



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**Efeitos de uma sobrecarga de sódio ou de antioxidantes sobre o estresse oxidativo e angiogênese placentária: repercussão sobre indicadores de estresse oxidativo no fígado fetal**

**NATALIE EMANUELLE RIBEIRO E SILVA**

**RECIFE-PE**

**2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**Efeitos de uma sobrecarga de sódio ou de antioxidantes sobre o estresse oxidativo e angiogênese placentária: repercussão sobre indicadores de estresse oxidativo no fígado fetal**

**NATALIE EMANUELLE RIBEIRO E SILVA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Anísio Francisco Soares  
Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Durce Oliveira da Paixão

## DEDICATÓRIA

A minha Mãe, Sonia Ribeiro e Silva por sempre ter me apoiado em toda jornada científica.

Ao meu esposo, Marcelo Ferreira Rodrigues, pelo seu amor, incentivo e forças.

Ao meu amado filho Kauã Ribeiro Cardoso.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por que sem Ele eu jamais teria concluído mais esta etapa na minha vida.

Ao Prof. Dr. Anísio Francisco Soares por ter acompanhado meu crescimento científico desde a época de iniciação científica, pela amizade e apoio.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Durce Oliveira da Paixão, pela oportunidade concedida em seu laboratório de realizar todos os experimentos desenvolvidos no decorrer desses anos, pela sua brilhante orientação e profissionalismo.

A veterinária Cláudia Paiva responsável pelo biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pela atenção dispensada com o manejo dos animais do laboratório.

Ao Marcos André Santos de Souza, funcionário do biotério da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela ajuda fornecida no momento em que mais necessitamos de animais.

Ao Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues e Prof. Dr. Almir Gonçalves Wanderley e todos os seus alunos, por terem aberto a porta dos seus laboratórios todos os dias possibilitando a utilização de alguns equipamentos.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal em especial a Luís Paulo Nogueira, Leucio Duarte Vieira-Filho, Daianna Rosse Martins Gonçalves, Edjair Vicente Cabral e Bruna da Rosa Maggi Sant'Helena, por todo apoio e auxílio no desenvolver do trabalho.

A minha grande amiga de Graduação Rafaella Christinne, por todo apoio e incentivo nessa minha caminhada.

As minhas amigas da pós-graduação em Ciência Animal Tropical, Débora Monteiro Navarro Marques de Oliveira, Maria Cecília Oliveira do Nascimento e Silvia Rafaelle Marques, por sempre terem ajudado quando eu mais precisei e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim pelo empenho em coordenar o programa durante esse período.

A todos os meus familiares que de forma direta ou indireta contribuíram na minha jornada acadêmica, em especial minha prima Fabiana Ribeiro e Silva e meu esposo Marcelo Ferreira que sempre esteve ao meu lado dando todo apoio e força quando precisei.

À Capes, pela bolsa de estudo que financiou o desenvolvimento desta dissertação.

*Porque para Deus não haverá impossíveis  
em todas as suas promessas  
Lucas 1:37*

## **FONTES FINANCIADORAS**

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
<b>Sobrecarga de sódio durante a gestação</b> .....	2
<b>Programação intra-uterina</b> .....	3
<b>Sobrecarga de sódio materna e função renal da prole</b> .....	4
<b>Efeito da sobrecarga de sódio no peso fetal e placentário</b> .....	4
<b>Estresse Oxidativo e Antioxidantes</b> .....	5
<b>Estresse oxidativo: Repercussão na placenta e feto</b> .....	6
<b>Angiogênese placentária</b> .....	6
<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	7
<b>OBJETIVOS</b> .....	8
<b>Geral</b> .....	8
<b>Específicos</b> .....	8
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	9
<b>Artigo submetido ao periodico Placenta</b> .....	16
<b>1. Introduction</b> .....	18
<b>2. Materials and Methods</b> .....	18
<b>3. Results</b> .....	20
<b>4. Discussion</b> .....	21
<b>References</b> .....	23
<b>Table 1</b> .....	27
<b>Table 2</b> .....	28
<b>Table 3</b> .....	29
<b>CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>ANEXOS</b> .....	32

## LISTA DE FIGURAS

Fig. 1: flt-1 expression



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Maternal and fetal data weight

Tabela 2: Oxidative stress markers in maternal placenta and in the fetal liver

Tabela 3: Oxidative stress markers in maternal liver

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANG II** - angiotensina II

**AP-1**- proteína-ativadora 1

**BU**- broto ureteral

**ECA2** -enzima conversora de angiotensina 2

**EDTA**- ácido etilenodiamino tetra-acético

**Flt-1**- fms-like tyrosine kinase-1

**GDNF**- fator neurotrófico derivado das células da glia

**GSH** glutathiona reduzida

**KCl** Cloreto de Potássio

**MDA** malonildialdeido

**NaCl** -Cloreto de sódio

**PE**- Pré-eclâmpsia

**PIGF**- fator de crescimento placentário

**PMSF**- fluoreto de fenilmetilsulfonilo

**ROS** - Espécies reativas de oxigênio

**sFlt1**- Soluble fms-like tyrosine kinase-1

**SDS**- Dodecil sulfato de sódio

**SOD**- superóxido dismutase

**SRAA**- sistema renina angiotensina aldosterona

**TBARS**- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TBS-T**- tampão salina-fosfato e Tween

**TCA** Ácido Tricloroacético

**TGF- $\beta$** - fator de crescimento transformante tipo  $\beta$

**VEGF**- vascular endothelial growth factor

**VEGFR1**- Vascular endothelial growth factor receptor 1

**VEGFR2** - Vascular endothelial growth factor receptor 2

## RESUMO

Doenças cardiovasculares programadas intrauterinamente podem está ligadas ao estresse oxidativo placentário. Neste trabalho, investigamos se a sobrecarga de NaCl, durante a gravidez, afeta o estresse oxidativo e angiogênese placentária, bem como se afeta os níveis de estresse oxidativo no fígado do feto. Mães foram tratadas com NaCl, 1,8%, na água de beber, 20 dias antes e ao longo da gravidez.  $\alpha$ -Tocoferol, tempol ou ambos foram administrados ao longo da gravidez. A angiogênese foi avaliada por meio da expressão do flt-1, o receptor tipo 1 para o VEGF, nos feixes vilosos do labrinto. A suplementação com NaCl diminuiu a expressão de flt-1, bem como, reduziu os níveis de malonildialdeído e aumentou os níveis de glutatona reduzida na placenta e no fígado fetal. O  $\alpha$ -tocoferol levou a uma redução adicional nos níveis de MDA nesses órgãos, mas diminuiu os níveis de GSH. De maneira diferente, o tempol aumentou os níveis de MDA e diminuiu os níveis de na placenta e no fígado fetal. O tratamento com os antioxidantes não alterou a expressão do flt-1. Os níveis reduzidos de MDA na placenta e no fígado do feto de mães submetidas a sobrecarga de NaCl podem ser devidos à angiogênese diminuída, o que reduziu o suprimento de oxigênio, ou aos os níveis aumentados de GSH. Entretanto, a ação paradoxal, pro-oxidante, do tempol indica que a reserva antioxidante nas mães submetidas a sobrecarga de sódio é limitada. Além disso, o paralelo entre o padrão de estresse oxidativo placentário e do fígado fetal sugere que ânions superóxidos transferidos a partir das mães podem ser importantes na programação das doenças cardiovasculares.

**Palavras chaves:** desenvolvimento fetal, estresse oxidativo, placenta, expressão de flt1, sobrecarga de sódio

## ABSTRACT

Intrauterine programmed cardiovascular disease may be linked to placental oxidative stress. It was investigated whether NaCl supplement, during pregnancy, affects placental oxidative stress and angiogenesis and imprints increased levels of oxidative stress in fetal liver. Dams were treated with 1.8% NaCl in drinking water from 20 days before and along pregnancy. Along pregnancy  $\alpha$ -tocopherol, tempol or both were administered. Angiogenesis was evaluated throughout the expression of flt-1, the type 1 receptor for VEGF, in the villous bundles/labirinth. NaCl diminished flt-1 expression, as well as, reduced malonyldialdehyde and augmented reduced glutathione in placenta and fetal liver.  $\alpha$ -Tocopherol led to an additional reduction in MDA levels in these organs, but diminished GSH. Otherwise, tempol increased MDA and diminished GSH in both placenta and fetal liver. No antioxidant changed the expression of flt-1. The reduced levels of MDA in placenta and fetal liver of dams under NaCl supplement might be due to reduced angiogenesis, that reduced oxygen supply, and also to the increased GSH levels. However the paradoxical pro-oxidant action of tempol indicates that the antioxidant reservoir in dams under sodium overload is limited. Furthermore, the parallel between the pattern of placental and fetal liver oxidative stress suggests that superoxide anions transferred from mothers may be important in programming cardiovascular diseases.

Keywords: fetal development, oxidative stress, placenta, flt-1 expression, sodium overload

## INTRODUÇÃO

Ratos submetidos a uma sobrecarga de sódio no período perinatal apresentam na idade adulta alterações no metabolismo lipídico (CARDOSO *et al.*, 2009) e também na função renal, tais como aumento na deposição de colágeno e alteração no sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (CABRAL *et al.*, 2012). Além disso, uma sobrecarga de sódio durante o período perinatal suprime os níveis de angiotensina II na prole afetando a nefrogênese (BALBI *et al.*, 2004). No que diz respeito à saúde materna, a alta ingestão de sódio durante a gestação leva a aumento na pressão arterial (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2003), e proteinúria (CARDOSO *et al.*, 2009), tendo sido proposto como um modelo experimental de pré-eclâmpsia (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2007). A sobrecarga de sódio pode influenciar o desenvolvimento fetal por meio do estresse oxidativo placentário aumentado (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2007) e está associado com retardo do crescimento fetal.

O  $\alpha$ -tocoferol é um dos isômeros mais ativos da família dos tocoferóis, os quais têm atividade antioxidante bem estabelecida e são genericamente denominados de vitamina E. Parte da ação antioxidante da vitamina E se faz pela eliminação dos radicais livres de oxigênio nas membranas lipídicas celulares. Outra ação da vitamina E consiste em estimular a angiogênese na placenta (KASIMANICKAM *et al.*, 2010), além de ser fundamental no processo de placentação (JISHAGE *et al.*, 2005). O tratamento materno com  $\alpha$ -tocoferol restaura alterações renais provocadas pela desnutrição intrauterina (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011)

Um desenho experimental que pode ser útil na investigação do papel angiogênico da vitamina E consiste na avaliação de fatores pro-angiogênicos, tais como o vascular endothelial growth factor (VEGF) e um de seus receptores, o fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1), comparando os efeitos desta vitamina com os efeitos do tempol, um agente quelante de radicais peróxidos livres que sabidamente não apresenta ação gênica.

Neste trabalho investigamos a hipótese de que uma sobrecarga de sódio aumenta o estresse oxidativo placentário e compromete o fluxo sanguíneo placentário, enquanto os agentes anti-oxidantes melhoram o fluxo sanguíneo placentário e o desenvolvimento fetal.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Sobrecarga de sódio durante a gestação

Os seres humanos são geneticamente programados para consumir baixas quantidades de sódio, cerca de 1g por dia. Nos últimos anos, devido a industrialização, a proporção de sal na dieta aumentou de tal modo que atualmente o consumo chega a cerca de 10g por dia ou mais (BLACKBURN, 1983). Índios Yanomamis que vivem na região amazônica brasileira ainda consomem baixas quantidades de sódio como cerca de 3 g por dia e por isso não apresentam elevação da pressão arterial com a idade, pelo contrário populações que ingerem altas quantidades de sódio por dia, 10 a 20 g, como os pastores nômades Quash'Qai que vivem no Irã e alguns habitantes da Caxemira do Norte apresentam aumento dos níveis pressóricos com avançar da idade (MENETON *et al.*, 2005). Embora o sódio seja essencial para a fisiologia dos mamíferos, a sua ingestão em altas quantidades torna-se prejudicial, pois os mamíferos, de uma forma geral, apresentam mecanismos fisiológicos que resultam em sua retenção, uma vez que foram programados para baixa ingestão deste eletrólito. O SRAA representa um destes sistemas de regulação do sódio no organismo, o qual se encontra ativo em pessoas que consomem quantidades mínimas de sódio diariamente (TAKAHASHI, *et al.*, 2011).

Durante a gestação, em condições normais, ocorre diminuição da pressão arterial, aumento do volume plasmático e mudanças hormonais (GARLAND *et al.*, 1987, DUVEKOT *et al.*, 1994). A alta ingestão de sódio durante a gestação leva a um aumento da pressão arterial (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2003), elevação do estresse oxidativo, disfunção placentária (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2007) e proteinúria (CARDOSO *et al.*, 2009). Portanto a alta ingestão de sódio induz um quadro similar à pré-eclâmpsia (PE) (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2007), uma doença de alta morbidade e mortalidade materna, na América Latina e no Caribe cerca de 26% da mortalidade materna está relacionada com distúrbios hipertensivos durante a gestação, enquanto que na Ásia e na África cerca de 9% das mortes estão relacionadas com o quadro hipertensivo (STEEGERS *et al.*, 2010). Ela é caracterizada por resistência vascular aumentada, e diminuição da complacência vascular e do débito cardíaco, o que gera diminuição do aporte sanguíneo para o feto e conseqüentemente comprometimento da nutrição fetal (CARR *et al.*, 2005).

Em condições normais, a angiotensina II (ANG II) e seus receptores encontram-se ativos na placenta e são responsáveis por promover uma vasodilatação e assim aumento de nutrientes para o feto. Na verdade a ação vasodilatadora é produzida pela enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), uma monoxipeptidase capaz de transformar a (ANG II) em Angiotensina 1-7, que possui ação vasodilatadora. Além disso, a ANG II estimula a produção de

prostaglandinas no tecido placentário que evita a ação vasoconstrictora da ANG II (KALLENGA *et al.*, 1996, ZHONG *et al.*, 2011). O SRAA é modulado pelo teor de sódio na dieta (HALL, 1991), assim o sódio elevado durante a gravidez pode suprimir a atividade do SRAA e levar a redução nos níveis de ANG II placentário (LEANDRO *et al.*, 2008) e comprometer a perfusão útero-placentário, comprometendo a nutrição e o crescimento fetal (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2007). O SRAA desempenha um papel crítico no desenvolvimento renal. A ANG II, via receptor AT<sub>1</sub>R, exerce ação direta na morfogênese do broto ureteral (BU), além de regular a expressão do gene para o fator neurotrófico derivado das células da glia (GDNF) e *c-ret/ Wnt11*, uma via de sinalização importante para a proliferação do BU no metanefron. Os níveis adequados do GDNF são fundamentais para o desenvolvimento do BU, a ANG II está associada com a produção do GDNF e assim constitui-se fundamental para a nefrogênese. Qualquer desarranjo na morfogênese do BU gera anomalias no rim e no trato urinário, sendo a principal causa de insuficiência renal em crianças (IOSIPIV *et al.*, 2003; YOSYPIV *et al.*, 2008; YOSYPIV, 2011)

### **Programação intra-uterina**

Programação intra-uterina constitui-se o processo pelo qual um estímulo no período crítico do desenvolvimento pode levar a alterações no sistema fisiológico e afetar irreversivelmente a estrutura e função de genes, células, tecidos e órgãos do feto (FOWDEN *et al.*, 2006). Tendo em vista que o feto se comunica com a mãe através da placenta, esta se torna a principal via de troca de nutrientes e resíduos entre eles, assim a disfunção placentária afeta o crescimento fetal e pode programar doenças que surgem na idade adulta do concepto. Algumas condições que sabidamente afetam o desenvolvimento fetal e provocam doenças na idade adulta são o tabagismo, a hipóxia e a qualidade da nutrição materna (MURPHY *et al.*, 2006).

A qualidade da nutrição materna é essencial para o desenvolvimento normal da prole (BARKER, 1995). Privações nutricionais durante a gravidez perturbam o transporte de nutrientes e o fluxo sanguíneo placentário (SAINTONGE, 1981; MYATT, 2006). Em resposta ao ambiente desfavorável, o feto adapta-se alterando seu metabolismo, sua produção de hormônios e diminuindo a taxa de crescimento, o que acarreta baixo peso ao nascimento (FOWDEN, 1995).

A natureza e a duração dessas perturbações sobre o feto são determinantes para o desenvolvimento de várias patologias (BERTRAM *et al.*, 2001), como doenças coronárias (BARKER *et al.*, 1995), intolerância a glicose, dislipidemia (FOWDEN *et al.*, 2006), hipertensão (MANNING & VEHASKARI, 2001), diabetes do tipo II (PHILLIPS, 1996) e dislipidemias (BARKER *et al.*, 1993).



### **Sobrecarga de sódio materna e função renal da prole**

A nefrogênese em ratos começa entre o décimo segundo e décimo terceiro dia pós-concepção e continua durante a primeira semana de vida pós-natal (NIGAM *et al.*, 1996). O SRAA é fundamental para o desenvolvimento do tecido renal fetal (TUFRO-MCREDDIE *et al.*, 1995) e qualquer alteração nesse sistema pode afetar o desenvolvimento renal da prole. Em neonatos, a sobrecarga de sódio durante a gestação, diminui a expressão da ANG II no córtex renal desses animais (BALBI *et al.*, 2004). Quando essa sobrecarga se estende até a lactação, a prole apresenta uma diminuição do número de glomérulos com uma semana de idade (KOLEGANOVA *et al.*, 2011). Tem sido evidenciado que aos trinta dias de vida pós-natal, a prole de mães submetidas ao aumento da ingestão de sódio durante a gestação apresenta aumento dos níveis pressóricos (BALBI *et al.*, 2004). Na idade adulta, as alterações na função renal se manifestam como elevação do estresse oxidativo renal (CARDOSO *et al.*, 2009), albuminúria (KOLEGANOVA *et al.*, 2011), alterações estruturais e aumento na expressão da subunidade  $\alpha$  da  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  em membranas do túbulo proximal (CABRAL *et al.*, 2012). Além disso, quando a sobrecarga é mantida durante a lactação, as alterações renais se tornam exacerbadas, o que deixa evidente que existe uma janela de programação que se estende além do período intrauterino (MANNING & VEHASKARI, 2005; CARDOSO *et al.*, 2009).

### **Efeito da sobrecarga de sódio no peso fetal e placentário**

O baixo peso ao nascimento constitui um marcador importante no comprometimento do desenvolvimento fetal durante a gestação, quando ocorre uma oferta inadequada de oxigênio e nutrientes da mãe para o feto (SAINTONGE *et al.*, 1981; BARKER, 1995; MYATT, 2006). Vários fatores estão relacionados com a redução de peso ao nascimento, entre eles a quantidade de sódio na dieta. Mães submetidas a um baixo teor de sódio apresentam uma ativação anômala do SRAA. O elevado nível de ANG II circulante inibe a invasão trofoblástica (BINDER *et al.*, 1995, XIA *et al.*, 2002) levando ao comprometimento da função placentária induzindo dessa forma baixo peso ao nascer (VIDONHO *et al.*, 2004). Em contrapartida a repercussão da sobrecarga de sódio materna no peso fetal é controversa. Foi observado que uma sobrecarga de sódio na última semana de gestação (15<sup>o</sup> ao 22<sup>o</sup>) reduz o peso corpóreo na prole ao nascimento (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2003), entretanto quando a sobrecarga de sódio é iniciada antes da gestação o peso da prole ao nascimento não é alterado (CARDOSO *et al.*, 2009).

O peso placentário também constitui um indicador de comprometimento da programação fetal, nesse aspecto os autores também diferem entre si. Roy-Clavel (1999), mostrou que baixas quantidades de sódio na dieta durante os últimos sete dias de gestação reduzem o peso placentário, assim como a sobrecarga de sódio do 15<sup>a</sup> ao 22<sup>a</sup> dia de gestação também foi

responsável por diminuir o peso placentário das mães tratadas com NaCl 1,8%. (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2003). Ademais, a sobrecarga de sódio materna induz o estresse oxidativo placentário que repercute na nutrição fetal e esta associado com retardo no crescimento fetal (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2007).

### **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**

Nos sistemas biológicos, o estresse oxidativo é ocasionado pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) em relação às defesas antioxidantes celulares. Muitas situações podem gerar estresse oxidativo como a exposição prolongada à luz solar, fumo, alcoolismo e consumo de alguns psicoativos. O estresse oxidativo pode modificar a estrutura e a função das proteínas celulares responsáveis pela sinalização celular e expressão gênica (BARFORD *et al.*, 2004). Assim, o estresse oxidativo desempenha papel crítico na patogênese de várias doenças, incluindo a obesidade e resistensia a insulina (URAKAWA *et al.*, 2003). Os agentes anti-oxidantes pode ser enzimáticos e não enzimáticos. A superóxido dismutase (SOD), catalase e glutaciona peroxidase são as principais defesas anti-oxidantes de natureza enzimática, já a vitamina C e vitamina E constituem-se como defesas antioxiantes não enzimáticas.

A SOD é essencial contra os produtos tóxicos oriundos do metabolismo celular, sua função consiste em degradar superóxidos em peróxido de hidrogênio. O tempol, (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidina-N-oxilo), um mimético da SOD, tem sido relatado em vários estudos por melhorar lesões renais (NISHIYAMA *et al.*, 2004; GURON *et al.*, 2006). Ademais, o tratamento crônico com tempol constitui-se uma grande manobra terapêutica no tratamento de sintomas clínicos característicos da PE (HOFFMANN *et al.*, 2008), bem como, também recupera a hipoperfusão pós-isquemia cerebral induzida por oclusão bilateral da artéria carótida (OKADA *et al.*, 2011).

A vitamina E é o nome comumente usado para as moléculas que constituem a família dos tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). O  $\alpha$ - tocoferol é a forma mais ativa, apresenta duas funções bastante estabelecida: i) Sua atividade antioxidante (WOLF *et al.*, 1998), ii) E sua ação gênica, com efeito na cascata de sinalização celular através da inibição da Proteína Kinase C e ativação do fator de transcrição proteína-ativadora 1 (AP-1) (STAUBLE *et al.*, 1994).

### **Estresse oxidativo: Repercussão na placenta e feto**

A placenta produz ROS, como peróxido nítrico e monóxido de carbono, onde estes exercem um efeito direto na proliferação e diferenciação trofoblástica. Tem sido reportado que ROS são os principais mediadores da angiogênese (LELKES *et al.*, 1998), uma vez que o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e a angiopoietina, fundamentais para angiogênese, são regulados pelo estado REDOX celular (LASSEGUE & CLEMPUS, 2003). Além disso, a NADPH-oxidase desempenha um importante papel na sinalização do VEGF (USHIO-FUKAI *et al.*, 2002). Entretanto, a produção excessiva de ROS, comumente encontrada em gestações patológicas, afetam o crescimento e o desenvolvimento fetal (MYATT & CIU., 2004; PHYLLIS, 2010), repercutindo no peso ao nascer e em alterações renais irreversíveis (BEAUSÉJOUR *et al.*, 2003; MAGALHÃES *et al.*, 2006)

### **Angiogênese placentária**

No desenvolvimento normal da placenta, os sincitiotrofoblastos invadem as artérias espiraladas maternas transformando os vasos de pequeno calibre em vasos de grande capacitância, os quais são necessários para garantir o fluxo sanguíneo e fornecer substratos para o desenvolvimento fetal. Dentre os fatores fundamentais para manter a saúde do endotélio placentário estão o VEGF, o fator de crescimento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e o fator de crescimento placentário (PlGF) com os seus respectivos receptores. O VEGF é o principal responsável pelo remodelamento dos vasos pré-existentes e atua através de dois receptores, o VEGFR1 ou Flt1 e o VEGFR2 ou Flk. O VEGF e seus receptores encontram-se expressos em altas quantidades no início da gestação. O PlGF, um fator de crescimento da família do VEGF, também encontra-se elevado nos trofoblastos e age no receptor Flt1. Já o TGF- $\beta$  se liga a um complexo formado por três subunidades para desempenhar sua função na migração e proliferação de células endoteliais, o Alk5-T $\beta$ R2-Endoglin. Alterações em qualquer uma dessas vias levam a uma disfunção placentária. O estresse oxidativo placentário e a hipóxia são responsáveis por causar um desequilíbrio entre fatores angiogênicos e anti-angiogênicos como o sFlt1 e a sEndoglin, fatores solúveis presentes na circulação que impedem a atuação adequados fatores angiogênicos no tecido placentário (GOUMANS *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2009; LARESGOITI-SERVITJE *et al.*, 2012). Esse desequilíbrio contribui para invasão inadequada dos citotrofoblastos nas artérias maternas e está envolvido na gênese da PE (NAGAMATSU *et al.*, 2004; ROMERO *et al.*, 2008).

## **JUSTIFICATIVA**

É sabido que a alta ingestão materna de sódio pode afetar o estresse oxidativo placentário que é um dos fatores que estão correlacionados com o desenvolvimento fetal e hipertensão programada durante a vida intrauterina. Tendo em vista que a incidência de hipertensão e suas complicações têm aumentado nos países em desenvolvimento, se faz necessário a compreensão da fisiopatologia destas doenças visando medidas de tratamento e também de manobras que resultem em redução dos custos para os serviços públicos de saúde.

## **OBJETIVOS**

### **Geral**

Investigar o papel do estresse oxidativo e angiogênese placentária no desenvolvimento fetal em ratas submetidas a sobrecarga de sódio

### **Específicos**

Investigar, em ratas submetidas à sobrecarga de sódio e vitamina E ou tempol, os seguintes parâmetros:

- níveis de estresse oxidativo placentário
- Expressão do receptor Flt1 na placenta
- peso fetal e placentário
- estresse oxidativo hepático fetal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALBI, A.P.; COSTA R.S.; COIMBRA T.M. Postnatal renal development of from rats mothers that received increased sodium intake. **Pediatric Nephrology**, v.19, n.11, p.1212-1218, 2004.
- BARFORD, D. The role of cysteine residues as redox-sensitive regulatory switches. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 14, n. 6, p. 679–86, 2004.
- BARKER D.J.P.; MARTYN C.N.; OSMOND C.; HALES C.N.; FALL C.H.D. Growth in utero and serum cholesterol concentrations in adult life. **British Medical Journal**, v. 307, n. 6918, p. 1524–7, 1993.
- BARKER, D.J.P. Fetal origins of coronary heart disease. **British Medical Journal**, v. 311, n. 6998, p. 171–4,1995.
- BEAUSÉJOUR, A.; AUGER, K.; ST-LOUIS, J.; BROCHU, M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. **American Journal Physioly Heart and Circulatory Physiology**, v. 285, n. 1, p. 375–383, 2003.
- BEAUSÉJOUR, A.; BIBEAU, K.; LAVOIE, J.C.; ST-LOUIS, J.; BROCHU, M. Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia. **Placenta**, v. 28, n. 1, p. 52-58, 2007.
- BERTRAM C.E. & HANSON M.A. Annual models and programming of metabolic syndrome. **British Medical Bulletin**, v. 60, n. 1, p. 103–121, 2001.
- BINDER, N.D.; LAIRD, M.R.; FABER, J.J. Interrelationships between the renin angiotensin system and uteroplacental blood flow—a recent perspective. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 6, p. 1437–1442, 1995.
- BLACKBURN, H. AND PRINEAS, R. Diet and hypertension: anthropology, epidemiology, and public health implications. **Progress in Biochemical Pharmacology**, v. 19, p. 31–79, 1983.
- CABRAL, E.V.; VIEIRA-FILHO, L.D.; SILVA, P.A.; NASCIMENTO, W.S.; AIRES, R.S.; OLIVEIRA, F.S.; LUZARDO, R.; VIEYRA, A.; PAIXÃO, A.D. Perinatal Na<sup>+</sup> overload programs raised renal proximal Na<sup>+</sup> transport and enalapril-sensitive alterations of Ang II signaling pathways during adulthood. **PLoS One**, v. 7, n. 8, p. 43–791, 2012.

- CARDOSO, H.D.; CABRAL, E.V.; VIEIRA-FILHO, L.D.; VIEYRA, A.; PAIXÃO, A.D. Fetal development and renal function in adult rats prenatally subjected to sodium overload. **Pediatric Nephrology**, v. 24, n. 10, p. 959–65, 2009.
- CARR, D.B.; EPPLEIN, M.; JOHNSON, C.O.; EASTERLING, T.R.; CRITCHLOW, C.W. A sister's risk: family history as a predictor of preeclampsia. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 193, n. 3, p. 965–972, 2005.
- DUVEKOT, J.J.; PEETERS, L.L.; Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 49, n. 12, p.830–9, 1994.
- FOWDEN, A.L.; GIUSSANI, D.A.; FORHEAD, A.J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. **Physiology**, v. 21, p. 29–37, 2006.
- FOWDEN, A.L. Endocrine regulation of fetal growth. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 3, p. 351–363, 1995.
- GARLAND, H.O.; ATHERTON, J.C.; BAYLIS, C.; MORGAN, M.R.; MILNE, C.M. Hormone profiles for progesterone, oestradiol, prolactin, plasma renin activity, aldosterone and corticosterone during pregnancy and pseudopregnancy in two strains of rat: correlation with renal studies. **Journal of Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 435–44, 1987.
- GOUMANS, M. J.; VALDIMARSDOTTIR, G.; ITOH, S.; ROSENDAH, A.; SIDERAS, P.; DIJKE, P. TEN. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. **Embo Journal**, v. 21, n. 7, p. 1743–1753, 2002.
- GURON, G.S.; GRIMBERG, E.S.; BASU, S.; HERLITZ, H. Acute effects of the superoxide dismutase mimetic tempol on split kidney function in two-kidney one-clip hypertensive rats. **Journal of Hypertension**, v. 24, n. 2, p. 387–94, 2006.
- HALL, J.E. The renin-angiotensin system: renal actions and blood pressure regulation. **Compr Ther**, v. 17, n. 5, p. 8–17.

- HOFFMANN, D.S.; WEYDERT, C.J.; LAZARTIGUES, E.; KUTSCHKE, W.J.; KIENZLE, M.F.; LEACH, J.E.; SHARMA, J.A.; SHARMA, R.V.; DAVISSON, R.L. Chronic Tempol Prevents Hypertension, Proteinuria, and Poor Feto-Placental Outcomes in BPH/5 Mouse Model of Preeclampsia. **Hypertension**, v. 51, n. 4, p. 1058–65, 2008.
- IOSIPIV, I.V.; SCHROEDER, M. A role for angiotensin II AT1 receptors in ureteric bud cell branching. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 285, n. 2, p. 199–207, 2003.
- JISHAGE, K.; TACHIBE, T.; ITO, T.; SHIBATA, N.; SUZUKI, S.; MORI, T.; HANI, T.; ARAI, H.; SUZUKI, H. VITAMIN E. Is Essential for Mouse Placentation but Not for Embryonic Development Itself. **Biology of Reproduction**, n. 73, n. 5, p. 983–7, 2005.
- KALENGA, M.K.; DE GASPARO, M.; THOMAS, K.; HERTOUGH, R.de. Angiotensin II and its different receptor subtypes in placenta and fetal membranes. **Placenta**, England, v. 17, n. 2–3, p. 103–110, 1996.
- KASIMANICKAM, R.K.; KASIMANICKAM, V.R.; RODRIGUEZ, J.S.; PELZER, K.D.; SPONENBERG, P.D.; THATCHER, C.D. Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 8:86. 2010.
- KOLEGANOVA, N.; PIECHA, G.; RITZ, E.; BECKER, L.E.; MÜLLER, A.; WECKBACH, M.; NYENGAARD, J. R.; SCHIRMACHER, P.; GROSS-WEISSMANN, M. L. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. **American Journal Physiology Renal Physiology**, v. 301, n. 2, p. 344–354, 2011.
- LASSEGUE, B.; CLEMPUS, R.E. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation **American. Journal. Physiology. Regulatory. Integrative. Comparative. Physiology**, v. 285, n. 2, p. 277–297, 2003.
- LARESGOITI-SERVITJE, E.; GOMEZ-LOPEZ, N. The Pathophysiology of Preeclampsia Involves Altered Levels of Angiogenic Factors Promoted by Hypoxia and Autoantibody-Mediated Mechanisms. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 2, p. 1–7, 2012.



- LELKES, P.I.; HAHN, K.L.; SUKOVICH, D.A.; KARMIOL, S.; SCHMIDT, D.H. On the possible role of reactive oxygen species in angiogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 454, p. 295–310, 1998.
- LEANDRO, S.M.; FURUKAWA, L.N.; SHIMIZU, M.H.; CASARINI, D.E.; SEGURO, A.C.; PATRIARCA, G.; COELHO, M.S.; DOLNIKOFF, M.S.; HEIMANN, J.C. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin-angiotensin system. **Physiology & Behavior**, v. 3, n. 95, p. 145–151, 2008.
- MAGALHÃES, J.C.; DA SILVEIRA, A.B.; MOTA, D.L.; PAIXÃO, A.D. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. **Experimental Physiology**, v. 91, n. 3, p. 611–9, 2006
- MANNING, J.; VEHASKARI, V.M. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. **Pediatric Nephrology**, v. 16, n. 5, p. 417–22, 2001
- MANNING, J.; VEHASKARI, V.M. Postnatal modulation of prenatally programmed hypertension by dietary Na and ACE inhibition. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 1, p. 80–84, 2005.
- MENETON, P.; JEUNEMAITRE, X.; DE WARDENER, H.E.; MACGREGOR, G.A. Links Between Dietary Salt Intake, Renal Salt Handling, Blood Pressure, and Cardiovascular Diseases **Physiological Reviews**, v. 85, p. 679–715, 2005.
- MYATT, L. Placental adaptive responses and fetal programming. **Journal of Physiology (London)**, v. 572, p. 25–30, 2006.
- MYATT, L.; CUI, X. Oxidative stress in the placenta. **Histochem Cell Biol**, v. 122, n. 4, p. 369–382, 2004.
- MURPHY, V.E.; SMITH, R.; GILES, W.B.; CLIFTON, V.L. Endocrine Regulation of Human Fetal Growth: The Role of the Mother, Placenta, and Fetus **Endocrine Reviews**, v. 27. N. 2, p. 141–169, 2006.

- NAGAMATSU, T.; FUJII, T.; KUSUMI, M.; ZOU, L.; YAMASHITA, T.; OSUGA, Y.; MOMOEDA, M.; KOZUMA, S.; TAKETANI, Y. Cytotrophoblasts Up-Regulate Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase-1 Expression under Reduced Oxygen: An Implication for the Placental Vascular Development and the Pathophysiology of Preeclampsia. **Endocrinology**, v. 145 n. 11 p. 4838–4845, 2004.
- NISHIYAMA, A.; YOSHIKUMI, M.; HITOMI, H.; KAGAMI, S.; KONDO, S.; MIYATAKE, A.; FUKUNAGA, M.; TAMAKI, T.; KIYOMOTO, H.; KOHNO, M.; SHOKOJI, T.; KIMURA, S.; ABE, Y.J. The SOD mimetic tempol ameliorates glomerular injury and reduces mitogen-activated protein kinase activity in Dahl salt-sensitive rats. **American Society of Nephrology**, v. 15, n. 2, p. 306–15, 2004
- NIGAM, S.K.; APERIA, A.C.; BRENNER, B.M. Development and maturation of the kidney. Rector FC (eds) *The kidney: physiology and pathology*, 5th edn. **W.B Saunders**, p 72–98, 1996
- OKADA, T.; TERANISHI, K.; CHEN, Y.; TOMORI, T.; STRASSER, A.; LENZ, F.A.; MCCARRON, R.M.; SPATZ, M. Reversal of Postischemic Hypoperfusion by Tempol: Endothelial Signal Transduction Mechanism. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 4, p. 680–8, 2012
- PHILLIPS, D.I.W. Insulin resistance as a programmed response to fetal undernutrition. **Diabetologia**, v. 39, n. 9, p. 1119–22, 1996.
- PHYLLIS, A.D. Oxidative stress in development: Nature or nurture? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, n. 7, p. 1147–1151, 2010.
- ROMERO, R.; NIEN, J.K.; ESPINOZA, J.; TODEM, D.; FU, W.; CHUNG, H.; KUSANOVIC, J.P.; GOTSCH, F.; EREZ, O.; MAZAKI-TOVI, S.; GOMEZ, R.; EDWIN, S.; CHAIWORAPONGSA, T.; LEVINE, R.J.; KARUMANCHI, A. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble VEGF receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small-for-gestational-age neonate. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 21, n. 1, p. 9–23, 2008

- ROY-CLAVEL E.; SERGE P.; JEAN ST-LOUIS.; BROCHU, M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats **American Journal Obstetric Gynecology**, v. 180, n. 3, p. 608–13, 1999.
- SAINTONGE, J.; ROSSO, P. Placental blood flow and transfer of nutrient analogs in large, average, and small guinea pig littermates. **Pediatric Research**, v. 15, n. 2, p. 152–156, 1981.
- STAUBLE, B.; BOSCOBOINIK, D.; TASINATO A.; AZZI, A. Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D-a-tocopherol in vascular smooth muscle cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 226, n. 2, p. 393–402, 1994.
- STEEGERS, E.A; VON, DADELSZEN P.; DUVEKOT, J.J.; PIJNENBORG, R. Pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 376, n. 9741, p. 631–644, 2010.
- TAKAHASHI H., YOSHIKA M., KOMIYAMA Y. AND NISHIMURA M. The central mechanism underlying hypertension: a review of the roles of sodium ions, epithelial sodium channels, the renin–angiotensin–aldosterone system, oxidative stress and endogenous digitalis in the brain. **Hypertension Research**, v. 34, p. 1147–1160, 2011.
- TUFRO-MCREDDIE, A.; ROMANO, L.M.; HARRIS, J.M.; FERDER, L.; GOMEZ, R.A. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. **The American Journal of Physiology**, v. 269, n. 2, p. 110–115, 1995.
- USHIO-FUKAI, M.; TANG, Y.; FUKAI, T.; DIKALOV, S.I.; MA, Y.; FUJIMOTO, M.; QUINN, M.T.; PAGANO, P.J.; JOHNSON, C.; ALEXANDER, R.W. Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. **Circulation Research**, v. 91, n. 12, p. 1160–1167, 2002.
- URAKAWA, H.; KATSUKI, A.; SUMIDA, Y.; GABAZZA, E.C.; MURASHIMA, S.; MORIOKA, K.; MARUYAMA, N.; KITAGAWA, N.; TANAKA, T.; HORI, Y.; NAKATANI, K.; YANO, Y.; ADACHI, Y. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 10, p.4673–4676, 2003

- VIDONHO, A.F.J.R.; DA SILVA, A.A.; CATANOZI, S.; ROCHA, .JC.; BEUTEL, A.; CARILLO, B.A.; FURUKAWA, L.N.; CAMPOS, R.R.; DE TOLEDO BERGAMASCHI, C.M.; CARPINELLI, A.R.; QUINTÃO, E.C.; DOLNIKOFF, M.S.; HEIMANN, J.C. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. **Pediatric Research**, v. 56, n. 6, p. 842–848, 2004.
- VIEIRA-FILHO, L.D.; CABRAL, E.V.; SANTOS, F.T.J.; COIMBRA, T.M.; PAIXÃO, A.D.O. Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. **Pediatric Nephrology**, v. 26, n. 11, p. 2019–29, 2011
- WOLF, R.; WOLF, D.; RUOCCO, V. Vitamin E: the radical protector. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 10, n. 2, p. 103–17, 1998
- WANG, A.; RANA, S.; KARUMANCHI, S.A. Preeclampsia: The Role of Angiogenic Factors in Its Pathogenesis **Physiology**, v. 24, p. 147–158, 2009.
- XIA, Y.; WEN, H.Y.; KELLEMS, R.E. Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24601–24608, 2002.
- ZHONG, J.; GUO, D.; CHEN, C.B.; WANG, W.; SCHUSTER, M.; LOIBNER, H.; PENNINGER, J.M.; SCHOLEY, J.W.; KASSIRI, Z.; OUDIT, G.Y. Prevention of Angiotensin II–Mediated Renal Oxidative Stress, Inflammation, and Fibrosis by Angiotensin-Converting Enzyme 2. **Hypertension**, v. 57, n. 2, p. 314–322, 2011.
- YOSYPIV, I.V.; BOH, M.K.; SPERA, M.A.; EL-DAHR, S.S. Downregulation of Spry-1, an inhibitor of GDNF/Ret, causes angiotensin II-induced ureteric bud branching. **Kidney International**, v. 74, n. 10, p. 1287–1293, 2008.
- YOSYPIV, I.V. Renin–angiotensin system in ureteric bud branching morphogenesis: insights into the mechanisms. **Pediatric Nephrology**, v. 26, n. 9, p. 1499–1512, 2011.

## **Artigo submetido ao periodico Placenta**

### **Sodium overload or antioxidant treatments affect markers of angiogenesis and oxidative stress in the placenta and alter fetal hepatic oxidative stress in rats**

N.E. Ribeiro<sup>a</sup>, L.D. Vieira-Filho<sup>b</sup>, E.V. Cabral<sup>b</sup>, D.R.M. Gonçalves<sup>b</sup>, L.P.N.C. Borges<sup>b</sup>, A.F. Soares<sup>a</sup>, A.D.O. Paixão<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Dom Manoel of Medeiros Street, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, Recife, Av. Prof<sup>o</sup>. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670 901, Recife, PE, Brazil.

Corresponding author at: Ana D. O. Paixão, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670 901, Recife, PE, Brasil.

Tel: + 55 81 2126 8530

Fax: +558121268976

Email: adpaixao@ufpe.br

## **Abstract**

The hypothesis that the levels of oxidative stress in the placenta and the fetal liver are correlated was investigated by maternal NaCl supplementation and/or treatment with antioxidants. To clarify in part how these treatments affect oxidative stress in the fetal liver, a marker of placental angiogenesis was measured: the expression of flt-1, the type 1 receptor for VEGF. Dams were treated with 1.8% NaCl in the drinking water from 20 days before and throughout pregnancy.  $\alpha$ -Tocopherol, tempol or both were administered during pregnancy. The NaCl supplement diminished flt-1 expression and the level of malonyldialdehyde (MDA) and increased the level of reduced glutathione (GSH) in placenta and fetal liver.  $\alpha$ -Tocopherol and tempol also diminished flt-1 expression in the placentas of control rats;  $\alpha$ -tocopherol also increased it in saline-treated dams but tempol did not.  $\alpha$ -Tocopherol led to an additional reduction in MDA levels in the placentas and fetal livers of saline treated rats, but diminished the GSH levels in these organs. Tempol increased MDA in both the placentas and fetal livers of the saline treated rats and reduced the GSH level in fetal liver. On the basis of these results, it is concluded that: (i) reduction in flt-1 was linked to lowered MDA, except in rats treated with tempol; (ii) the paradoxical pro-oxidant action of tempol in NaCl-supplemented rats indicates that antioxidant capacity is limited under this treatment; (iii) there was a parallel between the pattern of oxidative stress in placenta and fetal liver, indicating that the placenta could have a role in the genesis of intrauterine-programmed diseases.

Keywords: fetal development, oxidative stress, placenta, flt-1 expression, sodium overload

## 1. Introduction

The fetal origin of subsequent metabolic and cardiovascular diseases has been evidenced in clinical studies [1-4] and by experimental findings [5-7]. Maternal high salt intake during the perinatal period changes renal function in rats during adult life [8-11] and has been shown to increase blood pressure in the offspring [12,13]. One common factor between NaCl supplementation [14] and other causes of intrauterine-programmed disease, such as maternal undernutrition [15], seems to be increased oxidative stress in the placenta. Increased oxidative stress in the kidneys [10,15] or vessels [13,16] is also common to adult offspring born from these mothers.

It is known that NaCl supplementation changes the hormonal status of the amniotic fluid and this influences fetal development [17]. However, placental oxidative stress could be one way in which utero-placental vessel resistance is decreased, reducing blood flow and nutrient supply to the fetus. Placental oxidative stress can also influence fetal development through epigenetic mechanisms [18]. On the other hand, in addition to its antioxidant effect,  $\alpha$ -tocopherol has angiogenic effects in the placenta and enhances fetal nutrition [19,20]. Tempol is not angiogenic but acts as an antioxidant since it is a superoxide dismutase mimetic [21]. We have shown that  $\alpha$ -tocopherol administered to undernourished mothers prevents the increment of hepatic oxidative stress in the fetuses and leads to a recovery of renal development [22].

Since intrauterine-programmed diseases could be attributable to placental oxidative stress, this work was undertaken to investigate the hypothesis of a direct correlation between the patterns of oxidative stress in the placenta and in the fetal liver. Maternal NaCl supplementation and treatment with  $\alpha$ -tocopherol and tempol were used to change placental oxidative stress. To clarify in part how these treatments affect fetal liver oxidative stress, a marker of placental angiogenesis was measured: expression of flt-1, the type 1 receptor for VEGF.

## 2. Materials and Methods

*2.1. Materials.* (+)- $\alpha$ -Tocopherol acetate, 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (tempol), thiobarbituric acid, L-cysteine, 1,1,3,3-tetraethoxy-propane (malonyldialdehyde), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) and trypsin inhibitor (type II-S) were purchased from Sigma-Aldrich. Rabbit anti-flt-1 antibody was obtained from Santa Cruz Biotechnology. Nitrocellulose membranes and horseradish peroxidase-conjugated antibody were obtained from GE Healthcare. All other reagents were of the highest purity available.

*2.2. Animals.* Female Wistar rats were used throughout the study. The experimental procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco. Rats were maintained in a 12:12 h light/dark cycle at  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $55 \pm 5\%$

humidity. Female rats, 70 days old, weighing 210 to 250 g, were randomly allocated to receive tap water ad libitum - the control dams (C) - or 1.8% saline - the saline group (S) – until the 20<sup>th</sup> day of pregnancy. All rats were maintained on a standard diet (Purina Agribands, Paulinia, SP, Brazil) *ad libitum*. They were mated at 90 days and the first pregnancy day was detected by the presence of a vaginal plug. Corn oil, the  $\alpha$ -tocopherol vehicle (V, 1 ml/kg body weight daily by gavage),  $\alpha$ -tocopherol (Toc, 350 mg/kg body weight daily by gavage, [23]), tempol (T, 30 mg/kg body weight daily dissolved in drinking water [24]), or both antioxidants (Toc and T) were administered throughout pregnancy until the 20<sup>th</sup> day. Depending on the parallel treatment with antioxidant, C and S dams were designated CV (n = 5), SV (n = 6), CToc (n = 7), SToc (n = 6), CT (n = 7), ST (n = 7), CTocT (n = 6) and STocT (n = 6). Dams were weighed every three days, while diet and water intake were measured daily. The prescribed tempol concentration was adjusted on the basis of daily fluid intake. Pregnancy was interrupted on the 20<sup>th</sup> day under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg body weight i.p.) to obtain the maternal livers, the placentas of the fetal males and their respective fetuses. The tissues were immediately weighed and transferred to 1.15% KCl in an ice bath. Some of placental tissues were treated differently: the decidua were removed and the villous bundles together with the labyrinth were used. The tissue was immediately placed in a cold isotonic solution (described below) to be subjected to western blotting for flt-1 evaluation. The fetuses were weighed and their livers were promptly harvested and also transferred to 1.15% KCl in an ice bath.

*2.3. Measurement of flt-1 expression.* The villous bundles/labyrinths were homogenized in a cold isotonic solution (0.25 M sucrose; 0.01 M HEPES; 0.002 M EDTA; 0.15 mg/L trypsin inhibitor; 0.001M PMSF, pH 7.6) in an IKA RW20 tissue grinder at 1,200 rpm for 2 min in an ice bath. Protein, 80  $\mu$ g, solubilized in a loading buffer containing SDS 2.5% (w/v), was subjected to SDS-PAGE (10%). The separated proteins were transferred to nitrocellulose membranes. Non-specific binding was prevented by incubating the membranes with 5% non-fat milk diluted in phosphate buffered saline containing 0.1% Tween 20 (PBS-T, pH 7.6) for 1 h. The membranes were probed with rabbit anti-flt-1 antibody (1:200 dilution) overnight at 4°C with gentle stirring, washed three times with PBS-T, exposed for 1h to peroxidase-conjugated secondary antibody against rabbit (1:1000 dilution) at room temperature, washed and visualized using ECL. Scion Image for Windows Alpha 4.0.3.2 (Scion Corporation), available at [www.scioncorp.com](http://www.scioncorp.com), was used for densitometry. Protein expression was normalized for protein load using Ponceau Red staining.

*2.4. Measurement of oxidative stress markers.* The tissues were homogenized in 1.15% KCl (1g tissue/5 ml) using an IKA RW20 tissue grinder at 1,200 rpm for 2 min in an ice bath. The levels of MDA were measured according to [25] with some modifications. Briefly, the homogenate was incubated with thiobarbituric acid in the presence of acetic acid and SDS for 60 min at 100 °C.



After chilling, butanol was added to the mixture, the tubes were centrifuged and the absorbance of the supernatant was measured at 535 nm. For the standard curve, 1,1,3,3-tetraethoxypropane was used. Levels of reduced glutathione (GSH) were assessed as non-protein sulfhydryl groups [26]. TCA (5%) was used to precipitate protein from the tissue homogenates (1g tissue/5 ml 1.1% KCl). The protein-free supernatant was incubated with 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) in Tris-EDTA buffer solution, pH 8.9, for 5 min at room temperature. L-cysteine was used for the standard curve and the absorbance was read at 412 nm. Both the MDA and GSH results were corrected for protein concentration measured by the Folin phenol method [27].

*2.5. Statistical analysis.* The results are presented as mean  $\pm$  SEM. Differences between groups were analyzed using one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls test. Kruskal-Wallis followed by Dunn's test was used to analyze the western blots. GraphPad Prism 5 software (Version 5.01, GraphPad Software) was used for all statistical analyses. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### **3. Results**

Maternal NaCl supplementation and antioxidants changed flt-1 expression in the placenta (Fig. 1). The maternal NaCl supplement reduced flt-1 expression (compare SV vs. CV).  $\alpha$ -Tocopherol, tempol and both antioxidants administered simultaneously also reduced flt-1 expression in the placentas of control rats (Compare CToc, CT and CTocT, respectively, vs. CV). In contrast, in the placentas of saline-fed rats,  $\alpha$ -tocopherol increased flt-1 expression (compare SToc vs SV and CV), while neither tempol nor both antioxidants administered simultaneously changed this parameter (compare ST and STocT, respectively, vs SV and CV).

Neither the NaCl supplement nor the antioxidants changed the maternal body weight gain during pregnancy (Table 1), nor did they change the dietary intake (data not shown), which was around  $19 \pm 1$  g per day. Water intake (data not shown) by control dams was around  $79 \pm 4$  ml per day and saline intake was around  $113 \pm 7$  ml. The antioxidant treatments did not change the fluid intake. Fetal and placental weights were not affected by NaCl supplementation or by the antioxidants (Table 1).

On the other hand, maternal NaCl supplementation reduced MDA levels in the placenta and the fetal liver while it increased the levels of GSH in the same organs (Table 2, compare SV vs. CV).  $\alpha$ -Tocopherol reduced the levels of MDA in the placenta and in the fetal liver in both the control (Table 2, compare CToc vs. CV) and saline-fed (Table 2, compare SToc vs. SV) groups. However, in control rats,  $\alpha$ -tocopherol augmented GSH levels in both organs (Table 2, compare CToc vs. CV), while in saline-fed rats it diminished this antioxidant defense (Table 2, compare SToc vs. SV). The only effect of tempol on the control group was to augment GSH levels in the

maternal placenta (Table 2, compare CToc vs. CV). In the saline-fed group it increased MDA in the placenta and fetal liver and diminished GSH in the fetal liver. When both antioxidants were administered simultaneously, GSH was increased in the placentas of control dams (Table 2, compare CTocT vs. CV) but MDA was increased in the placentas of saline dams (Table 2, compare STocT vs. SV).

Markers of oxidative stress were measured in maternal liver for comparison with the placenta.  $\alpha$ -Tocopherol diminished MDA and increased GSH in control dams (Table 3, compare CToc vs. CV) and decreased MDA in dams supplemented with NaCl (Table 3, compare SToc vs. SV). Tempol increased GSH in control dams (Table 3, compare CT vs. CV), while both antioxidants were diminished MDA in the livers of dams supplemented with NaCl (Table 3, compare STocT vs. SV).

#### **4. Discussion**

The present results show that while one week on a 1.8% NaCl supplement in the drinking water leads to increased levels of oxidative stress markers [15, 28], a longer period, from 20 days before and throughout pregnancy, leads to increased levels of GSH and reduced levels of MDA in the placenta and fetal liver. Furthermore, contrary to previous evidence showing a reduction in dietary intake that leads to lowered fetal weight [28], the tendency to reduced dietary intake that would lead to fetal undernutrition was not seen, perhaps owing to the longer exposure to the NaCl supplement. Besides the increased GSH, the reduced levels of MDA in the placenta and fetal liver of dams under sodium overload might be attributable to the reduced supply of oxygen consequent on compromised angiogenesis, as demonstrated by the reduced flt-1 expression in the placenta (Fig. 1).

The reduction of flt-1 in the placentas of control rats treated with  $\alpha$ -tocopherol, tempol, or both antioxidants simultaneously (Fig. 1) is consistent with findings that superoxide anions promote angiogenesis [29]; antioxidants have antiangiogenic effects [30], though there are contrasting with reports showing that  $\alpha$ -tocopherol increases VEGF and placental angiogenesis when administered to ewes during late gestation [31]. It is not clear yet whether these discrepancies are due to differences in species or the length of treatment. In contrast, in saline-treated rats,  $\alpha$ -tocopherol, which is known to have antioxidant and genic effects, did not add to the reduction of flt-1 expression by saline treatment but had a contrary effect. Nor did tempol contribute to reducing flt-1 expression in the saline-treated rats; it did not change flt-1 expression in these animals. It could be assumed that the extremely low levels of MDA in the placentas and fetal livers of the SToc group (Table 2) contributed to increased angiogenesis. This assumption is based on the fact that tempol, which did not increase flt-1, increased MDA in the placentas and fetal livers of the ST group (Table 2). This paradoxical effect of tempol indicates that the antioxidant profile presented by saline-fed rats might be limited. Tempol has a

pro-oxidant effect when it is administered in high dosage, as reviewed in [32]; or, in vitro, when there is a lack of vitamin C [33]. However, this was not the case in the present study, where the one dosage used (30 mg/kg/day) has been reported to reduce superoxide production in the placentas of pregnant rats treated with an antiangiogenic factor [24]. Furthermore, there is a report that tempol dosage from 20 to 60 mg/kg/day, in a rat pre-eclamptic model, increases the vasodilator effect of acetylcholine [34].

The vulnerability to increased oxidative stress in dams supplemented with NaCl was also evident in the liver, where  $\alpha$ -tocopherol and tempol had characteristic antioxidant effects in control dams but not in saline-fed dams (Table 3). This finding is consistent with reports showing that a high salt diet for four or two weeks increases NADPH oxidase activity in the skeletal muscle microcirculation [35] and the renal cortex [36, 37]; it is also consistent with a finding that a 1% NaCl supplement for 45 days increases MDA in the kidneys of male rats [38]. It seems possible that high salt intake increases an endogenous digitalis, marinobufagenin, which is responsible for sodium-induced natriuresis [39] but increases oxidative stress [40, 41]. As in the placenta and maternal liver, the vulnerability of NaCl-supplemented fetuses to tempol indicates an exhausted antioxidant reservoir that will be manifested during adulthood [10]. We have also observed that maternal NaCl supplementation imprints in the offspring an increment of the  $\alpha$ -subunit of (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)ATPase in the basolateral membranes of proximal tubules [10].

Overall, it may be concluded that: (i) NaCl supplementation reduced flt-1 in the placenta and MDA in both placenta and fetal liver; (ii) the reduction in flt-1 was linked to lowered MDA, except in rats treated with tempol; (iii) although  $\alpha$ -tocopherol diminished flt-1 in the control rat placentas, it increased flt-1 in NaCl-supplemented rats; (iv) the paradoxical pro-oxidant action of tempol in NaCl-supplemented rats could indicate that although MDA was decreased and GSH increased, antioxidant capacity is limited under sodium overload; (v) there was a parallel between the patterns of placental and fetal liver oxidative stress, indicating that the placenta could have a role in the genesis of intrauterine-programmed diseases.

## **Acknowledgements**

This work was supported by grants from the National Institutes of Science and Technology, CNPq, Facepe, UFPE and CAPES (Brazil). Editing and English corrections of the manuscript by BioMedES (UK) are also acknowledged.

## References

- [1] Lackland DT, Bendall HE, Osmond C, Egan BM, Barker DJ. Low birth weights contribute to high rates of early-onset chronic renal failure in the Southeastern United States. *Arch Intern Med.* 2000;160(10):1472–6.
- [2] Lackland DT, Egan BM, Fan ZJ, Syddall HE. Low birth weight contributes to the excess prevalence of end-stage renal disease in African Americans. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2001;3(1):29–31.
- [3] Painter RC, Roseboom TJ, van Montfrans GA, Bossuyt PM, Krediet RT, Osmond C, et al. Microalbuminuria in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16(1):189–94.
- [4] de Rooij SR, Painter RC, Phillips DI, Osmond C, Michels RP, Godsland IF, et al. Impaired insulin secretion after prenatal exposure to the Dutch famine. *Diabetes Care.* 2006;29(8):1897–901.
- [5] Burns SP, Desai M, Cohen RD, Hales CN, Iles RA, Germain JP, et al. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest.* 1997;100(7):1768–74.
- [6] Desai M, Byrne CD, Meeran K, Martenz ND, Bloom SR, Hales CN. Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rat dams fed a reduced-protein diet. *Am J Physiol.* 1997;273(4 Pt 1):899–904.
- [7] Manning J, Vehaskari VM. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr Nephrol.* 2001;16(5):417–22.
- [8] Marin EC, Balbi AP, Francescato HD, Alves da Silva CG, Costa RS, Coimbra TM. Renal structure and function evaluation of rats from dams that received increased sodium intake during pregnancy and lactation submitted or not to 5/6 nephrectomy. *Ren Fail.* 2008;30(5):547–55.
- [9] Cardoso HD, Cabral EV, Vieira-Filho LD, Vieyra A, Paixão AD. Fetal development and renal function in adult rats prenatally subjected to sodium overload. *Pediatr Nephrol.* 2009;24(10):1959–65.
- [10] Cabral EV, Vieira-Filho LD, Silva PA, Nascimento WS, Aires RS, Oliveira FS, et al. Perinatal Na<sup>+</sup> overload programs raised renal proximal Na<sup>+</sup> transport and enalapril-sensitive alterations of Ang II signaling pathways during adulthood. *PLoS One.* 2012;7(8):43–791.
- [11] Coimbra TM, Francescato HD, Balbi AP, Marin EC, Costa RS. Renal Development and Blood Pressure in Offspring from Dams Submitted to High-Sodium Intake during Pregnancy and Lactation. *Int J Nephrol.* 2012;(2012):919128.
- [12] Contreras RJ, Wong DL, Henderson R, Curtis KS, Smith JC. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. *PhysiolBehav.* 2000;71(1-2):173–81.

- [13] Piecha G, Koleganova N, Ritz E, Müller A, Fedorova OV, Bagrov AY, et al. High salt intake causes adverse fetal programming--vascular effects beyond blood pressure. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(9):3464–76.
- [14] Beauséjour A, Bibeau K, Lavoie JC, St-Louis J, Brochu M. Placental oxidative stress in a rat model of preeclampsia. *Placenta*. 2007;28(1):52–8.
- [15] Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, Luzardo R, Einicker-Lamas M, Cardoso HD, et al. Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. *ClinExpPharmacol Physiol*. 2009;36(12):1157–63.
- [16] Franco Mdo C, Akamine EH, Di Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB, Tostes RC, et al. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res*. 2003;59(3):767–75.
- [17] Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Becker LE, Müller A, Weckbach M, et al. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(2):344–54.
- [18] Rexhaj E, Bloch J, Jayet PY, Rimoldi SF, Dessen P, Mathieu C, Tolsa et al. Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(1):247–52.
- [19] Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Rodriguez JS, Pelzer KD, Sponenberg PD, Thatcher CD. Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8–86.
- [20] Zingg JM, Meydani M, Azzi A.  $\alpha$ -Tocopheryl phosphate--an activated form of vitamin E important for angiogenesis and vasculogenesis? *Bio factors*. 2012 ;38(1):24–33.
- [21] Hoffmann DS, Weydert CJ, Lazartigues E, Kutschke WJ, Kienzle MF, Leach JE, et al. Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor feto-placental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension*. 2008;51(4):1058–65.
- [22] Vieira-Filho LD, Cabral EV, Santos FT, Coimbra TM, Paixão AD. Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. *PediatrNephrol*. 2011;26(11):2019–29.
- [23] Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, Santos FT, Luzardo R, Oliveira FS, et al. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal  $\alpha$ -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys*. 2011;505(1):91–7.
- [24] Tam Tam KB, Lamarca B, Arany M, Cockrell K, Fournier L, Murphy S, et al. Role of reactive oxygen species during hypertension in response to chronic antiangiogenic factor (sFlt-1) excess in pregnant rats. *Am J Hypertens*. 2011;24(1):110–3.
- [25] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95(2):351–8.

- [26] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25(1):192–205.
- [27] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265–75.
- [28] Fedorova OV, Simbirtsev AS, Kolodkin NI, Kotov AY, Agalakova NI, Kashkin VA, et al. Monoclonal antibody to an endogenous bufadienolide, marinobufagenin, reverses preeclampsia-induced Na/K-ATPase inhibition and lowers blood pressure in NaCl-sensitive hypertension. *J Hypertens.* 2008;26(12):2414–25.
- [29] Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Reactive oxygen species promote angiogenesis in the infarcted rat heart. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(6):621-9.
- [30] Miyazawa T, Tsuzuki T, Nakagawa K, Igarashi M. Antiangiogenic potency of vitamin E. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1031:401-4.
- [31] Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Rodriguez JS, Pelzer KD, Sponenberg PD, Thatcher CD. Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010;8:86.
- [32] Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev.* 2008;60(4):418–69.
- [33] May JM, Qu ZC, Juliao S, Cobb CE. Ascorbic acid decreases oxidant stress in endothelial cells caused by the nitroxide tempol. *Free Radic Res.* 2005;39(2):195–202.
- [34] Talebianpoor MS, Mirkhani H. The effect of tempol administration on the aortic contractile responses in rat preeclampsia model. *ISRN Pharmacol.* 2012;2012:187–208.
- [35] Lenda DM, Boegehold MA. Effect of a high-salt diet on oxidant enzyme activity in skeletal muscle microcirculation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(2):H395-402.
- [36] Kitiyakara C, Chabrashvili T, Chen Y, Blau J, Karber A, Aslam S, et al. Salt intake, oxidative stress, and renal expression of NADPH oxidase and superoxide dismutase. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(11):2775-82.
- [37] Johns EJ, O'Shaughnessy B, O'Neill S, Lane B, Healy V. Impact of elevated dietary sodium intake on NAD(P)H oxidase and SOD in the cortex and medulla of the rat kidney. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010;299(1):R234-40.
- [38] Magalhães JC, da Silveira AB, Mota DL, Paixão AD. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Exp Physiol.* 2006;91(3):611-9.
- [39] McCarty MF. Marinobufagenin and cyclic strain may activate endothelial NADPH oxidase, contributing to the adverse impact of salty diets on vascular and cerebral health. *Med Hypotheses.* 2012;78(2):191–6.
- [40] Priyadarshi S, Valentine B, Han C, Fedorova OV, Bagrov AY, Liu J, et al. Effect of green tea extract on cardiac hypertrophy following 5/6 nephrectomy in the rat. *Kidney Int.* 2003;63(5):1785–90.

[41] Kennedy DJ, Vetteth S, Periyasamy SM, Kanj M, Fedorova L, Khouri S, et al. Central role for the cardiotonic steroid marinobufagenin in the pathogenesis of experimental uremic cardiomyopathy. *Hypertension*. 2006;47(3):488–95.

**Table 1**

Maternal and fetal weight data

	Maternal weight gain, (g)	<i>n</i>	Fetal body weight, (g)	<i>n</i>	Placental weight, (g)	<i>n</i>
CV	91.80 ± 4.7	5	3.88 ± 0.14	10	0.62 ± 0.03	10
SV	81.17 ± 4.9	6	3.68 ± 0.12	14	0.61 ± 0.01	14
CToc	85.57 ± 7.1	7	4.20 ± 0.11	11	0.60 ± 0.02	11
SToc	76.33 ± 4.0	6	3.82 ± 0.21	12	0.61 ± 0.03	12
CT	92.29 ± 6.6	7	3.90 ± 0.06	14	0.58 ± 0.01	14
ST	75.57 ± 7.8	7	3.90 ± 0.14	15	0.60 ± 0.02	15
CTocT	96.20 ± 8.9	5	4.05 ± 0.07	11	0.54 ± 0.01	11
STocT	62.00 ± 7.4	6	4.05 ± 0.09	9	0.54 ± 0.01	9

CV, CToc, CT and CTocT are control dams, treated during pregnancy, respectively, with  $\alpha$ -tocopherol vehicle (V),  $\alpha$ -tocopherol (Toc), tempol (T) or  $\alpha$ -tocopherol + tempol (TocT); SV, SToc, ST and STocT are dams maintained from 20 days before and throughout pregnancy with 1.8% NaCl supplement and treated, during pregnancy, with the same antioxidants as the control group. Each dam is represented with at least one placenta/fetus. From some of them, two placentas/fetuses were used.

Results are mean ± SEM.



**Table 2**

Markers of oxidative stress in the placenta and in the fetal liver

	MDA <sup>a</sup> , nmol/mg protein				GSH <sup>b</sup> , nmol/mg protein			
	Placenta	<i>n</i>	Fetal liver	<i>n</i>	Placenta	<i>n</i>	Fetal liver	<i>n</i>
CV	0.71 ± 0.07	8	0.68 ± 0.07	8	11.36 ± 0.55	10	18.47 ± 1.32	1 0
SV	0.54 ± 0.03*	12	0.45 ± 0.03*	11	17.27 ± 1.11*	13	23.43 ± 0.99*	1 2
CToc	0.35 ± 0.04*	10	0.41 ± 0.05*	10	19.24 ± 0.65*	12	27.41 ± 0.99*	1 2
SToc	0.29 ± 0.02†	10	0.26 ± 0.02†	10	10.13 ± 0.33†	12	16.91 ± 1.52†	1 1
CT	0.70 ± 0.05	12	0.66 ± 0.06	12	15.85 ± 0.62*	13	17.81 ± 0.97	1 4
ST	1.10 ± 0.16†	8	0.76 ± 0.02†	8	15.17 ± 0.93*	16	19.74 ± 1.09†	1 4
CToc T	0.63 ± 0.04	12	0.58 ± 0.06	12	18.56 ± 1.19*	12	19.90 ± 1.23	1 2
SToc T	0.73 ± 0.04†	10	0.51 ± 0.06	10	17.22 ± 1.42	11	18.14 ± 1.42	1 1

See description of groups in Table 1. Each dam is represented with at least one placenta/fetus. From some of them, two placentas/fetuses were used.

<sup>a</sup> MDA- malonyldialdehyde

<sup>b</sup> GSH- reduced glutathione

p<0.05: \* vs. CV, † vs. SV.

**Table 3**

Markers of oxidative stress in maternal liver

	MDA, nmol/mg protein		GSH, nmol/mg protein	
		<i>n</i>		<i>n</i>
CV	0.32 ± 0.08	4	10.99 ± 0.84	5
SV	0.31 ± 0.02	5	14.81 ± 1.55	6
CToc	0.15 ± 0.01*	5	17.74 ± 1.75*	6
SToc	0.15 ± 0.01†	5	11.50 ± 0.8	6
CT	0.30 ± 0.04	6	18.26 ± 1.88*	7
ST	0.35 ± 0.01	4	14.52 ± 0.84	7
CTocT	0.26 ± 0.01	5	14.26 ± 0.77	5
STocT	0.28 ± 0.02‡	5	13.35 ± 1.28	6

See description of groups in Table 1

p&lt;0.05: \* vs. CV, † vs. SV.

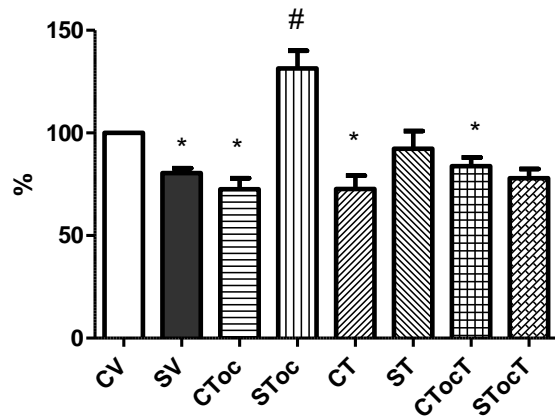


Fig. 1. Effect of NaCl supplement and antioxidants on flt-1 expression in the placenta. The upper part shows a representative immunodetection in a single gel. CV (n=6), CToc (n=6), CT (n=6) and CTocT (n=5) are placentas of control dams, treated during pregnancy, respectively, with  $\alpha$ -tocopherol vehicle (V),  $\alpha$ -tocopherol (Toc), tempol (T) or  $\alpha$ -tocopherol + tempol (TocT); SV (n=7), SToc (n=7), ST (n=7) and STocT (n=6) are placentas of dams maintained from 20 days before and throughout pregnancy with 1.8% NaCl supplement and treated, during pregnancy, with the same antioxidants as the control group. Only one placenta was obtained from each dam, except in there CV and CT groups, where there was one additional placenta per mother. Results are mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs. CV.

## CONCLUSÃO

A suplementação materna com NaCl levou a níveis reduzidos de peroxidação lipídica na placenta, provavelmente porque a angiogênese apresentou-se diminuída e também porque os níveis de glutathiona reduzida apresentaram-se elevados. No entanto, o conjunto de dados indica que a reserva antioxidante materna se apresenta diminuída diante de uma sobrecarga de sódio. Ainda se conclui com os presentes dados que ocorre uma direta correlação entre os níveis de estresse oxidativo na placenta e os níveis de estresse oxidativo no fígado fetal, o que indica que a placenta é uma fonte importante de ânions superóxidos, os quais, já se sabe desempenham papel fundamental na programação de doenças cardiovasculares.

## ANEXOS