

SANDRA MÁRCIA LEANDRO

**Sobrecarga e restrição de sal na dieta durante  
a gestação em ratas Wistar: efeitos sobre o  
sistema renina-angiotensina, função renal,  
resistência à insulina e pressão arterial**

SÃO PAULO

2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SANDRA MÁRCIA LEANDRO

**Sobrecarga e restrição de sal na dieta durante  
a gestação em ratas Wistar: efeitos sobre o  
sistema renina-angiotensina, função renal,  
resistência à insulina e pressão arterial**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de Doutor em  
Ciências

Área de concentração: Nefrologia

Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

SÃO PAULO

2006

*Para meu querido irmão JULIO CÉSAR,  
o maior incentivador para eu seguir  
a carreira científica  
e minha querida irmã ANA FLÁVIA  
sempre presente em todos os momentos da  
minha vida.*

*Para meus queridos pais, JOAQUIM e WALDONI,  
que me ensinaram que a educação é o bem maior que se pode adquirir*

## AGRADECIMENTOS

*Dr. Joel C. Heimann* por ter aceitado me orientar e por ter confiado em mim. Obrigada por todos os ensinamentos e paciência para eu desempenhar esta tarefa. Sua disponibilidade constante e suas palavras de carinho, motivação e de incentivo foram fundamentais para a realização e finalização desta tese.

*Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa* exemplo de paciência, dedicação, e bom humor. Obrigada pelos seus ensinamentos, pela ajuda na realização dos experimentos e discussão e pela sua amizade acima de tudo.

*Dra. Maria Palmira Daflon Gremião* pela orientação na iniciação científica e por ter me dado a base para a carreira acadêmica.

*Ivone Oliveira Braga* pela alegria que trouxe ao nosso laboratório e pela ajuda imprescindível na realização dos experimentos.

*Dra. Dulce E. Casarini e Luciana, da UNIFESP,* pelas dosagens de angiotensinas.

*Dra. Claudia Yrigoyen e Dra. Kátia De Angelis* pelo ensinamento da técnica de microesferas coloridas.

À *Luciana Faria* pela preparação das lâminas para imuno-histoquímica e histologia.

*Dra. Miriam Serman Dolnikoff e Dr. Carlos Nascimento* pela contribuição na interpretação dos resultados.

À *Faculdade de Medicina, em especial ao Dr. Roberto Zatz e Dr. Rui Toledo Barros* por me aceitarem no programa de Pós-graduação da Nefrologia.

Ao *Instituto de Ciências Biomédicas* por ter me aceito inicialmente no programa de Pós-Graduação do Departamento de Farmacologia.

À querida *Heloísa Shimizu* pela sua constante disposição em ajudar e realização das dosagens de TBARS!

A todos do *LIM 10*, em especial *Dra. Marisa, Valéria, Jussara e Dr. Sérgio*, pelo uso constante dos aparelhos para realizar meus experimentos de Biologia Molecular.

Á amiga *Daniele Nunes Ferreira* sempre disposta a ajudar e me incentivar.

À amiga *Dra. Giuliana Patriarca* pelo tempo que convivemos no Laboratório, aprendi muito com você! Obrigada pelas conversas, desabafos e caronas. Obrigada por fazer parte de tudo isso!

*Dra. Michella Soares Coelho Araújo* obrigada por todos conselhos, pelo estímulo, pelas viagens e principalmente por toda a disposição em ajudar a finalizar esta tese e relatório.

Ao pediatra do nosso Laboratório, *Nautilo Lima* que sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas contribuiu muito para a finalização desta tese.

A todos amigos do *Laboratório de Hipertensão Experimental*, *Daniela, Karen, Débora, Volney* e aos alunos que passaram por este laboratório, *Dr. Armando, Dr. Alexandre, Dr. Gilson e Luciene*, a ajuda de vocês foi fundamental.

Á todos do *Laboratório da Dra. Vanda Jorgetti*, em especial à *Fabiana* pelas aulas de dança do ventre que deram mais vida ao nosso Laboratório.

A todos do Laboratório da *Dra. Irene Noronha, Tati, Rita, Arianni, Camile, Camila, Cléo, Becker, Humberto, Dimitri* e em especial ao *Wagner* por toda ajuda estatística e de informática.

*Walter Campestre e Janice Pião* poder contar com vocês foi muito bom. Obrigada pela amizade e pelas palavras de incentivo, vou sentir saudades.

Às amigas *Neide e Denise* pela ajuda constante em toda a burocracia durante o doutorado.

À *todos os Laboratórios do LIM 16*, muito obrigada pela utilização dos aparelhos e cooperação!

As *funcionárias da Biblioteca da FMUSP*, em especial à *Valéria Vilhena e Marinalva de Souza Aragão* pela ajuda na busca e correção das referências bibliográficas e ficha catalográfica.

A *todos meus amigos* que sempre estiveram presente nos momentos alegres e nos momentos difíceis durante estes quatro anos de doutorado!

Às minhas queridas tias *Léo e Zula* por todo amor, preocupações e orações.

À *todos da minha família*, pelo carinho e por acreditar tanto em mim.

Às minhas *ratinhas* porque sem elas a ciência não existiria.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, *FAPESP*, pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

Agradeço a Deus por me ter dado força, tranquilidade e muitos amigos para me ajudar a superar todos os obstáculos.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

SUMMARY

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3 MÉTODOS</b> .....	29
3.1 Animais.....	29
3.2 Protocolo experimental.....	30
3.3 Medidas e dosagens.....	31
3.3.1 Peso corpóreo.....	31
3.3.2 Peso dos fetos e placentas.....	31
3.3.3 Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário.....	31
3.3.4 Implantação de cateteres.....	31
3.3.5 Medida da pressão arterial direta e freqüência cardíaca....	32
3.3.6 Clamp euglicêmico hiperinsulinêmico.....	32
3.3.6.1 Determinação da insulinemia.....	33
3.3.7 Avaliação da função renal.....	33
3.3.7.1 Creatinina sérica, fração de excreção de sódio e potássio.....	33
3.3.7.2 Clearance de lítio.....	34
3.3.8 Avaliação do sistema renina-angiotensina.....	35
3.3.8.1 Medida da atividade da renina plasmática.....	35
3.3.8.2 Medida da atividade da enzima conversora de angiotensina.....	35
3.3.8.3 Quantificação de angiotensinas I, II e 1-7 plasmáticas e tecidual.....	37
3.3.8.3.1 Preparação do coquetel de inibidores de peptidases.....	37
3.3.8.3.2 Procedimento para coleta do sangue e da	

placenta.....	37
3.3.8.3.3 Quantificação de angiotensinas I e II plasmática e tecidual.....	38
3.3.8.4 Expressão gênica dos componentes do sistema renina angiotensina.....	38
3.3.8.4.1 Extração de RNA total.....	39
3.3.8.4.2 Reação de transcriptase reversa.....	40
3.3.8.4.3 Reação de polimerase em cadeia.....	41
3.3.9 Expressão gênica do fator de necrose tumoral.....	42
3.3.10 Medida do fluxo sanguíneo uterino, placentário e renal...	42
3.3.10.1 Microesferas coloridas.....	42
3.3.10.2 Técnica.....	43
3.3.10.3 Preparação dos reagentes.....	43
3.3.10.4 Processamento dos tecidos e sangue.....	44
3.3.10.5 Cálculos.....	45
3.3.11 Índice de peroxidação lipídica.....	46
3.3.12 Imuno-histoquímica para Bax.....	47
3.3.12.1 Processamento dos tecidos para análise histopatológica.....	47
3.3.12.2 Processamento para imuno-histoquímica.....	47
3.3.12.3 Técnica de imuno-histoquímica.....	48
3.3.12.4 Técnica estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina.	48
3.3.13 Análise estatística.....	50
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
4.1 Peso corpóreo.....	51
4.2 Peso dos fetos e placentas.....	52
4.3 Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário.....	54
4.4 Pressão arterial média.....	54
4.5 Frequência cardíaca.....	55
4.6 Sensibilidade à insulina.....	56
4.7 Função renal e consumo de ração e água.....	60
4.8 Sistema renina-angiotensina.....	63

4.9 Fluxo sanguíneo, débito cardíaco e resistência vascular periférica.....	75
4.10 Índice de peroxidação lipídica.....	77
4.11 Imuno-histoquímica para Bax.....	77
<b>5 RESUMO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>80</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>81</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>94</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>95</b>
<b>9 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG I: Angiotensina I

ANG II: Angiotensina II

AT1: Receptor de angiotensina II do tipo 1

AT2: Receptor de angiotensina II do tipo 2

ARP: Atividade da renina plasmática

bpm: Batimentos por minuto

cDNA: DNA complementar

*Clamp*: “Clamp” euglicêmico hiperinsulinêmico

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DNAase: Enzima que degrada DNA

dNTP: 2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato

ECA: Enzima conversora de angiotensina I

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EPM: Erro padrão da média

EUA: Estados Unidos da América

FC: Frequência cardíaca

GFAT: Glutamina frutose-6 fosfato amidotransferase

cGMP: Guanosina monofosfato cíclico

HO: Dieta hipossódica

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HR: Dieta hipersódica

IL-6: Interleucina 6

MDA: Malondialdeído

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

NaCl: Cloreto de sódio

NO: Óxido nítrico

NR: Dieta normossódica

PAM: Pressão arterial média

PE: Polietileno

PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoreto

RCIU: Restrição de crescimento intra-uterino

RNA: Ácido ribonucléico

RNAase: Enzima que degrada RNA

ROS: Espécies reativas de oxigênio

RT-PCR: Transcriptase reversa e reação em cadeia da polimerase

SNS: Sistema nervoso simpático

SRA: Sistema renina angiotensina

TBARS: Espécies reativas com ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa

11- $\beta$  HSD: Enzima 11- $\beta$  hidroxisteróide desidrogenase

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da implantação do blastocisto....	12
Figura 2	Placenta de camundongo.....	12
Figura 3	Peso corpóreo das ratas não grávidas e grávidas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	42
Figura 4	Peso corpóreo dos fetos e peso das placentas das ratas na 3ª semana de gestação submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	44
Figura 5	Pressão arterial média nas ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de vida.....	46
Figura 6	Frequência cardíaca nas ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	47
Figura 7	Glicemia nas ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	48
Figura 8	Captação periférica de glicose nas ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de vida.....	49

Figura 9	Fração de excreção de sódio e potássio nas ratas não grávidas e grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de vida.....	51
Figura 10	Atividade da renina plasmática em ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	55
Figura 11	Angiotensina I e angiotensina II em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	58
Figura 12	Expressão do gene (mRNA) do receptor AT1 em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	63
Figura 13	Índice de peroxidação lipídica em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	82
Figura 14	Quantificação de Bax em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	83
Figura 15	Expressão de Bax em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	84

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Sensibilidade à insulina, insulinemia e glicemia de jejum de ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade..... 50
- Tabela 2 Função renal, consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário de ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade..... 53
- Tabela 3 Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) tecidual e plasmática em ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade..... 57
- Tabela 4 Expressão dos genes do sistema renina angiotensina no rim de ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade..... 60
- Tabela 5 Expressão dos genes do sistema renina angiotensina no coração de ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade..... 62
- Tabela 6 Expressão dos genes do sistema renina angiotensina e TNF- $\alpha$  em placentas de ratas Wistar submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade..... 64

Tabela 7	Fluxo sanguíneo placentário, uterino e renal e resistência vascular periférica e débito cardíaco em ratas Wistar grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.....	67
----------	--	----

## RESUMO

Leandro SM. São Paulo, 2006. Sobrecarga e restrição de sal na dieta durante a gestação em ratas Wistar: efeitos sobre o sistema renina-angiotensina, função renal, resistência à insulina e pressão arterial. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Diversos estudos epidemiológicos têm relacionado doenças na vida adulta, como diabetes tipo-2 e hipertensão, e ambiente inadequado durante a vida fetal. Fatores distintos relacionados aos hábitos alimentares, como ingestão de sal na dieta, podem ter impacto importante no período perinatal. Recentemente, demonstramos que dieta hipossódica (HO) durante a gestação está associada com baixo peso ao nascimento e alterações na vida adulta. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da dieta HO e hipersódica (HR) durante gestação em ratas. Ratas Wistar foram alimentadas com dieta HO, dieta normossódica ou HR desde a 8ª semana e foram acasaladas com 12 semanas de idade. Estes animais foram estudados na terceira semana de gestação e um grupo adicional de ratas virgens foi estudado como controle para o efeito da gestação. O peso da placenta e o do feto e o fluxo sangüíneo uterino foram menores e a resistência vascular periférica foi maior no grupo HO. Maior peroxidação lipídica e expressão gênica do receptor AT1 na placenta foram observadas no grupo HR. Em conclusão, peso do feto, peso da placenta e fluxo sangüíneo uterino são influenciados pelo consumo de sal durante a gestação.

**Descritores:** 1. Sódio 2. Prenhez 3. Placenta 4. Fluxo sangüíneo regional 5. Sistema renina-angiotensina 6. Ratos Wistar

## SUMMARY

Leandro SM. São Paulo, 2006. Dietary salt overload or restriction during gestation in Wistar rats: effects on the renin-angiotensin system, renal function, insulin resistance and blood pressure. Thesis. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Many epidemiological studies have linked diseases in adulthood, such as type-2 diabetes and hypertension, to adverse intrauterine environment during fetal life. Distinct factors related to dietary habits, such as salt intake, may have a major impact on the perinatal period. Recently, we have demonstrated that low-salt diet (LSD) during pregnancy is associated with low birth weight and diseases during adulthood. The aim of this study was to evaluate the effect of LSD and high-salt diet (HSD) during pregnancy in rats. Female Wistar rats were fed with LSD, normal-salt diet or HSD since 8 weeks of age and mated with 12 weeks of age. These animals were studied at the third week of gestation and one additional group of virgin rats was evaluated as a control for the gestation effect. Placenta and fetus weight and uterine blood flow were lower and peripheral vascular resistance was higher in the LSD group. In the placenta from HSD rats, higher lipid peroxidation and AT1 receptor mRNA were observed. In conclusion, fetal weight, placenta weight and uterine blood flow are influenced by the degree of salt consumption during pregnancy.

**Descriptors:** 1. Sodium 2. Pregnancy, Animal 3. Placenta 4. Regional blood flow 5. Renin-angiotensin system 6. Rats, Wistar

## 1 INTRODUÇÃO

Barker et al. em 1989 demonstraram, num estudo epidemiológico realizado na Inglaterra e no País de Gales, que homens nascidos entre 1911 e 1930 com baixo peso apresentam maior risco de morte por doenças isquêmicas cardíacas na vida adulta. Da mesma forma, Osmond et al. (1993) analisaram registros de nascimento de homens e mulheres com idade acima de 40 anos e verificaram uma associação entre baixo peso ao nascimento e hipertensão na idade adulta. Em outro trabalho, Barker et al. (1990) demonstraram também que o peso da placenta acompanhado por baixo peso ao nascimento é preditivo de doenças na vida adulta. Este estudo coletou informações como condições físicas, psicológicas e nutricionais maternas, peso da placenta e medidas antropométricas do recém-nascido dos prontuários de pacientes nascidos entre 1935 e 1943, na cidade de Preston na Inglaterra.

Além das doenças cardiovasculares, o baixo peso ao nascimento também está associado a maior probabilidade de desenvolvimento da síndrome plurimetabólica (hipertensão, diabetes, obesidade e dislipidemia) na prole na vida adulta (Barker, 1999, 2001). Tais associações foram descritas em populações com diferentes idades, gêneros e etnias (Fowden et al., 2006) e são independentes do estilo de vida e estatura na idade adulta.

Estudos epidemiológicos subseqüentes (Moore et al., 1999; Persson e Jansson, 1992) comprovaram os achados de Barker et al. e mostraram que adaptações fetais a um ambiente intra-uterino inadequado (desnutrição materna e/ ou fetal) podem levar a doenças na vida adulta. Segundo a teoria de Barker (1999), o feto pode sofrer adaptações fisiológicas, neuroendócrinas ou metabólicas para conseguir sobreviver em um período intra-uterino inadequado. As adaptações, que acontecem durante o desenvolvimento fetal, podem levar a uma reprogramação permanente na proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento dos tecidos e órgãos, resultando em doenças na vida adulta.

O aporte de nutrientes é um dos fatores mais importantes que regula o desenvolvimento e crescimento fetal. Sendo assim, a desnutrição fetal pode ocorrer no momento em que a demanda é maior que a oferta de nutrientes ao feto. Esta oferta pode estar comprometida quando a mãe é desnutrida ou na vigência de uma insuficiência placentária. Por outro lado, a demanda pode elevar-se em resposta a um crescimento fetal acelerado (Barker, 2001).

Os mecanismos responsáveis pela associação do baixo peso ao nascimento e doenças na vida adulta ainda não são totalmente conhecidos. Uma das possíveis explicações para o baixo peso ao nascimento é a insuficiência placentária com conseqüente redução no aporte de oxigênio e nutrientes para o feto. Alexander (2003) demonstrou que ratas grávidas submetidas à diminuição da perfusão uterina, levando à insuficiência placentária, tiveram recém-nascidos de baixo peso que desenvolveram hipertensão na vida adulta. Este autor conjecturou que o baixo peso destes animais predispõe a doenças na vida adulta como hipertensão. Em outro estudo do mesmo Laboratório e no mesmo modelo experimental, Payne et al. (2003) observaram vasoconstrição e hipertensão nos animais na vida adulta. Esta disfunção endotelial observada na vida adulta é devida à inibição do relaxamento vascular dependente de NO observada nestes animais. Em modelo de baixo peso ao nascimento por desnutrição materna, Franco et al. (2003) também observaram disfunção endotelial em circulação mesentérica e incremento na pressão arterial em ratos na vida adulta que foram revertidos por tratamento com anti-oxidantes (vitaminas C e E).

Diante de um quadro de desnutrição materna, um outro mecanismo descrito na literatura é a redução da atividade da enzima 11 beta-hidroxisteróide-desidrogenase ( $11\beta$ -HSDE) na placenta, o que resulta em um aporte elevado de glicocorticóides ao feto. Este evento pode ser responsável por alterações morfofuncionais que poderiam explicar alguns dos fenômenos observados na vida adulta (Edwards et al., 1993).

Adicionalmente, alterações no metabolismo de insulina e glicose na vida adulta também podem ocorrer em resposta à desnutrição materna

(Forsen et al., 2000). Experimentos em animais indicam que a restrição de crescimento fetal, devido à desnutrição protéica materna, pode estar ligada à deficiência na secreção de insulina devido à redução na vascularização das células das ilhotas pancreáticas (Snoeck et al., 1990). O estudo epidemiológico de Mi et al. (2000), na população de Beijing, verificou que o baixo peso ao nascimento está associado a maior pressão arterial, maior concentração plasmática de insulina, glicose e triacilgliceróis na idade adulta. Neste estudo, também foi verificado que a oferta de aminoácidos e ácidos graxos ao feto está comprometida na vigência de desnutrição materna. Estes estudos sugerem que desnutrição materna durante a gravidez e baixo peso ao nascimento estão associados à resistência à insulina e à reduzida tolerância à glicose na prole durante a vida adulta.

As doenças que se manifestam na fase adulta dependem do período da gravidez em que ocorre a desnutrição. A desnutrição materna no final da gestação pode levar a uma diminuição do crescimento dos rins devido ao comprometimento da replicação das células renais e conseqüente diminuição permanente do seu número (Hinchliffe et al., 1992). Menor número de néfrons e a supressão do sistema renina-angiotensina do recém-nascido, observado em diversos estudos, demonstram ser os principais fatores que levam à hipertensão na vida adulta em animais que apresentaram baixo peso ao nascimento (Mackenzie et al., 1995; Woods et al., 2001). Outros estudos demonstraram que a desnutrição materna causa retenção de sódio e água em indivíduos cujos rins têm menor número de glomérulos, o que resulta em maior pressão arterial (Woods e Rasch, 1998; Woods, 2000).

Além da desnutrição materna, existem outros fatores nutricionais que podem desencadear várias desordens tanto no feto quanto na mãe. Um destes fatores considerados relevantes, mas pouco estudado, é a variação do conteúdo de sal na dieta durante a gestação. Em nosso laboratório, Silva et al. (2003) demonstraram que a prole adulta de ratas Wistar que receberam dieta hipersódica durante a gravidez e lactação apresentaram maior pressão arterial, menor peso corpóreo, menor sensibilidade à pressão

arterial ao sal, além de um aumento no conteúdo renal de angiotensina II e ausência de atividade moduladora de renina plasmática em resposta a variações no consumo de sal na dieta. Uma hipótese para explicar estes resultados poderia ser uma mudança na morfologia renal da prole. Esta mudança poderia ser desencadeada pela diminuição da angiotensina II materna em resposta ao aumento de sal na dieta, uma vez que a angiotensina II é importante na nefrogênese (Wolf, 2002).

Em estudo posterior realizado neste laboratório, Vidonho et al. (2004) verificaram que a restrição de sal na dieta durante a gestação e lactação está associado com menor peso ao nascimento e menor sensibilidade à insulina da prole na vida adulta. Battista et al. (2002) também observaram que prole de ratas submetidas à dieta hipossódica durante a última semana de gestação apresentaram restrição de crescimento intra-uterino (RCIU). Neste último estudo, também foi demonstrada maior pressão arterial na vida adulta, em ambos os sexos, hipertrofia cardíaca nas fêmeas e alterações no sistema renina-angiotensina (SRA) e na função renal nos machos.

A relação entre restrição de sal na dieta materna durante a gestação e baixo peso da prole ao nascimento poderia ser decorrente da ativação do sistema renina-angiotensina materno (Binder et al., 1995; Hagemann et al., 1994). É sabido que a angiotensina II inibe a invasão trofoblástica podendo comprometer a função placentária e a nutrição fetal (Xia et al., 2002) causando baixo peso ao nascimento. Além disso, Holcberg et al. (2001) mostraram que angiotensina II aumenta a liberação do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) no sobrenadante de cotilédones isolados de fetos normais. TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que pode contribuir para a constrição do leito vascular placentário e conseqüente isquemia fetal (Holcberg et al., 2001). Da mesma forma, a angiotensina II através do receptor AT1 é capaz de estimular a produção de superóxido por ativar a enzima NADPH oxidase. Esta produção excessiva de radicais livres pela placenta pode afetar a função placentária uma vez que altera a proliferação e diferenciação trofoblástica e a reatividade vascular contribuindo para a patogênese da pré-eclâmpsia e RCIU (Myatt e Cui, 2004). Portanto, estes

mecanismos podem ser uma explicação para o baixo peso ao nascimento no grupo que recebeu dieta com restrição de sal observado por Vidonho et al. (2004).

Além da ativação do sistema renina-angiotensina, a dieta hipossódica aumenta a atividade do sistema nervoso simpático (Folkow e Ely, 1987). Uma conjectura é que a ativação do sistema nervoso simpático pode provocar alterações hemodinâmicas na circulação útero-placentária comprometendo a nutrição fetal.

Um terceiro fator pelo qual a restrição de sal pode comprometer a nutrição fetal é uma diminuição do volume extracelular e perfusão tecidual incluindo o complexo útero-placentário (Roy-Clavel et al., 1999).

Portanto, vários mecanismos podem estar envolvidos na nutrição fetal deficiente em decorrência da variação no consumo de sal na dieta durante a gestação. Em função dos resultados obtidos neste Laboratório e os estudos da literatura (Binder et al., 1995; Hagemann et al., 1994; Xia et al., 2002; Holcberg et al., 2001) é plausível considerar a importância da participação do SRA vinculado às alterações intra-uterinas com conseqüentes efeitos na prole na vida adulta na vigência de sobrecarga ou restrição de sal na dieta materna.

## **Placenta**

Por muito tempo a placenta foi considerada um canal passivo que não fornecia informação clinicamente relevante sobre o desenvolvimento do feto. Entretanto, este ponto de vista não é mais sustentado pelos recentes estudos que mostram que a placenta pode dar indicações específicas do grau de comprometimento fetal (Sibley et al., 2005).

Deve-se ressaltar que a placenta consiste dos componentes fetal e materno (Ishikawa et al., 2006) sendo sua principal função a nutrição do feto por intermédio da difusão de nutrientes e oxigênio do sangue materno para o sangue fetal (Poisner, 1998). Além disso, ela é responsável pela difusão de produtos de excreção do feto para a mãe, propicia uma interface imune entre a mãe e o feto e é uma fonte de muitos peptídeos e hormônios esteróides,

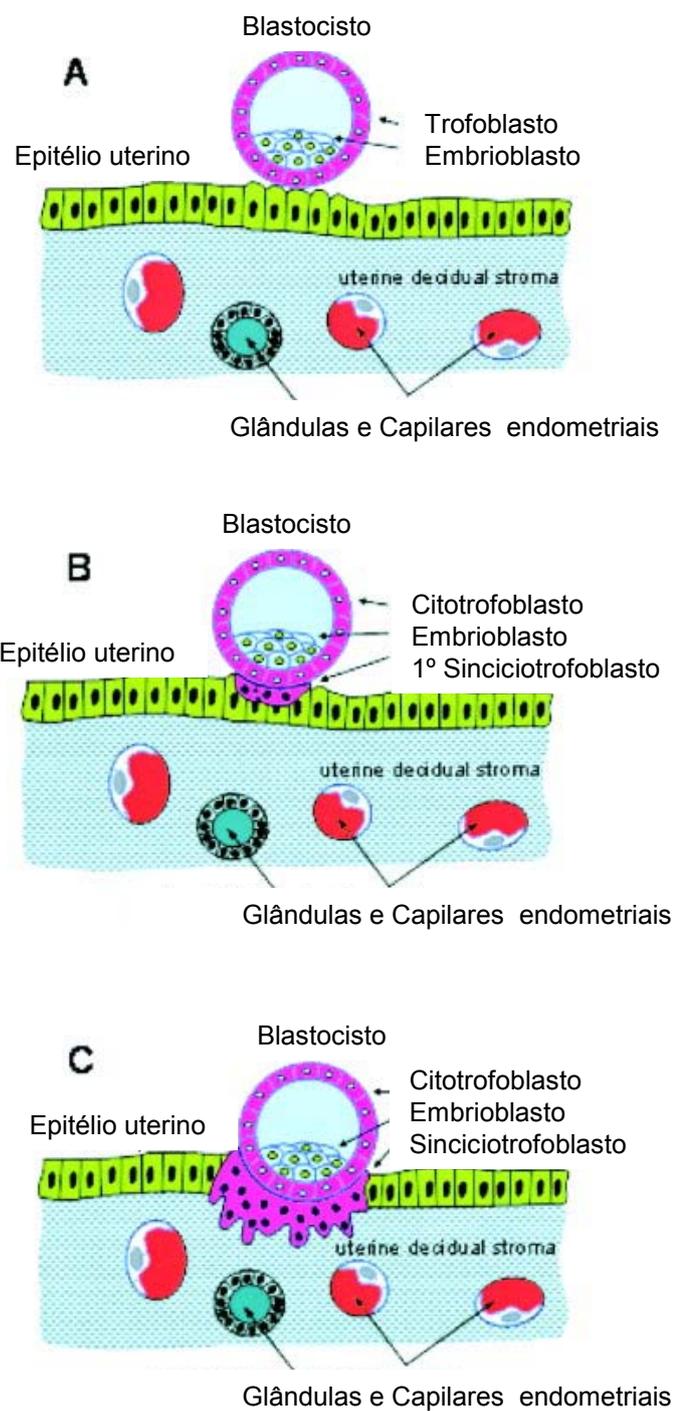
os quais exercem influência no metabolismo e desenvolvimento do feto (Myatt, 2006).

Estudos recentes demonstram uma correlação entre crescimento fetal e peso do feto e da placenta em diferentes espécies (humanos, roedores, coelhos e porcos) (Sanin et al., 2001; Gilbert and Leturque, 1982; Bruce and Abdul, 1973; Wootton et al., 1977). Alguns autores sugerem que este reduzido crescimento fetal está associado com alterações na transferência de nutrientes através da placenta (Sibley et al., 2005). Baixo peso ao nascimento pode estar associado à modificação na expressão e atividade de transportadores de aminoácidos dependentes de sódio, como é o caso do sistema A (Myatt, 2006).

Smith et al. (1997) observaram em placentas humanas que a apoptose pode ser um importante determinante no peso e função da placenta e no crescimento fetal. A maioria dos casos de restrição de crescimento intrauterino é atribuída a um inapropriado crescimento placentário (Regnault et al., 2002; Heinonen et al., 2001). Estudos evidenciaram um aumento de apoptose placentária que pode estar associado com alterações no tamanho e arquitetura interna do órgão (Sibley et al., 2005). Estudos realizados em ovelhas indicam que baixo peso ao nascimento também está relacionado à diminuição do crescimento da placenta (Wallace et al., 1996) por diminuição da proliferação celular placentária e/ ou aumento de apoptose na fase de crescimento placentário (Lea et al., 2005).

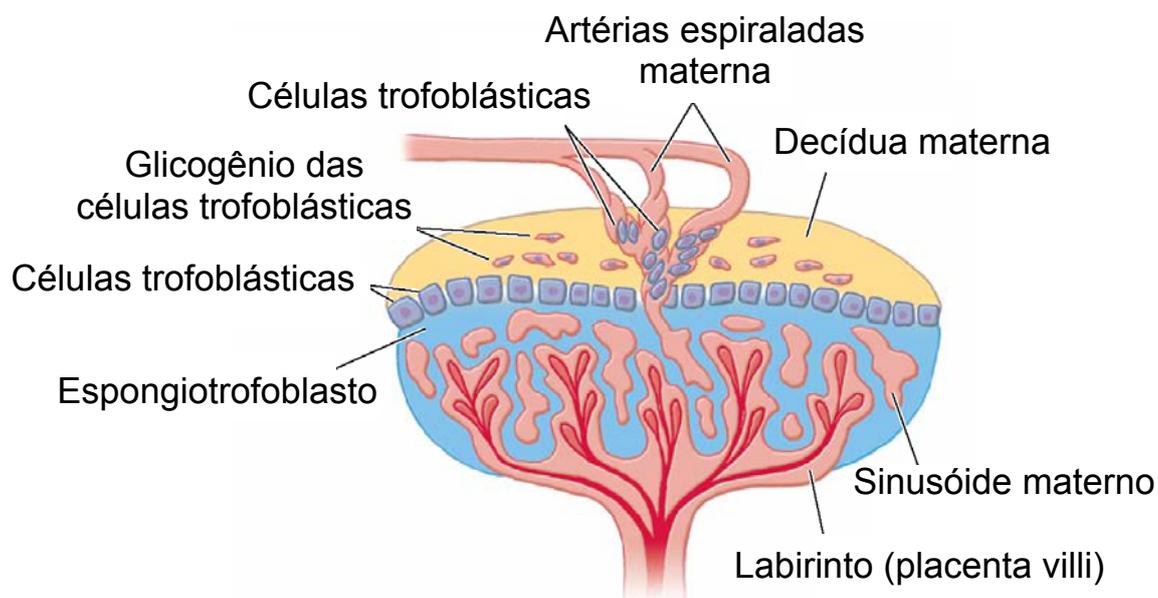
Em modelo de pré-eclâmpsia e RCIU é observado aumento da peroxidação lipídica na placenta, o qual é considerado um marcador do estresse oxidativo. O estresse oxidativo ocorre quando há aumento na geração de ROS e/ou diminuição dos antioxidantes de defesa do organismo, em resposta a um estado de hipóxia. O superóxido gerado pelas mitocôndrias da placenta é uma das principais fontes de ROS (Gupta et al., 2005). Assim sendo, a hipóxia e o estresse oxidativo podem alterar o desenvolvimento da placenta, modificando a programação fetal (Myatt, 2006).

O desenvolvimento e a implantação placentária normal são necessários para que ocorra um desenvolvimento e crescimento normal do feto. O desenvolvimento do embrião humano, antes da implantação no útero, é caracterizado por um aumento na divisão celular e a implantação acontece quando o embrião atinge o estágio de blastocisto (Figura 1A). O blastocisto, que é o ovo em divisão celular, alcança o útero e permanece na cavidade uterina antes de implantar-se no endométrio, ocorrendo assim a invasão trofoblástica. Células trofoblásticas, que são células mononucleadas que se desenvolvem na superfície do blastocisto, secretam enzimas proteolíticas, que digerem e liquefazem as células adjacentes do endométrio uterino. O líquido e os nutrientes, assim liberados, são ativamente transportados pelas mesmas células trofoblásticas para o interior do blastocisto, contribuindo assim para seu sustento e crescimento. Quando o feto se implanta no endométrio, a progesterona, secretada pela placenta, faz com que estas células se tornem mais volumosas e armazenem os nutrientes. Estas células são denominadas células decíduais enquanto a massa total formada pelas mesmas é conhecida como decídua (Huppertz e Herrler, 2005). As células da decídua têm importante papel na implantação e nutrição do embrião e acredita-se que estas células produzam fatores que controlam a invasão trofoblástica e protejam o embrião da rejeição pelo sistema imune materno (Fazleabas e Strakova, 2002). As células do trofoblasto, ao iniciar a invasão do endométrio, diferenciam-se em duas camadas: uma interna, o citotrofoblasto (Figura 1B), formado por células mononucleadas e outra externa, o sinciotrofoblasto (Figura 1C), por sua vez formado por células multinucleadas (Huppertz & Herrler, 2005). Uma vez ocorrida a implantação, a camada interna irá originar o feto e a camada externa, o trofoblasto, essencial para o desenvolvimento da placenta (Figura 2).



**Figura 1** – Representação esquemática da implantação do blastocisto.

*Birth Defects Res C, 2005; 75:249-261.*



**Figura 2** – Placenta de camundongo. *Physiology*, 2005; 20:180-193.

A placenta é uma unidade altamente especializada, constituída por vários tipos de células que estão envolvidas na estrutura e função das trocas materno-fetais. Ela consiste de duas regiões distintas morfológica e funcionalmente conhecidas como zona basal e labirinto. A zona basal inclui as células trofoblásticas gigantes e o espongiotrofoblasto e está envolvida na secreção de hormônios e de fatores angiogênicos, de crescimento vascular endotelial e de remodelamento tecidual. Por outro lado, a zona labirinto é o maior local de transferência de nutrientes entre o espaço sangüíneo materno e o fetal (Ishikawa et al., 2006).

Na placenta humana, a primeira barreira de troca materno-fetal é o sinciciotrofoblasto, um epitélio de transporte que cobre a vilosidade placentária a qual se projeta para dentro do sangue materno do espaço intervilososo. As vilosidades compreendem uma rede de capilares derivadas da circulação fetal (Sibley et al., 2005). O sangue do feto flui por duas artérias umbilicais, perfundindo os capilares das vilosidades e retornando ao feto através da veia umbilical. O sangue materno flui das artérias espiraladas da parede uterina para os grandes sinusóides que circundam as vilosidades e retorna pelas veias uterinas da mãe (Han e Carter, 2001).

Além de hormônios e diversos fatores de crescimento, a placenta humana produz e secreta vários fatores pró-inflamatórios incluindo citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e prostaglandinas (Lappas et al., 2005). Entretanto, o papel das citocinas placentárias não é bem conhecido. Postula-se que as citocinas liberadas da placenta para a circulação sistêmica materna contribuem para as alterações metabólicas materna no final da gestação, para suprir as necessidades energéticas do feto neste período (Hauguel-de-Mouzon e Guerre-Millo, 2006).

A placenta, como a maioria dos tecidos, também possui um sistema renina-angiotensina tecidual. Do ponto de vista da origem celular, atualmente existem dois SRA na placenta, um no tecido placentário fetal e outro no tecido placentário materno, isto é, na decídua (Shah, 2005). A ativação deste sistema pode ser um mecanismo importante na patogênese de muitas doenças como a pré-eclâmpsia e a RCIU possivelmente por levar a uma deficiência na perfusão útero-placentária. Todos os componentes do SRA já foram identificados na placenta, tanto fetal quanto materna, como o angiotensinogênio, a enzima conversora de angiotensina (ECA) (Sim e Seng, 1984), ECA 2, angiotensina 1-7 (Valdes et al., 2006), angiotensina I, angiotensina II bem como o receptor AT1 (Bédard et al., 2005). É importante ressaltar que na placenta também existe evidência de geração de angiotensina II por via independente da ECA (Svane et al., 1995). Finalmente, Lenz (1996) observou que a concentração de pró-renina é discretamente maior no sangue venoso umbilical do que na artéria, sugerindo assim uma produção de pró-renina pela placenta.

Conforme mencionado, vários estudos verificaram a repercussão de fatores nutricionais incidentes na gestação e no feto sobre fenômenos que ocorrem na vida adulta (Silva et al., 2003; Vidonho et al., 2004). O efeito de distúrbios e/ou alterações nutricionais sobre a gestante é um tema pouco estudado, principalmente no que se refere a sobrecarga e restrição de sal na dieta.

## 2 OBJETIVOS

Diante dos indícios de que fenômenos que ocorrem durante a vida intra-uterina influenciam o desenvolvimento de doenças na vida adulta da prole, os objetivos deste estudo foram:

1. avaliar a função renal, pressão arterial, sensibilidade à insulina e sistema renina-angiotensina durante a gestação em resposta a diferentes conteúdos de sal na dieta.

2. verificar se a ativação ou supressão do SRA durante a gestação, em resposta a alterações na ingestão de sal, modifica o fluxo sanguíneo uterino associado.

3. verificar se o baixo peso ao nascimento da prole de mães que receberam dieta hipossódica durante a gestação é decorrente de um fluxo útero-placentário menor.

### 3 MÉTODOS

Os experimentos realizados neste projeto de pesquisa estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Os experimentos foram aprovados pelos Comitês de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas (Protocolo 166/02) e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolos 933/04 e 653/04).

#### 3.1 Animais

Ratas Wistar fêmeas, com três semanas de idade (recém desmamadas), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram alimentadas com dieta usual (Nuvilab CR1- Colombo, Brasil) até dois meses de idade. Em seguida as ratas foram divididas em três grupos de acordo com a dieta (Harlan Teklad, EUA ou Rhoister, Brasil):

**Hipossódica - HO** (0,15% NaCl e 25% de proteína) ou

**Normossódica - NR** (1,27% NaCl e 25% de proteína) ou

**Hipersódica – HR** (7,94% NaCl e 25% de proteína).

As ratas permaneceram em gaiolas de plástico (quatro animais por gaiola), em ambiente mantido a 25°C, com ciclos claro-escuros fixos (12/12 horas) e receberam dieta e água *ad libitum*.

### 3.2 Protocolo experimental

Este protocolo foi composto por dois grupos, ratas grávidas e ratas não grávidas. No grupo grávidas, as ratas com 3 meses de idade foram acasaladas com ratos Wistar machos que receberam dieta NR desde o desmame (Nuvilab CR1- Colombo, Brasil). Para o acasalamento, uma rata e um rato permaneceram na mesma gaiola durante 3 dias. O 2º dia foi considerado o 1º dia de gravidez e os experimentos foram realizados na segunda e terceira semana de gestação. O método de acasalamento foi considerado satisfatório uma vez que atingiu 66% de sucesso e não houve diferença entre dietas.

No grupo de ratas não grávidas, as ratas não foram fecundadas com a finalidade de estudá-las na ausência de gestação e as medidas foram realizadas com 12 semanas de idade.

As ratas foram pesadas semanalmente desde o desmame até 12 semanas (grupo não grávidas) ou 15 semanas de idade (grupo grávidas).

A pressão intra-arterial foi medida na 12ª semana de idade no grupo não grávidas e na terceira semana de gestação no grupo grávidas.

A medida da sensibilidade à insulina foi realizada por meio do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico (*clamp*) ao final da terceira semana de gestação ou com 12 semanas de idade no grupo não grávidas. Antes do início do *clamp* foi realizada a medida de pressão arterial carotídea. Ao final do *clamp* foram colhidas amostras de sangue do cateter da artéria carótida. Após 24 a 48 horas as ratas foram decapitadas para retirada de amostras de tecidos e coleta de sangue. Os fetos e as placentas foram pesados.

Avaliação da função renal foi realizada por meio do *clearance* de lítio e da creatinina sérica no grupo de ratas não grávidas (11 semanas de idade) e grávidas (segunda semana de gestação). A coleta de sangue foi realizada por punção da veia caudal.

Nas amostras de sangue foram medidas creatinina, lítio, sódio, potássio, angiotensinas e determinação das atividades de renina e da enzima conversora de angiotensina I (ECA). Nas amostras de tecidos - coração, rim e placenta - foi avaliada a atividade da ECA e a expressão

gênica (mRNA) dos componentes do SRA enquanto na placenta foi avaliada também a expressão gênica (mRNA) do TNF- $\alpha$  e quantificado a concentração de angiotensinas neste tecido.

Em um grupo adicional de ratas, a medida do fluxo sanguíneo na artéria uterina foi realizada apenas no grupo de ratas grávidas, no 19º ou 20º dia da gestação. Neste grupo foram verificados o débito cardíaco e a resistência periférica vascular, além da avaliação da massa renal esquerda destas ratas.

### **3.3 Medidas e dosagens**

#### **3.3.1 Peso corpóreo**

O peso corpóreo foi avaliado semanalmente nos animais desde o desmame até a 12ª semana no grupo não grávidas e até a 15ª semana no grupo gestação.

#### **3.3.2 Peso dos fetos e placentas**

Após a decapitação das ratas grávidas, aproximadamente no 20º dia da gestação, os fetos e as placentas foram retiradas e pesadas.

#### **3.3.3 Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário**

O consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário de 24 horas foram medidos após dois dias de adaptação em gaiolas metabólicas nos grupos não grávidas (11 semanas de vida) e grávidas (2ª semana da gestação). Os valores de consumo de ração e ingestão hídrica foram corrigidos pelo peso corpóreo dos animais.

#### **3.3.4 Implantação de cateteres**

Os animais foram anestesiados com 50 mg/kg de cetamina (Ketamin, Cristália, Brasil) associado com 5 mg/kg de xilazina (Rompun, Bayer, Brasil) para implantação de cateteres de polietileno estéreis (PE-50, Intramedic Inc., EUA) na artéria carótida e na veia jugular esquerda. Os cateteres foram exteriorizados entre as escápulas e preenchidos com uma solução de

salina com heparina 500 UI/mL (Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A, Brasil).

Após a cirurgia, os animais foram colocados em gaiolas individuais. O cateter da artéria carótida foi utilizado para medida da pressão arterial e coleta de amostras de sangue e o da veia jugular para a infusão de insulina e glicose durante o *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico.

### **3.3.5 Medida da pressão arterial direta e frequência cardíaca**

As medidas de pressão arterial carotídea e frequência cardíaca foram realizadas em animais acordados e em total liberdade de movimentação em ratas não grávidas com 12 semanas de vida e ratas grávidas na 3ª semana de gestação (15ª semana de vida) após dois dias de recuperação da cirurgia.

As ratas foram colocadas em sala apropriada no período da manhã, para a medida da pressão arterial direta. O cateter da artéria carotídea foi conectado a um transdutor de pressão (Argon, modelo CDX III, EUA), acoplado a um amplificador (Stemtech Inc., GPA-4 modelo 2, EUA), o qual fornece um sinal analógico. Este sinal analógico foi digitalizado e registrado utilizando-se um sistema computadorizado de aquisição e análise dos dados por meio do programa CODAS (DATAQ Instruments Inc., EUA), permitindo a medida contínua da pressão arterial média, sistólica, diastólica e frequência cardíaca após um período de 20 a 30 minutos de acomodação do animal.

### **3.3.6 Avaliação da sensibilidade à insulina (*clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico)**

A sensibilidade à insulina foi avaliada pela técnica do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico descrita por DeFronzo et al. (1979) com adaptações para animal de experimentação.

O *clamp* foi realizado em animais acordados e sem restrição à movimentação. Na manhã do dia do experimento a pressão arterial carotídea foi medida e a ração foi retirada 6 horas antes do início do

experimento. Uma hora antes do início do *clamp* foi coletada amostra de sangue para determinação da glicemia e insulinemia basais.

Uma solução de insulina humana biossintética regular (Novo Nordisk Farmacêutica do Brasil Ltda, Brasil) foi infundida pelo cateter da veia jugular em velocidade constante (3 mU/kg/min), durante 120 minutos. Cinco minutos após o início da infusão da insulina, foi iniciada a infusão de glicose (20 g/100mL), também pelo cateter da veia jugular. A cada 5 minutos foram coletadas amostras de sangue (50 µL) pelo cateter da artéria carótida para determinação da glicemia em glicosímetro (Advantage, Roche, Brasil). A glicemia foi ajustada por meio de variação na velocidade de infusão de glicose para permanecer dentro de uma faixa de variação de mais ou menos 10% do valor da glicemia basal. A utilização periférica da glicose foi considerada igual à quantidade de glicose infundida nos últimos 30 minutos do *clamp*, considerando que a glicemia se mantém constante e a produção de glicose hepática está praticamente inibida (Guignot e Mithieux, 1999).

O hematócrito foi determinado antes e depois do experimento para verificar se houve hemodiluição decorrente das sucessivas coletas de amostras de sangue.

#### **3.3.6.1 Determinação da insulinemia**

O sangue coletado foi imediatamente centrifugado para separação do plasma e estocado a -20°C até o momento da dosagem da insulina.

A dosagem da insulina plasmática foi realizada pelo método de radioimunoensaio descrito por Morgan e Lazarow (1963) utilizando o *kit* da marca Linco (EUA) para ratos.

#### **3.3.7 Avaliação da função renal**

##### **3.3.7.1 Creatinina sérica, fração de excreção de sódio e potássio**

Estas medidas foram realizadas na 11<sup>a</sup> semana de vida no grupo de ratas não grávidas e na segunda semana da gestação no grupo grávidas. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas com ração em pó e água. Após dois dias de adaptação, foi medida a diurese de 24 horas e foram

separadas alíquotas para posterior dosagem de sódio, potássio e creatinina e realizada a coleta de sangue para dosagem de sódio, potássio e creatinina sérica.

A creatinina sérica e urinária foram determinadas pelo método colorimétrico da reação de Jaffé (Slot, 1965). O sódio e potássio urinários e plasmáticos foram determinados utilizando-se o eletrodo de íon seletivo (modelo Codas Integra 700, Roche, Suíça).

### 3.3.7.2 Clearance de lítio

O *clearance* de lítio é um indicador da porcentagem de reabsorção proximal de sódio.

No momento inicial (tempo zero) da medida do *clearance* de lítio, foi administrado, por gavagem, 60  $\mu\text{mol}$  de cloreto de lítio/100g de peso corpóreo (Quadros et al., 1996). Os animais foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas com livre acesso à água potável, mas sem comida por um período de quatro horas. Durante este período foi coletado e medido o volume urinário. Uma amostra de sangue de 2 mL foi coletada por punção caudal para dosagem de creatinina, lítio, sódio e potássio.

A concentração de lítio urinária e sérica foi medida usando um eletrodo de íon seletivo (modelo Codas Integra 700, Roche, Suíça).

Os diversos indicadores de função renal foram calculados conforme segue abaixo:

#### **Clearance de creatinina (mL/min/100g):**

$$\frac{\text{Concentração urinária}_{\text{creatinina}} \times \text{Volume urinário}_{24\text{horas}}}{\text{Tempo de excreção} \times \text{Concentração sérica}_{\text{creatinina}}}$$

O *clearance* foi corrigido pelo peso corpóreo do animal.

#### **Fração de excreção de sódio (%):**

$$\frac{\text{Concentração urinária}_{\text{sódio}} \times \text{Concentração sérica}_{\text{creatinina}}}{\text{Concentração urinária}_{\text{creatinina}} \times \text{Concentração sérica}_{\text{sódio}}}$$

**Fração de excreção de potássio (%):**

$$\frac{\text{Concentração urinária}_{\text{potássio}} \times \text{Concentração sérica}_{\text{creatinina}}}{\text{Concentração urinária}_{\text{creatinina}} \times \text{Concentração sérica}_{\text{potássio}}}$$

**Clearance de lítio (mL/min/100g):**

$$\frac{\text{Concentração urinária}_{\text{lítio}} \times \text{Volume urinário}}{\text{Tempo de excreção} \times \text{Concentração sérica}_{\text{lítio}}}$$

O clearance foi corrigido pelo peso corpóreo do animal.

**Reabsorção proximal de sódio (%):**

$$\frac{(\text{Concentração sérica}_{\text{sódio}} \times \text{Clearance}_{\text{creatinina}}) - (\text{Concentração sérica}_{\text{sódio}} \times \text{Clearance}_{\text{lítio}})}{\text{Concentração sérica}_{\text{sódio}} \times \text{Clearance}_{\text{creatinina}}} \times 100$$

**3.3.8 Avaliação do sistema renina-angiotensina (SRA)****3.3.8.1 Medida da atividade da renina plasmática (ARP)**

As amostras de sangue para dosagem da ARP foram coletadas na 12ª semana de vida no grupo não grávidas e no final da 3ª semana de gestação. Os animais foram sacrificados por decapitação e 2 mL de sangue foi coletado em tubos plásticos contendo 64 µL de anticoagulante EDTA 3,8% pH 5,5. O sangue foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3.000 rpm e o plasma foi armazenado em freezer -20°C para posterior medida da atividade de renina plasmática usando *kit* de radioimunoensaio (CIS Bio International, França) segundo o método descrito por Page et al. (1969).

**3.3.8.2 Medida da atividade da enzima de conversão da angiotensina (ECA) sérica e tecidual**

Para a dosagem da atividade da ECA foi coletada a amostra de sangue de ratas na 12ª semana de vida no grupo não grávidas e no final da 3ª semana de gestação.

Os animais foram sacrificados por decapitação e o sangue foi coletado em tubos de ensaio sem anticoagulante, mantidos em gelo e rapidamente centrifugados a 4°C por 10 minutos a 3.000 rpm. O soro foi

armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até as amostras serem processadas. O tecido renal e cardíaco e as placentas foram coletadas em tubos plásticos, os quais foram colocados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em tampão borato com sacarose na proporção de 1 g de tecido para 10 mL de tampão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos a 2.500 rpm e os sobrenadantes separados e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o seu processamento final.

A atividade da enzima foi determinada em 10  $\mu\text{L}$  de soro (Santos et al., 1985) ou em 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante de homogeneizados de tecidos (Oliveira et al., 2000). O soro foi incubado com 490  $\mu\text{L}$  de substrato da ECA, Hippuril-Histidil-Leucina (Hip-His-Leu 5mM), a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos. Os sobrenadantes dos homogenatos de rim e coração foram incubadas com 480  $\mu\text{L}$  da solução de Hip-His-Leu a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. O sobrenadante do homogenato das placentas foi incubado com 470  $\mu\text{L}$  de substrato e 10  $\mu\text{L}$  de inibidor de peptidases por 40 minutos. Esta reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de solução de NaOH 0,34 N. A seguir, acrescentou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução de *o*-ftaldialdeído 2%, protegido da luz e em temperatura ambiente. Esta substância liga-se ao produto da reação enzimática, o His-Leu, e permite a sua leitura fluorimetricamente. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de HCl 3N, sempre sob agitação. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante foi então submetido à leitura da intensidade de fluorescência em espectrofluorímetro usando um comprimento de onda 365 nm para excitação e 495 nm para emissão.

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas, sendo que a fluorescência intrínseca das amostras foi corrigida pelo controle onde a amostra foi adicionada logo após a reação ser interrompida com NaOH 0,34 M, mantendo as demais etapas do ensaio inalteradas. Uma curva padrão de His-Leu foi realizada em cada ensaio.

A dosagem da concentração de proteína foi realizada, pelo método colorimétrico de Bradford (1976), nas amostras de tecidos onde foi medida a

atividade da ECA. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas. Para cada ensaio foi realizada uma curva padrão, utilizando-se a albumina sérica bovina como padrão.

A atividade específica da ECA foi expressa em  $\eta$ Moles His-Leu/min/mL no soro e  $\eta$ Moles His-Leu/min/mg de proteína nos tecidos.

### **3.3.8.3 Quantificação de angiotensinas I e II plasmática e tecidual**

#### **3.3.8.3.1 Preparação do coquetel de inibidores de peptidases**

O coquetel de inibidores foi preparado seguindo a ordem de adição das soluções: 10  $\mu$ L de solução de *p*-ácido hidroximercuribenzóico 1 nM, 50  $\mu$ L de solução *o*-fenantrolina 30 nM, 10  $\mu$ L de solução de PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 1 nM, 50  $\mu$ L de solução de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 7,5%, 20  $\mu$ L de solução de pepstatina 1 nM, solução A (HCl 0,18 N) e solução B (etanol ácido: 200 mL de solução A e 600 mL de etanol absoluto).

Para cada amostra de placenta foi utilizado 1.400  $\mu$ L do coquetel de inibidores e 280  $\mu$ L para amostras de sangue.

#### **3.3.8.3.2 Procedimento para coleta do sangue e da placenta**

A coleta de sangue e da placenta foi realizada em um grupo adicional de ratas após decapitação dos animais no 20º dia de gestação. As amostras foram coletadas em tubo falcon contendo o coquetel de inibidores de peptidases. As amostras de placenta previamente homogeneizadas e as de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O plasma e o sobrenadante do homogenato das placentas foram colocados em nitrogênio líquido e estocados em freezer -80°C para posterior quantificação de angiotensinas.

### 3.3.8.3.3 Quantificação de angiotensinas I, II e 1-7 plasmática e tecidual

A quantificação das angiotensinas I, II e 1-7 foi realizada em cromatografia de fase reversa acoplada a um detector ultravioleta (214 nm) como descrito por Franco et al. (2003). Os tecidos foram previamente homogeneizados em 8 mL de tampão fosfato sódico 0,1 M contendo sacarose 0,34 M e cloreto de sódio 0,3 M (pH 7,2). Angiotensina III (320 ng) foi adicionada a cada amostra como padrão interno. A extração das angiotensinas I e II foi realizada usando cromatografia em coluna Sep-Pak-C<sub>18</sub> (Millipore, EUA). A coluna foi ativada com os seguintes reagentes: 5 mL de metanol, 5 mL de tetraidrofurano, 5 mL de hexano e 10 mL de água Milli-Q. Em seguida, as amostras foram passadas pela coluna e os peptídeos foram eluídos com os seguintes reagentes: 10 mL de água, 5 mL de ácido acético 4% e 5 mL de etanol/ácido acético/água (90:4:6, v/v). Os peptídeos de interesse foram extraídos da coluna na última fase e evaporados no equipamento Speed Vac SC 110 (Savant Instruments Inc., EUA). Os extratos das amostras foram reconstituídos com 500 µL de ácido fosfórico 0,1% em acetonitrila 5%, filtradas e injetadas na coluna Aquapore OD 300, 7 µm (4,6 x 250 mm) (Applied Biosciences, EUA) do sistema de HPLC. Os peptídeos foram inicialmente separados por eluição isocrática durante 5 minutos seguido por um gradiente linear de 5 a 35% de acetonitrila em ácido fosfórico 0,1% durante 20 minutos a um fluxo de 1,5 mL/min. Os tempos de retenção foram usados para identificar os picos de interesse, previamente determinados por eluição com os peptídeos padrão. Os cálculos foram realizados baseados na área do pico formado e a concentração das angiotensinas na placenta foi expressa em ng/g de tecido e no plasma em ng/mL.

### 3.3.8.4 Expressão gênica (mRNA) da renina, angiotensinogênio, ECA e receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1) e 2 (AT2)

A expressão gênica de todos os componentes do SRA no rim, coração e placenta foi realizada pelo método de transcriptase reversa e

reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) conforme descrito por Katwa et al. (1997). Os diversos reagentes utilizados foram adquiridos das empresas Invitrogen (Brasil) e Labtrade (Brasil) e os *primers* utilizados na RT-PCR foram adquiridos de diferentes empresas (Anexos I e II).

#### 3.3.8.4.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada em 4 a 10 amostras por vez para evitar erros de manipulação e degradação do RNA das amostras durante a extração. Os tecidos armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  foram pesados (balança AL200, Marte, Brasil) e colocados em tubo de ensaio de plástico estéril. Todo o procedimento foi realizado sob gelo. Foram acrescentados 2 mL de Trizol para cada 100 mg de tecido e homogeneizados em aparelho Ultra-Turrax (IKA Works Inc., modelo T-25, EUA).

Deste homogenato foi transferido 1 mL para um tubo plástico livre de RNase e DNase e incubado por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Este homogenato foi centrifugado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio para separação da amostra em fase orgânica e inorgânica. Esta solução foi agitada no *vortex* e incubada à temperatura ambiente por 2 minutos e a seguir foi centrifugada a  $4^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, a 14.000 rpm. A fase superior (incolor) da solução foi transferida para outro tubo e acrescentados 500  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugada a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. Novamente o material foi centrifugado (9.000 rpm, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspendido com 100  $\mu\text{L}$  de água DEPC (dietilpirocarbonato) e esta

solução foi incubada em banho seco a 65°C por 10 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C após a quantificação do RNA total.

A quantificação do RNA foi realizada através de leituras a 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-1100, Japão). Para isso, tubo livre de RNase e DNase contendo 5 µL de amostra e 995 µL de água Milli-Q autoclavada foi incubado em banho seco a 65°C por 10 minutos. Uma unidade de densidade óptica, lida no comprimento de onda de 260 nm, equivale a 40 µg/mL de RNA total.

Para o cálculo da pureza do RNA, a razão entre a leitura a 260 nm, que detecta RNA, e a leitura a 280 nm, que detecta proteína, deve estar entre 1,8 a 2,2 para ser aceitável. Eletroforese em gel de agarose a 1% foi realizada para verificar visualmente a integridade das bandas 28S e 18S do RNA.

#### **3.3.8.4.2 Reação de transcriptase reversa (RT)**

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada através da reação de RT utilizando-se a enzima RT ImProm II (Promega, Brasil). O protocolo para a síntese de cDNA foi dividido em três fases; sendo a primeira, a fase de desnaturação, onde 1 µg de RNA total foi colocado em tubo livre de RNase e DNase. Adicionou-se 1 µL de oligo deoxirribonucleotídeo T(dT) 150 ng/mL e completou-se o volume com água DEPC para 5 µL. Os tubos foram colocados em termociclador (PTC-200, MJ Research, Inc., EUA) e incubados a 70°C por 5 minutos.

Para a segunda fase, chamada fase de anelamento, foi preparada uma solução constituída por 4 µL de tampão de reação 5X; 1 µL de dNTP [2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato] (10 mM); 2,4 µL de cloreto de magnésio (25 mM); 6,6 µL de água Milli-Q autoclavada e 1 µL de Improm II e esta foi adicionada ao tubo de reação. Após a adição da solução, as amostras foram levadas ao termociclador utilizando um programa de 25°C por 5 minutos e depois 60 minutos a 42°C. Na última fase ocorre a inativação da

transcriptase reversa por aquecimento a 70°C por 15 minutos. As amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

#### 3.3.8.4.3 Reação de polimerase em cadeia (PCR)

Uma alíquota de 1 µL de cDNA foi transferida para tubo livre de RNase e DNase onde foi realizada a reação de PCR. Preparou-se uma solução de reação contendo para cada tubo 2,5 µL de tampão PCR 10X [100 mM Tris HCl pH 8,5 e 500 mM KCl]; 0,75 µL de cloreto de magnésio (50 mM); 0,5 µL de dNTP (10 mM); 3 µL de *primer* sense (5 ρMol/ µL); 3 µL de *primer* antisense (5 ρMol/ µL); 0,4 µL de Taq DNA polimerase; 2,5 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e 11,35 µL de água Milli-Q. A solução foi homogeneizada em *vortex*, adicionada ao tubo contendo amostra de cDNA e levado ao termociclador.

Os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio usando um DNA ladder de 100 pares de base. Foi feito rotineiramente um controle negativo omitindo apenas o cDNA da reação de PCR. As bandas foram semi-quantificadas usando o software Alpha Imager™ 1220 version 5.5 (Alpha Innotech Corporation, EUA) e comparou relativamente com a expressão gênica da β-actina, onde foi expressa como valor de densidade integrada (IDV/ β-actina).

As quantidades de cDNA, temperatura de anelamento e número de ciclos usados no PCR das amostras do coração, rim e placenta estão descritos no anexo I. É importante ressaltar que a temperatura de anelamento é específica do gene (*primer*) e o número de ciclos é diferente para o mesmo gene, variando conforme o tecido.

#### 3.3.9 Expressão gênica do fator de necrose tumoral (TNF-α) na placenta

Na placenta, além do SRA, foi quantificada a expressão gênica do TNF-α pelo método de transcriptase reversa e reação em cadeia da

polimerase (RT-PCR), conforme descrito anteriormente. Para a expressão gênica do TNF- $\alpha$  utilizou-se *primer* (Peltier e Brown, 2005) adquirido da Dialab (Brasil) e foram necessários 40 ciclos, 1  $\mu$ L de cDNA e temperatura de anelamento de 65,8°C para a reação de PCR (Anexo II).

### **3.3.10 Medida do fluxo sanguíneo uterino, placentário e renal**

Em um grupo adicional de ratas, os fluxos sanguíneos uterino e placentário foram medidos pelo método de microesferas coloridas de acordo com o descrito por De Angelis et al. (2005). Os animais foram anestesiados com pentobarbital (40 mg/kg) para implantação de cateteres na artéria carótida direita (PE-50, Intramedic Inc., EUA) com a ponta dentro do ventrículo esquerdo para a infusão das microesferas coloridas e na artéria femoral (PE-10, Intramedic Inc., EUA) para coleta de amostra de sangue de referência. Os cateteres estavam previamente preenchidos com solução fisiológica.

A pressão arterial e frequência cardíaca foram medidas cinco minutos antes da infusão das microesferas conectando o transdutor de pressão ao cateter da artéria femoral.

#### **3.3.10.1 Microesferas coloridas**

Microesferas amarelas de 15  $\mu$ m de diâmetro (Dye-Trak CM; Triton Technology, EUA) foram infundidas dentro do ventrículo esquerdo dos animais no 19º ou 20º dia da gestação. Para isto, a suspensão mãe de microesferas foi sonicada por 5 minutos e diluída em solução fisiológica 0,9% contendo Tween 0,01% para a concentração de 300.000 microesferas em 180  $\mu$ L.

#### **3.3.10.2 Técnica**

As esferas diluídas (infusato de microesferas) foram sonicadas por 3 minutos antes da infusão nos animais. Uma das extremidades do tubo de polietileno (PE-50) preenchido com 180  $\mu$ L de infusato de microesferas foi

conectada ao cateter ventricular esquerdo e a outra extremidade foi conectada a uma seringa contendo 0,5 mL de solução fisiológica pré-aquecida. A seringa foi conectada a uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, modelo 55-1111, EUA). Ao mesmo tempo, uma bomba de aspiração (Harvard Apparatus, modelo 901, EUA) foi conectada ao cateter da artéria femoral através de uma seringa pré-heparinizada e pesada para coleta da amostra de sangue de referência. A coleta desta amostra iniciou-se 10 segundos antes do início da infusão das microesferas e continuou por 75 segundos, a uma velocidade de 0,7 mL/min. O infusato de microesferas e solução fisiológica pré-aquecidas foram infundidas por 50 segundos a uma velocidade de 0,5 mL/min.

Após a infusão das microesferas, as placentas, útero e rins foram retirados e pesados para determinar o fluxo sangüíneo regional. Os rins direito e esquerdo foram extraídos e usados como padrão para verificar se a técnica foi adequada. Resultados com uma variabilidade maior que 20% entre os fluxos sangüíneos renal direito e esquerdo não foram aceitos para análise.

As placentas, o útero, os rins e a amostra de sangue de referência foram processados como descrito por Hakkinen et al. (1995) com pequenas modificações.

### **3.3.10.3 Preparação dos reagentes para processamento dos órgãos e do sangue**

#### **Reagente I**

Este reagente é uma solução de Triton X-100 a 10%. Para a preparação da solução colocou-se 1.800 mL de água destilada em béquer e sob agitação aqueceu esta água até 50°C. Adicionou-se 12,12 g de Tris-base e 0,2 g de azida sódica e acertou o pH para 8,5. Adicionou-se 200 mL de Triton X-100 e sob agitação aqueceu esta solução até ficar límpida. Desligou-se o aquecedor e resfriou-se a solução a temperatura ambiente com agitação.

#### **Reagente II**

Esta solução foi preparada colocando 1 L de água destilada em béquer e sob agitação aqueceu-se esta água até 50°C. Adicionou-se 6,06 g de Tris-base e 0,5 mL de Tween 80 e 0,10 g de azida sódica. Acertou-se o pH para 8,5 e adicionou-se 20,73 g de ácido deoxicólico sódico. Após a adição deste ácido o pH foi acertado novamente para 8,5.

#### **Reagente de hemólise**

A preparação desta solução foi realizada adicionando, sob agitação, 200 mL de etanol absoluto em 1L de solução Triton-X 100 10%.

#### **3.3.10.4 Processamento dos órgãos e sangue**

Imediatamente após o término da infusão das microesferas, os órgãos inteiros e o sangue foram pesados, colocados em tubo falcon e processados. Foram utilizadas seis placentas de cada mãe para a medida do fluxo placentário, sendo que este processo foi realizado em dois tubos separados, ou seja, três placentas em cada tubo. Foi calculada a média dos resultados dos dois tubos.

No tubo falcon contendo o sangue, foi adicionado 4 mL do reagente de hemólise e centrifugado a 4.000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente para formar o *pellet*. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 4 mL de NaOH 2 M ao *pellet*. Nos tubos contendo os órgãos também foi adicionado 4 mL de NaOH 2 M. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram aquecidos a 70°C por 3 horas, sendo homogeneizados a cada 30 minutos e deixados a temperatura ambiente durante o período noturno. No dia seguinte, os tubos foram novamente aquecidos a 70°C até a dissolução completa dos órgãos e do *pellet*. Após a dissolução completa, foi adicionado 9 mL do reagente I em todos os tubos, homogeneizados por inversão e centrifugados a 4.000 rpm por 30 minutos para formar o *pellet*. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 10 mL do reagente II ao *pellet*. Em seguida, foi homogeneizado usando o *vortex* e os tubos contendo as amostras foram aquecidos a 70°C durante a noite. Foi necessário o uso de sonicador para dissolver as partículas ainda suspensas e os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 4.000 rpm por 30 minutos. O

sobrenadante foi aspirado e desprezado. Adicionou-se 1,9 mL de álcool absoluto gelado em todos os tubos e homogeneizou usando *vortex*. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e desprezado e os tubos contendo o *pellet* foram deixados em estufa a 60°C durante a noite para evaporar o álcool residual. Adicionou-se 500 µL de dimetilformamida (DMF) em todos os tubos e estes foram homogeneizados usando *vortex* e centrifugados a 4.000 rpm por 10 minutos. A leitura óptica do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-1100, Japão) a 448 nm usando cubeta de quartzo.

Para calcular a perda de microesferas durante a extração nos tecidos e sangue, um volume de 12.500 microesferas foi colocado em tubo falcon e processado em paralelo com as amostras.

### 3.3.10.5 Cálculos

O fluxo sanguíneo regional, débito cardíaco e resistência vascular periférica foram calculados pelas seguintes fórmulas:

#### **Fluxo sanguíneo (mL/min):**

$$\frac{\text{Peso}_{\text{sangue}} \div \text{Densidade}_{\text{sangue}}}{\text{Volume}_{\text{sangue}} \div \text{Velocidade de retirada}_{\text{sangue}}}$$

Sendo:

densidade específica do sangue = 1,05 g/mL

velocidade de aspiração de sangue = 0,5 mL/min

#### **Fluxo sanguíneo regional (mL/min/g):**

$$\text{Absorbância}_{\text{sangue}} \times (\text{Fluxo sanguíneo} \div \text{Absorbância}_{\text{sangue}})$$

O fluxo foi corrigido por grama de tecido.

#### **Débito cardíaco (mL/min):**

$$\frac{\text{número de microesferas}_{\text{injetadas}} \times \text{velocidade de infusão}}{\text{número de microesferas}_{\text{sangue}}}$$

**Resistência vascular periférica (mmHg/mL/min):**

$$\frac{\text{Pressão arterial}_{\text{femoral}}}{\text{Débito cardíaco}}$$

**3.3.11 Dosagem de TBARS (Substâncias Reativas com o Ácido Tiobarbitúrico), como produto da peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi avaliada pela concentração dos produtos da reação das substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (*TBARS*). Esta peroxidação foi verificada utilizando o método colorimétrico descrito por Ohkawa et al. (1979), em amostras de placentas retiradas no 19º dia da gestação.

As placentas foram homogeneizadas com tampão fosfato de sódio pH 7,4 e dosadas as concentrações de proteína nos tecidos pelo método de Bradford (1976). Foi utilizado a concentração de 1,0 mg de proteína no tecido/mL para a dosagem de *TBARS*, diluindo a amostra em tampão fosfato de sódio 0,02 M em pH 7,4. A concentração de *TBARS* na placenta foi avaliada usando tubo de ensaio imerso em gelo, adicionado 1 mL do homogenato diluído e acrescentado 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 17,5% e em seguida, 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,6% pH 2,0. Os tubos foram colocados em banho de água fervente por 15 minutos e após este período a reação foi interrompida colocando os tubos em gelo. Foi adicionado a esta mistura 1 mL de ácido tricloroacético 70% e incubado por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 2.000 rpm e a densidade óptica do sobrenadante foi lida em espectrofotômetro (Femto, modelo 432C, Brasil) a 534 nm. A concentração dos produtos da peroxidação lipídica foi calculada, utilizando-se coeficiente de extinção molar equivalente para malondialdeído (MDA-equivalente), de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (utilizado para o complexo malondialdeído e ácido tiobarbitúrico). Os conteúdos de *TBARS* na placenta foram expressos em nmoles *TBARS*/ mg de proteína.

### **3.3.12 Imuno-histoquímica para Bax em placentas**

#### **3.3.12.1 Processamento dos tecidos para análise histopatológica**

Amostras de placentas foram coletadas no 20º dia de gestação e armazenadas em freezer -80°C para imuno-histoquímica. Para a realização do processo de parafinização e inclusão do tecido, os fragmentos foram colocados em solução fisiológica a 4°C para descongelar e posteriormente transferidos os fragmentos para solução Duboscq-Brasil por 2 horas. Após este período, os fragmentos foram colocados em solução de formol 10% e tampão fosfato e colocados em caixetas perfuradas. Este processo de inclusão foi realizado em um processador automático de tecido (Jung-Histokinette 2000 Leica, Alemanha) por um período que durou cerca de 14 horas, para desidratação dos tecidos em concentrações progressivas de álcoois. Em seguida, foram realizados três banhos de xilol, sendo então imersos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos e, após solidificação, permaneceu à temperatura ambiente.

#### **3.3.12.2 Processamento para imuno-histoquímica**

A técnica de imuno-histoquímica utilizada neste estudo foi aplicada em tecido em parafina. Os tecidos incluídos em blocos de parafina permaneceram 30 minutos a -20°C antes do corte, para evitar enrugamento do corte do tecido. Os blocos foram cortados em micrótomo (Reichert Yung Supercut 2065 Leica, Alemanha) com navalhas descartáveis com espessura de 3 a 4 µm e aderidos em lâminas previamente revestidas por gelatina 2% (Sigma, EUA). As lâminas com os cortes permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, Brasil) a 60°C por 2 horas e em seguida foram armazenadas a 4°C.

Antes da realização das colorações histológicas, as lâminas passaram por um processo de desparafinização em xilol e desidratação em álcool absoluto, álcool 96% e álcool 70%. Finalizado este processo, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS) pH 7,6.

### 3.3.12.3 Técnica de imuno-histoquímica

O anticorpo utilizado foi anti-Bax (MoAb, IgG1 de camundongo; Santa Cruz, EUA). O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos, omitindo-se o anticorpo primário. Para aumentar a exposição antigênica, utilizamos uma panela a vapor (Arno, Brasil), onde as lâminas foram imersas em tampão citrato pH 6,0 por 30 minutos.

### 3.3.12.4 Técnica estreptavidina-biotina/ fosfatase alcalina

A técnica utilizada para a detecção do antígeno Bax foi a estreptavidina-biotina/fosfatase alcalina (Fujihara et al., 1998).

Após a exposição antigênica, as lâminas foram colocadas em câmara úmida e realizado o bloqueio com avidina endógena por 15 minutos seguido de um bloqueio da biotina endógena por 15 minutos (Vector, Burlingame, EUA). Em seguida, foi realizado um bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:70, durante 30 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram incubados com o anticorpo primários BAX por 20 horas a 4°C em câmara úmida. Após lavagem das lâminas, os cortes foram incubados com anti-imunoglobulina de camundongo biotinilada adsorvida em rato (Vector, EUA), na diluição de 1:200 durante 45 minutos. Depois de novas lavagens, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-biotina/fosfatase-alcalina (Vector, EUA) durante 30 minutos.

Para a visualização da positividade das células foi utilizado um substrato cromogênico preparado a base do corante "fast red". Para esta revelação, as lâminas foram então incubadas com o substrato naftol AS-MX-fosfato (Sigma, EUA) dissolvido em DMF (Merck, Alemanha) acrescido de solução tris-tamponada 0,1M pH=8,2 e corante "fast red" (Sigma, EUA). Para bloquear a fosfatase alcalina endógena foram adicionados 20 µl de levamisol 1M (Sigma, EUA). Este substrato foi filtrado utilizando-se filtro 0,22 µm (Millipore, Brasil).

Durante o período de revelação, as lâminas foram observadas sob microscopia (Alphaphote-2 Nikon, Japão) para visualização da positividade celular. Após um período de aproximadamente 20 minutos, a revelação foi interrompida mergulhando-se as lâminas em TBS. Em seguida, os cortes foram contra-corados durante 2 minutos com hemalumbre de Mayer (Merck, Alemanha) e para intensificação da tonalidade azul do corante as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

Para montagem das lâminas, as lamínulas foram colocadas com gelatina glicerinada Kaiser (Merck, Alemanha) previamente aquecida. As células positivas apresentaram cor vermelha.

Para a quantificação do marcador, foi contado o número de células positivas presentes em 25 campos em um aumento de 200 vezes. Todas as células cujo citoplasma coravam-se em vermelho foram identificadas e contadas. O número obtido foi expresso em células positivas/ mm<sup>2</sup>. Para o aumento empregado o fator de correção foi de 1,274.

### 3.3.13 Análise Estatística

A comparação de duas médias em grupos experimentais diferentes foi realizada pelo teste "t" de *Student* não pareado. Quando o número de médias a serem comparadas era de três ou mais, o teste utilizado foi a análise de variância - de um ou dois fatores, conforme o caso - seguida do pós-teste de Newman-Keuls ou Bonferroni.

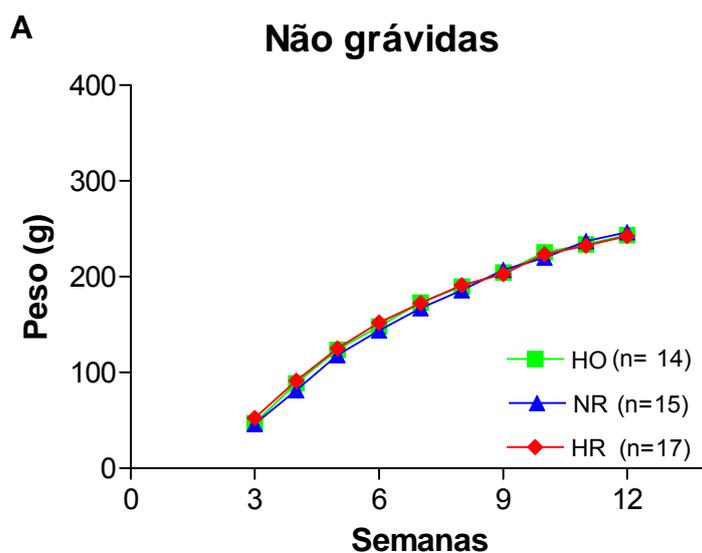
Os resultados foram expressos como média e erro-padrão da média (EPM) e foi adotado como nível de significância  $P < 0,05$ .

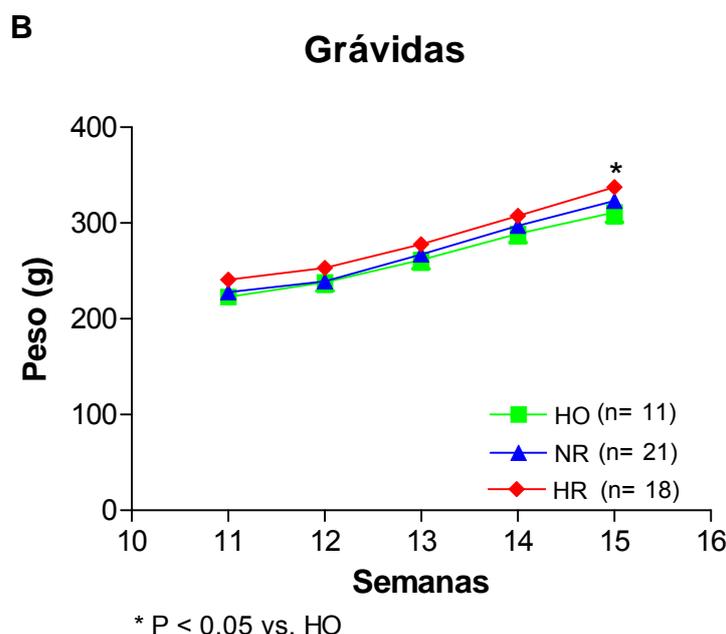
## 4 RESULTADOS

Os resultados foram analisados avaliando a influência do sal na dieta e o efeito da gestação.

### 4.1 Peso corpóreo

O peso corpóreo avaliado nas ratas não grávidas (Figura 3A) desde o desmame até 12 semanas de idade não foi diferente entre os grupos de dieta, indicando que a variação no consumo de sal na dieta nestes animais não influenciou o peso corpóreo. Durante a gestação, o peso corpóreo foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo HR comparado com o grupo HO na última semana de gestação (Figura 3B).





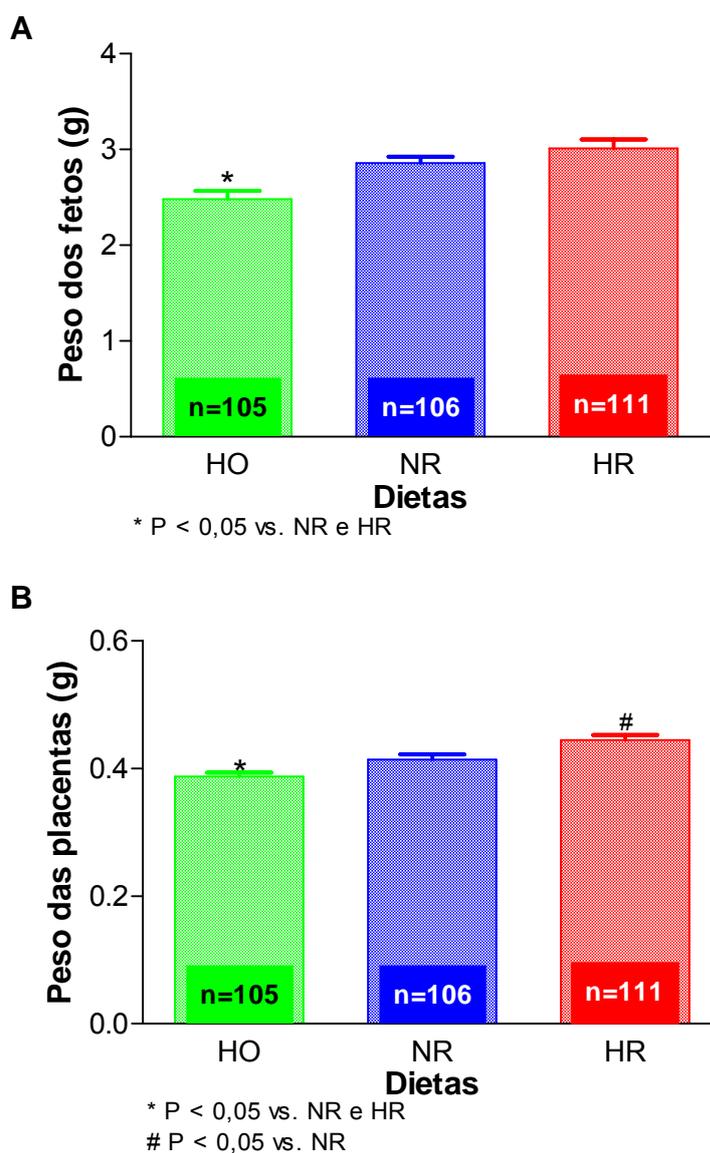
**Figura 3** – Peso corpóreo das ratas não grávidas (A) e grávidas (B) que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

#### 4.2 Peso dos fetos e placentas

Após a decapitação das ratas grávidas, aproximadamente no 20º dia da gestação, os fetos e as placentas foram pesados.

A figura 4A mostra a influência do consumo de sal sobre o peso dos fetos. Observamos que o peso dos fetos é diretamente proporcional ao consumo de sal das mães, ou seja, o peso é menor no grupo de mães alimentadas com dieta HO e vice-versa. Fetos de mães que receberam HO ( $2,48 \pm 0,08$ ;  $n=105$ ) são menores ( $P < 0,05$ ) comparados aos fetos de mães que receberam dieta NR ( $2,86 \pm 0,07$ ;  $n=106$ ) e HR ( $3,01 \pm 0,09$ ;  $n=111$ ).

O peso das placentas de ratas que receberam dieta HO ( $0,39 \pm 0,01$ ;  $n=105$ ) foi menor ( $P < 0,05$ ) quando comparado com o peso das placentas dos grupos de dietas NR ( $0,41 \pm 0,01$ ;  $n=106$ ) e HR ( $0,44 \pm 0,01$ ;  $n=111$ ). Estes resultados estão representados na Figura 4B. Para obtenção dos pesos dos fetos e das placentas foram utilizadas 8 mães HO, 8 NR e 9 HR.



**Figura 4** – Massa corpórea dos fetos (A) e massa das placentas (B) das ratas na 3ª semana de gestação submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

É importante ressaltar que o número de fetos por mãe não foi diferente entre as dietas HO ( $12,6 \pm 0,8$ ;  $n=11$ ), NR ( $13,6 \pm 0,5$ ;  $n=11$ ) e HR ( $12,7 \pm 1,2$ ;  $n=9$ ), ou seja, não foi influenciado pelo conteúdo de sódio na dieta.

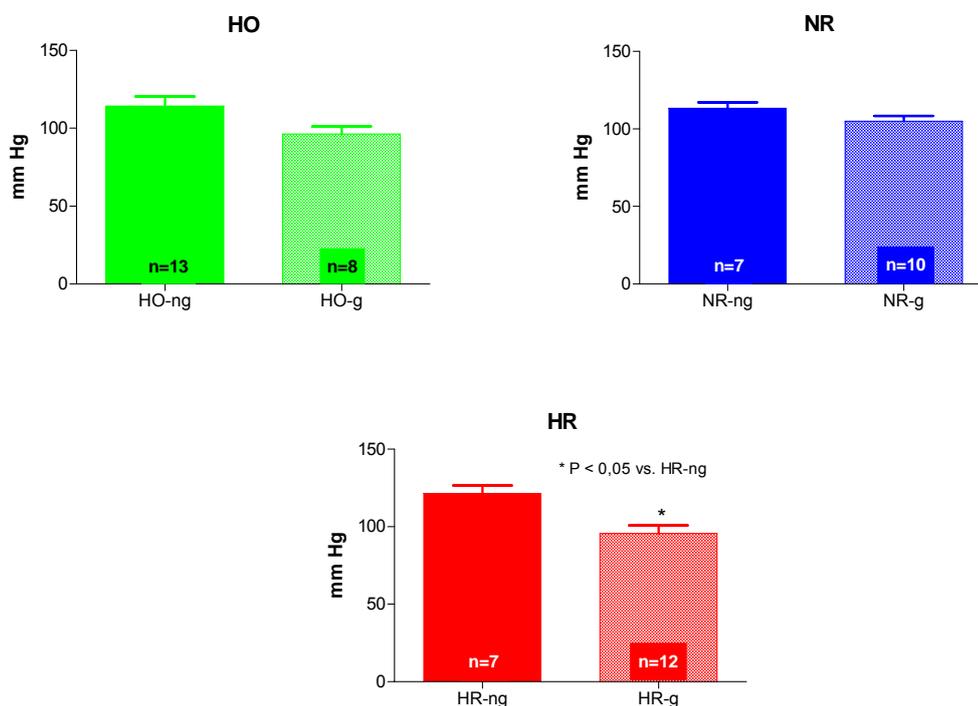
### 4.3 Consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário

O consumo de ração de 24 horas (g/ 24 h) não foi diferente entre os grupos de dieta tanto nas ratas não grávidas (HO:  $16 \pm 1$ , n=6; NR:  $15 \pm 1$ , n=9; HR:  $15 \pm 2$ ; n=10) quanto nas ratas grávidas (HO:  $19 \pm 1$ , n=6; NR:  $18 \pm 1$ , n=10; HR:  $18 \pm 1$ ; n=10). No entanto, a ingestão hídrica de 24 horas (mL/ 24 h) no grupo de ratas não grávidas (HO:  $19 \pm 1$ , n=6; NR:  $20 \pm 1$ , n=9; HR:  $65 \pm 10$ ; n=10) e grávidas (HO:  $26 \pm 2$ , n=6; NR:  $33 \pm 2$ , n=10; HR:  $88 \pm 5$ ; n=10) foram maiores ( $P < 0,05$ ) na dieta HR quando comparado com as demais dietas. O mesmo resultado foi observado no volume urinário de 24 horas (mL/ 24 h). Ratas não grávidas (HO:  $10 \pm 1$ , n=6; NR:  $12 \pm 1$ , n=9; HR:  $46 \pm 7$ ; n=10) e grávidas (HO:  $11 \pm 2$ , n=6; NR:  $16 \pm 1$ , n=10; HR:  $71 \pm 7$ ; n=10) em dieta HR apresentaram maior volume urinário comparado com as dietas HO e NR.

A ingestão hídrica sofreu influência da gestação, sendo maior ( $P < 0,05$ ) em ratas grávidas comparado com ratas não grávidas em todas as dietas. Entretanto, o volume urinário foi maior ( $P < 0,05$ ) na gestação apenas nas dietas NR e HR.

### 4.4 Pressão arterial direta

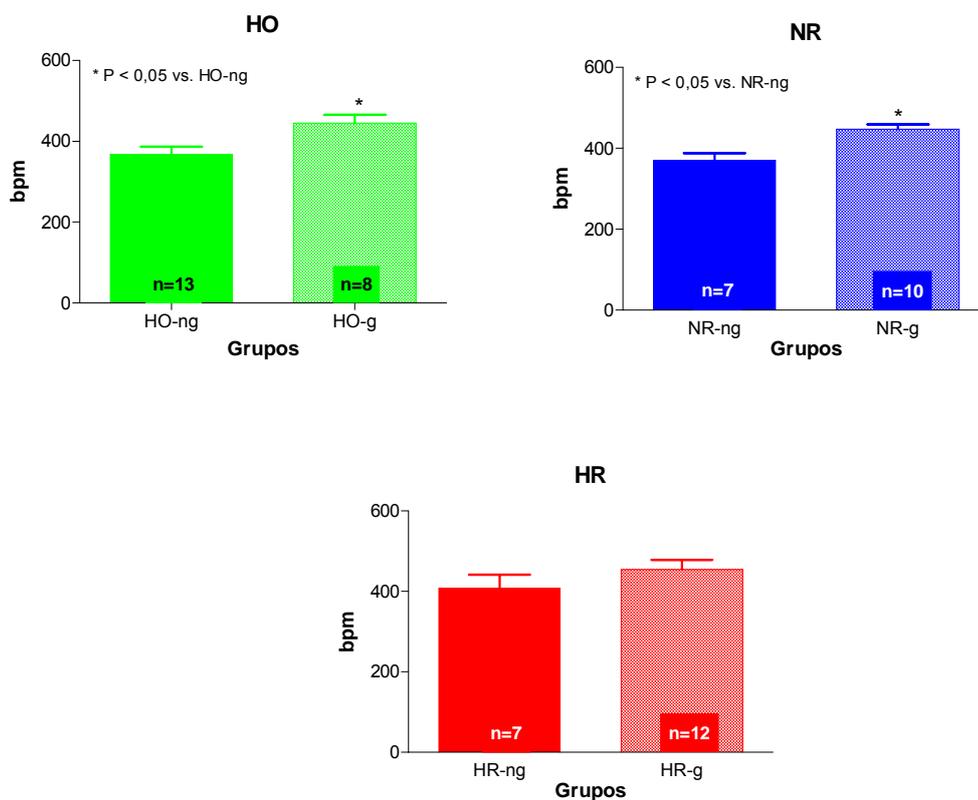
A medida da pressão arterial direta foi realizada por meio do cateter implantado na artéria carótida. Apesar dos diferentes conteúdos de sal na dieta, ratas não grávidas (HO:  $115 \pm 6$ , n=13; NR:  $113 \pm 4$ , n=7; HR:  $121 \pm 5$ ; n=7) e grávidas (HO:  $98 \pm 5$ , n=8; NR:  $105 \pm 3$ , n=10; HR:  $96 \pm 5$ ; n=12) não apresentaram diferenças na PAM (mm Hg). Durante a gestação, as ratas alimentadas com dieta HR apresentaram menor ( $P < 0,05$ ) PAM quando comparado com ratas não grávidas na mesma dieta (Figura 5).



**Figura 5** - Pressão arterial média nas ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR), hipersódica (HR) desde a 8ª semana de vida. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

#### 4.5 Frequência cardíaca

A frequência cardíaca (bpm) não sofreu influência do consumo de sal na dieta e foi maior ( $P < 0,05$ ) durante a gestação quando comparado com o grupo de ratas não grávidas (Figura 6) submetidas às dietas HO (não grávidas:  $368 \pm 19$ ; grávidas:  $445 \pm 20$ ) ou NR (não grávidas:  $370 \pm 18$ ; grávidas:  $447 \pm 12$ ). O grupo de ratas em dieta HR (não grávidas:  $408 \pm 34$ ; grávidas:  $455 \pm 24$ ) não apresentou maior frequência cardíaca durante a gestação.



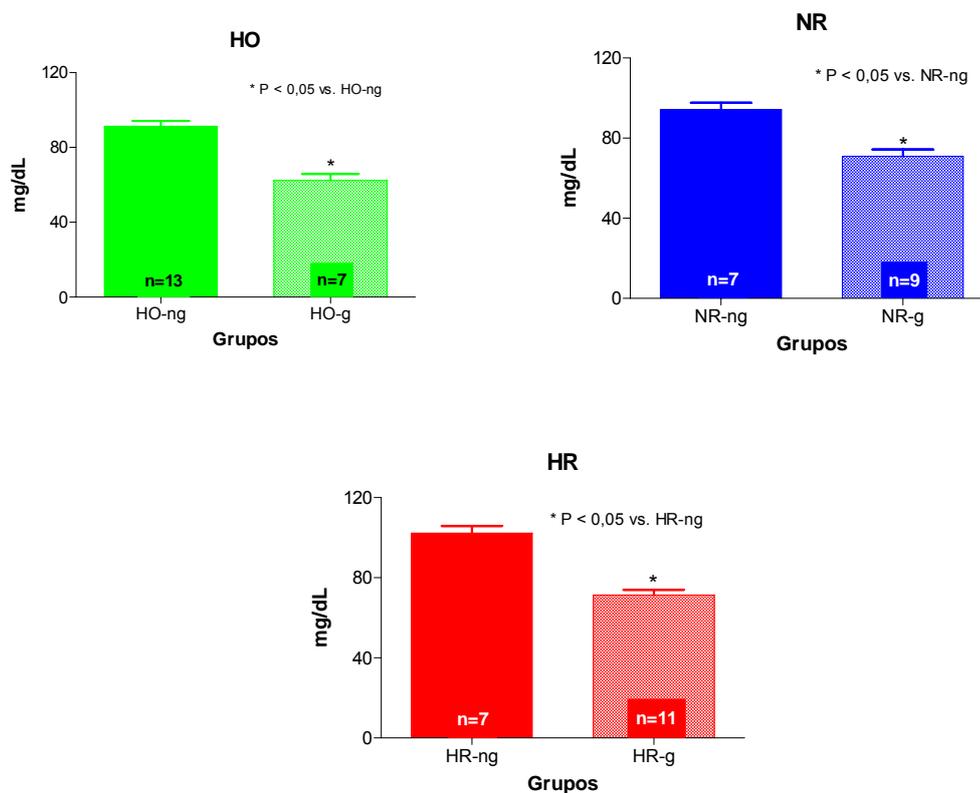
**Figura 6** – Frequência cardíaca nas ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

## 4.6 Sensibilidade à insulina

### 4.6.1 Glicemia

A glicemia das ratas do grupo não grávidas e grávidas é mostrada na figura 7.

Não foram verificadas diferenças nas glicemias basais (mg/dL) de ratas não grávidas e grávidas submetidas à dieta HO, NR ou HR (Tabela 1). Estes resultados nos mostram que a glicemia não foi influenciada pelo conteúdo de sal na dieta. No entanto, a glicemia sofreu influência da gestação, sendo menor nas ratas grávidas (Figura 7) comparadas às ratas do grupo não grávidas em todas as dietas.



**Figura 7** – Glicemia nas ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de vida. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

#### 4.6.2 Insulinemia

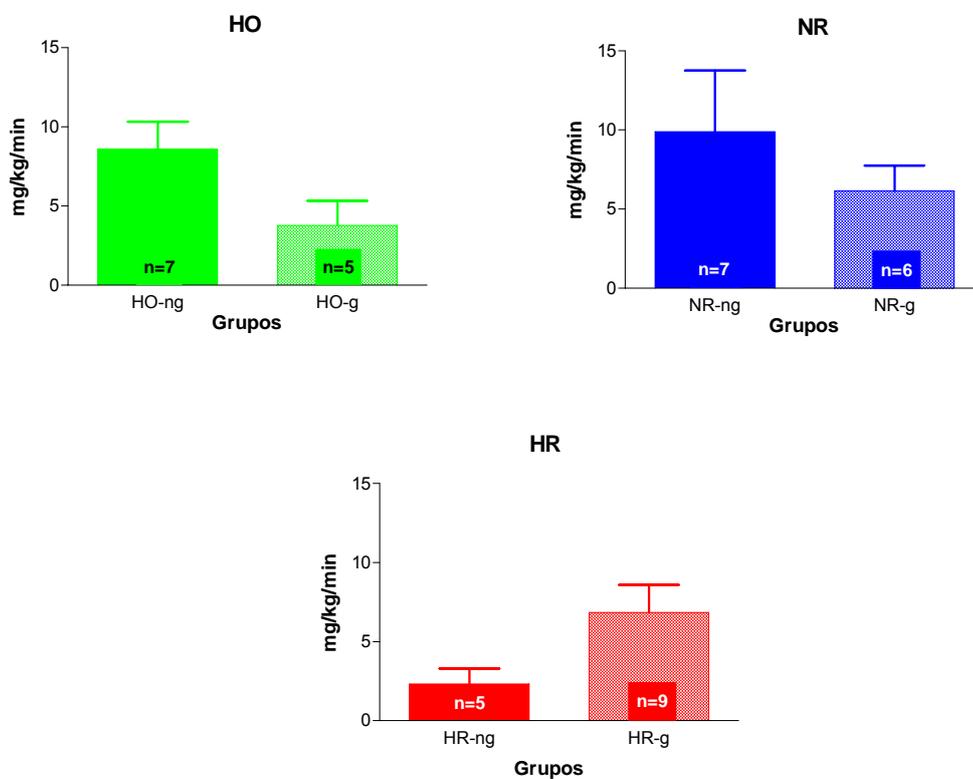
Os resultados da insulina plasmática basal do *clamp* são mostrados na tabela 1. Não foram verificadas diferenças na concentração de insulina plasmática basal entre animais submetidos às dietas HO, NR ou HR no grupo não grávidas e grávidas (Tabela 1).

#### 4.6.3 Consumo periférico de glicose

A captação de glicose que representa a sensibilidade à insulina está demonstrada na tabela 1 e figura 8.

Na gestação, as captações de glicose nas dietas HO e NR não foram diferentes entre os grupos de dieta. Apesar de não haver diferença significativa, os resultados de captação de glicose foram menores no grupo

de ratas grávidas nas dietas HO e NR quando comparado ao grupo de ratas não grávidas nas mesmas dietas.



**Figura 8** – Captação periférica de glicose nas ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de vida. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

**Tabela 1** – Avaliação da sensibilidade à insulina, insulinemia e glicemia de jejum de ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.

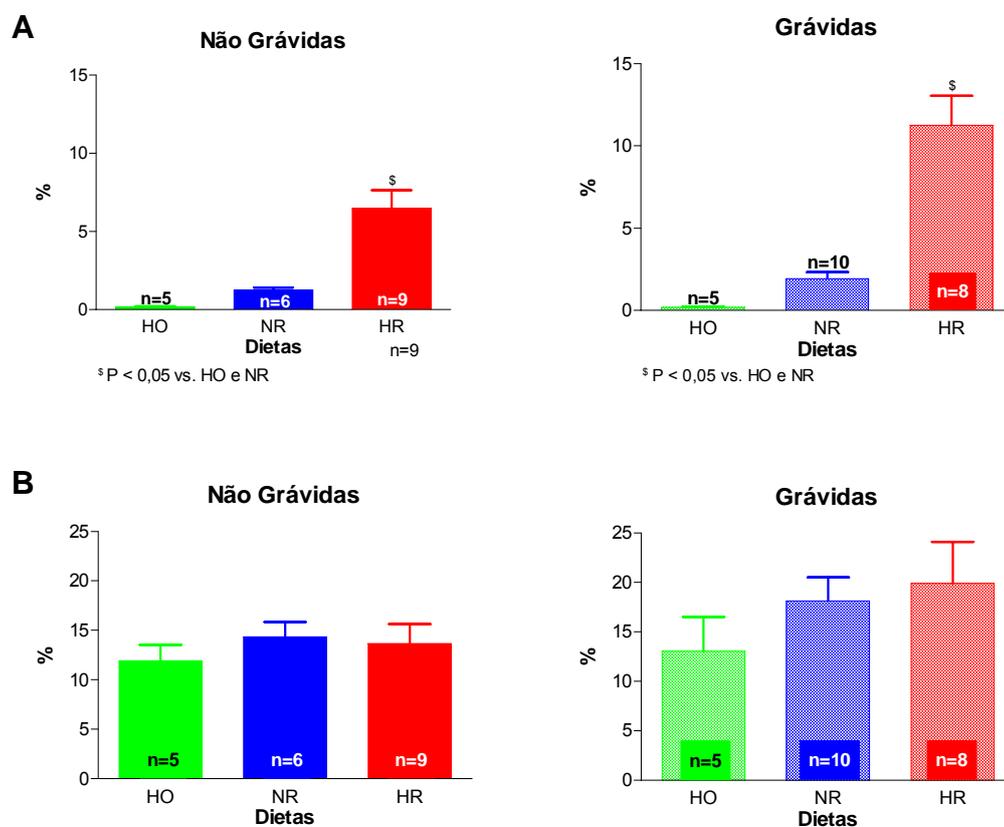
	Não Grávidas			Grávidas		
	HO	NR	HR	HO	NR	HR
Glicemia (mg/dL)	91±3	94±3	102±4	62±3 <sup>@</sup>	71±3 <sup>@</sup>	71±3 <sup>@</sup>
Insulinemia basal (pmoL)	185±35	212±51	112±23	247±62	164±89	175±38
Captação periférica de glicose (mg/kg/min)	7,6±1,4	9,9±3,9	2,3±1,0	3,8±1,5	5,8±1,2	6,8±1,8

Valores estão expressos como média e erro padrão da média. <sup>@</sup> P < 0,05 vs. mesma dieta do grupo não grávidas. Cada grupo foi composto por 6 a 13 animais.

## 4.7 Função renal

### 4.7.1 Fração de excreção de sódio e potássio

Os resultados da fração de excreção urinária de sódio confirmam os diferentes consumos de sal na dieta nas ratas não grávidas e grávidas (Tabela 2 e Figura 9A). A fração de excreção urinária de potássio (Figura 9B) não foi diferente entre os grupos de dietas e não sofreu influência da gestação (Tabela 2).



**Figura 9** – Fração de excreção de sódio (A) e potássio (B) nas ratas não grávidas e grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR). Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

#### **4.7.2 Creatinina, sódio e potássio séricos**

A creatinina sérica e as concentrações séricas de sódio e potássio não foram diferentes entre os grupos de dietas e não sofreram influência da gestação. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

#### **4.7.3 Reabsorção proximal de sódio**

O *clearance* de lítio foi realizado para avaliação da reabsorção proximal de sódio no túbulo proximal. A reabsorção proximal de sódio não foi diferente entre os grupos de dieta e nem durante a gestação. Estes resultados estão demonstrados na tabela 2.

**Tabela 2** – Avaliação da função renal, consumo de ração, ingestão hídrica e volume urinário de ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR).

	Não Grávidas			Grávidas		
	HO	NR	HR	HO	NR	HR
<i>Creatinina sérica (mg/dL)</i>	0,35±0,04	0,43±0,06	0,37±0,03	0,34±0,05	0,53±0,10	0,38±0,03
<i>Clearance de lítio (mL/min/100g)</i>	0,16±0,06	0,32±0,03	0,22±0,05	0,10±0,01	0,12±0,03	0,16±0,03
<i>Reabsorção proximal de Sódio (%)</i>	73±21	94±2	80±5	73±6	73±7	77±5
<i>Fração de excreção Sódio (%)</i>	0,2±0,04	1,3±0,2	6,5±1,2 <sup>s</sup>	0,2±0,03	1,9±0,4	11,3±1,8 <sup>s</sup>
<i>Fração de excreção Potássio (%)</i>	11,9±1,6	14,4±1,5	13,7±1,9	13,0±3,5	18,1±2,4	19,9±4,2
<i>Sódio sérico (mEq/L)</i>	140±5	142±4	133±3	141±1	133±4	129±3
<i>Potássio sérico (mE/L)</i>	4,4±0,3	4,6±0,3	4,3±0,1	4,3±0,2	4,8±0,2	4,5±0,1

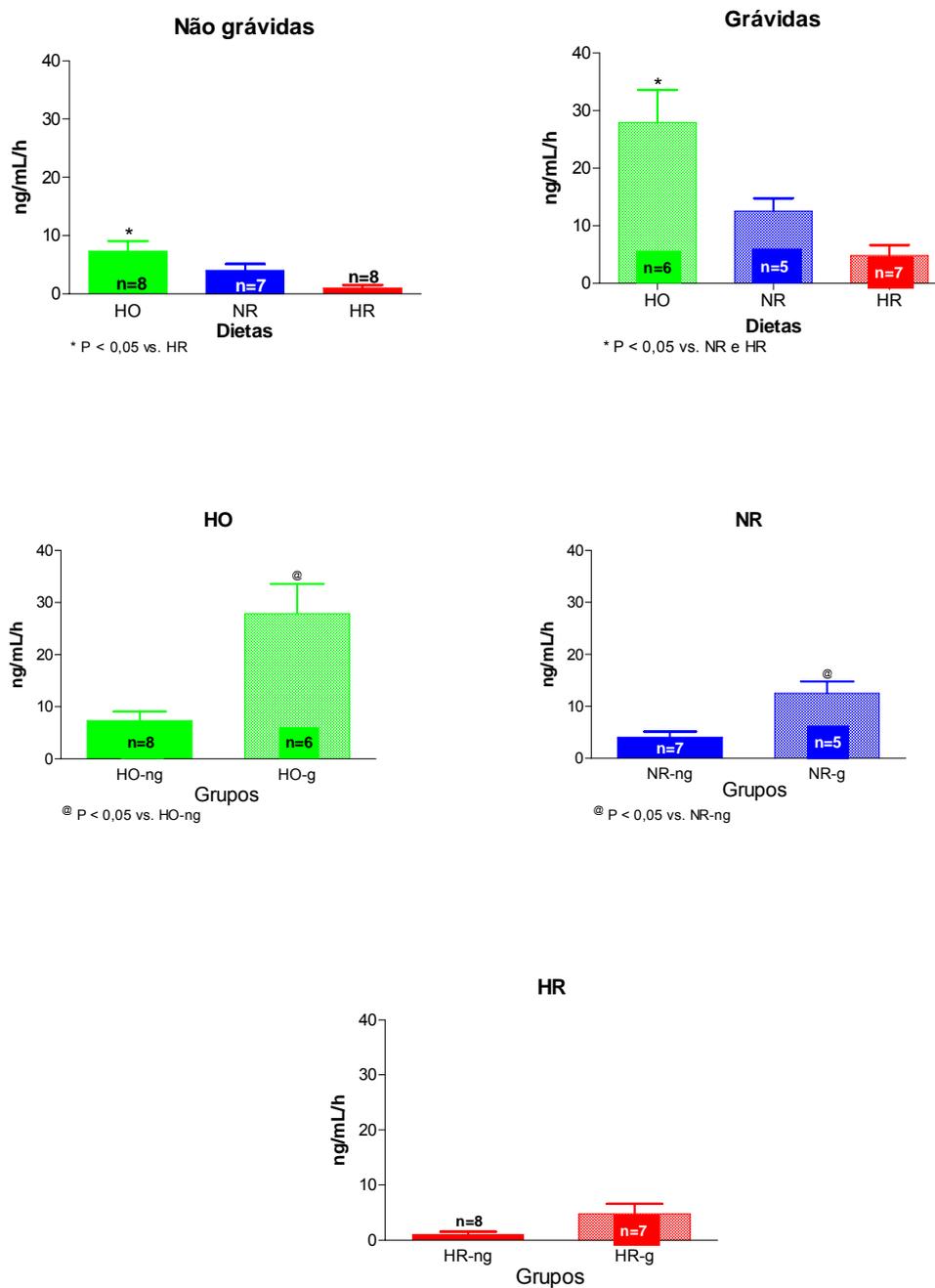
Valores estão expressos como média e erro padrão da média. <sup>s</sup> P < 0,05 vs. HO e NR do mesmo grupo. Cada grupo foi composto por 6 a 10 animais.

## 4.8 Sistema renina angiotensina

### 4.8.1 Atividade da renina plasmática (ARP)

A ARP (ng/mL/h) em ratas não grávidas na vigência de dieta HO ( $7,3 \pm 1,8$ ; n=8) foi maior ( $P < 0,05$ ) quando comparada com a dieta HR ( $1,0 \pm 0,5$ ; n=8) mas não foi diferente do grupo que recebeu dieta NR ( $4,0 \pm 1,1$ ; n=7). Em ratas grávidas na 3<sup>a</sup> semana de gestação, a ARP (ng/mL/h) também foi maior ( $P < 0,05$ ) na dieta HO ( $27,9 \pm 5,7$ ; n=6) comparado com as dietas NR ( $12,5 \pm 2,2$ ; n=5) e HR ( $4,8 \pm 1,8$ ; n=7).

A atividade da renina plasmática sofreu influência da gestação, sendo maior nas ratas grávidas submetidas às dietas HO (não grávidas:  $7,3 \pm 1,8$ ; grávidas:  $27,9 \pm 5,7$ ;  $P < 0,05$ ) e NR (não grávidas:  $4,0 \pm 1,1$ ; grávidas:  $12,5 \pm 2,2$ ;  $P < 0,05$ ), porém não foi diferente na dieta HR (não grávidas:  $1,0 \pm 0,5$ ; grávidas:  $4,8 \pm 1,8$ ) quando comparada com as ratas não grávidas. Os resultados da ARP em ratas grávidas e não grávidas estão demonstrados na figura 10.



**Figura 10** – Atividade da renina plasmática em ratas não grávidas (ng) e grávidas (g) que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

#### **4.8.2 Atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA)**

A atividade da ECA na placenta, rim e coração está demonstrada na tabela 3. Não houve diferença da atividade da ECA no soro, rim, coração e placenta em resposta à variação no consumo de sal na dieta. Entretanto, a atividade da ECA no soro sofreu influência da gestação, apresentando uma menor ( $P < 0,05$ ) atividade neste período quando comparado com o grupo de ratas não grávidas na mesma dieta. A atividade da ECA no rim e coração das ratas avaliadas não sofreu influência da gestação.

**Tabela 3** – Avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina tecidual e plasmática em ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.

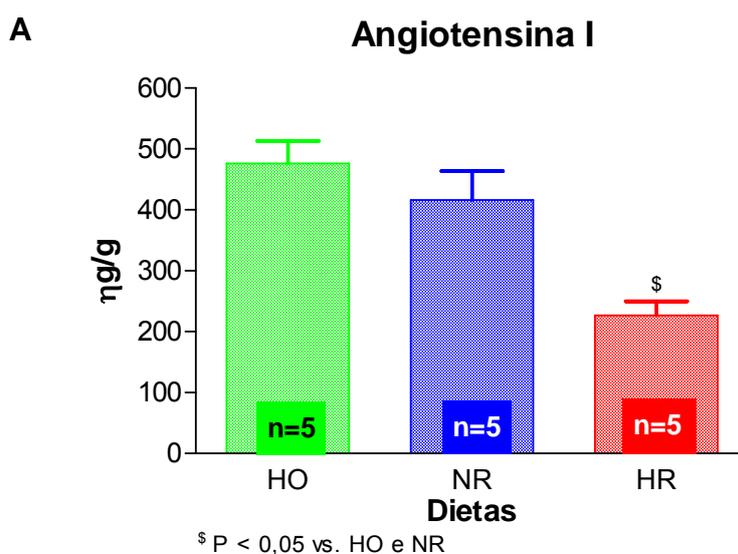
	Não Grávidas			Grávidas		
	HO	NR	HR	HO	NR	HR2
Soro (nmol His Leu/min)	96,6±6,7	83,8±3,9	83,5±5,0	61,3±5,5 <sup>@</sup>	63,7±3,2 <sup>@</sup>	59,9±3,0 <sup>@</sup>
Rim (nmol His Leu/min/mg)	4,0±0,4	4,9±0,6	4,8±1,0	3,4±0,3	3,4±0,5	4,3±0,8
Coração (nmol His Leu/min/mg)	0,19±0,03	0,27±0,07	0,23±0,03	0,23±0,03	0,16±0,03	0,15±0,03
Placenta (nmol His Leu/min/mg)				1,7±0,2	2,0±0,2	2,1±0,3

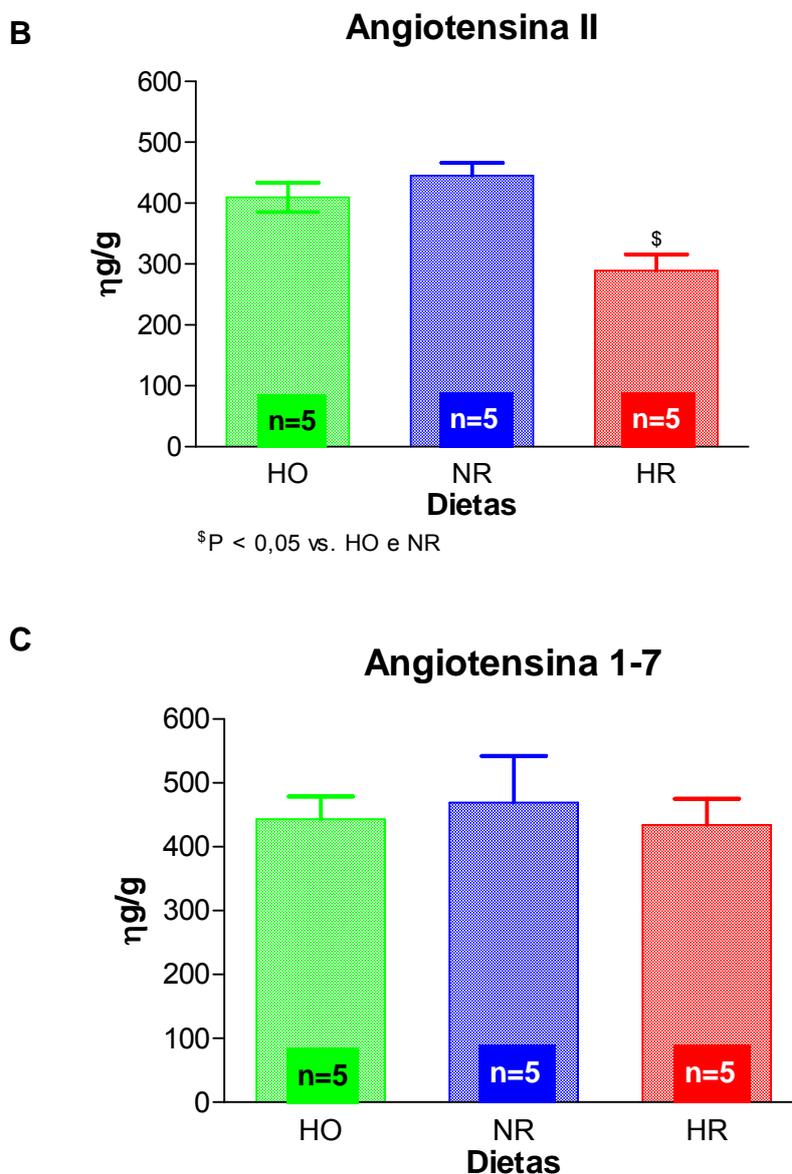
Valores estão expressos como média e erro padrão da média. <sup>@</sup> P < 0,05 vs. mesma dieta do grupo não grávidas. Cada grupo foi composto por 8 a 12 animais no grupo não grávidas, 3 a 10 animais no grupo grávidas e 5 animais para atividade da ECA na placenta.

### 4.8.3 Angiotensinas

As concentrações de angiotensina I (Figura 11A) e angiotensina II (Figura 11B) na placenta foram inversamente proporcionais ao conteúdo de sal na dieta, ou seja, as ratas em dieta HR (ANG I:  $226,6 \pm 22,9$ ; ANG II:  $289,4 \pm 26,2$ ;  $n=5$ ) apresentaram menor ( $P < 0,05$ ) concentração de angiotensina I e II na placenta quando comparado às ratas em dieta HO (ANG I:  $476,1 \pm 37,0$ ; ANG II:  $409,6 \pm 24,1$ ;  $n=5$ ) e NR (ANG I:  $416,1 \pm 47,7$ ; ANG II:  $445,1 \pm 21,2$ ;  $n=5$ ).

A concentração de angiotensina 1-7 na placenta não foi diferente entre os animais que receberam dieta HO ( $443,5 \pm 35,4$ ;  $n=5$ ), NR ( $469,2 \pm 73,1$ ;  $n=5$ ) ou HR ( $434,2 \pm 41,2$ ;  $n=5$ ). Estes resultados estão demonstrados na figura 11C.





**Figura 11** - Angiotensina I (A), angiotensina II (B) e angiotensina 1-7 (C) em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

A concentração de angiotensina I (ng/mL) no sangue materno não foi diferente entre os três grupos de dieta (HO:  $70,2 \pm 22,6$ ; n=6 - NR:  $51,9 \pm 15,1$ ; n=7 - HR:  $94,8 \pm 3,5$ , n=4). Resultados semelhantes foram obtidos para a concentração de angiotensina II (ng/mL) nos grupos

maternos que receberam dieta HO ( $57,8 \pm 5,3$ ;  $n=6$ ), NR ( $58,9 \pm 8,9$ ;  $n=7$ ) e HR ( $53,4 \pm 13,7$ ;  $n=4$ ).

#### **4.8.4 Expressão gênica dos componentes do sistema renina angiotensina**

A expressão gênica dos componentes do SRA foi quantificada no rim (Tabela 4) e coração (Tabela 5) de ratas que receberam diferentes conteúdos de sal na dieta desde a 8<sup>a</sup> semana de vida até a 12<sup>a</sup> semana de vida (grupo não grávidas) ou 15<sup>a</sup> semana de vida (grupo grávidas). Também foi verificada a expressão gênica dos componentes do SRA na placenta (Tabela 6) de ratas na terceira semana de gestação.

No rim, a expressão dos genes de angiotensinogênio, renina, ECA e AT1 não foi diferente entre os grupos de dieta nas ratas não grávidas. No entanto, nas ratas grávidas foi observada maior ( $P < 0,05$ ) expressão do gene da renina quando comparado com ratas não grávidas. A expressão do gene do angiotensinogênio, ECA e AT1 não foi diferente entre os grupos de dieta em ratas grávidas e não grávidas.

**Tabela 4** –Expressão dos genes (unidades arbitrárias) do sistema renina angiotensina no RIM de ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.

	Não Grávidas			Grávidas		
	HO	NR	HR	HO	NR	HR
	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)	(n=5)
Angiotensinogênio (angiotensinogênio/ $\beta$ -actina)	0,33±0,02	0,37±0,01	0,36±0,01	0,37±0,01	0,38±0,03	0,41±0,03
Renina (renina/ $\beta$ -actina)	0,31±0,01	0,34±0,01	0,29±0,01	0,43±0,03 <sup>@</sup>	0,42±0,01 <sup>@</sup>	0,41±0,03 <sup>@</sup>
ECA (ECA/ $\beta$ -actina)	0,09±0,01	0,10±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01
AT1 (AT1/ $\beta$ -actina)	0,40±0,02	0,40±0,01	0,42±0,02	0,37±0,03	0,39±0,02	0,43±0,03
AT2 (AT2/ $\beta$ -actina)	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Valores estão expressos como média e erro padrão da média. <sup>@</sup> P < 0,05 vs. mesma dieta do grupo não grávidas.

NA = não avaliado.

No coração de ratas não grávidas, a expressão do gene angiotensinogênio foi menor ( $P < 0,05$ ) no grupo que recebeu dieta HR comparados com o grupo NR. Foi observado menor ( $P < 0,05$ ) expressão gênica para o gene da renina nos grupos que receberam dieta HO e HR quando comparados com o grupo NR. A expressão da ECA foi menor ( $P < 0,05$ ) no grupo HO do que no grupo NR e HR de ratas não grávidas. A expressão do gene AT1 e AT2 não foi diferente entre os grupos de dieta em ratas não grávidas.

Na gestação, a expressão do gene do angiotensinogênio, renina, ECA, AT1 e AT2 não foi influenciada pelo diferentes conteúdos de sal na dieta e não sofreu influência da gestação. Estes resultados estão apresentados na tabela 5.

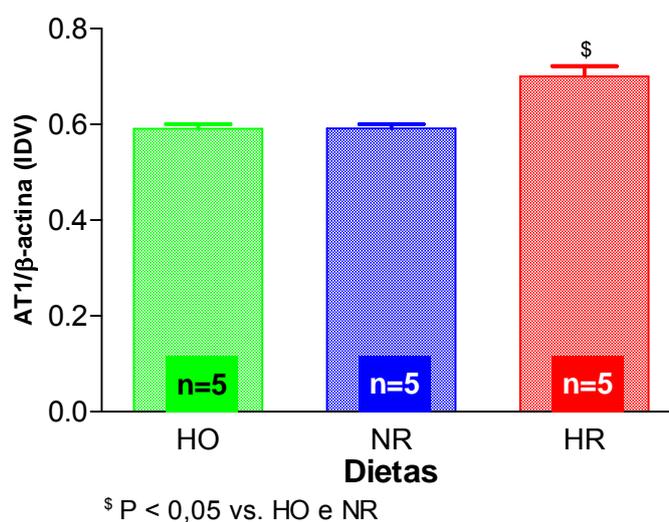
**Tabela 5** – Avaliação da expressão dos genes (unidades arbitrárias) do sistema renina angiotensina no CORAÇÃO de ratas Wistar grávidas e não grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.

	Não Grávidas			Grávidas		
	HO (n=5)	NR (n=5)	HR (n=5)	HO (n=5)	NR (n=5)	HR (n=5)
Angiotensinogênio (angiotensinogênio/ $\beta$ -actina)	0,26±0,01	0,30±0,02	0,25±0,01 #	0,22±0,02	0,21±0,01	0,22±0,02
Renina ( $\times 10^{-2}$ ) (renina/ $\beta$ -actina)	3,72±0,09 #	4,24±0,02	3,55±0,05 #	4,48±0,70	4,10±0,12	3,68±0,21
ECA (ECA/ $\beta$ -actina)	0,11±0,01*	0,15±0,01	0,15±0,01	0,12±0,01	0,12±0,00	0,11±0,01
AT1 (AT1/ $\beta$ -actina)	0,27±0,02	0,28±0,01	0,26±0,02	0,23±0,01	0,24±0,01*	0,22±0,01
AT2 (AT2/ $\beta$ -actina)	0,03±0,01	0,03±0,00	0,05±0,01	0,03±0,01	0,03±0,00	0,04±0,01

Valores estão expressos como média e erro padrão da média. # P < 0,05 vs. NR do grupo não grávidas. \* P < 0,05 vs. NR e HR do grupo não grávidas.

Na placenta, a expressão gênica do angiotensinogênio, ECA e TNF- $\alpha$  não foi influenciada pelo conteúdo de sal na dieta (Tabela 6). No entanto, a expressão do AT1 sofreu influência do consumo de sal, sendo maior ( $P < 0,05$ ) nas placentas de animais que receberam dieta HR quando comparada com os grupos HO e NR (Figura 12 e Tabela 6).

A expressão do gene da renina e do receptor AT2 na placenta apesar de ter sido realizada uma quantificação usando 7  $\mu$ L e 10  $\mu$ L, respectivamente, de cDNA, estes genes não foram detectáveis na placenta (Tabela 6).



**Figura 12** - Expressão do gene (mRNA) do receptor AT1 em placentas de ratas grávidas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Os valores estão expressos como média e erro padrão da média.

**Tabela 6** – Avaliação da expressão dos genes (unidades arbitrárias) do sistema renina angiotensina e TNF- $\alpha$  em PLACENTAS de ratas Wistar submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.

	<i>Dietas</i>		
	<i>HO</i> (n=5)	<i>NR</i> (n=5)	<i>HR</i> (n=5)
<i>Angiotensinogênio (angiotensinogênio/<math>\beta</math>-actina)</i>	0,83±0,06	0,84±0,06	0,69±0,03
<i>Renina (renina/<math>\beta</math>-actina)</i>	ND	ND	ND
<i>ECA (ECA/<math>\beta</math>-actina)</i>	0,54±0,03	0,55±0,04	0,52±0,03
<i>AT1 (AT1/<math>\beta</math>-actina)</i>	0,59±0,01	0,59±0,01	0,70±0,02 <sup>§</sup>
<i>AT2 (AT2/<math>\beta</math>-actina)</i>	ND	ND	ND
<i>TNF-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>/<math>\beta</math>-actina) (n=10 em cada dieta)</i>	0,82±0,06	0,85±0,05	0,89±0,04

Valores estão expressos como média e erro padrão da média. Para a expressão de TNF- $\alpha$  foram utilizados 10 animais. <sup>§</sup> P < 0,05 vs. HO e NR. ND = não detectável.

## **4.9 Fluxo sangüíneo**

### **4.9.1 Fluxo sangüíneo uterino, placentário e renal**

O fluxo sangüíneo foi avaliado no 19º ou 20º dia de gestação em ratas que receberam dieta HO, NR e HR e estão demonstrados na tabela 7.

Não foram verificadas diferenças no fluxo sangüíneo placentário e renal nos diferentes grupos de dieta. O fluxo sangüíneo uterino foi maior ( $P < 0,05$ ) no grupo que recebeu dieta HR comparado com os grupos HO e NR (Tabela 7).

### **4.9.2 Débito cardíaco e resistência vascular periférica**

A resistência vascular periférica foi menor ( $P < 0,05$ ) no grupo HR comparado com o grupo que recebeu dieta HO e o débito cardíaco ( $P < 0,05$ ) foi maior no grupo HR comparado com os grupos HO e NR.

Os resultados estão demonstrados na tabela 7.

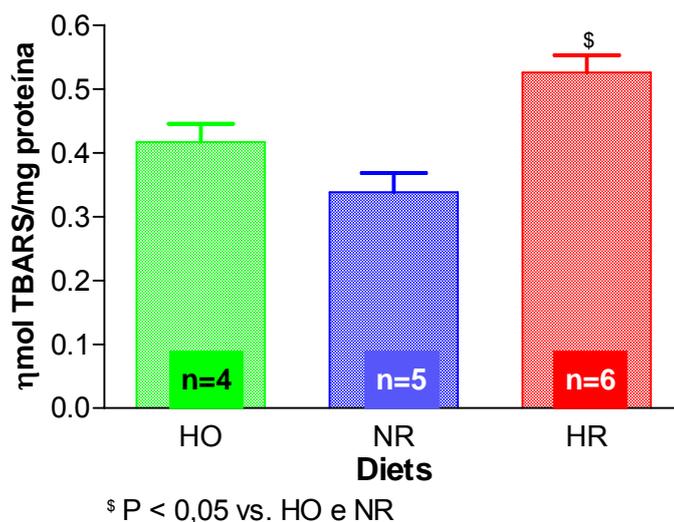
**Tabela 7** – Fluxo sanguíneo placentário, uterino e renal e resistência vascular periférica e débito cardíaco em ratas Wistar grávidas submetidas à dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade.

	Dietas		
	HO (n=5)	NR (n=4)	HR2 (n=4)
Placentário (mL/min/g)	0,74±0,11	0,94±0,23	0,60±0,16
Uterino (mL/min/g)	0,28±0,05	0,35±0,05	0,68±0,13 <sup>§</sup>
Renal direito (mL/min/g)	2,14±0,19	2,80±0,34	2,87±0,33
Renal esquerdo (mL/min/g)	2,24±0,21	2,62±0,30	3,12±0,34
Resistência vascular periférica (mm Hg/mL.min <sup>-1</sup> )	2,23±0,31	1,68±0,21	1,12±0,27**
Débito cardíaco (mL/min)	42,3±4,0	58,1±4,8	108,7±21,2 <sup>§</sup>
Massa renal esquerda (g/g)	0,27±0,01	0,28±0,01	0,38±0,02 <sup>§</sup>

Valores estão expressos como média e erro padrão da média. \*\* P < 0,05 vs. HO. <sup>§</sup> P < 0,05 vs. HO e NR.

#### 4.10 Índice de peroxidação lipídica

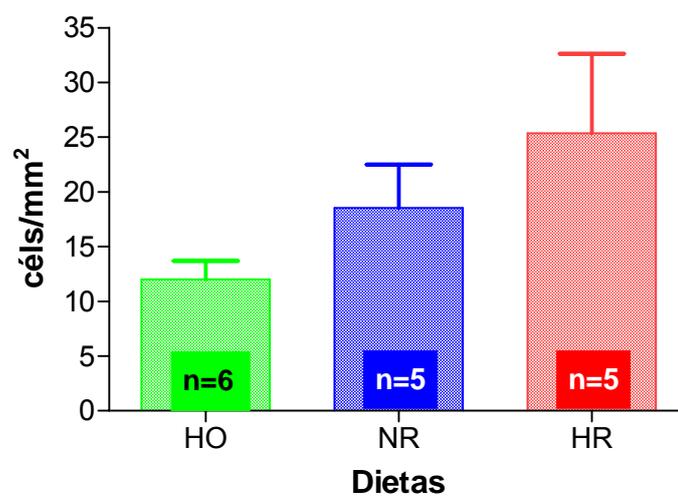
A peroxidação lipídica foi maior em placentas de ratas que receberam dieta HR ( $0,53 \pm 0,03$ ;  $n=6$ ) comparado com placentas de ratas em dieta HO ( $0,42 \pm 0,03$ ;  $n=4$ ) ou NR ( $0,34 \pm 0,03$ ;  $n=5$ ). Os resultados estão demonstrados na figura 13.



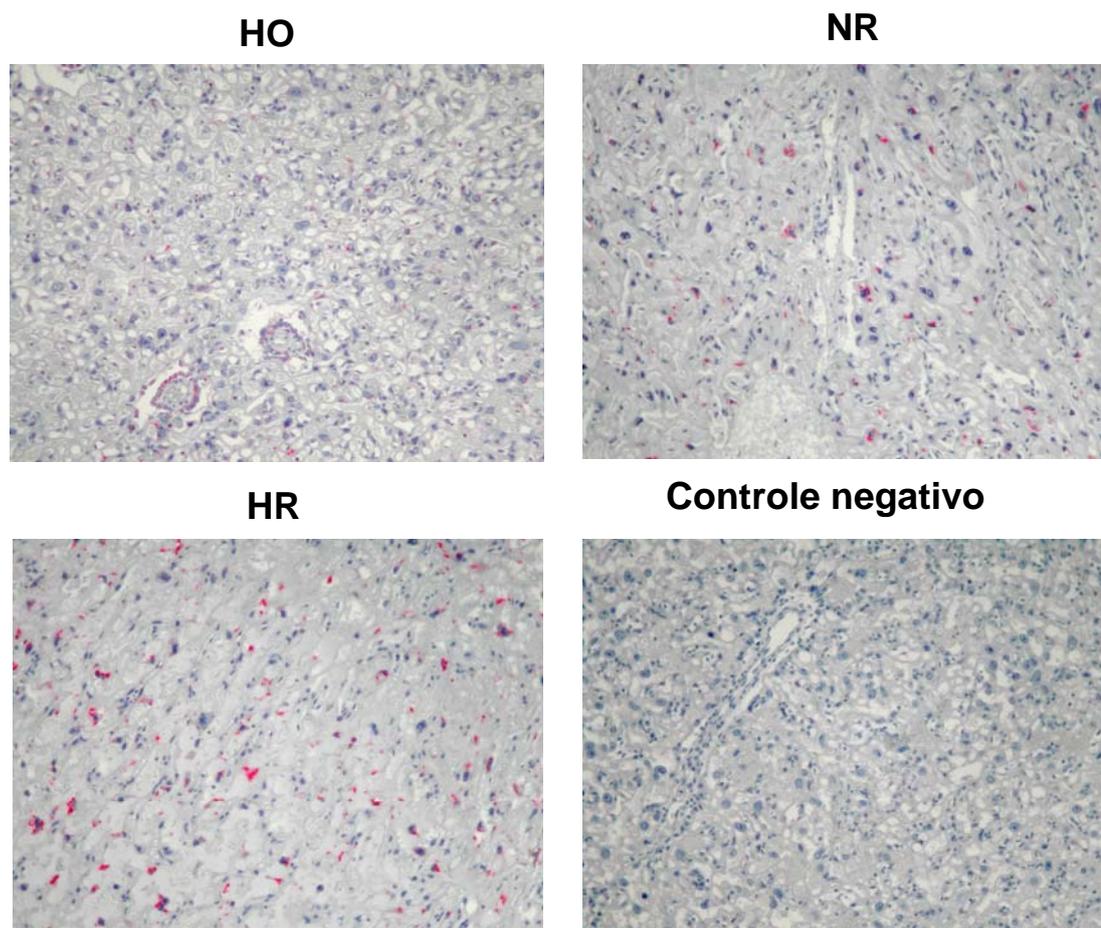
**Figura 13** - Índice de peroxidação lipídica em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.

#### 4.11 Imuno-histoquímica para Bax

Apesar do número maior de células positivas para Bax em placentas de ratas que receberam dieta HR ( $25,4 \pm 7,3$ ;  $n=5$ ), não houve diferença estatisticamente significativa quando comparado com os grupos HO ( $12,0 \pm 1,7$ ;  $n=6$ ) e NR ( $18,5 \pm 4,0$ ;  $n=5$ ) (Figura 14). Estes resultados mostram que o conteúdo de sódio na dieta não influenciou a quantificação de Bax neste tecido.



**Figura 14** - Quantificação de Bax em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão.



**Figura 15** - Expressão de Bax em placentas de ratas que receberam dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) desde a 8ª semana de idade. Aumento de 100x.

## **5 RESUMO DOS RESULTADOS**

Os principais resultados encontrados no presente estudo foram:

1 – Ratas submetidas à restrição de sal apresentaram menor peso da placenta e dos fetos, menor fluxo sanguíneo uterino e maior resistência periférica vascular.

2 – Ratas submetidas à sobrecarga de sal apresentaram maior peso da placenta, supressão do SRA, maior fluxo sanguíneo uterino e maior índice de estresse oxidativo na placenta.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o efeito da sobrecarga e restrição de sal na dieta em ratas grávidas sobre o peso corpóreo, pressão arterial, função renal, sensibilidade à insulina, sistema renina-angiotensina, fluxo sanguíneo uterino e estresse oxidativo. Estas verificações poderiam explicar os fenômenos observados na prole na vida adulta em estudos anteriores realizados em nosso Laboratório, nos quais a mãe recebeu sobrecarga ou restrição de sal durante a gravidez.

Os principais achados deste estudo foram o menor peso da placenta e do feto de mães que receberam dieta hipossódica, indicando que a variação no consumo de sal na dieta leva à restrição de crescimento intra-uterino da prole, confirmando fenômeno já observado anteriormente por Vidonho et al. (2004) na prole de mães que receberam a dieta hipossódica. Na idade adulta, esta prole tem resistência à insulina (Vidonho et al., 2004) que pode ser decorrente do baixo peso ao nascimento. A associação entre baixo peso ao nascimento e resistência à insulina já é conhecida há alguns anos (Li et al., 2001; Barker et al., 1993), no entanto, em nenhum dos estudos nos quais se demonstrou esta associação o modelo avaliado foi a restrição crônica de sal na dieta.

O peso corpóreo de ratas não grávidas não foi influenciado pela variação no consumo de sal na dieta. Além disso, foi verificado que o consumo de ração não foi diferente entre os grupos de dieta. Estes resultados de peso corpóreo corroboram os achados anteriores de nosso Laboratório (Silva et al, 2003; Vidonho et al., 2004). Entretanto, o grupo de ratas grávidas teve seu peso influenciado pelo conteúdo de sal na dieta na 3ª semana de gestação. Na terceira semana de gestação, ratas que receberam dieta hipersódica apresentaram maior peso corpóreo do que ratas que se alimentaram com dieta hipossódica. O maior peso corpóreo em ratas que consumiram dieta hipersódica não foi acompanhado por um aumento na ingestão alimentar. Há que se lembrar que a ingestão alimentar foi avaliada durante a segunda semana de gestação e o maior peso

corpóreo foi observado na terceira semana de gestação. Uma possível explicação para peso corpóreo maior sem incremento no consumo de ração é um menor gasto energético neste grupo de animais. Estudos adicionais são necessários para verificação desta hipótese. Neste grupo de animais, o consumo hídrico foi maior como esperado devido à alta concentração de sal na dieta.

Como esperado, neste estudo, as ratas grávidas que receberam dieta hipersódica apresentaram maior diurese e natriurese, resultados estes já observados na literatura (Carvalho et al., 1998). Estes resultados demonstram que as ratas grávidas foram capazes de manter o equilíbrio hidro-eletrolítico que ocorre em gravidez normal mesmo quando submetidas à dieta com sobrecarga de sal. Alguns fatores, tais como aldosterona e peptídeo natriurético atrial contribuem para a homeostase do sódio e da água. A associação entre o peptídeo natriurético atrial plasmático e sobrecarga de sal ainda é matéria controversa (Penner et al., 1990; Makino et al., 1996; Wolf e Kurtz, 1997). Deloof et al. (2000) observaram que a ingestão alta de sal não modifica a concentração de peptídeo natriurético atrial plasmático e a densidade e afinidade aos seus receptores, entretanto a concentração de aldosterona está diminuída. Este estudo sugere que o peptídeo natriurético atrial não está envolvido na regulação do balanço eletrolítico em resposta a sobrecarga de sal na dieta.

O alto consumo de sal na dieta tem sido implicado na patogênese da hipertensão, particularmente em indivíduos sal-sensíveis e a restrição de sal é frequentemente recomendada para controle da hipertensão arterial. No presente estudo, a pressão arterial direta em ratas grávidas e não grávidas não foi influenciada pelo conteúdo de sal. No entanto, houve uma tendência a maior pressão arterial no grupo de ratas não grávidas que recebeu dieta hipersódica. Uma possível explicação para ausência de efeito pressórico seria que o período de sobrecarga de sal foi curto. Outra possível explicação seria que o início do período de exposição à dieta não ocorreu em fases precoces da vida uma vez que estudo anterior realizado neste Laboratório mostrou que ratas que receberam dieta hipersódica desde o desmame

apresentaram um incremento da pressão arterial com 12 semanas de vida (Patriarca et al., 2004).

Durante a gestação, tanto em humanos e ratos, ocorrem adaptações hemodinâmicas e fisiológicas maternas que são caracterizadas por queda da pressão arterial (Slangen et al., 1997) e resistência periférica total, juntamente com aumento do débito cardíaco e volume extracelular. No presente estudo, foi observado menor pressão arterial durante a gestação em ratas HR comparada com o grupo de ratas não grávidas na mesma dieta. As alterações hemodinâmicas e vasculares durante a gestação normal têm sido atribuídas em parte à síntese aumentada de óxido nítrico por várias células, incluindo as células endoteliais (Williams et al., 1997). O SRA está ativado (Bédard et al., 2005), no entanto a resistência vascular periférica está diminuída durante a gravidez (St-Louis et al., 2006). Isto é decorrente de um menor efeito da angiotensina II sobre os receptores AT1. O presente estudo não foi desenhado para avaliar mecanismos de queda da pressão arterial durante a gestação. Por isso, estudos adicionais são necessários para entender melhor a ausência de queda pressórica durante a gestação nos grupos de ratas alimentadas com dieta normo ou hipossódica.

Interessantemente, o mecanismo que leva ao menor peso da placenta e do feto na vigência de dieta HO não é decorrente da menor pressão arterial neste grupo, uma vez que não houve diferenças de pressão arterial entre os três grupos de dieta. Possivelmente, a resistência periférica vascular aumentada neste grupo seria responsável por este fenômeno.

A variação do conteúdo de sal na dieta também não influenciou a frequência cardíaca nos grupos de ratas grávidas e não grávidas. Entretanto, a frequência cardíaca foi maior em gestantes do que em não gestantes nos grupos hipossódico e normossódico. Resultado semelhante foi observado nos grupos de animais em dieta hipersódica, mas sem atingir significância estatística. Este efeito da gestação sobre a frequência cardíaca já era conhecido (Slangen et al., 1997). A ausência de maior frequência cardíaca no grupo de ratas gestantes que recebeu a dieta hipersódica sugere que o excesso de sal interferiu na regulação da frequência cardíaca durante a

gestação, possivelmente devido ao menor tônus simpático ou maior atividade vagal.

A gestação é caracterizada como um estado de resistência à insulina onde ocorre um aumento da concentração basal de insulina devido à diminuição da sensibilidade em tecidos periféricos alvos da ação da insulina (Leturque et al., 1984). Foi verificado que a dieta hipossódica induz a resistência à insulina tanto em ratos machos (Prada et al., 2000) como em fêmeas (Patriarca et al., 2004) e também na prole adulta de mães que receberam a dieta hipossódica durante a gestação (Vidinho et al., 2004). No presente estudo, não houve efeito da gestação e da restrição no consumo de sal sobre resistência à insulina. Uma possível explicação para este achado poderia ser a duração da restrição de sal que não foi suficiente ou porque o início da dieta não ocorreu em fases precoces da vida, uma vez que Prada et al. (2000) avaliaram em machos com 12 semanas e Patriarca et al. (2004) em fêmeas com 18 semanas de idade e o início da oferta da dieta ocorreu desde o desmame. A menor sensibilidade à insulina relacionada à restrição de sal é assunto contraditório na literatura. Ogihara et al. (2001, 2002) verificaram que a sobrecarga e não a restrição de sal na dieta é responsável pela resistência à insulina em ratos Sprague Dawley e em ratos Dahl sensíveis. Nestes estudos a dieta hipersódica foi introduzida tardiamente, semelhantemente ao realizado no presente trabalho. Estudos adicionais são necessários para esclarecer a relação entre a sensibilidade à insulina e variação do consumo de sal em diferentes períodos.

A insulinemia e a glicemia também foram avaliadas antes do *clamp* para verificar a sensibilidade à insulina. No presente estudo, não foram verificadas diferenças de insulina plasmática basal entre as dietas nos grupos de ratas grávidas e não grávidas. Além disso, a concentração plasmática de insulina apresentou uma variabilidade grande e uma possível explicação seria a duração do jejum que foi de apenas seis horas. Ayala et al. (2005) mostraram que camundongos submetidos a um período de 18 horas de jejum apresentaram resultados de insulinemia com menor variabilidade. No presente estudo, a glicemia basal, avaliada tanto em ratas

grávidas quanto não grávidas, não foi influenciada pelos diferentes conteúdos de sal na dieta. Entretanto, em ratas grávidas foi observado uma menor glicemia basal quando comparado com as ratas não grávidas, independente do conteúdo de sódio na dieta e isto está de acordo com os resultados da literatura (Munoz et al., 1995). Esta menor glicemia em ratas grávidas é provavelmente devido à utilização da glicose pelo feto e podendo ocorrer hipoglicemia em animais em jejum devido à falta de resposta apropriada ao glucagon verificado por Saudek et al. (1975).

Além das adaptações maternas já citadas anteriormente que ocorrem durante a gestação, observa-se também aumento da filtração glomerular, do fluxo sanguíneo renal (Duvekot e Peeters, 1994) e da retenção de sódio, particularmente na última semana de gestação, período em que ocorre o crescimento máximo do feto (Wallace et al., 2004). Neste estudo, a concentração de creatinina sérica não foi diferente entre ratas não grávidas e grávidas nos três grupos de dieta, permitindo inferir que a função renal não foi influenciada pelos diferentes conteúdos de sódio na dieta. A excreção urinária de sódio maior no grupo de ratas submetidas à dieta HR comprova o maior consumo de sal neste grupo de ratas. A excreção urinária de potássio e a reabsorção de sódio proximal, avaliada pelo *clearance* de lítio, não foram diferentes entre os grupos de dieta. Este resultado associado a maior excreção urinária de sódio indica que a reabsorção distal de sódio está diminuída neste grupo de animais. O inverso ocorreu nas ratas que receberam restrição de sal na dieta.

No presente estudo, a expressão gênica do TNF- $\alpha$  e a quantificação do gene pró-apoptótico Bax em placentas de ratas não foram diferentes entre os três grupos de dieta. O TNF- $\alpha$  é responsável por limitar as propriedades invasivas no início da gestação e estimular a apoptose no trofoblasto próximo ao parto (Hauguel-de-Mouzon e Guerre-Millo, 2006). Desta forma, os nossos resultados não confirmam os resultados da literatura onde é observado um menor crescimento da placenta por aumento de apoptose na fase de crescimento associado a baixo peso ao nascimento. É

possível que a ausência de confirmação de observações prévias seja decorrente do modelo experimental avaliado no presente estudo.

O SRA tem papel importante na manutenção do tônus vascular e balanço hidro-eletrolítico. A atividade biológica do SRA é mediada principalmente pelo octapeptídeo angiotensina II através de sua ligação e ativação dos receptores transmembrânicos acoplados à proteína G, os receptores AT1 e AT2. O receptor do subtipo AT1 medeia a maioria dos efeitos clássicos da angiotensina II como vasoconstrição e homeostase hidro-eletrolítica enquanto estudos sugerem que o subtipo AT2 apresenta efeitos opostos ao do receptor AT1 (Zheng et al., 2005). Portanto, para verificar o efeito do sal sobre o SRA durante a gestação, o sistema SRA foi estudado em ratas grávidas e não grávidas. A atividade de renina plasmática foi maior nas ratas que receberam dieta hipossódica e menor nas ratas em dieta hipersódica comparado com grupo normossódico de não grávidas, o que está de acordo com a literatura, tanto em ratos machos quanto em fêmeas (Prada et al., 2000; Beausejour et al., 2003). A maior PRA observada em ratas em dieta hipossódica sugere uma diminuição de sódio tubular na mácula densa, resultando em liberação de renina das células justaglomerulares. Recentemente, foi demonstrado em ratas que a atividade da renina plasmática e a concentração de aldosterona aumentam durante a gravidez (Bédard et al., 2005). No presente estudo, observações similares foram relatadas, onde a atividade da renina plasmática, no final da gestação, foi maior em todos os grupos de dieta comparada com o grupo de ratas não grávidas. Estes achados também confirmam os resultados obtidos por Beausejour et al. (2003) onde estes autores demonstraram que a dieta hipossódica está associada com uma maior ativação do SRA uma vez que a atividade da renina plasmática já se encontra aumentada na gravidez. Estes dados indicam que a gravidez é capaz de ativar o SRA nas dietas hipossódica e normossódica, enquanto que na dieta hipersódica, a ativação do SRA não foi observada, sugerindo uma supressão deste sistema causado pela sobrecarga de sal na dieta. Está bem descrito na literatura que tanto a concentração plasmática de renina quanto de aldosterona está aumentada

durante a gestação para favorecer a retenção de sódio e conseqüentemente retenção de água, que é um dos mecanismos da expansão volêmica na gravidez (Shah, 2005).

A atividade da ECA no coração, rim, placenta e no soro das ratas grávidas e não grávidas também foi estudada para avaliar o SRA. Não foi observada diferença na atividade da ECA entre os três grupos de dieta nestes tecidos e no soro. No entanto, a atividade da ECA no soro foi menor durante a gestação nos três grupos de dietas comparada com o grupo de ratas não grávidas. É importante ressaltar que a menor atividade da ECA no soro foi acompanhada por maior atividade da renina plasmática durante a gestação sugerindo um *feedback* positivo. Este resultado é interessante, pois Bolterman et al. (2005) observaram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) tratados com captopril, um inibidor da ECA, apresentaram aumento da atividade da renina plasmática. Em um outro estudo, Harris (2003) mostrou que administração de inibidores da ECA ou antagonistas do receptor AT1 resulta em aumento da expressão do gene e proteína da renina no rim. A partir dos resultados do presente estudo, podemos inferir que o conteúdo de sal na dieta influencia a atividade da renina plasmática, enquanto que a atividade da ECA não é influenciada, tanto em ratas grávidas como não grávidas.

A concentração de angiotensina I e II avaliada na placenta foi menor em animais submetidos à dieta hipersódica comparado com os outros grupos de dieta. Esta menor concentração de angiotensina I e II na placenta pode ser associada à diminuição da atividade da renina plasmática nestes animais, uma vez que a renina tem sua produção modulada pela oferta de sódio na mácula densa. Como a atividade da ECA e a expressão gênica do substrato para angiotensina, o angiotensinogênio, não foram diferentes na placenta, podemos inferir que estes não são os fatores limitantes para a síntese de angiotensina II. Um resultado interessante, é que as concentrações de angiotensina I e II na placenta foram maiores que as concentrações plasmáticas, sendo maior na dieta hipossódica e normossódica do que na dieta hipersódica. Isto sugere que há uma produção local de angiotensina I e

II e exclui a contaminação pelo plasma, o que está de acordo com os resultados de Ingert et al. (2002). Além disso, foi observado neste estudo que a concentração de angiotensina 1-7 na placenta não foi diferente entre os grupos de dieta. Apesar da concentração de angiotensina II placentária ser menor na dieta hipersódica, o mesmo não ocorreu com a angiotensina 1-7 cujo conteúdo na placenta foi semelhante as demais dietas. Este resultado pode ser indicativo de que a via de síntese de angiotensina 1-7 é diferente entre os três grupos experimentais. Um mesmo conteúdo de angiotensina 1-7 na vigência de menor conteúdo de angiotensina II na placenta pode ser uma explicação para o maior fluxo útero-placentário detectado neste grupo.

A avaliação da expressão dos genes do SRA também foi realizada em coração, rim e placenta de ratas grávidas e não grávidas que receberam diferentes conteúdos de sal na dieta. No coração de ratas não grávidas, a expressão do gene angiotensinogênio estava diminuída na dieta hipersódica e a expressão gênica da renina também estava diminuída nas ratas que receberam dieta hipersódica e hipossódica. No rim, a expressão gênica da renina foi maior no grupo de ratas grávidas comparada com o grupo de ratas não grávidas, independente do conteúdo de sal na dieta. Este resultado é interessante, pois a expressão gênica de renina aumentada correlacionou-se com o aumento da atividade de renina plasmática na gestação.

A expressão do gene do receptor AT1 na placenta foi maior nas ratas grávidas que receberam dieta hipersódica, o que está de acordo com os resultados de Nickenig et al.(1998) onde se observa aumento da expressão gênica do receptor AT1 vascular na vigência de dieta hipersódica e também em córtex renal observado por Stewen et al. (2003). Esta maior expressão do gene do receptor AT1 na placenta, em ratas submetidas à dieta hipersódica, pode ser consequência da menor concentração de angiotensina II neste tecido, semelhantemente ao observado por Wang e Du (1998) em artérias aorta e mesentérica de ratos submetidos a dieta hipersódica. Não foi observada diferença na expressão do gene do receptor AT1 na placenta de ratas submetidas à dieta hipossódica comparado às ratas alimentadas com dieta normossódica. Este resultado está de acordo com o estudo de Bédard

et al. (2005) onde também não é observada a diferença da expressão gênica do receptor AT1 na placenta de ratas submetidas à dieta hipossódica comparada com a dieta normossódica.

A angiotensina II pode ter papel importante no controle da circulação feto-placentária via ativação do receptor AT1 e conseqüentemente no crescimento fetal. Foi recentemente demonstrado que angiotensina II pode, via ativação de AT1, aumentar a expressão de fatores de crescimento epidermal vascular (VEGF) (Kang et al., 2006). Este fator tem papel importante no remodelamento da vasculatura útero-placentária e feto-placentária. Além disso, a angiotensina II estimula a liberação do hormônio lactogênico placentário via receptor AT1. Baseado nestas considerações, a restrição de sal durante a gestação em ratas poderia diminuir a expressão protéica do receptor AT1 na placenta, levando à diminuição da síntese de VEGF e hormônio lactogênico placentário, impedindo o crescimento vascular, circulação feto-placentária e crescimento fetal o que pode ter refletido no menor peso da placenta e do feto, observado no presente estudo.

A não detecção da expressão gênica do receptor AT2 na placenta observado neste estudo está de acordo com os resultados de Cooper et al. (1999) que não detectaram expressão de mRNA do receptor AT2 em placentas humanas. Bédard et al. (2005) também mostraram que mesmo não sendo detectável a expressão gênica do receptor AT2 na placenta de ratas, verificaram que a expressão protéica do receptor AT2 está presente neste tecido. Isto sugere que o receptor AT2 pode ser sintetizado mesmo quando não há detecção da expressão deste gene na placenta.

Está bem estabelecido que a gestação está associada com aumento da reatividade do sistema arterial uterino aos vasoconstritores. Os vasos sanguíneos de ratas tornam-se mais calibrosos por mecanismos de hipertrofia e hiperplasia durante a última semana de gestação. Estas alterações estruturais são acompanhadas por modulação na reatividade vascular que podem então acomodar o aumento no fluxo sanguíneo para a artéria uterina, ajudando no crescimento fetal. St-Louis et al. (2006)

sugeriram que a diminuição do peso da unidade feto-placentário observada em ratas que receberam dieta hipossódica durante a última semana de gestação deve-se ao menor diâmetro, maior tensão e maior reatividade vascular a angiotensina II na parede da artéria arqueada, que pode levar a um menor fluxo sanguíneo uterino. Além disso, McMillen et al. (2005) descrevem que a diminuição do fluxo uterino reduz a disponibilidade de macro-nutrientes para o feto, dificultando seu crescimento e levando a anormalidades na função cardiovascular, metabólica e endócrina tanto no período pré-natal quanto perinatal. No presente estudo, foi avaliado o fluxo sanguíneo uterino em ratas grávidas. Observamos menor fluxo sanguíneo uterino e maior resistência vascular em ratas grávidas que receberam dieta hipossódica comparado com o grupo da dieta hipersódica. É plausível sugerir que esta resistência vascular aumentada com restrição de sal levou a um menor diâmetro da artéria arqueada, diminuindo o fluxo sanguíneo uterino o que pode ter contribuído para o menor peso placentário e conseqüentemente menor peso do feto, encontrado neste presente estudo.

Além da restrição de crescimento intra-uterino encontrado neste estudo, outros trabalhos observaram fenômenos como hiponatremia, diminuição do diâmetro da artéria arqueada, menor reatividade vascular, ativação do SRA na vigência de dieta hipossódica durante apenas a última semana de gestação (Beausejour et al., 2003; Bédard et al., 2005; St-Louis et al., 2006). Deve-se ressaltar que os autores utilizaram dieta com conteúdo de sal de 0,03%, diferindo do nosso estudo onde foi utilizada dieta contendo 0,06% de sódio. Foi demonstrado por Ganguli et al. (1969) que o conteúdo mínimo de sal na dieta para um desenvolvimento normal do rato é de 0,05% de sódio, sendo que uma dieta contendo 0,03% de sódio durante a fase fértil da rata não altera o tamanho da prole, entretanto o peso da prole ao nascimento foi afetado pelo baixo conteúdo de sal na dieta. Toal e Leenen (1983) observaram também que a quantidade mínima exigida de sódio durante a gravidez para o desenvolvimento normal do feto é de 0,06%. Estes resultados mostram que os fenômenos observados no presente estudo não

são causados pela insuficiente oferta de sódio para um crescimento normal do feto.

O fluxo sanguíneo uterino foi maior no grupo de ratas que recebeu dieta hipersódica durante a gestação, associado ao maior débito cardíaco e menor resistência vascular periférica encontrado nestes animais. Um outro fator que pode ter contribuído para o maior fluxo sanguíneo observado nestes animais é a diminuição tanto da reatividade da artéria uterina a angiotensina II como da tensão na parede uterina na vigência da dieta hipersódica (St-Louis et al., 2006). Assim sendo, nossos achados revelam que a sobrecarga e restrição de sal na dieta têm efeitos opostos no fluxo sanguíneo uterino talvez devido às diferentes propriedades mecânicas das artérias arqueadas uterinas durante a gestação, como investigado por St-Louis et al. (2006).

O fluxo sanguíneo placentário não foi diferente entre os três grupos de dieta, entretanto foi um resultado interessante, mas para o qual ainda não temos uma interpretação adequada. Uma possível explicação para este resultado é que animais em dieta hipersódica e normossódica possuem mecanismos compensatórios para aumentar o fluxo uterino em gestação com maior número de filhotes (resultados não apresentados). Entretanto, no grupo de dieta hipossódica não foi observada esta compensação, podendo comprometer o crescimento fetal durante a gestação e causando baixo peso da prole ao nascimento.

A gravidez por si é um estado de estresse oxidativo por aumento na produção de radicais livres (Wisdom et al., 1991), principalmente o superóxido e o peroxinitrito. A produção excessiva de radicais livres pela placenta pode afetar a função placentária por alterar a proliferação e diferenciação trofoblástica e a reatividade vascular contribuindo para a patogênese da pré-eclâmpsia e da restrição de crescimento intra-uterino (Myatt e Cui, 2004). No presente estudo, a peroxidação lipídica foi utilizada como marcador de estresse oxidativo em placentas. Esta peroxidação lipídica é produzida principalmente na placenta devido à ruptura da membrana pelas espécies reativas de oxigênio. A peroxidação lipídica foi

maior em placentas de mães que receberam dieta hipersódica comparado com as dietas HO e NR, sugerindo um estresse oxidativo nestas placentas. Um outro estudo do nosso Laboratório vem corroborar com este resultado onde é observado maior concentração plasmática de nitrato e nitrito em ratos machos que receberam dieta hipersódica (Ruivo et al., 2006). Além disso, é conhecido que a sobrecarga de sal na dieta aumenta a liberação de radicais livres tais como o superóxido (Lenda et al., 2000; Zhu et al., 2004). É descrito na literatura que uma produção aumentada de superóxido pode levar a diminuição de óxido nítrico devido à maior formação de peroxinitrito, um radical livre altamente reativo e responsável por peroxidação nas membranas lipídicas (Lenda et al., 2000). Portanto, maior concentração plasmática de nitrato e nitrito nos animais submetidos à dieta hipersódica poderia explicar o maior estresse oxidativo em placentas de ratas em dieta hipersódica. Como hipótese, o aumento da expressão gênica do receptor AT1 nestas placentas pode ser outro mecanismo responsável pelo aumento do estresse oxidativo. No entanto, estes comentários são especulativos e merecem ser investigado no modelo de restrição e sobrecarga de sal na dieta durante a gestação.

Como já mencionado previamente, a menor massa placentária e dos fetos de mães alimentadas com dieta hipossódica é, possivelmente, decorrente de um hipofluxo útero-placentário. Lopes et al. (2005) observaram que o SRA não é o responsável pelo baixo peso ao nascimento da prole de mães que receberam dieta hipossódica. Estes autores demonstraram que o peso da prole de mães que receberam dieta hipossódica juntamente com bloqueador de receptor AT1 ou inibidor da ECA, durante a gestação, apresentaram menor peso ao nascimento comparado com a prole de mães que receberam apenas dieta hipossódica, ou seja, sem tratamento.

Por outro lado, na vigência de sobrecarga de sal na dieta foi observado maior peso da placenta, supressão do sistema renina angiotensina circulante e placentário com um aumento na expressão gênica do receptor AT1, levando a um aumento no fluxo sangüíneo uterino e maior

estresse oxidativo. Neste contexto, os presentes resultados podem elucidar o aumento da pressão arterial na vida adulta da prole de mães que receberam dieta hipersódica observado em nosso Laboratório por Silva et al. (2003). Além disso, estes resultados reforçam o achado de Barker et al. (1990) onde estes autores mostraram uma correlação positiva entre peso da placenta e pressão arterial em humanos na vida adulta. McCrabb et al. (1991) observaram maior peso da placenta em ovelhas que sofreram restrição alimentar durante a metade da gestação sem alteração no peso do feto.

Os resultados encontrados neste estudo evidenciam que tanto a sobrecarga como a restrição de sal na dieta causa alterações na gestação que podem repercutir em desenvolvimento de doenças na vida adulta da prole.

## **7 CONCLUSÕES**

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que modificações no conteúdo de sal na dieta, durante a gestação, estão associados com alterações no peso da placenta e do feto.

Evidências deste estudo sugerem que o baixo peso dos fetos e das placentas de mães que consumiram dieta hipossódica durante a gestação é decorrente de hipoperfusão do complexo útero-placentário. Outros estudos são necessários para explicar o mecanismo responsável por estes resultados, porém, podemos afirmar que este mecanismo independe do SRA.

## 8 ANEXOS

### Placenta

<i>Gene</i>	<b><math>\beta</math>-actina</b>	<b>ECA</b>	<b>Renina</b>	<b>Angiotensinogênio</b>	<b>AT1</b>	<b>AT2</b>
<b>Fornecedor</b>	IDT	IDT	Wmed 1	Invitrogen	Invitrogen	Imprint
<b>Quantidade de cDNA</b>	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	7 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	10 $\mu$ L
<b>Temperatura Anelamento</b>	57,2°C	52,8°C	57,8°C	55°C	61°C	60°C
<b>Ciclos</b>	25	35	40	30	30	40

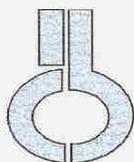
### Coração

<i>Gene</i>	<b><math>\beta</math>-actina</b>	<b>ECA</b>	<b>Renina</b>	<b>Angiotensinogênio</b>	<b>AT1</b>	<b>AT2</b>
<b>Fornecedor</b>	IDT	IDT	Wmed 1	Invitrogen	Invitrogen	Imprint
<b>Quantidade de cDNA</b>	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L	7 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L	7 $\mu$ L
<b>Temperatura Anelamento</b>	57,2°C	52,8°C	58°C	55°C	61°C	60°C
<b>Ciclos</b>	30	35	40	40	30	40

### Rim

<i>Gene</i>	<b><math>\beta</math>-actina</b>	<b>ECA</b>	<b>Renina</b>	<b>Angiotensinogênio</b>	<b>AT1</b>	<b>AT2</b>
<b>Fornecedor</b>	IDT	IDT	Wmed 1	Invitrogen	Invitrogen	Imprint
<b>Quantidade de cDNA</b>	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
<b>Temperatura Anelamento</b>	57,2°C	52,8°C	51,5°C	55°C	61°C	60°C
<b>Ciclos</b>	30	30	35	30	35	40

<b>Gene</b>	<b>Seqüência dos <i>Primers</i></b>	<b>Tamanho produto</b>
$\beta$ -actina	(as) 5' TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC AT-3' (s) 5' TAT GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG-3'	331 bp
Renina	(as) 5' TCA TCG TTC CTG AAG GGA TTC-3' (s) 5' CAT TAC CAG GGC AAC TTT CAC-3'	332 bp
Angiotensinogênio	(as) 5' TAG ATG GCG AAC AGG AAC GG-3' (s) 5' AGC ACG ACT TCC TGA CTT GG-3'	313 bp
ECA	(as) 5' ATG TCG TAA ATG TTC TCC-3' (s) 5' ACA GCT ATA ACT CGA GTG-3'	746 bp
AT1	(as) 5' TCG GAT CCG CAC AAT CGC CAT AAT TAT CC-3' (s) 5' TCG AAT TCC ACC TAT GTA AGA TCG CTT C-3'	446 bp
AT2	(as) 5' CCC ATA GCT ATT GGT CTT CAG CAG ATG-3' (s) 5' GCA TGA GTG TTG ATA GGT ACC AAT CGG-3'	325 bp
TNF- $\alpha$	(as) 5' CAG CCT TGT CCC TTG AAG AGA ACC-3' (s) 5' TAC TGA ACT TCG GGG TGA TTG GTC C-3'	295 bp



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

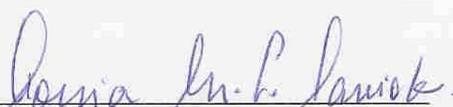
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil  
Telefone : (55) (011) 3813-0900 – telefax : (55) (011) 3818-7438  
e-mail: [icbsedir@icb.usp.br](mailto:icbsedir@icb.usp.br)

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo para uso de animais em experimentação nº 166/02, sobre o projeto intitulado **“Sobrecarga e restrição de sal na dieta durante a gestação em ratas Wistar: efeito sobre o sistema Renina-Angiotensina, função renal, resistência à insulina e pressão arterial”**, sob a responsabilidade de **Sandra Márcia Leandro**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em reunião de **20/06/2002**.

(We certify that the protocol nº 166/02, about **“Overload and restriction salt diet during Wistar rats pregnancy: effects on the Renin Angiotensin System (RAS), renal function, insulin resistance and blood pressure”** agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the BIOMEDICAL SCIENCES INSTITUTE/USP- ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in **20/06/2002** meeting.)

São Paulo, 21 de junho de 2002.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Sonia Malheiros L. Sanioto  
Coordenadora da CEEA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Marília Cerqueira Leite Seelaender  
Secretária da CEEA



O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **RATIFICA, ad referendum,** o parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP referente ao Protocolo de Pesquisa nº **933/04** intitulado: **"Sobrecarga e restrição de sal na dieta durante a gestação em ratas Wistar: efeitos sobre o sistema renina-angiotensina, função renal, resistência à insulina e pressão arterial"**, apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Joel Cláudio Heimann**

Pesquisador(a) Executante: **Sra. Sandra Márcia Leandro**

CAPPesq, 29 de outubro de 2004.

**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa


**HOSPITAL DAS CLÍNICAS**  
 DA FACULDADE DE MEDICINA  
 DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

no prof. joel heimann  
 Nefrologia  
 7º and - ICHB  
 20 / 08 / 2004  
 Eliana Costa Ponte  
 Secretária do Departamento de Clínica Médica FMUSP

DIRETORIA CLÍNICA

**Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa**

**APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11.08.04, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **653/04**, intitulado: "Efeito da restrição de sal na dieta durante a gestação em ratas Wistar: efeitos sobre o sistema renina-angiotensina na placenta" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**.

Pesquisador(a) Responsável: **Prof. Dr. Joel Claudio Heimann**

Pesquisador(a) Executante: **Sra. Sandra Márcia Leandro**

CAPPesq, 11 de Agosto de 2004.

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
 Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

OBSERVAÇÃO: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de

## 9 REFERÊNCIAS\*

- Alexander BT. Placental insufficiency leads to development of hypertension in growth-restricted offspring. *Hypertension*. 2003;41:457-62.
- Ayala J, Bracy D, Fueger P, McGuinness O, Wasserman D. Characterization of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp in the mouse: comparison of blood sampling site and fast duration. *FASEB J*. 2005;19:A630.
- Barker DJP, Winter PD, Osmond C, Margetts B., Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;2:577-80.
- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 1993;36:62-7.
- Barker DJP, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Br Med J*. 1990;301:259-62.
- Barker DJP. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med*. 1999;31:3-6.
- Barker DJP. The malnourished baby and infant. *Br Med Bull*. 2001;60:69-88.

---

\* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo, Serviço de Biblioteca e Documentação: 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

- Battista MC, Oligny LL, St-Louis J, Brochu M. Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002;283:E124-31.
- Beausejour A, Auger K, St-Loius J, Brochu M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H375-83.
- Bédard S, Sicotte B, St-Loius J, Brochu M. Modulation of bloody fluids and angiotensin li receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol.* 2005;562:937-50.
- Binder ND, Laird MR, Faber JJ. Interrelationships between the renin angiotensin system and uteroplacental blood flow: a recent perspective. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7:1437-42.
- Bolterman RJ, Manriquez MC, Ortiz Ruiz MC, Juncos LA, Romero JC. Effects of captopril on the renin angiotensin system, oxidative stress, and endothelin in normal and hypertensive rats. *Hypertension*, 2005; 46:943-947.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Bruce NW, Abdul K. Relationships between fetal weight, placental weight and maternal circulation in the rabbit at different stages of gestation. *J Reprod Fertil.* 1973;32:15-24.
- Carvalho EG, Franci CR, Antunes-Rodrigues J, Gutkowska J, Favaretto ALV. Salt overload does not modify plasma atrial natriuretic peptide or vasopressin during pregnancy in rats. *Exp Physiol.* 1998;83:503-11.
- Cooper AC, Robinson G, Vinson GP, Cheung WT, Pipkin FB. The localization and expression of the renin-angiotensin system in the human placenta throughout pregnancy. *Placenta.* 1999;20:467-74.
- De Angelis K, Gama VM, Farah VAM, Irigoyen MC. Blood flow measurements in rats using four color microspheres during blockade of different vasopressor systems. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38:119-25.

- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol.* 1979;237:E214-23.
- Deloof S, De Seze C, Montel V, Chatelain A. Atrial natriuretic peptide and aldosterone secretions, and atrial natriuretic peptide-binding sites in kidneys and adrenal glands of pregnant and fetal rats in late gestation in response to a high-salt diet. *Eur J Endocrinol.* 2000;142:524-32.
- Duvekot JJ, Peeters LL. Renal hemodynamics and volume homeostasis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 1994;49:830-9.
- Edwards CRW, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl FR. Dysfunction of glucocorticoid barrier: Link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet.* 1993;341:355-7.
- Fazleabas AT, Strakova Z. Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;186:143-7.
- Folkow B, Ely DL. Dietary sodium effects on cardiovascular and sympathetic neuroeffector functions as studied in various rat models. *J Hypertens.* 1987;5:383-95.
- Forsen T, Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann Intern Med.* 2000;133:176-82.
- Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology.* 2006;21:29-37.
- Franco Mdo C, Akamine EH, Aparecida de Oliveira M, Fortes ZB, Tostes RC, Carvalho MH, Nigro D. Vitamins C and E improve endothelial dysfunction in intrauterine-undernourished rats by decreasing vascular superoxide anion concentration. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2003;42:211-7.
- Franco MdCP, Akamine EH, Di Marco GS, Casarini DE, Fortes ZB, Tostes RCA, Carvalho MHC, Nigro D. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin-angiotensin system. *Cardiovasc Res.* 2003;59:767-75.

- Fujihara CK, Malheiros DMAC, Zatz R, Noronha IL. Mycophenolate mofetil attenuates renal injury in the rat remnant kidney. *Kidney Int.* 1998;54:1510-9.
- Ganguli MC, Smith JD, Hanson LE. Sodium metabolism and its requirement during reproduction in female rats. *J Nutr.* 1969;99:225-34.
- Gilbert M, Leturque A. Fetal weight and its relationship to placental blood flow and placental weight in experimental intrauterine growth retardation in the rat. *J Dev Physiol.* 1982;4:237-46.
- Guignot L, Mithieux G. Mechanisms by which insulin, associated or not with glucose, may inhibit hepatic glucose production in the rat. *Am J Physiol.* 1999;277:E984-9.
- Gupta S, Agarwal A, Sharma RK. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. *Obstet Gynecol Surv.* 2005;60:807-16.
- Hagemann A, Nielsen AH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system: a review. *Exp Clin Endocrinol.* 1994;102:252-61.
- Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res.* 1995;29:74-9.
- Han VK, Carter AM. Control of growth and development of the feto-placental unit. *Curr Opin Pharmacol.* 2001;1:632-40.
- Harris RC. Interactions between COX-2 and the renin-angiotensin system in the kidney. *Acta Physiol Scand.* 2003;177:423-7.
- Hauguel-de-Mouzon S, Guerre-Millo M. The placenta cytokine network and inflammatory signals. *Placenta.* 2006;27:794-8.
- Heinonen S, Taipale P, Saarikoski S. Weights of placentae from small-for-gestational age infants revisited. *Placenta.* 2001;22:399-404.
- Hinchliffe SA, Lynch MRJ, Sargent PH, Howard CV, Van Velzen D. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. *Br J Obstet Gynaecol.* 1992;99:296-301.
- Holcberg G, Huleihel M, Sapir O, Katz M, Tsadkin M, Furman B, Mazor M, Myatt L. Increased production of tumor necrosis factor- $\alpha$  TNF- $\alpha$  by IUGR human placentae. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2001;94:69-72.

- Huppertz B, Herrler A. Regulation of proliferation and apoptosis during development of the preimplantation embryo and the placenta. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2005;75:249-61.
- Inger C, Grima M, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL. Effects of dietary salt changes on renal renin-angiotensin system in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2002;283:F995–F1002.
- Ishikawa H, Seki R, Yokonishi S, Yamauchi T, Yokoyama K. Relationship between fetal weight, placental growth and litter size in mice from mid- to late-gestation. *Reprod Toxicol*. 2006;21:267-70.
- Kang YS, Park YG, Kim BK, Han SY, Jee YH, Han KH, Lee MH, Song HK, Cha DR, Kang SW, Han DS. *J Mol Endocrinol*. 2006;36:377-88.
- Katwa LC, Campbell SE, Tyagi SC, Lee SJ, Cicila GT, Weber KT. Cultured myofibroblasts generate angiotensin peptides de novo. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:1375-86.
- Lappas M, Permezel M, Rice GE. Leptin and adiponectin stimulate the release of proinflammatory cytokines and prostaglandins from human placenta and maternal adipose tissue via nuclear factor- $\kappa$ B, peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and extracellularly regulated kinase 1/2. *Endocrinology*. 2005;146:3334-42.
- Lea RG, Hannah LT, Redmer DA, Aitken RP, Milne JS, Fowler PA, Murray JF, Wallace JM. Developmental indices of nutritionally induced placental growth restriction in the adolescent sheep. *Pediatr Res*. 2005;57:599-604.
- Lenda DM, Sauls BA, Boegehold MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H7-H14.
- Lenz T. Prorenin and active renin in human fetal circulation. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1996;75:291-3.
- Leturque A, Burnol AF, Ferré P, Girard J. Pregnancy-induced insulin resistance in the rat: assessment by glucose clamp technique. *Am J Physiol*. 1984;246:E25-E31.

- Li C, Johnson MS, Goran MI. Effects of low birth weight on insulin resistance syndrome in caucasian and African-American children. *Diabetes Care*. 2001;24:2035-42.
- Lopes KL, Furukawa LNS, Heimann JC. Angiotensin I converting enzyme (ACE) and angiotensin II receptor 1 (AT1) inhibition during pregnancy and lactation: effect on the renin-angiotensin system (RAS) of adult offspring. *Pediatric Res*, 2005;58:1054.
- Mackenzie HS, Brenner BM. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension? *Am J Kidney Dis*. 1995;26:91-8.
- Makino Y, Minamino N, Kakishita E, Kangawa K, Matsuo H. Natriuretic peptides in water-deprived and in salt-loaded rats. *Peptides*. 1996;17:1031-9.
- McCrabb GJ, Egan AR, Hosking BJ. Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep. Placental size and its relationship to calcium transfer during late pregnancy. *Br J Nutr*. 1991;65:157-68.
- McMillen I and Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*. 2005;85:571-633.
- Mi Jie, Law C, Zhang KL, Osmond C, Stein C, Barker DJP. Effects of Infant birthweight and maternal body mass index in pregnancy on components of the insulin resistance syndrome in China. *Ann Med*. 2000;132:253-60.
- Moore VM, Cockington RA, Ryan P, Robinson JS. The relationship between birth weight and blood pressure amplifies from childhood to adulthood. *J Hypertens*. 1999;17:883-8.
- Morgan CR, Lazarow A. Immunoassay of insulin: two antibody system. Plasma insulin levels in normal, subdiabetic, and diabetic rats. *Diabetes*. 1963;12:115-26.
- Munoz C, Lopez-Luna P, Herrera E. Glucose and insulin tolerance tests in the rat on different days of gestation. *Biol Neonate*. 1995;68:282-91.
- Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol*. 2006;572:25-30.
- Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol*. 2004;122:369-82.

- Nickenig G, Strehlow K, Roeling J, Zolk O, Knorr A, Bohm M. Salt induces vascular AT1 receptor overexpression in vitro and in vivo. *Hypertension*. 1998;31:1272-7.
- Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sekine N, Sakoda H, Anai M, Onishi Y, Fujishiro M, Ono H, Shojima N, Inukai K, Fukushima Y, Kikuchi M, Fujita T. Insulin resistance with enhanced insulin signaling in high-salt diet-fed rats. *Diabetes*. 2001;50:573-83.
- Ogihara T, Asano T, Ando K, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Abe M, Fukushima Y, Kikuchi M, Fujita T. High-salt diet enhances insulin signaling and induces insulin resistance in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*. 2002;40:83-9.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351-8.
- Oliveira EM, Santos RA, Krieger JE. Standardization of a fluorimetric assay for the determination of tissue angiotensin-converting enzyme activity in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2000;33:755-64.
- Osmond C, Barker DJP, Winter PD, Fall CHD, Simmonds SJ. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ*. 1993;307:1519-24.
- Page LB, Haber E, Kimura AY, Purnode A. Studies with the radioimmunoassay for angiotensin II, and its application to measurement of renin activity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1969;29:200-6.
- Patriarca G, Heimann JC, Furukawa LNS. Blood pressure and metabolic responses to salt overload and restriction: is gender a determinant factor? *J Hypertens*. 2004;22:S199.
- Payne JA, Alexander BT, Khalil RA. Reduced endothelial vascular relaxation in growth-restricted offspring of pregnant rats with reduced uterine perfusion. *Hypertension*. 2003;42:768-74.
- Peltier MR, Brown MB. Experimental genital mycoplasmosis causes increased levels of mRNA for IL-6 and TNF- $\alpha$  in the placenta. *Am J Reprod Immunol*, 2005; 53:189-198.

- Penner SB, Thliveris JA, McKenzie JK, Smyth DD. Atrial-specific granule number and plasma atrial natriuretic peptide in rats: effects of beta-adrenoceptor blockade and sodium intake. *Anat Rec.* 1990;228:418-24.
- Persson E, Jansson T. Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. *Acta Physiol Scand.* 1992;145:195-6.
- Poisner AM. The human placental renin-angiotensin system. *Front Neuroendocrinol.* 1998;19:232-52.
- Prada PA, Okamoto MM, Furukawa LN, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High- or low-salt diet from weaning to adulthood: effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension.* 2000;35:424-9.
- Quadros MR, Gontijo JAR, Figueiredo JF. Renal tubular sodium handling determined by lithium clearance in partially hepatectomized rats. *Braz J Med Biol Res.* 1996;29:1077-83.
- Regnault TR, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies: a review. *Placenta.* 2002;23:S119-S29.
- Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M. Induction of intrauterine growth restriction with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;180:608-13.
- Ruivo GF, Leandro SM, Nascimento CA, Catanozi S, Rocha JC, Furukawa LNS, Dolnikoff MS, Quintão ECR, Heimann JC. Insulin resistance due to chronic salt restriction is corrected by  $\alpha$  and  $\beta$  blockade and by L-arginine. *Physiol Behav.* 2006;88:364-70.
- Sanin LH, Lopez SR, Olivares ET, Terrazas MC, Silva MA, Carrillo ML. Relation between birth weight and placental weight. *Biol Neonate.* 2001;80:113-7.
- Santos RA, Krieger EM, Greene LJ. An improved fluorimetric assay of rat serum and plasma converting enzyme. *Hypertension.* 1985;7:244-52.
- Saudek CD, Finkowski M, Knopp RH. Plasma glucagon and insulin in rat pregnancy. Roles in glucose homeostasis. *J Clin Invest.* 1975;55:180-7.

- Shah DM. Role of the renin-angiotensin system in the pathogenesis of preeclampsia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;288:F614-F25.
- Sibley CP, Turner MA, Cetin I, Ayuk P, Boyd CA, D'Souza SW, Glazier JD, Greenwood SL, Jansson T, Powell T. Placental phenotypes of intrauterine growth. *Pediatr Res*. 2005;58:827-32.
- Silva AA, Noronha IL, Oliveira IB, Malheiros DMC, Heimann JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2003;13:133-9.
- Sim MK, Seng KM. Development of angiotensin converting enzyme in fetal lung and placenta of the rat and human. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1984;11:497-501.
- Slangen BFM, Out ICM, Janssen BJA, Peeters LLH. Blood pressure and heart rate variability in early pregnancy in rats. *Heart Circ Physiol*. 1997;42:H1794-9.
- Slot C. Plasma creatinine determination: a new and specific Jaffe reaction method. *Scand J Clin Lab Invest*. 1965;17:381-7.
- Smith SC, Baker PN, Symonds EM. Increased placental apoptosis in intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 1997;177:1395-401.
- Snoeck A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. *Biol Neonate*. 1990;57:107-18.
- Stewen P, Mervaala E, Karppanen H, Nyman T, Saijonmaa O, Tikkanen I, Fyhrquist F. Sodium load increases renal angiotensin type 1 receptors and decreases bradykinin type 2 receptors. *Hypertens Res*. 2003;26:583-9.
- St-Loius J, Sicotte B, Beauséjour A, Brochu M. Remodeling and angiotensin II responses of the uterine arcuate arteries of pregnant rats are altered by low- and high-sodium intake. *Reproduction*. 2006;131:331-9.
- Svane D, Kahr O, Hansen VB, Holm-Nielsen P, Forman A. Angiotensin-converting enzyme activity and contractile effects of angiotensin I and II in human uteroplacental arteries. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172:991-7.
- Toal CB, Leenen FHH. Dietary sodium restriction and development of hypertension in spontaneously hypertension rats. *Am J Physiol*. 1983;245:H1081-H4.

- Valdes G, Neves LA, Anton L, Corthorn J, Chacon C, Germain AM, Merrill DC, Ferrario CM, Sarao R, Penninger J, Brosnihan KB. Distribution of angiotensin-(1-7) and ACE2 in human placentas of normal and pathological pregnancies. *Placenta*. 2006; 27:200-207.
- Vidinho AF Jr, Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa LN, Campos RR, de Toledo Bergamaschi CM, Carpinelli AR, Quintão EC, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult Wistar rats. *Pediatr Res*. 2004;56:842-8.
- Wallace JM, Aitken RP, Cheyne MA. Nutrient partitioning and fetal growth in rapidly growing adolescent ewes. *J Reprod Fertil*. 1996;107:183-90.
- Wallace JM, Aitken RP, Milne JS, Hay WW Jr. Nutritionally mediated placental growth restriction in the growing adolescent: consequences for the fetus. *Biol Reprod*. 2004;71:1055-62.
- Wang DH, Du Y. Regulation of vascular type 1 angiotensin II receptor in hypertension and sodium loading: role of angiotensin II. *J Hypertens*. 1998;16:467-75.
- Williams DJ, Vallance PJ, Neild Gh, Spencer JA, Imms FJ. Nitric oxide-mediated vasodilation in human pregnancy. *Am J Physiol*. 1997;272:H748-H52.
- Wisdom SJ, Wilson R, McKillop JH, Walker JJ. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *Am J Obstet Gynecol*. 1991;165:1701-4.
- Wolf G. Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:48-51.
- Wolf K and Kurtz A. Influence of salt intake on atrial natriuretic peptide gene expression in rats. *Pflügers Arch*. 1997;433:809-16.
- Woods LL. Fetal origins of adult hypertension: a renal mechanism? *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2000;9:419-25.
- Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res*. 2001;49:460-7.

- Woods LL, Rasch R. Perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number, and renal function in rats. *Am J Physiol*. 1998;275:R-1593-9.
- Wootton R, McFadyen IR, Cooper JE. Measurement of placental blood flow in the pig and its relation to placental and fetal weight. *Biol Neonate*. 1977;31:333-9.
- Xia Y, Wen HY, Kellems RE. Angiotensin II inhibits human trophoblast invasion through AT1 receptor activation. *J Biol Chem*. 2002;277:24601-8.
- Zheng J, Bird IM, Chen DB, Magness RR. Angiotensin II regulation of ovine fetoplacental artery endothelial functions: interactions with nitric oxide. *J Physiol*. 2005;565:59-69.
- Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high-salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286:H575-H83.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)