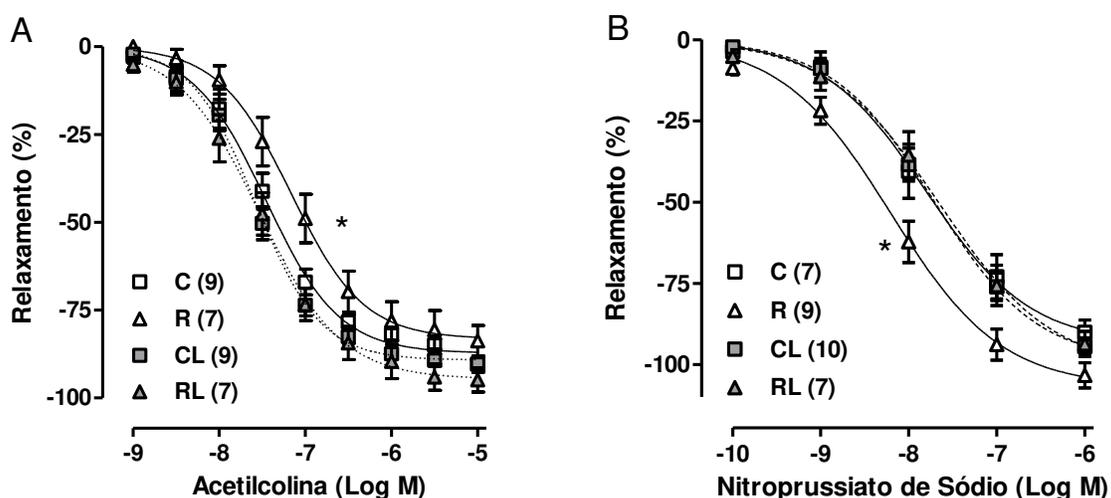


Figura 3: Curvas concentração-resposta à acetilcolina (A) e ao nitroprussiato de sódio (B) em anéis de aorta de ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com leucina (CL e RL). Valores são expressos como média \pm e.p.m. O número de ratos utilizados aparece entre parênteses. ANOVA 2-vias: * $p < 0,05$ vs. C.

Tabela 4: Valores de contração ao KCl e de Emax e pD₂ das curvas de relaxamento induzido por acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) e das curvas de contração induzidas por fenilefrina (Fe) na aorta de ratos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com leucina (CL e RL)

| | C | R | CL | RL |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| KCl | | | | |
| Delta (g) | 2,06 ± 0,16 (14) | 1,82 ± 0,14 (14) | 1,96 ± 0,14 (11) | 1,76 ± 0,08 (11) |
| Fe (% KCl) | | | | |
| pD ₂ | 6,79 ± 0,21 (8) | 6,94 ± 0,12 (9) | 6,78 ± 0,13 (10) | 6,79 ± 0,17 (8) |
| Emax (%) | 62,7 ± 13,7 (8) | 70,1 ± 12,5 (10) | 78,4 ± 13,2 (10) | 70,4 ± 13,7 (8) |
| ACh | | | | |
| pD ₂ | 7,45 ± 0,07 (9) | 7,11 ± 0,11 (6)* | 7,59 ± 0,07 (9) | 7,56 ± 0,10 (7) ⁺ |
| Emax (%) | -90,4 ± 1,9 (9) | -83,8 ± 4,4 (7) | -90,8 ± 2,0 (9) | -95,5 ± 3,3 (7) |
| NPS | | | | |
| pD ₂ | 7,79 ± 0,21 (7) | 8,30 ± 0,10 (8)* | 7,70 ± 0,11 (10) | 7,59 ± 0,19 (7) ⁺ |
| Emax (%) | -90,1 ± 3,8 (7) | -103,3 ± 3,9 (9) | -94,4 ± 2,7 (10) | -93,7 ± 3,9 (7) |

Valores são média ± e.p.m. O número de animais utilizados está entre parênteses. ANOVA 1-via: * p < 0,05 vs. C; ⁺p < 0,05 vs. R.

A incubação por 30 minutos com DMSO, veículo do LY294002, causou uma instabilidade na manutenção da pré-contracção com serotonina. Assim, neste protocolo, utilizou-se o U-46619 para gerar um tônus contrátil nas aortas antes da curva de ACh. Quando os anéis aórticos foram pré-contráidos com U-46619 também foi observada uma redução significativa da resposta de relaxamento à ACh no grupo R com relação ao grupo C, porém neste caso houve um prejuízo do Emax à ACh, normalizado pela suplementação com leucina, mas sem alterações significativas na pD₂ (**Tabela 5**). A incubação com LY294002, um inibidor seletivo de PI3K, causou uma redução significativa do relaxamento à ACh nos anéis de aorta dos grupos C, R, CL e RL, em comparação aos anéis de seus respectivos grupos não incubados (**Figura 4, Tabela 5**). Entretanto, a diferença estatística entre as curvas de C vs. C + LY294002 (**Figura 4A**), CL vs. CL +

LY294002 (**Figura 4C**) e RL vs. RL + LY294002 (**Figura 4D**) foi mais significativa ($p < 0,001$) do que a observada em R vs. R+LY294002 ($p < 0,05$, **Figura 4B**). Além disso, o LY294002 foi capaz de reduzir o E_{max} da ACh em aorta dos grupos C, CL e RL, mas não em R (**Tabela 5**).

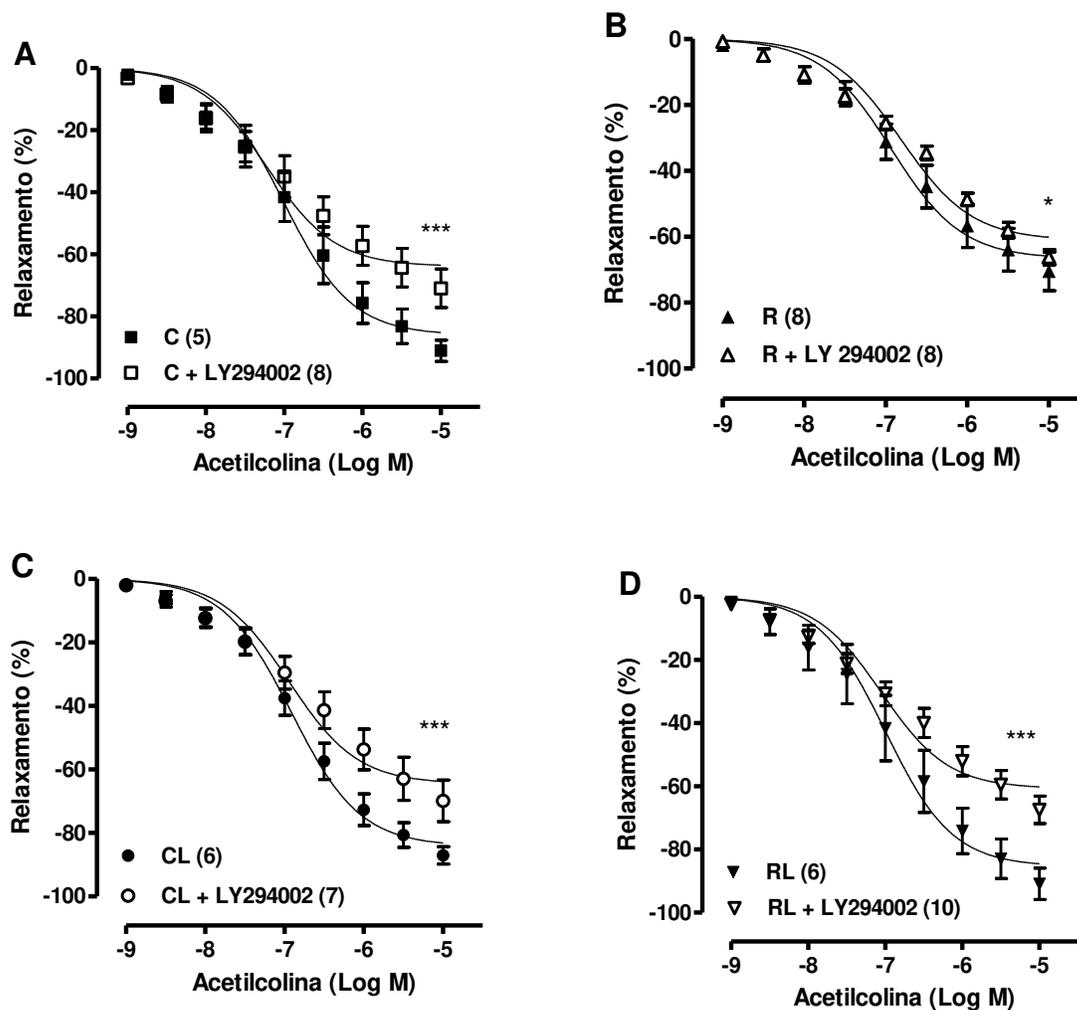


Figura 4: Curvas de concentração resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com leucina (CL e RL) pré-incubados ou não com LY294002 (30 μ M). As respostas de relaxamento são expressas como porcentagem da pré-contracção induzida por U-46619. Valores são expressos como média \pm e.p.m. O número de ratos utilizados aparece entre parênteses. ANOVA 2-vias: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ vs. respectivo grupo sem incubação.

Tabela 5: Efeitos da incubação com LY294002 sobre os valores de Emax e pD₂ das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) na aorta de ratos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com leucina (CL e RL)

| | C | R | CL | RL |
|----------------------|------------------------------|------------------|------------------------------|-------------------------------|
| ACh | | | | |
| pD ₂ | 6,63 ± 0,22 (4) | 6,70 ± 0,18(10) | 6,78 ± 0,13 (6) | 6,82 ± 0,24 (6) |
| Emax (%) | -91,0 ± 3,4 (5) | -70,5 ± 5,9 (8)* | -87,0 ± 2,8 (6) | -90,9 ± 5,0 (6) ⁺ |
| ACh+ LY294002 | | | | |
| pD ₂ | 6,97 ± 0,20 (7) | 6,30 ± 0,12 (8) | 6,59 ± 0,13(6) | 6,55 ± 0,15 (10) |
| Emax (%) | -71,3 ± 5,6 (8) [#] | -66,2 ± 2,3 (8) | -69,1 ± 6,3 (7) [#] | -67,4 ± 4,3 (10) [#] |

Valores são média ± e.p.m. O número de animais utilizados aparece entre parênteses. ANOVA 2-vias: *p<0,05 vs. C; ⁺p<0,05 vs. R; [#]p<0,05 vs. respectivo grupo sem incubação.

4.1.4. NO_x⁻ plasmático e tecidual

Não foram encontradas diferenças significativas no conteúdo de nitrito e nitrato (NO_x⁻) nem no plasma nem nas aortas dos ratos dos grupos C, R, CL e RL (**Figura 5**).

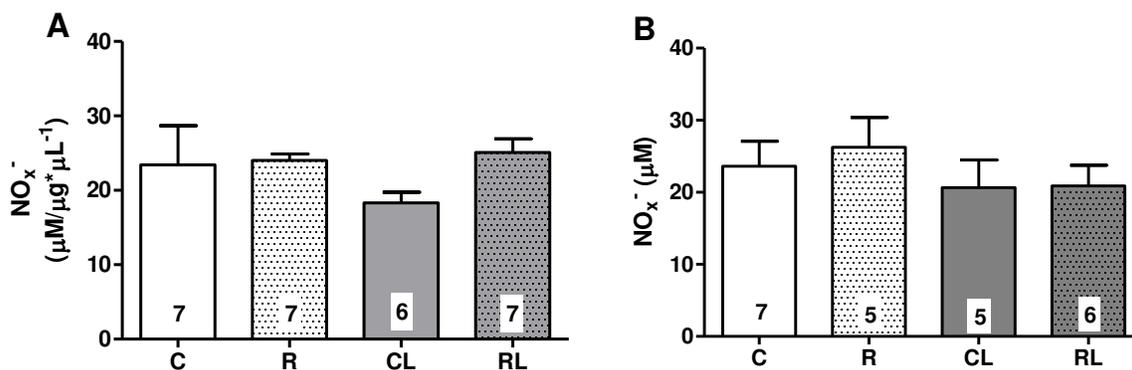


Figura 5: Níveis teciduais aórticos **(A)** e plasmáticos **(B)** de nitrito/nitrato (NO_x⁻) dos ratos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com leucina (CL e RL). O conteúdo de NO_x⁻ na aorta foi normalizado pelo conteúdo proteico total do tecido homogeneizado. Valores são expressos como média ± e.p.m. O número de animais utilizados aparece dentro das barras. ANOVA 2-vias.

4.1.5. Western Blotting

A expressão de PI3K não foi alterada pela restrição proteica, mas a suplementação com leucina elevou a expressão desta proteína em controles e restritos (**Figura 6A**). Os conteúdos de Akt e eNOS totais foram semelhantes entre os subgrupos C, R, CL e RL (**Figuras 6B e 6D**). No entanto, as expressões de ^{Ser473}p-Akt e de ^{Ser1177}p-eNOS foram reduzidas pela restrição proteica, sendo normalizadas pela suplementação com leucina (**Figuras 6C e 6E**). Em comparação com C, a expressão de PDE-5 foi reduzida em R e normalizada pela suplementação com leucina (**Figura 6F**). A expressão de GCs- α -1 não diferiu entre os grupos avaliados (**Figura 6G**).

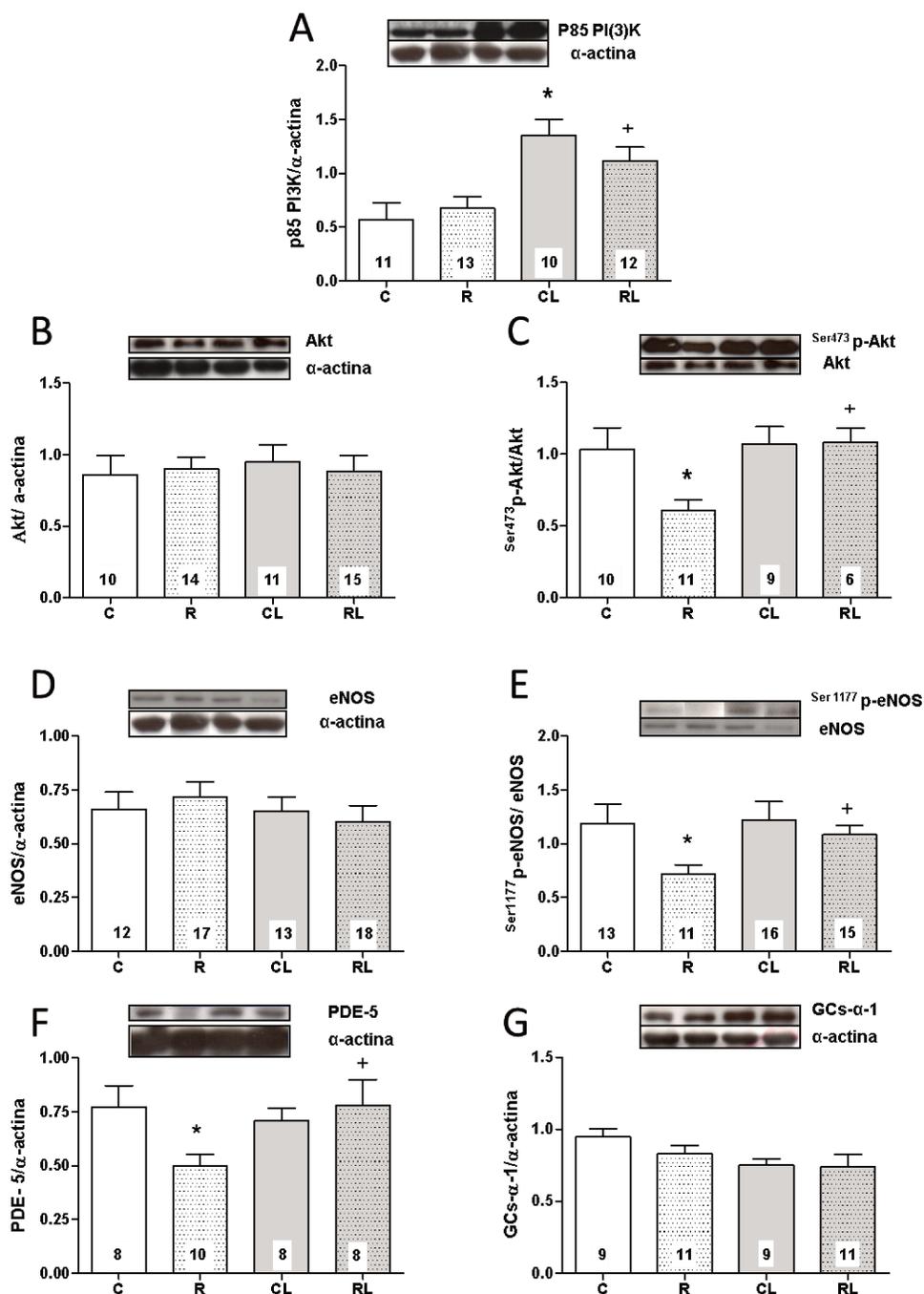


Figura 6: Imagens representativas (painéis superiores) e análises densitométricas (em gráfico) da expressão proteica de PI3K (A), Akt (B), ^{Ser473}p-Akt (C), eNOS(D), ^{Ser1177}p-eNOS (E), PDE-5 (F) e GCs- α -1 (G) na aorta torácica de ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e dos mesmos grupos dietéticos suplementados com leucina (CL e RL). A expressão das proteínas fosforiladas(p) foi normalizada pelo conteúdo de suas respectivas proteínas totais (razão fosforilada/total), enquanto que a expressão das proteínas totais foi normalizada pelo conteúdo de α -actina de cada amostra. Valores são media \pm e.p.m. O número de animais utilizados está dentro das barras. ANOVA 2-vias: *p < 0,05 vs. C; +p < 0,05 vs. R.

4.1.6. Multiplex

O conteúdo de $\text{Ser}^{2448}\text{p-mTOR}$ não foi alterado nem pela restrição proteica pós-desmame nem pela suplementação com leucina (**Figuras 7A**). Já as expressões das formas fosforiladas das proteínas S6K em Thr 412 e de STAT3, em Ser 727, foram significativamente elevadas na aorta de ratos desnutridos, parâmetros estes que foram normalizados pela suplementação com leucina nos animais RL (**Figura 7B e 7C**).

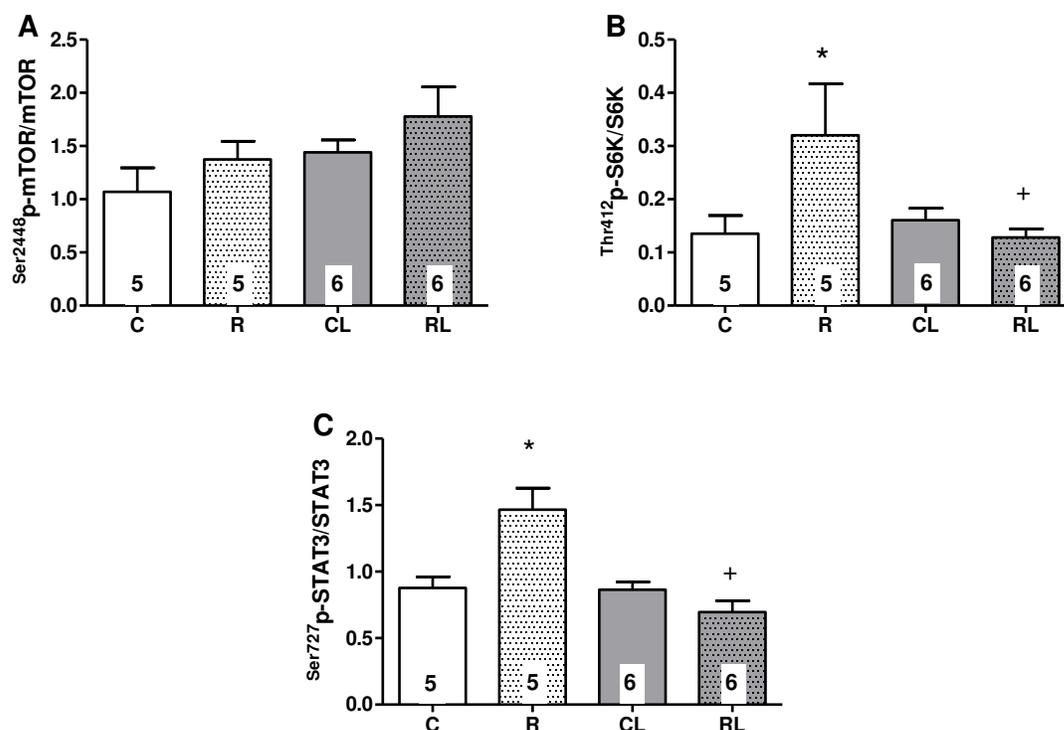


Figura 7: Conteúdo proteico de $\text{Ser}^{2448}\text{p-mTOR}$ (A), $\text{Thr}^{412}\text{p-S6K}$ (B) e $\text{Ser}^{727}\text{p-STAT3}$ (C) na aorta torácica de ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e dos mesmos grupos dietéticos suplementados com leucina (CL e RL). A expressão das proteínas fosforiladas avaliadas (p-) foi normalizada pelo conteúdo de suas respectivas proteínas totais. Valores são média \pm e.p.m. O número de animais utilizados está dentro das barras. ANOVA 2-vias: * $p < 0,05$ vs. C; + $p < 0,05$ vs. R.

4.2. Efeitos da suplementação dietética com taurina sobre as alterações vasculares causadas pela restrição proteica pós-desmame

4.2.1. Peso corporal

O peso corporal dos animais pertencentes aos subgrupos C, R, CT e RT não diferiu no início do tratamento (**Tabela 6**). Ao final dos 90 dias, a restrição proteica causou diminuição do peso corporal de R em relação a C, efeito parcialmente prevenido pela taurina, uma vez que o peso corporal final dos ratos RT foi significativamente maior em comparação a R, embora seja menor do que o peso final dos animais CT (**Tabela 6**).

Tabela 6: Peso corporal inicial, aos 21 dias de idade, e final, após 90 dias de protocolo, dos ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos suplementados com taurina (CT e RT)

| | C (8) | R (10) | CT (9) | RT (10) |
|------------------|----------|-----------|---------|----------------------------|
| Peso inicial (g) | 58 ± 2 | 58 ± 2 | 53 ± 2 | 57 ± 2 |
| Peso Final (g) | 412 ± 19 | 177 ± 6 * | 433 ± 4 | 235 ± 13 ^{+&} |

Valores são média ± e.p.m. Número de animais utilizados no estudo entre parênteses. ANOVA 1-via: *p <0,05 vs. C; ⁺p<0,05 vs. R; [&]p<0,05 vs. CT.

4.2.2. Hemodinâmica

Os valores de PAS, PAD e PAM foram elevados no grupo R em comparação com C (**Tabela 7**). A suplementação com taurina atenuou a elevação da PAS nos animais submetidos à restrição proteica, todavia este parâmetro ainda permaneceu elevado quando comparado aos valores de CT (**Tabela 7**). A taurina não foi capaz de reduzir significativamente os valores de PAD e nem de PAM no grupo RT em comparação ao R

(**Tabela 7**). A frequência cardíaca não se mostrou alterada nem pela restrição proteica e nem pela suplementação com taurina (**Tabela 7**).

Tabela 7: Efeitos da restrição proteica pós-desmame e da suplementação com taurina sobre a pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e média (PAM) e sobre a frequência cardíaca (FC) dos ratos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos suplementados com taurina (CT e RT)

| | C | R | CT | RT |
|------------|----------|-------------|----------|----------------------------|
| PAS (mmHg) | 116 ± 3 | 142 ± 2*** | 118 ± 2 | 128 ± 3 ^{++&} |
| PAD (mmHg) | 65 ± 4 | 88 ± 5 *** | 64 ± 4 | 79 ± 4 ^{&} |
| PAM (mmHg) | 84 ± 3 | 110 ± 4 *** | 84 ± 3 | 98 ± 4 ^{&} |
| FC (BPM) | 363 ± 17 | 395 ± 16 | 353 ± 10 | 386 ± 9 |

Valores são média ± e.p.m. N=7-10 animais por grupo. ANOVA 2-vias: *** p <0,001 vs. C; ++ p <0,01 vs. R; &p <0,05 vs. CT.

4.2.3. Reatividade Vascular

Não foram observadas diferenças significativas na resposta contrátil das aortas tanto em resposta ao KCl quanto à fenilefrina entre os grupos C, R, CT e RT (**Tabela 8**). A curva de relaxamento em resposta à ACh se mostrou deslocada para a direita no grupo R em relação a C, com valores de pD₂ diminuídos, indicando redução da sensibilidade a este agonista neste grupo (**Figura 8A**). O tratamento com taurina não provocou modificações em relação à resposta relaxante à ACh no grupo alimentado com dieta normoproteica (**Figura 8A**). Entretanto, a suplementação com este aminoácido ao longo do protocolo dietético de restrição proteica evitou que o grupo RT apresentasse redução no relaxamento à ACh, mantendo valores de pD₂ semelhantes entre RT e CT (**Tabela 8**; **Figura 8A**). A resposta de relaxamento ao NPS que foi exacerbada no grupo R em comparação a C, apresentado maiores valores de pD₂, não foi influenciada pelo tratamento com taurina (**Figura 8B, Tabela 8**). Os valores de E_{max} de C, R, CT e RT são

semelhantes na resposta NPS (**Tabela 8**). Já na resposta à ACh, o Emax do grupo RT foi significativamente maior que o de R, porém não foi encontrada diferença neste parâmetro entre os grupos C e R nem entre CT e RT (**Tabela 8**).

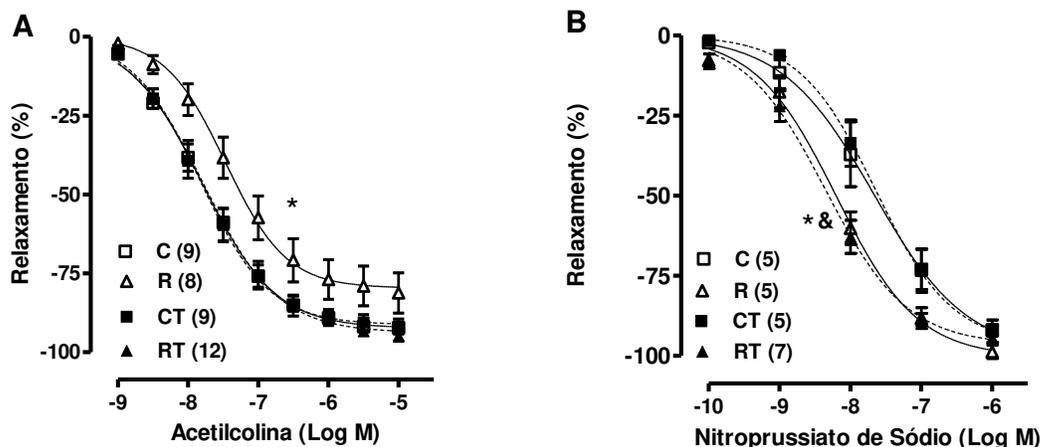


Figura 8: Curvas de concentração resposta à acetilcolina (A) e ao nitroprussiato de sódio (B) e em anéis de aorta de ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com taurina (CT e RT). As respostas de relaxamento são expressas como porcentagem da pré-contracção induzida por serotonina (A) ou fenilefrina (B). Valores são expressos como média \pm e.p.m. O número de ratos utilizados aparece entre parênteses. ANOVA 2-vias: * $p < 0,05$ vs.C; & $p < 0,05$ vs. CT.

Tabela 8: Valores de contração ao KCl e de Emax e pD₂ das curvas de relaxamento induzido por acetilcolina (ACh) e nitroprussiato de sódio (NPS) e das curvas de contração induzidas por fenilefrina (Fe) na aorta de ratos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com taurina (CT e RT)

| | C | R | CT | RT |
|------------------|------------------|------------------|-----------------|----------------------------------|
| KCl | | | | |
| Delta (g) | 2,06 ± 0,16 (14) | 1,86 ± 0,14 (13) | 1,96 ± 0,17 (5) | 1,55 ± 0,06 (7) |
| Fe (%KCl) | | | | |
| pD ₂ | 6,76 ± 0,09 (5) | 6,75 ± 0,07 (5) | 6,83 ± 0,06 (5) | 6,54 ± 0,21 (6) |
| Emax (%) | 80,1 ± 6,6 (5) | 79,8 ± 10,5 (5) | 99,8 ± 12,2 (4) | 75,2 ± 4,5 (5) |
| ACh | | | | |
| pD ₂ | 7,80 ± 0,08 (9) | 7,41 ± 0,12 (8)* | 7,83 ± 0,10 (9) | 7,78 ± 0,10 (12) ⁺ |
| Emax (%) | -93,1 ± 2,2 (9) | -81,2 ± 6,4 (8) | -92,1 ± 2,5 (9) | -94,9 ± 1,8 (12) ⁺ |
| NPS | | | | |
| pD ₂ | 7,77 ± 0,23 (5) | 8,21 ± 0,09 (5)* | 7,65 ± 0,16 (5) | 8,36 ± 0,13 (7) ^{&} |
| Emax (%) | -92,0 ± 1,7 (5) | -98,8 ± 2,2 (5) | -92,3 ± 3,5 (5) | -94,4 ± 1,5 (7) |

Valores são média ± e.p.m. O número de animais utilizados aparece entre parênteses. ANOVA 1-via: *p <0,05 vs. C; ⁺p <0,05 vs. R; [&]p <0,05 vs. CT.

As incubações dos anéis de aorta dos ratos R com SOD ou apocinina normalizaram o relaxamento induzido pela ACh deste grupo, revertendo a redução da sensibilidade da aorta (pD₂) à ACh causada pela restrição proteica (**Figura 9B; Tabela 9**). Nos anéis de aorta dos grupos C, CT e RT, nem a incubação com SOD nem com apocinina causaram efeito significativo sobre a resposta de relaxamento da ACh (**Figuras 9A, 9C e 9D; Tabela 9**).

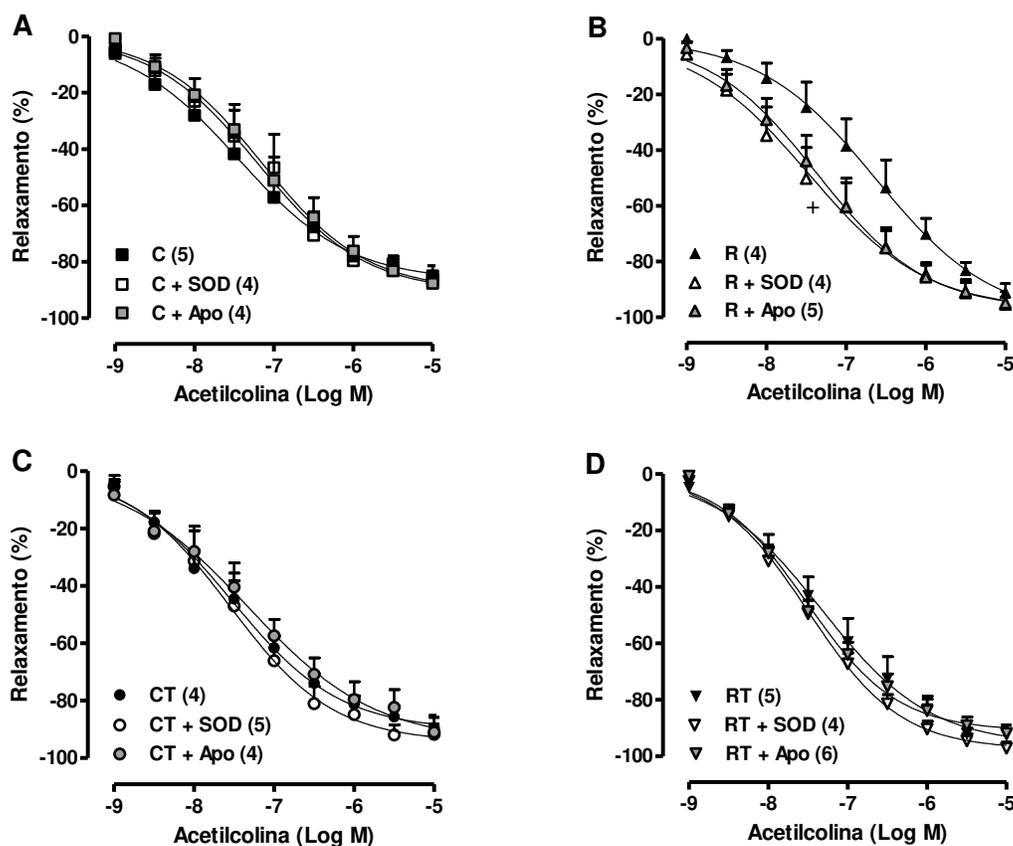


Figura 9: Curvas de concentração-resposta à acetilcolina em anéis de aorta de ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com taurina (CT e RT) pré-incubados ou não com superóxido dismutase (SOD 150 U/ml) ou apocinina (Apo 30 μ M). As respostas de relaxamento são expressas como porcentagem da pré-contracção induzida por serotonina. Valores são expressos como média \pm e.p.m. O número de ratos utilizados aparece entre parênteses. ANOVA 2-vias: $^+p < 0,05$ vs. R.

Tabela 9: Efeitos da incubação com superóxido dismutase (SOD) e apocinina (Apo) sobre os valores de Emax e pD₂ das curvas de relaxamento induzido pela acetilcolina (ACh) na aorta de ratos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com taurina (CT e RT)

| | C | R | CT | RT |
|-----------------|-----------------|------------------------------|-----------------|------------------------------|
| Ach | | | | |
| pD ₂ | 7,76 ± 0,12 (4) | 6,84 ± 0,28 (4)* | 7,70 ± 0,18 (4) | 7,61 ± 0,09 (4) ⁺ |
| Emax (%) | -85,3 ± 1,7 (5) | -91,0 ± 3,1 (4) | -89,4 ± 3,5 (4) | -92,5 ± 3,7 (5) |
| ACh+SOD | | | | |
| pD ₂ | 7,40 ± 0,30 (4) | 7,80 ± 0,23 (4) [#] | 7,73 ± 0,25 (5) | 7,58 ± 0,11 (4) |
| Emax (%) | -86,8 ± 4,7 (4) | -95,4 ± 2,6 (5) | -93,1 ± 3,3 (5) | -97,1 ± 2,1 (4) |
| ACh+Apo | | | | |
| pD ₂ | 7,29 ± 0,22 (4) | 7,67 ± 0,20 (4) [#] | 7,61 ± 0,24 (4) | 7,60 ± 0,07 (6) |
| Emax (%) | -87,6 ± 3,6 (4) | -94,9 ± 4,0 (5) | -91,0 ± 5,8 (4) | -91,9 ± 2,2 (6) |

Valores são média ± e.p.m. O número de animais utilizados aparece entre parênteses. ANOVA 1-via: *p<0,05 vs. C; ⁺p<0,05 vs. R; [#]p<0,05 vs. respectivo grupo sem incubação.

4.2.4. NO_x⁻ plasmático

A restrição proteica pós-desmame ou a suplementação com taurina, isoladamente, não foram fatores capazes de alterar os níveis de NO_x⁻ plasmático (**Figura 10**). Contudo, os animais RT, que foram submetidos à desnutrição concomitante com a suplementação com taurina, apresentaram um acentuado aumento dos níveis plasmáticos de NO_x⁻ em comparação aos demais grupos, indicando a interação entre os dois fatores, restrição proteica pós-desmame e suplementação com taurina (**Figura 10**).

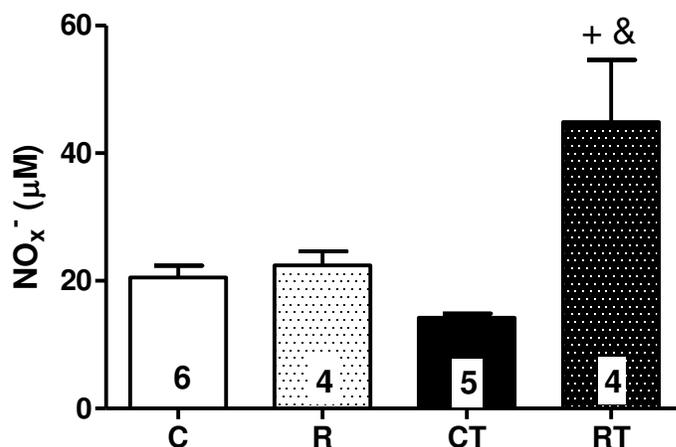


Figura 10: Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NO_x^-) dos ratos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com taurina (CT e RT). Valores são expressos como média \pm e.p.m. O número de animais utilizados aparece dentro das barras. ANOVA 2-vias: *p < 0,05 vs. R; &p < 0,05 vs. CT.

4.2.5. Produção de ROS em aorta

A fluorescência da sonda DHE foi significativamente mais intensa na aorta dos animais R em relação a C, sendo que a suplementação com taurina 2,5% na água de beber dos animais RT foi capaz de restaurar estes valores (**Figura 11**), indicando que a restrição proteica pós-desmame induz estresse oxidativo vascular que é prevenido pela suplementação com taurina.

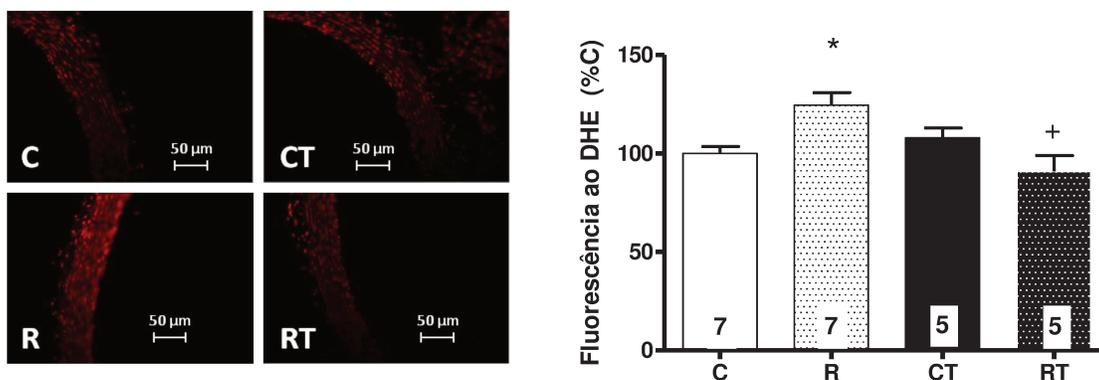


Figura 11: Análise representativa (esquerda) e quantitativa (direita) da fluorescência ao di-hidroetídeo (DHE) em cortes transversais de aorta torácica de ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e os mesmos grupos dietéticos tratados com taurina (CT e RT). A produção de ROS foi avaliada através da transformação de DHE em brometo de etídio (vermelho fluorescente). Os dados são expressos como porcentagem relativa ao grupo C. Valores são média \pm e.p.m. O número de animais utilizados está dentro das barras. ANOVA 2-vias: * $p < 0,05$ vs. C; + $p < 0,05$ vs. R.

4.2.6. Western Blotting

A expressão proteica total de eNOS não foi diferente entre os grupos C, R, CT e RT (**Figura 12A**). Já o conteúdo proteico de EC-SOD apresentou-se reduzido em R, sendo normalizado pela suplementação deste grupo com taurina (**Figura 12B**). Mn-SOD tem a expressão aumentada em aorta de R em comparação a C e a taurina não modificou este padrão de resposta (**Figura 12C**). Já a expressão proteica da subunidade p47-phox da NADPH oxidase revelou-se aumentada em decorrência da restrição proteica pós-desmame e a suplementação com taurina foi efetiva em normalizar este parâmetro (**Figura 12E**). Os conteúdos proteicos de CuZn-SOD, da subunidade GP91-phox da NADPH oxidase, da GPX e da catalase foram semelhantes entre os quatro grupos analisados (**Figuras 12D, 12F, 12G e 12H**).

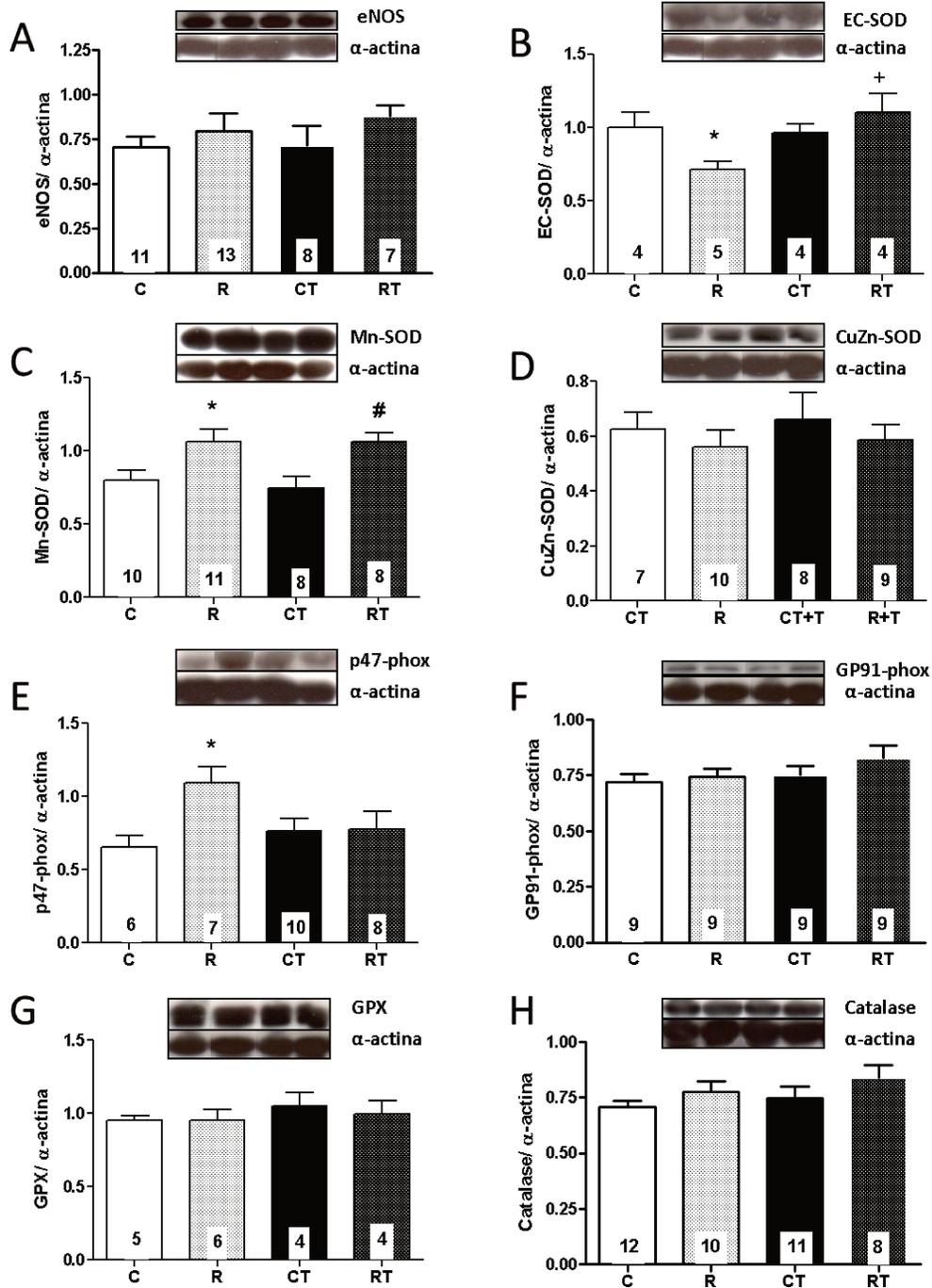


Figura 12: Imagens representativas (painel superior) e análises densitométricas (gráficos de barras) das expressões proteicas de eNOS (A), EC-SOD (B), Mn-SOD (C), CuZn-SOD (D), p47-phox (E), GP91-phox (F), GPX (G) e Catalase (H) na aorta torácica de ratos dos grupos controle (C), restrito proteico pós-desmame (R) e dos mesmos grupos dietéticos suplementados com taurina (CT e RT). A expressão das proteínas avaliadas foi normalizada pelo conteúdo de α -actina em cada amostra (razão proteína total/ α -actina). Valores são media \pm e.p.m. O número de animais utilizados está dentro das barras. ANOVA 2-vias: * $p < 0,05$ vs. C; + $p < 0,05$ vs. R; # $p < 0,05$ vs. CT.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeitos da restrição proteica pós-desmame

No presente estudo, assim como em trabalhos prévios da literatura, os animais submetidos à dieta hipoproteica logo após o desmame por 90 dias contínuos apresentaram menor ganho de peso corporal (FILIPUTTI et al., 2008; 2010; DA SILVA et al., 2010; 2012), culminando com uma redução de aproximadamente 50% da massa corpórea ao final do tratamento, que é o início da fase adulta do animal. Estes autores também demonstraram que há uma redução significativa do peso dos órgãos e do conteúdo plasmático de proteínas totais e albumina, associado a uma maior quantidade de ácidos graxos livres, embora a glicemia de jejum, os níveis de triglicérides e de colesterol sejam normais. Assim, este modelo experimental foi validado como um modelo de desnutrição proteica pós-desmame.

É bem descrito que a desnutrição proteica durante a gestação causa redução significativa do peso do feto ao nascer e predispõe ao desenvolvimento de doenças endócrinas e cardiovasculares como hipertensão arterial e diabetes (HEYWOOD et al., 2004; FRANCO et al., 2009; TORRENS et al., 2009). Similarmente, a alimentação com uma dieta com escassez de proteínas na fase inicial da vida também leva a uma redução significativa do ganho de massa corporal e aumenta a propensão a distúrbios metabólicos destacando-se, neste caso uma redução da secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas em resposta a estímulos como alta glicose em ratos e camundongos (FILIPUTTI et al., 2008; 2010; AMARAL et al., 2010; BATISTA et al., 2010; DA SILVA et al., 2010; 2012).

Especificamente no sistema cardiovascular tem sido demonstrado que a alimentação de ratos com uma dieta com baixo teor proteico (6%) logo após o desmame

por 35 dias seguidos pode cursar com aumento da pressão arterial sistólica e diastólica e da frequência cardíaca (OLIVEIRA et al., 2004; LOSS et al., 2007; MARTINS et al., 2011); aumento da variabilidade da pressão arterial (OLIVEIRA et al., 2004); disfunção do barorreflexo (TROPIA et al., 2001; LOSS et al., 2007); hipertrofia cardíaca e disfunção ventricular diastólica (MURÇA et al., 2012). De acordo com estes dados, no presente estudo também observamos um discreto, mas significativo, aumento da pressão arterial sistólica, diastólica e média, sem alteração da frequência cardíaca. Este aumento de pressão arterial pode estar associado a um aumento da atividade simpática nestes animais, tanto para o coração como para a vasculatura, neste caso alterando o controle do tônus vasomotor (TROPIA et al., 2001; MARTINS et al., 2011).

Avaliamos a resposta contrátil vascular induzida por alta concentração de KCl, que induz vasoconstrição independente de receptor por causar despolarização das células musculares lisas, e à fenilefrina, um agonista do receptor α_1 -adrenérgico. Ambas as respostas contráteis não foram alteradas pela desnutrição proteica pós-desmame. De acordo, de Belchior e colaboradores demonstram que ratos tratados com dieta com baixo teor proteico (9%) por 90 dias não apresentam alteração da resposta contrátil em aorta (DE BELCHIOR et al., 2012). Mas estes autores demonstraram que há aumento da resposta contrátil à fenilefrina em leito vascular caudal de animais submetidos à desnutrição proteica pós-desmame, indicando que o aumento do tônus vasomotor em artérias de resistência poderia ser um dos mecanismos envolvidos no aumento da pressão arterial por um aumento da resistência vascular periférica na situação de restrição proteica.

Em diferentes doenças cardiovasculares, a alteração do controle do tônus vasomotor pode acontecer, entre outras causas, devido ao desenvolvimento de disfunção endotelial, que caracteriza-se pela alteração na síntese, liberação e/ou ação de fatores vasoativos pelas células endoteliais, que pode levar a prejuízo do controle do tônus

vascular, como redução da ação vasodilatadora de substâncias que agem de maneira dependente do endotélio. A ocorrência de disfunção endotelial em ratos nascidos de mães submetidas à restrição calórica durante a gravidez apresenta-se detalhadamente descrita na literatura: foi demonstrado que a prole (machos e fêmeas) de ratas Wistar submetidas à restrição nutricional calórica (50% da dieta *ad libitum*) no período da gravidez apresenta hipertensão arterial e disfunção endotelial caracterizada por diminuição da vasodilatação dependente do endotélio em resposta à acetilcolina e à bradicinina em aorta e leito vascular mesentérico (FRANCO et al., 2002; 2003; 2009). Brawley e colaboradores demonstraram pela primeira vez que a restrição dietética específica de proteínas (9%) durante a gravidez causa significativo prejuízo na resposta de relaxamento endotélio-dependente em artérias de resistência da prole gerada, mesmo sendo a dieta isocalórica em comparação às mães controles alimentadas com dieta normoproteica (BRAWLEY et al., 2003). No presente estudo investigamos se a alimentação com uma dieta com restrição proteica na fase pós-natal poderia causar alteração da função endotelial.

Demonstrou-se aqui que a administração de dieta hipoproteica (6%) após o desmame até a fase adulta causa prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio induzida pela acetilcolina em aorta de ratos. Recentemente, Lebreton e colaboradores publicaram que a desnutrição proteica em ratos adultos por 14 dias causa disfunção endotelial em artéria mesentérica de resistência, sendo que a ingestão calórica dos animais restritos foi similar aos controles normoproteicos (LEBRETON et al., 2013). O presente estudo observou um efeito similar, entretanto relata pela primeira vez a ocorrência de disfunção endotelial provocada pela restrição unicamente proteica em um vaso de condutância, no caso a aorta, e numa fase crucial do desenvolvimento, que corresponde logo após o nascimento do indivíduo até a entrada na fase adulta. Além disso, o presente trabalho é o primeiro a propor mecanismos de sinalização celular

envolvidos nesta alteração, uma vez que até o momento, não são descritos na literatura os mecanismos que estariam associados à disfunção endotelial causada pela restrição proteica após o nascimento.

Franco e colaboradores demonstraram que a restrição alimentar materna causa disfunção endotelial na prole associada à redução da atividade e da transcrição gênica de eNOS (FRANCO et al., 2002). Em corroboração, dados do mesmo grupo de pesquisa demonstraram que há redução significativa da produção de NO, inferida pela medida da fluorescência da sonda diaminofluoresceína-2A (DAF-2A) na aorta desta prole (FRANCO et al., 2009). Porém, artérias isoladas de animais filhos de mães submetidas à restrição proteica isocalórica podem apresentar ou não redução dos níveis de RNAm para eNOS (LAMIREAU et al., 2002; TORRENS et al., 2006; 2009). No presente estudo não observamos modificação da expressão total desta enzima, mas sim uma significativa redução da expressão de sua forma ativada por fosforilação no resíduo Ser1177, o que poderia explicar, ao menos em parte, a redução da resposta de relaxamento à acetilcolina na aorta dos animais restritos. Contrariamente, de Belchior e colaboradores demonstraram que há um aumento do conteúdo total de eNOS na aorta de ratos submetidos a desnutrição proteica pós-desmame. Entretanto, no referido trabalho, a dieta administrada apresentou, além de baixo teor proteico, alta quantidade de carboidratos e baixa quantidade de vitaminas, além de ser hipercalórica, o que dificulta a interpretação dos efeitos da restrição proteica *per se* na vasculatura (DE BELCHIOR et al., 2012).

Em vasos sanguíneos de animais com disfunção endotelial associada a distúrbios metabólicos, como a diabetes tipo II, pode ser observada a diminuição da fosforilação de eNOS em Ser1177 (TAGUCHI et al., 2012). Nestes casos, a redução da ^{Ser1177}p-eNOS está associada a um prejuízo da atividade da via PI3K, que culmina com prejuízo da fosforilação da Akt em seus sítios de ativação (KOBAYASHI et al., 2004). No presente trabalho demonstrou-se pela primeira vez que a restrição proteica pós-desmame pode

provocar prejuízo da fosforilação da Akt no sítio de ativação Ser473, e assim este mecanismo pode estar diretamente relacionado à redução da ativação da eNOS, uma vez que a Akt ativa pode fosforilar a eNOS no resíduo Ser1177 (DIMMELER et al., 1999; FULTON et al., 1999; LUO et al., 2000). De acordo com esta hipótese, no presente estudo demonstrou-se que a inibição da via PI3K/Akt pela incubação das aortas com LY294002 causou redução significativa do relaxamento à ACh no grupo controle, mas apresentou efeito minimizado nas aortas dos animais submetidos à restrição proteica. Estes dados indicam que o prejuízo na ativação da via PI3K/Akt em células vasculares está relacionado ao prejuízo endotelial deste grupo experimental, uma vez que na presença do LY294002 não há diferença na resposta de relaxamento à ACh entre anéis oriundos de ratos que cresceram recebendo dieta normoproteica e o de ratos alimentados com dieta hipoproteica após o desmame.

Apesar da redução da expressão de ^{Ser1177}p-eNOS e do menor relaxamento à ACh observados na aorta dos animais submetidos à restrição proteica, não observamos modificação dos níveis plasmáticos nem teciduais de nitrito/nitrato (NO_x^-) nestes animais com relação ao grupo controle. Sabe-se que a avaliação dos níveis de NO_x^- é um método indireto utilizado para avaliar a produção de NO, uma vez que, através deste método quantifica-se nitrito e nitrato, metabólitos do NO. Assim, o uso de metodologias que avaliem diretamente os níveis de NO ao invés de seus metabólitos, como a sonda DAF-2A ou o uso de um sensor que detecta NO amperométricamente (CERON et al., 2001) poderiam gerar resultados de produção/biodisponibilidade de NO mais precisos.

Além disso, as aortas utilizadas para as medidas de NO_x^- não foram previamente estimuladas com ACh, fator este que indicou a disfunção endotelial na aorta do grupo de animais restritos, o que pode indicar que não há prejuízo do NO basal, mas sim dependente da estimulação por um fator ativador da eNOS. De acordo com esta hipótese, ao avaliar a produção de NO utilizando-se a sonda DAF-2A na aorta de animais controle,

restritos e restritos suplementados com micronutrientes, Franco e colaboradores não observaram diferenças nos valores obtidos no estado basal, mas apenas quando os vasos foram incubados com ACh (100 μ M) e observou-se que a produção tecidual de NO dos animais restritos era reduzida e foi recuperada pela suplementação dietética em questão (FRANCO et al., 2009).

A biodisponibilidade e ação relaxante do NO podem estar prejudicadas não apenas pela alteração de sua síntese, mas também devido ao aumento da degradação desta molécula por um possível estado de desbalanço redox. Franco e colaboradores demonstraram aumento da atividade da enzima NADPH oxidase que culmina com estresse oxidativo e redução de NO na aorta de ratos filhos de mães submetidas a restrição nutricional (FRANCO et al., 2003). De acordo com estes dados, foi demonstrado que a perfusão do leito vascular mesentérico com apocinina, um inibidor da atividade da NADPH oxidase, restaura o relaxamento vascular prejudicado a acetilcolina e a bradicinina neste leito vascular.

No presente estudo observou-se aumento da produção de ROS na aorta torácica dos animais restritos pós-desmame, indicado pelo aumento da fluorescência da sonda DHE e, na presença de apocinina ou de SOD, a resposta à ACh foi normalizada no grupo restrito. Além disso, observou-se na aorta dos animais submetidos à restrição proteica uma redução da expressão de EC-SOD concomitante com aumento da expressão da subunidade p47-phox, ativadora da atividade catalítica da NADPH oxidase. Assim, em conjunto, estes dados sugerem que a alimentação pós-natal com uma dieta de restrição proteica, mesmo isocalórica, induz estresse oxidativo na aorta de maneira dependente da ativação da NADPH oxidase, e este mecanismo corrobora para o quadro de disfunção endotelial neste modelo experimental.

Apesar da redução da expressão de EC-SOD, houve um aumento do conteúdo de Mn-SOD na aorta dos animais submetidos a restrição proteica. Na literatura, a Mn-SOD é

descrita como a isoforma que pode ser induzida na proteção contra diversos agente oxidantes, ação esta fundamental para a manutenção do equilíbrio oxidativo (MACMILLAN-CROW e CRUTHIRDS, 2001). Entretanto, mesmo com o aumento da expressão desta enzima antioxidante, houve um aumento de ROS vascular no grupo restrito. Ao medir o conteúdo das três diferentes isoformas de SOD na parede de artérias coronárias e aorta torácica, Starlin e colaboradores relataram que a EC-SOD é a isoforma vascular mais abundante neste tecido (STARLIN et al., 1995). Em humanos acometidos pela falência cardíaca crônica, o relaxamento da artéria radial em resposta à injeção de vitamina C é diminuído, efeito este relacionado à diminuição da atividade da EC-SOD neste vaso (LANDMESSER et al., 2002). Assim, a queda do conteúdo proteico de EC-SOD na aorta dos ratos submetidos à restrição proteica pós-desmame pode estar anulando funcionalmente a ação antioxidante provocada pelo aumento da expressão de Mn-SOD, dada a maior abundância relativa de EC-SOD.

Outro fator indicativo de injúria vascular observado na aorta dos animais submetidos à restrição proteica pós-desmame foi o aumento da ativação via fosforilação em Ser 727 de STAT3. Tal fosforilação pode ocorrer através da ação de diversas quinases, como PI3K, ERK1/2, mTOR, Src e JAK2, dependendo do tecido analisado e do estímulo a ele aplicado (KAKISIS et al., 2005, DUAN et al., 2013). Os efeitos da ativação desta quinase podem ser diversos e dependem do estímulo e do tecido/órgão em questão, mas em geral, a ativação desta via apresenta efeitos de progressão do ciclo celular, diferenciação celular e anti-apoptose (KIM et al., 2007). De acordo com esta hipótese, foi demonstrado que após isquemia seguida de reperfusão (I/R) o coração de camundongos knockout para STAT3 endotelial (STAT3-KO) tem prejuízo na recuperação dos níveis normais de função cardíaca e diminuição da integridade da membrana celular de cardiomiócitos em comparação com o observado no coração de animais controle (WANG et al., 2007). Ainda, a ativação de STAT3 é um dos fatores que medeiam a

proliferação de células musculares lisas de aorta em cultura quando expostas a ciclos de estiramento (KAKISIS et al., 2005). Entretanto, apesar de contribuir para sobrevivência celular, a ativação da STAT3 pode levar a alterações estruturais e/ou funcionais no órgão-alvo sob injúria. Foi demonstrado que células endoteliais de veia umbilical humana (HUVECs) expostas ao fator de necrose tumoral α (TNF- α) apresentam estresse oxidativo e morte celular, associado à ativação de JNK, p38 e STAT3 (KIM et al., 2007). Já está estabelecido na literatura que a ativação das MAPKs JNK e p38 podem mediar os efeitos de injúria tecidual observados em resposta ao TNF- α . Entretanto, os efeitos da ativação de STAT3 ainda não são tão claros e podem apresentar ação anti-ou pró-apoptótica dependendo do tecido e do estímulo (KIM et al., 2007).

O efeito pró-apoptótico da STAT3 em células endoteliais foi demonstrado em HUVECs expostas ao estresse oxidativo através de sua incubação com peróxido de hidrogênio. Nestas células tanto o bloqueio farmacológico da ativação de STAT3, quanto o silenciamento da tradução desta proteína pela técnica de RNA de interferência melhoraram o índice de viabilidade celular e diminuíram o índice apoptótico (DUAN et al., 2013). Assim, no modelo de restrição proteica pós-desmame avaliado no presente estudo, a ativação de STAT3 pode ser fruto do estresse oxidativo observado na aorta destes animais. A ativação de STAT3 observada aponta a ocorrência de injúria tecidual na aorta dos ratos submetidos à restrição proteica, uma vez esta proteína é ativada perante estímulos potencialmente danosos para a célula. Entretanto o resultado da ativação desta proteína na aorta dos ratos desnutridos ainda é indefinido, uma vez que são descritos na literatura tanto efeitos maléficos, como a injúria tecidual, quanto benéficos, como a sobrevivência celular, relacionados ao aumento da ativação da STAT 3 (KAKISIS et al., 2005; KIM et al., 2007; WANG et al., 2007; DUAN et al., 2013).

Os anéis de aorta de ratos submetidos à restrição de proteica apresentaram ainda uma resposta de relaxamento exacerbado ao doador de NO nitroprussiato de sódio. Este

efeito foi associado a uma redução significativa de PDE-5 na aorta dos ratos desnutridos, o que pode explicar o aumento da vasodilatação ao nitroprussiato de sódio por aumentar a meia-vida do GMPc. Este pode ser um mecanismo compensatório em resposta à redução da biodisponibilidade do NO induzido pela restrição proteica.

Assim, em resumo, a restrição proteica pós-desmame causou disfunção endotelial indicada por prejuízo significativo de relaxamento à ACh em aorta de ratos, que foi associado à redução da ativação da via Akt/eNOS e ao estresse oxidativo local dependente da NADPH oxidase e redução da expressão da enzima antioxidante EC-SOD. A ativação de mecanismos potencialmente compensatórios como o aumento da expressão proteica Mn-SOD, PDE-5 e STAT3 podem ter amenizado os efeitos da restrição proteica, mas não foram capazes de impedir o desenvolvimento da disfunção endotelial e do estresse oxidativo.

5.2. Efeitos da suplementação com leucina

A suplementação com leucina não recuperou o déficit de crescimento observado nos animais submetidos a restrição alimentar de proteínas durante o período de crescimento pós-desmame. Estes dados estão de acordo com trabalhos prévios da literatura utilizando o mesmo modelo experimental e dose de leucina (DA SILVA et al., 2012). Na literatura, este aminoácido é apontado como o principal responsável pelo aumento da síntese proteica estimulado pelos aminoácidos de cadeia ramificada. Todavia, a oferta de altas concentrações de leucina desacompanhada do incremento nas ofertas de valina e isoleucina pode resultar em não incremento do peso corporal, como demonstrado anteriormente (DA SILVA et al., 2012) ou até mesmo em um efeito inverso: ratos que receberam dieta de restrição proteica pós-desmame e que foram suplementados com altas concentrações de leucina apresentaram redução do

crescimento acompanhado de redução das concentrações circulantes de isoleucina e valina (SAUBERLICH, 1961). Este efeito aparentemente se deve a um aumento da oxidação dos aminoácidos de cadeia ramificada estimulado pelas altas concentrações de leucina, em um fenômeno conhecido como “paradoxo da leucina” e que se reflete em diminuição das concentrações plasmáticas dos aminoácidos em questão (SHIMOMURA e HARRIS, 2006). Além disso, os ratos submetidos à restrição proteica seguida de posterior suplementação com leucina permanecem com acesso muito limitado a um fator crucial para a síntese de proteínas: uma oferta suficiente de aminoácidos circulantes, os blocos de construção das proteínas (REEDS et al., 1993).

Apesar de não melhorar o ganho de massa corporal, observou-se aqui que a suplementação com leucina por 30 dias reverte o aumento de pressão arterial e a disfunção endotelial nos animais com restrição proteica pós-desmame. A sensibilidade à acetilcolina nos animais RL foi normalizada ao nível dos animais que receberam dieta normoproteica. Este efeito foi relacionado a um aumento da expressão da expressão de ^{Ser1177}p-eNOS e de ^{Ser473}p-Akt na aorta dos animais RL. Adicionalmente, observamos que a suplementação com leucina normalizou a ativação de STAT3 aumentada no grupo restrito proteico, indicando uma melhora da injúria vascular induzida pela restrição proteica pós-desmame. De acordo com os presentes resultados, Amaral e colaboradores demonstraram que a suplementação com leucina aumenta a secreção de insulina prejudicada pela restrição proteica pós-desmame, efeito este relacionado ao aumento da expressão de ambos ^{Ser473}p-Akt e Akt total em ilhotas pancreáticas de camundongos (AMARAL et al., 2010). Sabe-se que a principal via de ativação da Akt é dependente da atividade da enzima PI3K. E no presente trabalho, apesar de não haver alterações significativas na expressão proteica basal desta proteína em animais desnutridos, a administração de leucina aumentou significativamente a expressão da subunidade p85 da PI3K na aorta de ambos: animais submetidos às dietas normoproteica ou hipoproteica. A

importância da ativação da via PI3K/Akt no efeito da leucina em animais restritos foi reforçado pela restauração do efeito do LY 294002 na aorta deste grupo, demonstrando um aumento significativo da participação da via PI3K/ Akt no relaxamento endotélio dependente induzido pela ACh.

Em ilhotas pancreáticas de animais submetidos à desnutrição proteica tratados com leucina, a ativação da via da PI3K/Akt/mTOR/S6K é um dos mecanismos associados ao reestabelecimento da secreção de insulina (FILIPUTTI et al., 2010). Nestas células, a leucina ativa a via da mTOR diretamente através dos metabólitos gerados por seu metabolismo mitocondrial, e assim esta via pode iniciar os efeitos celulares da leucina aumentando a síntese de diferentes proteínas (XU et al., 2000).

Ao contrário do observado em ilhotas pancreáticas, no presente trabalho foi observada elevada ativação de S6K indicada por sua maior fosforilação no resíduo Thr412 na aorta dos desnutridos e este efeito foi revertido pela leucina. Já foi descrito que ratos submetidos à desnutrição intra-uterina apresentam elevados níveis séricos de angiotensina II (FRANCO et al., 2003). E, por sua vez, a angiotensina II pode ativar a via mTOR/S6K em células endoteliais, o que culmina em redução da ^{Ser473}p-Akt e da ^{Ser1177}p-eNOS, levando a menor produção de NO em resposta à insulina (KIM et al., 2011). Assim, a maior expressão de p-S6K poderia explicar a redução de p-Akt e de p-eNOS observada na aorta de animais desnutridos. Apesar de a leucina aumentar em outros tecidos a ativação da via mTOR/S6K (SURIWAN et al., 2008; FILIPUTTI et al., 2010), observamos neste estudo que a suplementação com leucina reduziu na aorta a expressão elevada de p-S6K dos animais restritos, ao nível do grupo controle. Assim, além do aumento da expressão de PI3K, a leucina poderia aumentar a expressão de p-Akt por reduzir os níveis de p-S6K na aorta, e assim, conseqüentemente, esta via de sinalização ativada pode levar ao aumento da fosforilação da eNOS em Ser 1177.

Apesar do aumento de ^{Ser1177}p-eNOS induzido por suplementação com leucina no grupo restrito, não observamos alteração dos níveis de nitrito/nitrato medidos tanto no plasma como na aorta destes animais. Como descrito anteriormente, o método de medida de nitrito e nitrato indiretamente indicam a produção do NO e assim, um possível efeito da leucina aumentando a biodisponibilidade de NO fosse visível na presença de ACh ou pelo uso de técnicas que possam medir diretamente o NO no vaso.

É fundamental ressaltar que estudos avaliando os efeitos da leucina em doenças do sistema cardiovascular são escassos. Recentemente foi demonstrado que a administração de dieta com conteúdo de leucina aumentado (com 5%, sendo que uma dieta normal contém aproximadamente 1,5%) aumenta a sobrevivência de camundongos quando administrada após indução do infarto do miocárdio durante 28 dias, tanto por aumentar a hipertrofia compensatória quanto por diminuir as taxas de fibrose e apoptose cardíacas (WITHAM et al., 2012). Desta forma, o presente trabalho foi pioneiro em demonstrar que a suplementação com a leucina, além de propiciar melhora dos distúrbios endócrinos provocados pela desnutrição proteica (AMARAL et al., 2010; FILIPUTTI et al., 2010; DA SILVA et al., 2012) é também capaz de normalizar a pressão arterial e reverter a disfunção endotelial de ratos submetidos a tal tipo de desnutrição, exclusivamente proteica e durante o crescimento pós-desmame. Indicou-se ainda mecanismos moleculares envolvidos nesses efeitos benéficos sobre a função endotelial: a leucina aumenta os estímulos para a ativação de eNOS quando administrada aos ratos desnutridos proteicos pós-desmame.

5.3. Efeitos da suplementação com taurina

No presente trabalho, a suplementação com taurina foi capaz de atenuar o prejuízo no ganho de massa dos ratos restritos proteicos pós-desmame e isto está de

acordo com a literatura, que aponta o envolvimento do estresse oxidativo na redução da massa corporal observada nos animais desnutridos. A suplementação com micronutrientes antioxidantes em ratas Wistar submetidas à restrição calórica durante a gravidez atenuou a perda exagerada de peso observada nas fêmeas não suplementadas e recuperou parcialmente o peso de nascimento de sua prole (FRANCO et al., 2009). O estresse oxidativo é apontado também como a principal causa de sarcopenia relacionada ao envelhecimento, e a suplementação de camundongos C57Bl-6 de meia idade com um antioxidante baseado na cisteína foi capaz de atenuar a perda de massa muscular observada nos animais após o avanço da idade não suplementados (SINHA-HIKIM et al., 2013). Assim, em nosso modelo experimental, a ação antioxidante da taurina (HUXTABLE, 1992) pode explicar a atenuação da perda de massa corporal induzida pela restrição proteica.

As propriedades antioxidantes da taurina, assim como sua própria ação vasodilatadora direta, a colocam como um potencial alvo terapêutico para doenças cardiovasculares. No presente estudo observou-se que a administração oral de taurina por 90 dias reduziu significativamente os valores de pressão arterial sistólica nos ratos desnutridos pós-desmame e preveniu a disfunção endotelial na aorta. De acordo com os presentes dados, foi demonstrado que ratos filhos de mães submetidas à restrição proteica e suplementadas com taurina durante a gravidez apresentaram uma significativa atenuação do aumento de pressão arterial sistólica induzida pela restrição proteica intra-uterina (SCABORA et al., 2013).

A administração de taurina tem sido descrita como um método eficaz em restabelecer ou recuperar danos da função endotelial. Em humanos, a administração oral de 1,5 g diárias de taurina durante cinco dias restaura o relaxamento da artéria braquial de jovens fumantes (FENNESSY et al., 2003). Similar efeito tem sido demonstrado em ratos Wistar com diabetes tipo I induzida por estreptozotocina (WANG et al., 2008; IKUBO

et al., 2011). Neste sentido, trabalhos mostraram que a taurina poderia proteger contra a disfunção endotelial induzida por LDL oxidada e por altas concentrações de glicose em HUVECs (TAN et al., 2007; ULRICH-MERZENICH et al., 2007). Além disso, já foi demonstrado que a administração aguda de taurina relaxa artérias isoladas tanto de animais normotensos (FRANCONI et al., 1982; RISTORI e VERDETTI, 1991) como hipertensos (LI et al., 1996). Doses crescentes de taurina estimulam relaxamento da ordem de 20% dos valores de pré-contracção em aorta torácica, efeito independente da produção de NO e praticamente abolido com o bloqueio inespecífico de canais de potássio (NIU, 2008). Corroborando estes dados, Abebe e Mozaffari demonstraram que anéis de aorta torácica isolados de ratos que receberam β -alanina cronicamente, para depletar a taurina interna, apresentam aumento nas respostas contráteis à noradrenalina e ao KCl, além de redução das respostas de relaxamento ao nitroprussiato de sódio e à ACh (ABEBE e MOZAFFARI, 2003).

Nos animais restritos tratados com taurina houve elevação dos níveis de expressão aórtica de EC-SOD, recuperados ao nível do observado em animais controles, concomitantemente à permanência do aumento dos níveis de Mn-SOD induzido pela desnutrição proteica, indicando uma regulação positiva das defesas antioxidantes vasculares. A produção de ROS foi reduzida pela taurina, associada a uma redução da expressão de p47-phox, que é elevada na aorta dos animais restritos. Em somatória a incubação com SOD ou apocinina, não alterou o relaxamento induzido pela ACh da aorta dos ratos desnutridos pós-desmame suplementados com taurina, ao contrário do observado no grupo restrito e similar ao grupo controle. Assim, ambos os mecanismos: a melhora da defesa antioxidante e a redução da expressão da p47-phox com consequente normalização da atividade da NADPH oxidase possivelmente levaram à recuperação do balanço redox neste vaso e ao aumento da biodisponibilidade de NO revelada pelo aumento do relaxamento aórtico à ACh e dos níveis de nitrito/nitrato plasmáticos.

6. CONCLUSÕES

A restrição proteica pós-desmame provocou aumento da pressão arterial e disfunção endotelial caracterizada por redução do relaxamento endotélio-dependente induzido por acetilcolina em aorta de ratos. Esta disfunção endotelial foi associada à redução da ativação da via $\text{Ser}^{473}\text{p-Akt/ Ser}^{1177}\text{p-eNOS}$ e aumento da $\text{Thr}^{412}\text{p-S6K}$ e $\text{Ser}^{727}\text{p-STAT3}$ (**Figura 13**), além da geração de estresse oxidativo local consequente do aumento da geração de ânion superóxido pela NADPH oxidase e da redução da atividade antioxidante da EC-SOD (**Figura 13**).

A leucina reverteu a elevação da pressão arterial e a suplementação dietética com leucina ou taurina corrigiu a disfunção endotelial causada pela restrição proteica pós-desmame. A leucina atua via recuperação da via $\text{PI3K/ Ser}^{473}\text{p-Akt/ Ser}^{1177}\text{p-eNOS}$, concomitantemente à normalização da expressão de $\text{Thr}^{412}\text{p-S6K}$ e de $\text{Ser}^{727}\text{p-STAT3}$ (**Figura 13**). Já a suplementação com taurina parece prevenir a disfunção endotelial dos animais desnutridos proteicos através da prevenção da redução da biodisponibilidade do NO, atuando via normalização tanto da produção de ânion superóxido pela NADPH oxidase quanto da ação antioxidante de EC-SOD (**Figura 13**).

Assim, em conjunto, os presentes achados sugerem que a suplementação com os aminoácidos leucina e taurina apresenta efeitos benéficos sobre os danos cardiovasculares provocados pela restrição proteica no período após o nascimento. A melhora da função endotelial observada com a suplementação com taurina corrobora dados obtidos com este mesmo aminoácido em outros modelos de disfunção endotelial, como observado em modelos animais que apresentam diabetes tipo I ou obesidade. Já os dados obtidos através da suplementação com leucina são pioneiros e adicionam ao conhecimento vigente outra possível ação da suplementação com este aminoácido de cadeia ramificada quando há restrição de proteínas na dieta.

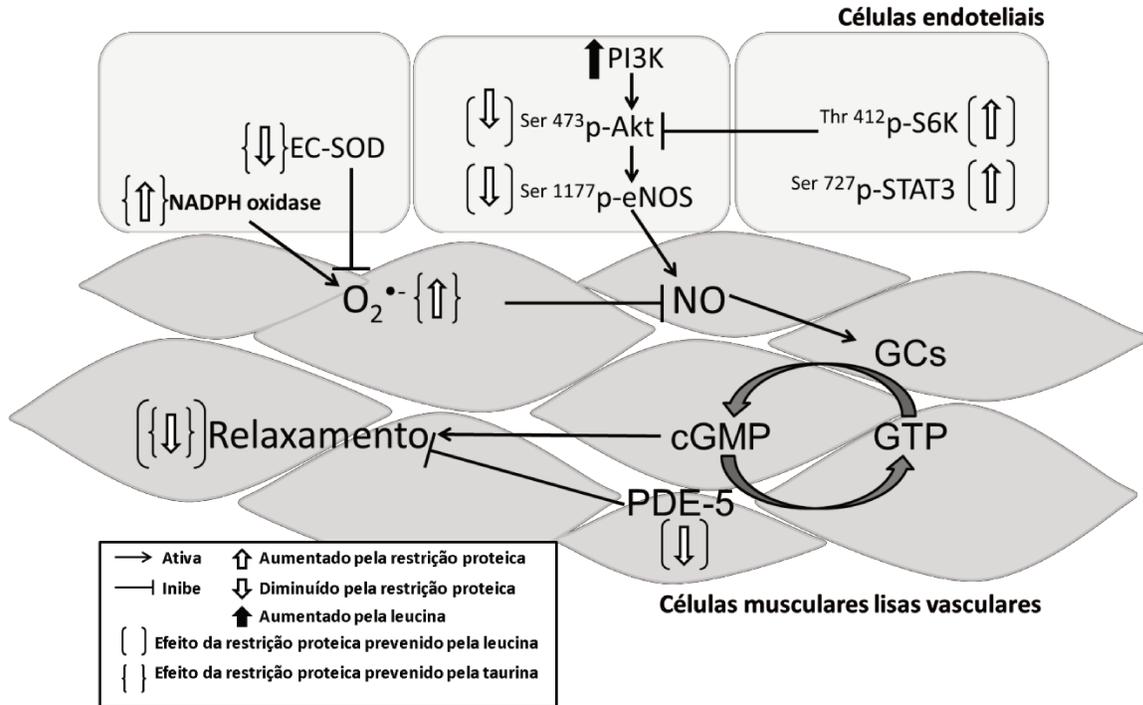


Figura 13: Esquema representativo dos efeitos da restrição proteica pós-desmame e da suplementação com leucina ou com taurina sobre a função endotelial da aorta de ratos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEBE W, MOZAFFARI MS. (2003) Taurine depletion alters vascular reactivity in rats. **Can J PhysiolPharmacol.** 81: 903-909.
- AERTS L, VAN ASSCHE FA. (2002) Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. **J Perinat Med.** 30: 281-286.
- AGO T, KURODA J, KAMOUCI M, SADOSHIMA J, KITAZONO T. (2011) Pathophysiological roles of NADPH oxidase/nox family proteins in the vascular system – Review and perspective. **Circ J.** 75: 1791-1800.
- ALVARADO-VÁSQUEZ N, ZAMUDIO P, CERÓN E, VANDA B, ZENTENO E, CARVAJAL-SANDOVAL G. (2003) Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. **CompBiochemPhysiol C ToxicolPharmacol.** 134: 521-527.
- AMARAL AG, RAFACHO A, MACHADO DE OLIVEIRA CA, BATISTA TM, RIBEIRO RA, LATORRACA MQ, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. (2010) Leucine supplementation augments insulin secretion in pancreatic islets of malnourished mice. **Pancreas.** 39(6) 847-855.
- ARCHER SL, HUANG JM, HAMPL V, NELSON DP, SHULTZ PJ, WEIR EK. (1994) Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K

- channel by cGMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 91(16):7583-7587.
- ARNOLD WP, MITTAL CK, KATSUKI S, MURAD F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc Natl Acad Sci USA.** 74(8):3203-3207.
- AVRUCH J, BELHAM C, WENG Q, HARA K, YONEZAWA K. (2001) The p70 S6 kinase integrates nutrient and growth signals to control translational capacity. **Prog Mol Subcell Biol.** 26:115-154.
- BARBOSA KBF, COSTA NMB, ALFENAS RCG, DE PAULA SO, MINIM VPR, BRESSAN J. (2010) Oxidative stress: concept, implications and modulating factors **Rev. Nutr.**23(4):629-643.
- BARKER DJ. (1995) Fetal origins of coronary heart disease. **BMJ.** 311: 171-174.
- BATISTA TM, RIBEIRO RA, AMARAL AG, OLIVEIRA CAM, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. (2012) Taurine supplementation restores glucose and carbachol-induced insulin secretion in islets from low-protein diet rats: involvement of Ach-M3R, Synt 1 and SNAP-25 proteins. **J NutrBiochem.** 23(3):306-312.
- BECKMAN JS, BECKMAN TW, CHEN J, MARSHALL PA, FREEMAN BA. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 87(4):1620-1624.
- BLEIL SI. (1998) O padrão alimentar ocidental: consideração sobre a mudança de hábitos no Brasil. **Revista Cadernos de Debate, Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação da UNICAMP**, volume VI p.1-25.
- BRAWLEY L, ITOH S, TORRENS C, BARKER A, BERTRAM C, POSTON L, HANSON M. (2003) Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring. **Pediatr Res.** 54(1):83-90.
- CERON PI, CREMONEZ DC, BENDHACK LM, TEDESCO AC. (2001) The relaxation induced by S-nitroso-glutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine in rat aorta is not related to nitric oxide production. **J Pharmacol Exp Ther.** 298(2):686-694.
- CHANDRA RK. (1997) Nutrition and the immune system: an introduction. **Am J ClinNutr.** 66(2):460S-463S.
- CORSON MA, JAMES NL, LATTA SE, NEREM RM, BERK BC, HARRISON DG. (1996) Phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in response to fluid shear stress. **Circ Res.** 79(5):984-991.
- DA SILVA PM, BATISTA TM, RIBEIRO RA, ZOPPI CC, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. (2012) Decreased insulin secretion in islets from protein malnourished rats is associated with impaired glutamate dehydrogenase function: effect of leucine supplementation. **Metabolism.** 61(5):721-732.
- DA SILVA PM, ZOPPI CC, FILIPUTTI E, SILVEIRA LR, QUESADA I, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. (2010) Preliminary report: leucine supplementation enhances

- glutamate dehydrogenase expression and restores glucose-induced insulin secretion in protein-malnourished rats. **Metabolism**. 59(6):911-913.
- DAVEL AP, FUKUDA LE, DE SÁ LL, MUNHOZ CD, SCAVONE C, SANZ-ROSA D, CACHOFEIRO V, LAHERA V, ROSSONI LV.(2008) Effects of isoproterenol treatment for 7 days on inflammatory mediators in the rat aorta. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**.295(1):H211-219.
- DAVEL AP, KAWAMOTO EM, SCAVONE C, VASSALLO DV, ROSSONI LV. (2006) Changes in vascular reactivity following administration of isoproterenol for 1 week: a role for endothelial modulation. **Br J Pharmacol**.148(5):629-39.
- DE BELCHIOR AC, ANGELI JK, DE O FARIA T, SIMAN FD, SILVEIRA EA, MEIRA EF, DA COSTA CP, VASSALLO DV, PADILHA AS. (2012) Post-weaning malnutrition increases blood pressure and induces endothelial dysfunction in rats. **PLoS One**. 7(4):e34876.
- DELBIN MA, DAVEL AP, ROSSONI LV, ANTUNES E, ZANESCO A.(2011) Beneficial effects of physical training on the cardio-inflammatory disorder induced by lung ischemia/reperfusion in rats. **Inflammation**. 34(5):319-325.
- DIMMELER S, FLEMING I, FISSLTHALER B, HERMANN C, BUSSE R, ZEIHNER AM. (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**. 399: 601-605.
- DUAN W, YANG Y, YI W, YAN J, LIANG Z, WANG N, LI Y, CHEN W, YU S, JIN Z, YI D. (2013) New role of JAK2/STAT3 signaling in endothelial cell oxidative stress injury and protective effect of melatonin. **PLoS One**. 8(3):e57941.
- EVORA PR, EVORA PM, CELOTTO AC, RODRIGUES AJ, JOVILIANO EE. (2012) Cardiovascular therapeutics targets on the NO-sGC-cGMP signaling pathway: a critical overview. **Curr Drug Targets**. 13(9):1207-1214.
- FENNESSY FM, MONELEY DS, WANG JH, KELLY CJ, BOUCHIER-HAYES DJ. (2003) Taurine and vitamin C modify monocyte and endothelial dysfunction in young smokers. **Circulation**. 107: 410-415.
- FILIPPUTTI E, FERREIRA F, SOUZA KL, STOPPIGLIA LF, ARANTES VC, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. (2008) Impaired insulin secretion and decreased expression of the nutritionally responsive ribosomal kinase protein S6K-1 in pancreatic islets from malnourished rats. **Life Sci**. 27;82(9-10):542-548.
- FILIPPUTTI E, RAFACHO A, ARAÚJO EP, SILVEIRA LR, TREVISAN A, BATISTA TM, CURI R, VELLOSO LA, QUESADA I, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. (2010) Augmentation of insulin secretion by leucine supplementation in malnourished rats: possible involvement of the phosphatidylinositol 3-phosphate kinase/mammalian target protein of rapamycin pathway. **Metabolism**. 59: 635-644.
- FORSTERMANN U, SESSA WC. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J**. 33(7): 829-837, 837a-837d.

- FRANCO MC, HIGA EM, D'ALMEIDA V, DE SOUSA FG, SAWAYA AL, FORTES ZB, SESSO R. (2007 b) Homocysteine and nitric oxide are related to blood pressure and vascular function in small-for-gestational-age children. **Hypertension**. 50: 396-402.
- FRANCO MC, KAWAMOTO EM, GORJÃO R, RASTELLI VM, CURI R, SCAVONE C, SAWAYA AL, FORTES ZB, SESSO R. (2007a) Biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in children born small for gestational age: evidence of lipid peroxidation. **Pediatr Res**. 62: 204-208.
- FRANCO MC, PONZIO BF, GOMES GN, GIL FZ, TOSTES R, CARVALHO MH, FORTES ZB. (2009) Micronutrient prenatal supplementation prevents the development of hypertension and vascular endothelial damage induced by intrauterine malnutrition. **Life Sci**. 85: 327-333.
- FRANCO MDOC , AKAMINE EH , DI MARCO GS , CASARINI DE , FORTES ZB , TOSTESRC ,CARVALHO MH, NIGRO D. (2003) NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. **Cardiovascular Research**. 59: 767-775.
- FRANCO MDOC, ARRUDA RM, DANTAS AP, KAWAMOTO EM, FORTES ZB, SCAVONEC, CARVALHO MH, TOSTES RC, NIGRO D. (2002) Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. **Cardiovasc Res**. 56(1):145-53.
- FRANCONI F, GIOTTI A, MANZINI S, MARTINI F, STENDARDI I, ZILLETTI L. (1982) The effect of taurine on high potassium- and noradrenaline-induced contraction in rabbit ear artery. **Br J Pharmacol**. 75:605-612.
- FULTON D, GRATTON JP, MCCABE TJ, FONTANA J, FUJIO Y, WALSH K, FRANKE TF, PAPAPETROPOULOS A, SESSA WC. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**. 399:597-601.
- FURCHGOTT RF, ZAWADZKI JV. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**. 288:373-376.
- GARCÍA-VILLAÓN AL, MONGE L, GARCÍA JL, FERNÁNDEZ N, GÓMEZ B, DIÉGUEZ G. (1996) Role of Na⁺/K⁺ ATPase on the relaxation of rabbit ear and femoral arteries. **J Pharm Pharmacol**. 48(10):1057-1062.
- GOLDEN MHN, GOLDEN BE, JACKSON AA. (1980) Albumin and nutritional oedema. **Lancet**. 1:114-116.
- GOLDEN MHN.(1982) Protein deficiency, energy deficiency, and oedema of malnutrition. **Lancet**. 1:1261-1265.
- GOMES-MARCONDES MC, VENTRUCCI G, TOLEDO MT, CURY L, COOPER JC. (2003) A leucine-supplemented diet improved protein content of skeletal muscle in young tumor-bearing rats. **Braz J Med Biol Res**. 36(11):1589-1594.
- HEYWOOD WE, MIAN N, MILLA PJ, LINDLEY KJ. (2004) Programming of defective rat pancreatic β -cell function in offspring from mothers fed a low-protein diet during gestation and the suckling periods. **Clin Science**. 107:37-45.

- HINK U, LI H, MOLLNAU H, OELZE M, MATHEIS E, HARTMANN M, SKATCHKOV M, THAISS F, STAHL RA, WARNHOLTZ A, MEINERTZ T, GRIENDLING K, HARRISON DG, FORSTERMANN U, MUNZEL T. (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. **Circ Res.** 88: E14- E22.
- HUXTABLE RJ. (1992) Physiological actions of taurine. **Physiol Rev.** 72(1):101-163.
- IGNARRO LJ, BUGA GM, WOOD KS, BYRNS RE, CHAUDHURI G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 84(24):9265-9269.
- IKUBO N, SAITO M, TSOUNAPI P, DIMITRIADIS F, OHMASA F, INOUE S, SHIMIZU S, KINOSHITA Y, SATOH K. (2011) Protective effect of taurine on diabetic rat endothelial dysfunction. **Biomed Res.** 32(3):187-93.
- KAKISIS JD, PRADHAN S, CORDOVA A, LIAPIS CD, SUMPIO BE. (2005) The role of STAT-3 in the mediation of smooth muscle cell response to cyclic strain. **Int J Biochem Cell Biol.** 37(7):1396-1406.
- KIM JA, JANG HJ, MARTINEZ-LEMUS LA, SOWERS JR. (2011) Activation of mTOR/p70S6 kinase by ANG II inhibits insulin-stimulated endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 302(2):E201-8.
- KIM YS, AHN Y, HONG MH, JOO SY, KIM KH, SOHN IS, PARK HW, HONG YJ, KIM JH, KIM W, JEONG MH, CHO JG, PARK JC, KANG JC. (2007) Curcumin attenuates inflammatory responses of TNF-alpha-stimulated human endothelial cells. **J Cardiovasc Pharmacol.** 50(1):41-49.
- KOBAYASHI T, TAGUCHI K, YASUHIRO T, MATSUMOTO T, KAMATA K. (2004) Impairment of PI3-K/Akt pathway underlies attenuated endothelial function in aorta of type 2 diabetic mouse model. **Hypertension.** 44: 956- 962.
- LAMIREAU D, NUYT AM, HOU X, BERNIER S, BEAUCHAMP M, GOBEIL F JR, LAHAIE I, VARMA DR, CHEMTOB S. (2002) Altered vascular function in fetal programming of hypertension. **Stroke.** 33(12):2992-2998.
- LANDMESSER U, SPIEKERMANN S, DIKALOV S, HELMATATGEWILKE R, KOHLER C, HARRISON DG, HORNIG B, AND DREXLER H. (2002) Vascular oxidant stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. **Circulation.**106: 3073–3078.
- LEBRETON G, TAMION F, COEFFIER M, RICHARD V, BUBENHEIM M, BESSOU JP, DOGUET F. (2013) Modulation of mesenteric vasoreactivity and inflammatory response by protein undernutrition in cardiopulmonary bypass. **Nutrition.** 29(1):318-324.
- LI H, WITTE K, AUGUST M, BRAUSCH I, GÖDTEL-ARMBRUST U, HABERMEIER A, CLOSS EI, OELZE M, MÜNZEL T, FÖRSTERMANN U. (2006) Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. **J Am Coll Cardiol.** 47: 2536-2544.

- LI N, SAWAMURA M, NARA Y, IKEDA K, YAMORI Y. (1996) Direct inhibitory effects of taurine on norepinephrine-induced contraction in mesenteric artery of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Adv Exp Med Biol.** 403: 257–262.
- LIN C, BOSLAUGH S, CILIBERTO H, MALETA K, ASHORN P, BRIEND A, MANARY M. (2007) A prospective assessment of food and nutrient intake in a population of Malawian children at risk for kwashiorkor. **J. Pediatr. Gastroenterol.Nutr.** 44, 487-493.
- LOSS I DE O, FERNANDES LG, MARTINS CD, CARDOSO LM, SILVA ME, DIAS-DA-SILVA VJ, MORAES MF, CHIANCA DA JR. (2007) Baroreflex dysfunction in rats submitted to protein restriction. **Life Sci.** 81(11):944-950.
- LUO Z, FUJIO Y, KUREISHI Y, RUDIC RD, DAUMERIE G, FULTON D, SESSA WC, WALSH K. (2000) Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. **J Clin Invest.**106(4):493-499.
- MA L, MA S, HE H, YANG D, CHEN X, LUO Z, LIU D, ZHU Z. (2010) Perivascular fat-mediated vascular dysfunction and remodeling through the AMPK/mTOR pathway in high-fat diet-induced obese rats. **Hypertens Res.** 33(5):446-453.
- MACMILLAN-CROW LA, CRUTHIRDS DL. (2001) Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. **Free Radic Res.** 34(4):325-336.
- MANEA A. (2010) NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. **Cell Tissue Res.** 342(3):325-339.
- MARTINS CD, CHIANCA DA JR, FERNANDES LG. (2011) Cardiac autonomic balance in rats submitted to protein restriction after weaning. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 38(2):89-93.
- MURÇA TM, MAGNO TS, DE MARIA ML, CAPURUÇO CA, CHIANCA DA JR, FERREIRA AJ. (2012) Cardiac responses of rats submitted to postnatal protein restriction. **Appl Physiol Nutr Metab.** 37(3):455-462.
- NARDELLI TR, RIBEIRO RA, BALBO SL, VANZELA EC, CARNEIRO EM, BOSCHERO AC, BONFLEUR ML. (2010) Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile in monosodium glutamate-obese rats. **Amino Acids.** 41:901-908.
- NEWSHOLME P, BRENNAN L, RUBI B, MAECHLER P. (2005) New insights into amino acid metabolism, beta-cell function and diabetes. **Clin Sci.** 108: 185-194.
- NIU LG, ZHANG MS, LIU Y, XUE WX, LIU DB, ZHANG J, LIANG YQ. (2008) Vasorelaxant effects of taurine is diminished by tetraethylammonium in rat isolated arteries. **Eur J Pharmacol.** 580:169–174.
- OLIVEIRA EL, CARDOSO LM, PEDROSA ML, SILVA ME, DUN NJ, COLOMBARI E, MORAES MF, CHIANCA DA JR. (2004) A low protein diet causes an increase in the basal levels and variability of mean arterial pressure and heart rate in Fisher rats. **NutrNeurosci.** 7(4): 201-215.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2010) Healthy growth and nutrition in children. Barilla Center for Food & Nutrition.

- PALMER RMJ, ASHTON DS, MONCADA S. (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**. 333:664-666.
- PIECH A, DESSY C, HAVAUX X, FERON O, BALLIGAND JL. (2003) Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. **Cardiovasc Res**. 57:456-467.
- RAGHEB R, SHANAB GM, MEDHAT AM, SEOUDI DM, ADELI K, FANTUS IG. (2009) Free fatty acid-induced muscle insulin resistance and glucose uptake dysfunction: evidence for PKC activation and oxidative stress-activated signaling pathways. **BiochemBiophys Res Commun**. 389: 211-216.
- RANA SK, SANDERS TBA. (1986) Taurine concentrations in the diet, plasma, urine and breast milk of vegans compared with omnivores. **British Journal of Nutrition**. 56, 17-27.
- RAND VE, GARLAND CJ. (1992) Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the rabbit basilar artery: importance of membrane hyperpolarization. **Br J Pharmacol**. 106(1):143-150.
- REEDS PJ, BURRIN DG, DAVIS TA, FIOROTTO ML. (1993) Postnatal growth of gut and muscle: competitors or collaborators. **ProcNutr Soc**. 52(1):57-67.
- REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC JR. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition adhoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**. 123(11):1939-1951.
- RIBEIRO RA, BONFLEUR ML, AMARAL AG, VANZELA EC, ROCCO SA, BOSCHERO AC, CARNEIRO EM. (2009) Taurine supplementation enhances nutrient-induced insulin secretion in pancreatic mice islets. **Diabetes Metab Res Ver**. 25: 370-379.
- RISTORI MT, VERDETTI J. (1991) Effects of taurine on rat aorta in vitro. **Fundam Clin Pharmacol**. 5:245–258.
- SAUBERLICH HE.(1961) Studies on the toxicity and antagonism of amino acids for weanling rats. **J Nutr**. 75:61-72.
- SCABORA JE, DE LIMA MC, LOPES A, DE LIMA IP, MESQUITA FF, BRÁZ TORRES D, BOER PA, GONTIJO JA. (2013) Impact of taurine supplementation on blood pressure in gestational protein-restricted offspring: Effect on the medial solitary tract nucleus cell numbers, angiotensin receptors, and renal sodium handling. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**. doi: 013/03/06/1470320313481255.long
- SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR. (2004) Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte** (10) 308-313.
- SHARKEY JR. (2008) Diet and Health Outcomes in Vulnerable Populations. **Ann. N.Y. Acad. Sci**. 1136: 210–217.
- SHIMOMURA Y, HARRIS RA. (2006) Metabolism and physiological function of branched-chain amino acids: discussion of session 1. **J Nutr**. 136:232S-233S.

- SINHA-HIKIM I, SINHA-HIKIM AP, PARVEEN M, SHEN R, GOSWAMI R, TRAN P, CRUM A, NORRIS KC. (2013) Long-Term Supplementation With a Cystine-Based Antioxidant Delays Loss of Muscle Mass in Aging. **J GerontolABiolSci Med Sci**. doi:10.1093/gerona/gls334.
- SORESCU D, WEISS D, LASSÈGUE B, CLEMPUS RE, SZÖCS K, SORESCU GP, VALPPU L, QUINN MT, LAMBETH JD, VEGA JD, TAYLOR WR, GRIENDLING KK. (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. **Circulation**. 105:1429-1435.
- STARLIN P, KARLSSON K, JOHANSSON BO, AND MARKLUND SL. (1995) The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. **ArteriosclerThrombVascBiol**.15: 2032–2036.
- SURYAWAN A, JEYAPALAN AS, ORELLANA RA, WILSON FA, NGUYEN HV, DAVIS TA. (2008) Leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of neonatal pigs by enhancing mTORC1 activation. **Am J Physiol Endocrino Metab**. 295(4):E868-875.
- TAGUCHI K, MATSUMOTO T, KAMATA K, KOBAYASHI T. (2012) Akt/eNOS pathway activation in endothelium-dependent relaxation is preserved in aortas from female, but not from male, type 2 diabetic mice. **Pharmacol Res**. 65(1): 56-65.
- TAN B, JIANG DJ, HUANG H, JIA SJ, JIANG JL, HU CP, LI YJ. (2007) Taurine protects against low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction by the DDAH/ADMA pathway. **VasculPharmacol**. 46:338-345.
- TANEJA G, MAHADEVAN N, BALAKUMAR P. (2013) Fish oil blunted nicotine-induced vascular endothelial abnormalities possibly via activation of PPAR γ -eNOS-NO signals. **Cardiovasc Toxicol**. 13(2):110-122.
- TENNER TE JR, ZHANG XJ, LOMBARDINI JB. (2003) Hypoglycemic effects of taurine in the alloxan-treated rabbit, a model for type 1 diabetes. **AdvExp Med Biol**. 526:97-104.
- TEODORO GF, VIANNA D, TORRES-LEAL FL, PANTALEÃO LC, MATOS-NETO EM, DONATO J JR, TIRAPEGUI J. (2012) Leucine is essential for attenuating fetal growth restriction caused by a protein-restricted diet in rats. **J Nutr**. 142:924-930.
- TORRENS C, BRAWLEY L, ANTHONY FW, DANCE CS, DUNN R, JACKSON AA, POSTON L, HANSON MA. (2006) Folate supplementation during pregnancy improves offspring cardiovascular dysfunction induced by protein restriction. **Hypertension**. 47(5):982-987.
- TORRENS C, KELSALL CJ, HOPKINS LA, ANTHONY FW, CURZEN NP, HANSON MA. (2009) Atorvastatin restores endothelial function in offspring of protein-restricted rats in a cholesterol-independent manner. **Hypertension**. 53(4):661-667.
- TROPIA FC, CARDOSO LM, PEDROSA ML, SILVA ME, HAIBARA AS, MORAES MF, CHIANCA DA JR. (2001) Effects of low-protein diet on the baroreflex and Bezold-Jarisch reflex in conscious rats. **Nutr Neurosci**. 4(2):99-107.
- ULRICH-MERZENICH G, ZEITLER H, VETTER H, BHONDE RR. (2007) Protective effects of taurine on endothelial cells impaired by high glucose and oxidized low density lipoproteins. **Eur J Nutr**. 46:431-438.

- VIANA LR, GOMES-MARCONDES MC. (2013) Leucine-rich diet improves the serum amino acid profile and body composition of fetuses from tumor-bearing pregnant mice. **Biol Reprod.** 88(5):121.
- VINCENT HK, INNES KE, VINCENT KR. (2007) Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. **Diabetes Obes Metab.**9(6):813-839.
- WANG LJ, YU YH, ZHANG LG, WANG Y, NIU N, LI Q, GUO LM. (2008) Taurine rescues vascular endothelial dysfunction in streptozocin-induced diabetic rats:correlated with downregulation of LOX-1 and ICAM-1 expression on aortas. **Eur J Pharmacol.**597 (1-3):75-80.
- WANG M, ZHANG W, CRISOSTOMO P, MARKEL T, MELDRUM KK, FU XY, MELDRUM DR. (2007) Endothelial STAT3 plays a critical role in generalized myocardial proinflammatory and proapoptotic signaling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 293(4):H2101-H2108.
- WARNHOLTZ A, NICKENIG G, SCHULZ E, MACHARZINA R, BRÄSEN JH, SKATCHKOV M, HEITZER T, STASCH JP, GRIENGLING KK, HARRISON DG, BÖHM M, MEINERTZ T, MÜNDEL T. (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. **Circulation.** 99:2027- 2033.
- WILLIAMS CD, OXON BM, LOND H. (1935) Kwashiorkor: A nutritional disease of children associated with a maize diet. **Lancet.** 226, 1151.
- WITHAM WG, YESTER KA, MCGAFFIN KR. (2012) A high leucine diet mitigates cardiac injury and improves survival after acute myocardial infarction. **Metabolism.** 62(2):290-302.
- XU GG, GAO ZY, BERGE PD, JEGIER PA, YOUNG RA, WOLF BA. (2000) Insulin regulation of beta-cell function involves a feedback loop on SERCA gene expression, Ca(2+) homeostasis, and insulin expression and secretion. **Biochemistry.** 39: 14912-14919.
- ZOPPI CC, HOHL R, SILVA FC, LAZARIM FL, NETO JM, STANCANELLI M, MACEDO DV. (2006) Vitamin C and E supplementation effects in professional soccer players under regular training. **J Int Soc Sports Nutr.** 3:37-44.