

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Medicina
Curso de Nutrição
Departamento de Nutrição
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica

Daniela Pereira Stocher

**Alterações mitocondriais e no estado redox em encéfalo da prole de ratas
Wistar submetidas à dieta com alto conteúdo de sal durante a gestação**

Porto Alegre

2015

Daniela Pereira Stocher

**Alterações mitocondriais e no estado redox em encéfalo da prole de ratas
Wistar submetidas à dieta com alto conteúdo de sal durante a gestação**

Trabalho de conclusão de graduação apresentado
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Bacharel em Nutrição, à Universidade Federal do
Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Matté

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Martine Kienzle Hagen

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Pereira Stocher, Daniela

Alterações mitocondriais e no estado redox em encéfalo da prole de ratas Wistar submetidas à dieta com alto conteúdo de sal durante a gestação / Daniela Pereira Stocher. -- 2015.

61 f.

Orientadora: Cristiane Matté.

Coorientadora: Martine Kienzle Hagen.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Curso de Nutrição, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. dieta hipersalina. 2. gravidez. 3. programação metabólica. 4. estresse oxidativo. I. Matté, Cristiane, orient. II. Kienzle Hagen, Martine, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã pelo apoio e por acreditarem em mim. Vocês foram essenciais nesta trajetória. Obrigada pela oportunidade de chegar até aqui.

Aos mestres que fizeram parte da minha graduação e contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

À minha orientadora, Prof^a Cristiane Matté, por todos os ensinamentos que me proporcionou, desde as disciplinas de bioquímica à orientação deste trabalho. Sou muito grata pela oportunidade de ter me inserido na iniciação científica. Obrigada pelo carinho e incentivo sempre. Gostaria de agradecer também a minha co-orientadora, Martine Hagen, pela parceria e suporte oferecido neste último ano.

Aos amigos do laboratório 23 que me auxiliaram na construção deste trabalho: esta conquista também é de vocês. Obrigada pela ajuda, pelos ensinamentos, pela amizade e pelos momentos que passamos juntos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e biotério por terem, de alguma forma, contribuído na realização deste trabalho.

RESUMO

No Brasil e no mundo, a ingestão excessiva de sal é resultado do padrão alimentar contemporâneo e está associada com o risco aumentado para doenças cardiovasculares. O excesso desse nutriente na alimentação está relacionado com alterações metabólicas importantes, inclusive no estado redox. A gestação é um período sensível a interferentes que possam afetar a programação metabólica do feto. Nesse contexto, fatores ambientais, tais como nutrição, exercício físico, drogas e estresse materno podem promover efeitos em curto e longo prazo na prole. Apesar de estar envolvido na fisiopatologia de muitas doenças, pouco se sabe sobre os efeitos do consumo excessivo de sal na gestação sobre parâmetros mitocondriais e de homeostase redox. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da dieta hipersalina, durante a prenhez e lactação, sobre massa e potencial de membrana mitocondrial e o estado redox encefálico da prole. Ratas Wistar adultas foram divididas em 2 grupos: dieta controle (NaCl 0,675%) e dieta hipersalina (NaCl 7,2%), que foram administradas durante 5 semanas consecutivas, tempo correspondente aos períodos de adaptação prévia à dieta, gestação e lactação. Os filhotes foram eutanasiados ao 7º dia de vida e as estruturas hipotálamo, cerebelo, córtex parietal, córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecadas e utilizadas imediatamente para as técnicas que envolvem citometria de fluxo, ou estocadas a -80º C até a realização dos demais ensaios bioquímicos. Foram mensurados a produção de espécies reativas, níveis de óxido nítrico, níveis de superóxido mitocondrial, massa mitocondrial e potencial de membrana, atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase, catalase, glutathione-peroxidase e glioxalase-1, além dos níveis de glutathione reduzida. A dieta materna hipersalina provocou aumento da produção de espécies reativas no cerebelo da prole, além de diminuição nos níveis de óxido nítrico e menores valores de massa mitocondrial e potencial de membrana. Observou-se um aumento dos níveis de óxido nítrico no hipotálamo e córtex pré-frontal dos filhotes. No hipocampo, a produção de espécies reativas encontrou-se diminuída, porém houve um aumento nos níveis de superóxido mitocondrial. A atividade da superóxido-dismutase e da glutathione-peroxidase encontraram-se aumentadas no cerebelo e córtex parietal da prole, respectivamente. Por outro lado, a dieta hipersalina provocou diminuição da atividade da catalase no córtex pré-frontal dos filhotes. Nenhuma alteração significativa foi encontrada na atividade da glioxalase-1 em nenhuma das estruturas avaliadas. Os resultados sugerem que a alimentação materna é capaz de influenciar de forma redox ativa a programação metabólica encefálica no período de desenvolvimento fetal. Além disso, a dieta hipersalina demonstrou ter efeito tecido-dependente e potencial pró-oxidante no encéfalo da prole.

ABSTRACT

In worldwide, excessive intake of salt is common in dietary patterns and it is associated with increased risk for cardiovascular disease. It is known that high-salt intake is associated with important metabolic changes, including in redox state. Pregnancy is an important period to metabolic programming. Environmental features, as physical activity, stress, drugs and maternal diet seem to influence the critical period of fetal development, and may cause short- or long-term effects. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress are involved in the pathophysiology of many diseases, but little is known about the effect of excessive salt intake during pregnancy on these parameters. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of high-salt diet supplemented during pregnancy and lactation on mitochondrial function and redox state of offspring's brain. Wistar rats were divided into two groups: control diet (0.675% NaCl) and high-salt diet (7.2% NaCl). Rats were fed during 5 weeks, time corresponding to diet adaptation, pregnancy and lactation. Offspring was euthanized at post-natal day 7 when hypothalamus, cerebellum, parietal cortex, prefrontal cortex, and hippocampus were dissected and used immediately for flow cytometry analysis, or stored at -80° C until biochemical assays. We evaluated reactive species production, activities of antioxidant enzymes superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glyoxalase-1, as far as reduced glutathione levels. High-salt diet during pregnancy and lactation promoted an increment in reactive species and decreased nitric oxide levels in offspring's cerebellum. Cerebellum also presented lower values of mitochondrial mass and membrane potential in high-salt diet group. Hypothalamus and prefrontal cortex showed an increment in nitric oxide levels. Offspring's prefrontal cortex also showed increased levels of mitochondrial superoxide. In hippocampus, the concentration of reactive species was decreased whereas levels of mitochondrial superoxide were increased. Besides, activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and glutathione peroxidase was increased in cerebellum and parietal cortex, respectively. In addition, high-salt diet caused an impairment in catalase activity in prefrontal cortex of offspring. No significantly difference was observed in glyoxalase-1 activity in the evaluated structures. Results suggests that maternal diet during pregnancy and lactation influences metabolic programming, and a high-salt diet can cause modulations in mitochondrial activity and redox state of the offspring's brain.

LISTA DE ABREVIATURAS

8-iso-PGF2 α – 8-iso-prostaglandina F2a

8-OHdG - 8-hidroxi-deoxiguanosina

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação

ANGII – Angiotensina II

CAT – Catalase

CCAC – Canadian Council on Animal Care

CEUA/UFRGS – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

COMPESQ – Comissão de Pesquisa

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTE – Cadeia transportadora de elétrons

CVD – Doença cardiovascular

DASH – Dietary Approach to Stop Hypertension

DBCA – Diretriz Brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos

DCFH-DA – Dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato

DCNT – Doenças crônicas não transmissíveis

DRI – Dietary Reference Intakes

ECA – Enzima conversora de angiotensina

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GLO1 – Glioxalase-1

GPx – Glutathione-peroxidase

Grx – Glutarredoxina

GSH – Glutathione reduzida

GSH-GSSG – Relação glutatona reduzida/ glutatona oxidada

H_2O_2 - Peróxido de hidrogênio

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

IGF-2 – Fator de crescimento tipo-insulina 2

IMC - Índice de massa corporal

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

NO^* - Óxido nítrico

$O_2^{\bullet-}$ - Radical ânion superóxido

*OH – Radical hidroxil

OMS – Organização Mundial da Saúde

$ONOO^-$ - Peroxinitrito

PA – Pressão arterial

PN0 – Dia pós-natal 0

PN7 – Dia pós-natal 7

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

Prx – Peroxirredoxina

SOD – Superóxido-dismutase

SRA – Sistema renina-angiotensina

Trx – Tiorredoxina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número médio de filhotes por ninhada e peso médio dos filhotes.	31
Tabela 2. Percentual de variação da intensidade de fluorescência dos níveis de espécies reativas produzidos após dieta hipersalina, avaliados pela oxidação da DCFH.	32
Tabela 3. Percentual de variação da intensidade de fluorescência dos níveis de óxido nítrico produzidos após dieta hipersalina.	33
Tabela 4. Percentual de variação da intensidade de fluorescência dos níveis de superóxido mitocondrial após dieta hipersalina.	34
Tabela 5. Percentual de variação da intensidade de fluorescência referente à massa mitocondrial após dieta hipersalina.	35
Tabela 6. Percentual de variação da intensidade de fluorescência referente ao potencial de membrana mitocondrial após dieta hipersalina.	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A produção de EROs e as defesas antioxidantes enzimáticas endógenas representadas pelas enzimas SOD, CAT e GPx.....	19
Figura 2. Linha do tempo experimental.....	25
Figura 3. Média de ganho de peso diário das ratas submetidas à dieta controle ou dieta hipersalina durante a gestação.....	31
Figura 4. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutational- peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutational reduzida (GSH) (D) no hipotálamo da prole (PN7).....	37
Figura 5. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutational- peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutational reduzida (GSH) (D) no cerebelo da prole (PN7).....	38
Figura 6. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutational- peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutational reduzida (GSH) (D) no córtex parietal da prole (PN7).....	39
Figura 7. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutational- peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutational reduzida (GSH) (D) no córtex pré- frontal da prole (PN7).....	40
Figura 8. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutational- peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutational reduzida (GSH) (D) no hipocampo da prole (PN7).....	41
Figura 9. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade da enzima antioxidante glioxalase-1 (GLO1) no cerebelo (A), córtex parietal (B), córtex pré- frontal (C) e hipocampo (D) da prole (PN7).....	42

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Perfil nutricional populacional e o consumo de sal.....	12
1.2. Evidências científicas sobre o efeito do sal no metabolismo.....	13
1.3. Gestação e nutrição	15
1.4. Estresse oxidativo	17
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. Animais	23
3.2. Reagentes.....	24
3.3. Modelo experimental.....	24
3.4. Dieta controle e dieta hipersalina	26
3.5. Ensaio bioquímico	26
3.5.1. <i>Parâmetros mitocondriais e níveis de espécies reativas</i>	26
3.5.2. <i>Atividade das enzimas antioxidantes</i>	27
3.5.3. <i>Níveis de glutathiona reduzida (GSH)</i>	28
3.5.4. <i>Concentração de proteínas</i>	28
3.6. Análises estatísticas.....	29
3.7. Descarte de resíduos	29
4. RESULTADOS	30
4.1. Média do consumo de sal das ratas mães	30
4.2. Avaliação do ganho de peso das ratas mães.....	30
4.3. Número de filhotes por ninhada e peso ao nascer	31
4.4. Efeito da dieta materna hipersalina sobre os níveis de espécies reativas no encéfalo da prole.....	32
4.5. Efeito da dieta materna hipersalina sobre os níveis de óxido nítrico no encéfalo da prole.....	33

4.6. Efeito da dieta materna hipersalina sobre os níveis de superóxido mitocondrial no encéfalo da prole	34
4.7. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a massa e o potencial de membrana mitocondriais no encéfalo da prole	35
4.8. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH no hipotálamo da prole.....	37
4.9. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH em cerebelo da prole	38
4.10. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH no córtex parietal da prole.....	39
4.11. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH no córtex pré-frontal da prole	40
4.12. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH no hipocampo da prole.....	41
4.13. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade da glicoxalase-1 no encéfalo da prole.....	42
5. DISCUSSÃO.....	43
6. CONCLUSÕES.....	51
7. REFERÊNCIAS	52
ANEXO I – Carta de aprovação da CEUA	61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Perfil nutricional populacional e o consumo de sal

O padrão alimentar contemporâneo é resultado de uma série de modificações que ocorreram ao longo do tempo, influenciadas pelos processos de industrialização e globalização (Popkin, 2006). A Revolução Industrial é um marco histórico importante na origem da transição nutricional através das mudanças nos processos de produção e distribuição de alimentos (Pinheiro, 2005). Inovações como a produção de alimentos em larga escala, a industrialização dos alimentos e o aperfeiçoamento dos métodos de conservação dos alimentos contribuíram para modificar o hábito alimentar e comportamental da população (Fonseca et al., 2011).

O simbolismo dado ao alimento deixou de caracterizar-se por refeições caseiras realizadas com a família e deu lugar para as refeições rápidas e a preferência por alimentos processados (Moreira, 2010). O tempo, o trabalho e a mídia são os principais fatores que influenciam as escolhas alimentares (Pinheiro, 2005, Popkin, 2006).

O aumento do consumo de produtos industrializados está associado a uma alimentação de baixa qualidade nutricional e alta densidade energética, pobre em vitaminas e minerais. Essa transição nutricional que vivenciamos somada ao estilo de vida sedentário confere aumento do risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como hipertensão arterial sistêmica (HAS), diabetes e câncer. No Brasil, esse perfil nutricional é percebido através dos resultados da última Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) realizada em 2008-2009, a qual indica um consumo elevado de açúcar, gorduras e/ou sódio na alimentação da população (IBGE, 2011).

O elevado consumo de sal presente na alimentação já é considerado um desafio para a saúde pública em nível mundial (WHO, 2007). No Brasil, a POF (2008-2009) demonstrou inadequação do consumo de sódio em todas as faixas etárias da população. Os dados obtidos indicam que a ingestão deste nutriente encontra-se acima do recomendado pelos valores de referência de ingestão dietética (Dietary Reference Intakes - DRIs) (Institute of Medicine, 2005, IBGE, 2011). E, em adição, a média do consumo de sal do brasileiro corresponde a 12 gramas diárias por pessoa, ou seja, mais que o dobro do recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), de 5 g/dia (WHO, 2012). Esses dados são tão alarmantes que, em 2010, o Ministério da Saúde e a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA) criaram um plano de estratégia a fim de reduzir o consumo de sal para menos de 2 g/dia até o ano de 2020 (BRASIL, 2010, BRASIL, 2011).

1.2. Evidências científicas sobre o efeito do sal no metabolismo

O sal é composto por eletrólitos essenciais para a homeostase celular: o sódio (Na^+) e o cloro (Cl^-). No entanto, é necessário que exista um balanço equilibrado nos níveis de sódio no organismo, a fim de manter o volume corporal e a pressão sanguínea (Gupta et al., 2011).

Sabe-se que o consumo de sal afeta diretamente o volume sanguíneo e a pressão arterial (PA). À medida em que os níveis de sódio aumentam, ocorre retenção de líquidos corporais, o que leva ao aumento do volume sanguíneo (Gupta et al., 2011). Em consequência da hipervolemia, a pressão sanguínea exercida sobre os vasos sanguíneos também se eleva. Em curto prazo, esse processo é regulado pelo organismo através do sistema renina-angiotensina (SRA), de forma a

manter a homeostase vascular e renal. No entanto, a ingestão crônica de alto teor de sal está associada à disfunção desse sistema, o que permite que os níveis elevados de PA sejam sustentados e, além disso, haja sobrecarga do trabalho renal, em função da alta taxa de excreção de Na^+ (Guyton and Hall, 2006).

O consumo excessivo de sal causa efeitos deletérios para a saúde e está associado a níveis elevados de PA (1988, Mohan and Campbell, 2009, Ito et al., 2015). O aumento da PA está relacionado com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV), bem como de complicações renais decorrentes da hipertensão arterial. Sendo assim, pode ser atribuído ao alto consumo de sal o risco aumentado para infarto agudo do miocárdio, parada cardíaca, acidente vascular encefálico, e, ainda, falência renal (Tuomilehto et al., 2001, Umesawa et al., 2008, O'Donnell et al., 2011).

A hipertensão arterial sistêmica é uma DCNT caracterizada por níveis elevados de pressão arterial sustentados em longo prazo (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2010). A HAS é uma doença multifatorial, onde além dos fatores de risco não modificáveis como idade, sexo e história familiar, é também influenciada por fatores de risco modificáveis, relacionados ao estilo de vida (Ruilope and Schmieder, 2012). Ao mesmo tempo, intervenções dietoterápicas com restrição de sal, como a dieta DASH (Dietary Approach to Stop Hypertension), demonstraram associação com diminuição do risco para DCV (Sacks et al., 2001, He et al., 2013). Sendo assim, o consumo de sódio representa um importante fator de risco modificável para o tratamento não medicamentoso da HAS e outras DCV (Blaustein et al., 2006, DuPont et al., 2013, Stocker et al., 2013).

As DCV estão entre as principais causas de morte no mundo e representam a principal causa de morte no Brasil. Segundo dados do DATASUS, as doenças cardiovasculares foram responsáveis por 339.672 óbitos no Brasil no ano de 2013. Além disso, as DCV são dispendiosas para o sistema de saúde. Portanto, com base na consistência de dados epidemiológicos, a OMS recomenda que o consumo médio das populações (de 9 a 12 g/dia) seja reduzido (WHO, 2007).

1.3. Gestação e nutrição

A gestação é um importante período para a programação metabólica fetal (Heijmans et al., 2008). A exposição da gestante a fatores externos/ambientais é capaz de modificar genes durante o desenvolvimento do feto; principalmente por modificações epigenéticas (Hales and Barker, 2001, Mathias et al., 2014, Bazrgar et al., 2015). Modificações epigenéticas podem ser resultantes de mudanças da homeostase do organismo decorrentes da resposta à nutrição, estresse, infecção e estilo de vida (Bale, 2015). Nesse contexto, os hábitos alimentares durante a gestação são capazes de causar alterações estruturais e/ou fisiológicas no feto que podem perdurar até a vida adulta (Canani et al., 2011, Mathias et al., 2014).

Em 1989, o epidemiologista David Barker demonstrou, pela primeira vez, a relação entre baixo peso ao nascer e risco aumentado para cardiopatia isquêmica na vida adulta (Barker et al., 1989). A partir desse, muitos outros estudos foram desenvolvidos sustentando a hipótese de Barker: a origem e/ou risco aumentado para o desenvolvimento de doenças crônicas durante a vida adulta são programadas durante o período intrauterino, estando relacionadas com as condições ambientais às quais a gestante é exposta durante o período crítico do desenvolvimento fetal

(Barker, 1995, Barker et al., 2006). O organismo é capaz de adaptar-se ao ambiente adverso, caracterizando a plasticidade que ocorre durante os estágios de desenvolvimento do feto (Bale et al., 2010, Bale, 2015)

As modificações epigenéticas envolvem mecanismos como a metilação do DNA, modificações covalentes nas histonas e modulação da expressão gênica por RNAs não codificantes. Essas modificações nas bases nitrogenadas e proteínas de enovelamento do DNA levam ao remodelamento da cromatina, afetando assim a expressão gênica e, portanto, contribuindo para a programação fetal (Sookoian et al., 2013). Tanto os excessos alimentares quanto a deficiência de nutrientes podem influenciar esse período (Lillicrop et al., 2005, Tzanetakou et al., 2011). Modelos de desnutrição pré-natal apresentaram alterações epigenéticas envolvendo o fator de crescimento tipo-insulina 2 (IGF-2) na prole, importante fator de crescimento durante o período gravídico (Heijmans et al., 2008, Zhang et al., 2010).

Estudos experimentais demonstraram que dietas restritas em proteínas oferecidas durante a prenhez estão relacionadas com baixo peso ao nascer, além de alterações na expressão de genes envolvidos na regulação da pressão arterial e alterações na expressão gênica de receptores de glicocorticoides e mineralocorticoides da prole (Bertram et al., 2001, Brennan et al., 2005, Guan et al., 2005). Restrições proteicas durante a gestação também estão relacionadas com alterações na expressão gênica de enzimas lipogênicas dos filhotes, sugerindo risco aumentado para síndrome metabólica na vida adulta (Maloney et al., 2003). Além disso, a metilação do DNA pode estar relacionada aos níveis elevados de glicose no sangue e até mesmo sustentar a hiperglicemia na vida adulta (Bouchard et al., 2012, Chen et al., 2013).

1.4. Estresse oxidativo

Durante o metabolismo celular, reações de oxidação e redução (redox) ocorrem o tempo todo e são responsáveis por converter a energia dos alimentos em uma forma quimicamente utilizável pelas células. Assim como essas reações são essenciais, também promovem a formação de espécies reativas, devido à alta taxa de transferência de elétrons entre moléculas (Halliwell, 2011). Considerando que o nosso metabolismo é predominantemente aeróbico, as principais espécies reativas que produzimos são aquelas derivadas do metabolismo do oxigênio. Além das espécies reativas de oxigênio (EROs), também são formadas espécies reativas a partir do metabolismo do nitrogênio (ERNs) (Schieber and Chandel, 2014). As espécies reativas desempenham funções fisiológicas importantes como a sinalização e defesa celular, mas também estão envolvidas em processos patológicos (Halliwell, 2011, Schieber and Chandel, 2014).

Sendo radicais livres ou não radicais, as espécies reativas são geradas em diversos locais da célula, em passos intermediários nas reações redox ou através do “vazamento” de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (CTE). Por serem instáveis, as espécies reativas podem reagir com biomoléculas essenciais ao organismo (proteínas, lipídios, carboidratos e DNA) na tentativa de alcançarem sua estabilidade. Ao sofrerem dano oxidativo, essas biomoléculas podem perder suas funções (Halliwell, 2006). Contudo, para o funcionamento normal do organismo é necessário que haja equilíbrio entre a produção e eliminação das espécies reativas, de forma que as funções fisiológicas não sejam prejudicadas em função do dano causado pelas espécies reativas (Winterbourn, 2008).

Existem diversas EROs e ERNs produzidas no organismo. Entre as principais estão: ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($\cdot OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico ($NO\cdot$) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Ao mesmo tempo, contamos com defesas antioxidantes, as quais protegem as biomoléculas contra o dano oxidativo. Os sistemas enzimáticos e não enzimáticos antioxidantes exercem suas funções com o intuito de manter o estado redox em condições de equilíbrio (Halliwell, 2012).

A CTE é a principal fonte do radical superóxido, pois o oxigênio, acceptor final de elétrons, é suscetível a sofrer redução parcial devido ao “vazamento” de elétrons entre os complexos I e III (Mailloux, 2015). Além da CTE, reações de auto-oxidação, atividade de células fagocíticas, catabolismo de purinas e a reação catalisada pela enzima NAD(P)H-oxidase podem gerar o radical $O_2^{\cdot-}$. O principal destino dessa espécie reativa é a dismutação, catalisada pela enzima antioxidante superóxido-dismutase (SOD) (Indo et al., 2015).

O peróxido de hidrogênio é produto da reação catalisada pela SOD, bem como de outras enzimas, tal como a acil-CoA-oxidase peroxissomal; é uma espécie reativa relativamente estável, sendo rapidamente eliminado por enzimas antioxidantes. O H_2O_2 é capaz de se difundir através das membranas, ou seja, pode ocasionar danos oxidativos a moléculas que se encontram distantes do seu local de origem (Halliwell et al., 2000). Apesar da baixa reatividade, o H_2O_2 pode ser convertido a espécies altamente reativas, como $\cdot OH$ e o ácido hipocloroso ($HOCl$). A eliminação do excesso de H_2O_2 celular e manutenção dos seus níveis fisiológicos é realizada pelas enzimas catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx) e pelo sistema tioredoxina (Trx) (Lushchak, 2014). A decomposição do H_2O_2 a $\cdot OH$ ocorre, principalmente, pela reação de Fenton, onde o H_2O_2 interage com o ferro (Fe^{2+}), ou ainda, pela reação de Haber-Weiss ao reagir com o radical $O_2^{\cdot-}$. O radical hidroxil

possui tempo de meia-vida muito curto e é considerado o radical livre mais danoso ao organismo, já que não possuímos defesas antioxidantes enzimáticas capazes de eliminá-lo (Halliwell, 2006). A figura 1 ilustra a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes endógenas, representadas pelas enzimas SOD, CAT e GPx.

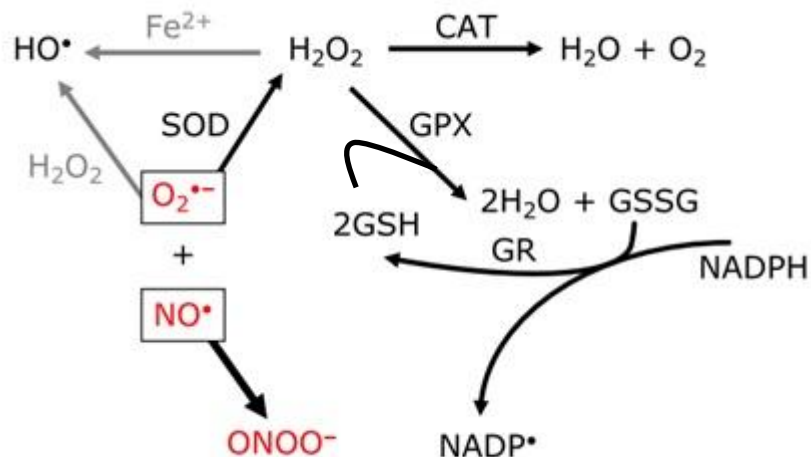


Figura 1. A produção de EROs e as defesas antioxidantes enzimáticas endógenas representadas pelas enzimas SOD, CAT e GPx. Adaptado de: Indo et al. (2015).

Abreviaturas: catalase (CAT), espécies reativas de oxigênio (EROs), glutaciona-peroxidase (GPx), superóxido-dismutase (SOD).

Além das defesas citadas anteriormente, o organismo conta ainda com as enzimas antioxidantes glicoxalase-1 (GLO1) (Thornalley, 2003), peroxirredoxina (Prx) (Perkins et al., 2015) e glutarredoxina (GRx) (Koharyova and Kolarova, 2008); bem como com moléculas antioxidantes de baixo peso molecular, tais como a glutaciona reduzida (GSH), vitaminas, carotenoides (precursores da vitamina A) e polifenóis presentes na alimentação (Da Costa et al., 2012, Halliwell, 2012). As moléculas antioxidantes são capazes de doar elétrons diretamente para os radicais livres, neutralizando-os e/ou transformando-os em espécies menos reativas.

A presença de mecanismos antioxidantes permite que as espécies reativas produzidas exerçam suas funções fisiológicas e, ao mesmo tempo, controlam os seus níveis intracelulares impedindo o seu aumento e conseqüente dano oxidativo às biomoléculas (Schieber and Chandel, 2014). No entanto, quando a produção de espécies reativas supera a capacidade antioxidante do organismo temos uma condição conhecida como estresse oxidativo (Sies, 2015). Esse desequilíbrio permite que as espécies reativas oxidem moléculas essenciais como proteínas, lipídios, carboidratos e DNA, modificando suas estruturas e funções biológicas (Halliwell, 2007). Frente a isso, as modificações ocasionadas pelo estresse oxidativo têm sido associadas ao desenvolvimento de diversas DCNTs, incluindo doenças cardiovasculares, câncer, isquemia cerebral, doenças neurodegenerativas, entre outras (Mayne, 2003, Head, 2009, Agnez-Lima et al., 2012).

Estudos realizados em humanos demonstraram marcadores importantes de estresse oxidativo aumentados em pessoas com hipertensão, inclusive em gestantes (Turpin et al., 2015). Estudos recentes associaram uma aumentada produção de EROs com hipertensão e insuficiência renal crônica (Rubattu et al., 2015).

O aumento da expressão da enzima NAD(P)H-oxidase e o aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidado nos vasos sanguíneos foram observados em pacientes com síndrome metabólica e aterosclerose. Está bem estabelecido que a síndrome metabólica é marcada pelo aumento excessivo de espécies reativas e diminuição das defesas antioxidantes (Andreadou et al., 2012). Estudos clínicos e em modelos animais de diabetes correlacionaram um elevado estresse oxidativo ao desenvolvimento da doença, onde existe diminuição da relação de GSH/GSSG, e aumento de 8-iso-prostaglandina F2a (8-iso-PGF2 α ;

marcador oxidativo do ácido araquidônico) e 8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG; marcador oxidativo do DNA) (Boren, 1976, Nishikawa et al., 2003).

Evidências sugerem que dietas hiperglicêmicas e hiperlipídicas favorecem o processo de dano oxidativo a biomoléculas e, conseqüentemente, o estresse oxidativo (De La Cruz et al., 2000, Remesar et al., 2015). Ambas estão associadas ao desenvolvimento de diabetes, aterosclerose, doenças cardiovasculares, inflamatórias e síndrome metabólica (Saisho, 2014, Iantorno et al., 2014). Em nível celular e molecular, a hiperglicemia é capaz de causar modificações epigenéticas (Russell and Cooper, 2015).

Modelos animais tratados com dieta com alto teor de sal também demonstraram alterações em parâmetros de estresse oxidativo. O aumento na produção de espécies reativas na região rostral da medula ventrolateral (Koga et al., 2008), bem como as alterações na capacidade cognitiva e favorecimento do estresse oxidativo no cérebro (aumento da produção de $O_2^{\cdot-}$ e redução da capacidade antioxidante) já foram atribuídos à dieta hipersalina (Liu et al., 2014). Além disso, foi encontrada diminuição da expressão da enzima antioxidante GLO1 no sistema nervoso central de ratos após dieta hipersalina (Chugh et al., 2013). Em humanos, a elevada ingestão de sal através da dieta demonstrou significativo aumento do isoprostano 8-iso-PGF2 α no sangue, um importante marcador de dano oxidativo a moléculas lipídicas (Laffer et al., 2006).

Considerando que: 1) as DCNT representam um grande problema de saúde pública; 2) o estresse oxidativo representa um fator importante na etiologia dessas doenças; 3) fatores externos durante a gestação podem influenciar o estado de saúde e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta do feto através da

programação metabólica intrauterina; 4) a ingestão de sal da população encontra-se acima das recomendações; 5) a PA durante a gestação representa risco para pré-eclâmpsia; e 6) a escassez de dados que investigam o estado redox no sistema nervoso central decorrente da alta ingestão de sal durante a gestação e os seus efeitos pós-natais, torna-se relevante investigar os efeitos que o consumo elevado de sal durante o período gravídico pode acarretar na vida pós-natal do feto.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos mitocondriais e no estado redox encefálico de filhotes de ratas Wistar submetidas à dieta com alto conteúdo de cloreto de sódio (NaCl) durante a prenhez e lactação.

2.2. Objetivos específicos

Mensurar a produção de espécies reativas, superóxido mitocondrial e óxido nítrico, massa e potencial de membrana mitocondriais através de citometria de fluxo no hipotálamo, cerebelo, córtex parietal, córtex pré-frontal e hipocampo da prole de ratas submetidas à dieta hipersalina durante o período de prenhez e lactação.

Determinar as defesas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT, GPx e GLO1) e níveis de GSH no hipotálamo, cerebelo, córtex parietal, córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes de ratas submetidas à dieta hipersalina durante a prenhez e lactação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados 81 filhotes de ratas Wistar adultas (40 animais), acasaladas com machos adultos (20 animais), provindos do biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS/UFRGS. Os animais foram mantidos em ciclos de 12h/12h, claro/escuro, à temperatura constante de $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, com acesso à alimentação (dieta controle ou dieta hipersalina) e água *ad libitum*.

Os animais permaneceram em sala destinada para alojamento de animais, com controle de ventilação, umidade e ruídos, no biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS/UFRGS, durante todo o período de estudo. A prole permaneceu com a mãe em caixa individual (41 x 34 x 16 cm), devidamente forrada com maravalha, trocada 2 vezes/semana, até a eutanásia (dia pós-natal 7 - PN7).

Todos os experimentos com os animais foram conduzidos seguindo os cuidados preconizados pelas diretrizes governamentais oficiais conforme a lei nº 11.794/2008 e as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em relação à experimentação animal (Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA) e eutanásia (Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA), indicadas pelas Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEUA/UFRGS), bem como normativas internacionais como o "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (publicação do NIH Nº 80-23, revisado em 1996) e as normas do Canadian Council on Animal Care (CCAC).

O projeto foi aprovado, sob o nº 28100, pela Comissão de Pesquisa (COMPESQ) do ICBS e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFRGS). A carta de aprovação encontra-se anexada a esse trabalho.

3.2. Reagentes

Os reagentes utilizados foram obtidos da SIGMA® Chemical Co. (St. Louis, Missouri, USA) e Life technologies (Carlsbad, California, USA). Todos os reagentes químicos foram manipulados com luvas, e em capela de exaustão, de acordo com as indicações do fabricante.

3.3. Modelo experimental

Ratas Wistar fêmeas foram alocadas na proporção 2 ratas:1 caixa e separadas em dois grupos: dieta controle e dieta hipersalina, sendo 20 animais em cada. Os animais controle receberam dieta padrão 0,675% NaCl (conteúdo normal de sal), enquanto que os animais do grupo hipersalina receberam dieta 7,2% NaCl (alto conteúdo de sal) (Liu et al., 2014). A administração da dieta foi iniciada 1 semana antes do acasalamento, como forma de adaptação. Os ratos Wistar machos foram colocados em contato com as fêmeas virgens por um período de 48 horas, na proporção 2 fêmeas:1 macho. A experimentação dos animais seguiu-se durante as 4 semanas seguintes: tempo correspondente ao período de prenhez (3 semanas) e lactação (1 semana). A figura 2 demonstra uma linha do tempo dos procedimentos experimentais realizados.

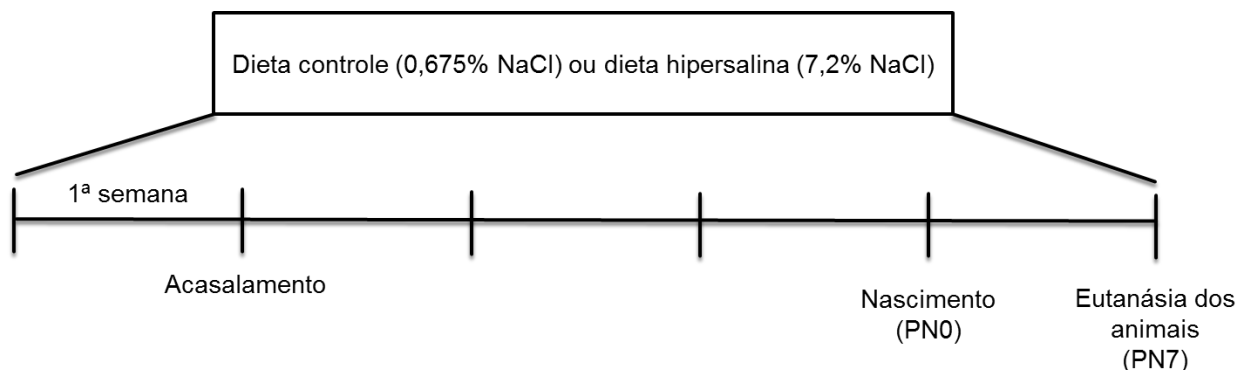


Figura 2. Linha do tempo experimental.

Abreviaturas: dia pós-natal 0 (PN0), dia pós-natal 7 (PN7).

As ratas foram pesadas diariamente para controle de ganho de peso. A ração também era pesada diariamente para que fosse obtida uma média de consumo por caixa.

Próximo ao dia de nascimento dos filhotes, as ratas foram alocadas em caixas individuais para o parto. Os nascimentos foram acompanhados a partir do 20º dia da detecção da prenhez sendo feitas duas verificações ao dia (uma pela manhã e a outra no período da tarde). Deste modo, definimos o dia pós-natal zero (PN0) de cada ninhada. Os filhotes foram deixados com a mãe até o PN7, quando foram eutanasiados por decapitação. O cérebro dos filhotes foi isolado e as estruturas cerebrais hipotálamo, cerebelo, córtex parietal, córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecadas. As amostras foram armazenadas à -80°C e aquelas utilizadas para citometria foram processadas no mesmo dia da eutanásia e a análise foi imediata.

A decapitação de todos os animais foi realizada em sala apropriada à eutanásia de animais, limpa e com exaustão, de forma a reduzir ao máximo o odor de sangue. Foram utilizadas guilhotina afiada própria para ratos e tesoura cirúrgica

adequada para a eutanásia das ratas mães e dos filhotes, respectivamente. Os materiais utilizados foram limpos com água abundante e as luvas trocadas após a eutanásia de cada animal.

Os animais destinados à eutanásia foram mantidos em outra sala até o momento em que foram levados, individualmente, para a sala destinada à eutanásia, a fim de evitar o estresse dos mesmos. Todo o procedimento foi realizado por alunos e pesquisadores treinados. Não foram utilizados anestésicos para a eutanásia dos animais, pois estes podem provocar alterações no sistema nervoso central interferindo nas análises bioquímicas que envolvem avaliação do estado redox (Istaphanous and Loepke, 2009, Jevtovic-Todorovic et al., 2003).

Utilizou-se um número amostral de 6 a 12 animais, sendo que um filhote de cada mãe foi utilizado para um ensaio diferente, a fim de evitar o "efeito ninhada" na amostragem.

3.4. Dieta controle e dieta hipersalina

A dieta controle contendo 0,675% de NaCl foi feita através da mistura de ração em farelo e água, enquanto que a dieta hipersalina contendo 7,2% de NaCl foi feita através da mistura de ração em farelo, água e sal de cozinha (Liu et al., 2014). A ração em farelo possui a mesma composição nutricional da ração padrão utilizada no biotério do Departamento de Bioquímica, ICBS/UFRGS.

3.5. Ensaio bioquímicos

3.5.1. Parâmetros mitocondriais e níveis de espécies reativas

Os níveis de espécies reativas, superóxido mitocondrial e óxido nítrico foram determinados através da marcação com dicloro-dihidro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA), MitoSOX™ Red® mitochondrial superoxide indicator, e diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-diclorofluoresceína (DAF-FM), respectivamente, através da técnica de citometria de fluxo. A massa e o potencial de membrana mitocondrial foram determinados utilizando as sondas MitoTracker® Green FM e MitoTracker® Red CM-H2XRos e, respectivamente, através da citometria de fluxo. Brevemente, 100 mg de tecido foi dissociado em 1mL de tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4 contendo 1mg% de colagenase IV e 0,5 mg% de DNase, filtrado e incubado à 37°C com as sondas fluorescentes de acordo com as especificações do fabricante. Após a incubação, as amostras foram avaliadas em citômetro, onde a fluorescência de 10.000 eventos foi quantificada. Os dados foram analisados com o software FlowJo®.

3.5.2. Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade das enzimas antioxidantes SOD (Boveris, 1984), CAT (Aebi, 1984), GPx (Wendel, 1981) e GLO1 (McLellan and Thornalley, 1989) foram mensuradas espectrofotometricamente.

3.5.2.1. Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada através da quantificação da inibição da auto-oxidação da adrenalina, medida no comprimento de onda de 480 nm. Os resultados estão expressos como Unidades/mg de proteína.

3.5.2.2. Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da CAT foi medida pela diminuição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) presente no meio, substrato da enzima, a uma absorvância de 240 nm. Os resultados estão expressos como Unidades/mg de proteína.

3.5.2.3. Atividade da enzima glutationa-peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada por meio de um ensaio indireto, através da redução da absorvância medida à 340 nm, referente à oxidação do $NADPH.H^+$ na reação de redução da GSSG, catalisada pela glutationa-redutase. Os resultados estão expressos como Unidades/mg de proteína.

3.5.2.4. Atividade da enzima glioxalase-1 (GLO1)

A atividade da GLO1 foi mensurada pela velocidade inicial de formação de S-D-lactoylglutathione, produto da reação entre metilglioxal e GSH, catalisada pela enzima, a uma absorvância de 240 nm. Os resultados estão expressos como Unidades/mg de proteína.

3.5.3. Níveis de glutationa reduzida (GSH)

Os níveis de GSH foram medidos por fluorimetria (Browne and Armstrong, 1998). As amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio 100 mM pH 8,0 contendo EDTA 5 mM e incubadas com o-ftaldialdeído (1 mg/mL de metanol) durante 15 minutos à temperatura ambiente. A fluorescência produzida foi medida em fluorímetro a comprimento de onda de excitação de 350 nm e de emissão de 420 nm. Uma curva padrão foi realizada em paralelo com as amostras, utilizando GSH como padrão (0,001-1 mM). Os resultados estão expressos em nmol GSH/mg de proteína.

3.5.4. Concentração de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada utilizando albumina bovina sérica como padrão (Lowry et al., 1951). Os dados foram expressos como mg de proteína/mL.

3.6. Análises estatísticas

A análise dos resultados foi realizada pelo teste *t* de Student e avaliada pelo programa Graph Pad 6.0. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3.7. Descarte de resíduos

A coleta, o tratamento e o descarte adequado dos resíduos biológicos foi realizada por empresa terceirizada contratada pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foram utilizados sacos brancos leitosos identificados para o descarte das carcaças dos animais, mantidos em freezer até o momento da coleta.

Resíduos químicos foram separados de acordo com as normas definidas pelo Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos, para onde foram destinados para correto descarte ou reaproveitamento.

Caixas de papelão do tipo "descarpack" foram utilizadas para descarte de materiais perfuro-cortante contaminados. Este material foi coletado por empresa licitada pela UFRGS para esse fim.

Todos os demais resíduos gerados no laboratório foram separados e descartados em lixo orgânico (preto), reciclável (azul) ou biológico (branco).

4. RESULTADOS

Os dados apresentados a seguir são referentes às análises realizadas em amostras encefálicas de filhotes de ratas submetidas à dieta hipersalina (7,2% de NaCl) durante a prenhez e lactação. O grupo controle recebeu dieta contendo 0,675% de NaCl.

4.1. Média do consumo de sal das ratas mães

A administração das dietas previstas para esse estudo foi controlada. A quantidade de ração oferecida para cada caixa e a quantidade de ração que restava após 24 horas eram aferidas diariamente e registradas. A partir disso, obtemos a média do consumo diário de sal por rata.

As ratas que recebiam a dieta controle (0,675% de NaCl) apresentaram um consumo médio de $0,28 \pm 0,03$ g de sal por dia; enquanto que aquelas que recebiam a dieta hipersalina (7,2% de NaCl) consumiam, em média, $3,09 \pm 0,34$ g de sal por dia [$t(13)=23,69;p=0,0001$].

4.2. Avaliação do ganho de peso das ratas mães

As ratas adultas submetidas às intervenções foram pesadas diariamente a fim de acompanharmos o ganho de peso das mesmas. O gráfico da figura 3 representa a média do ganho de peso diário das ratas mães de ambos os grupos ao longo do experimento. Não houve diferença estatística entre os grupos.

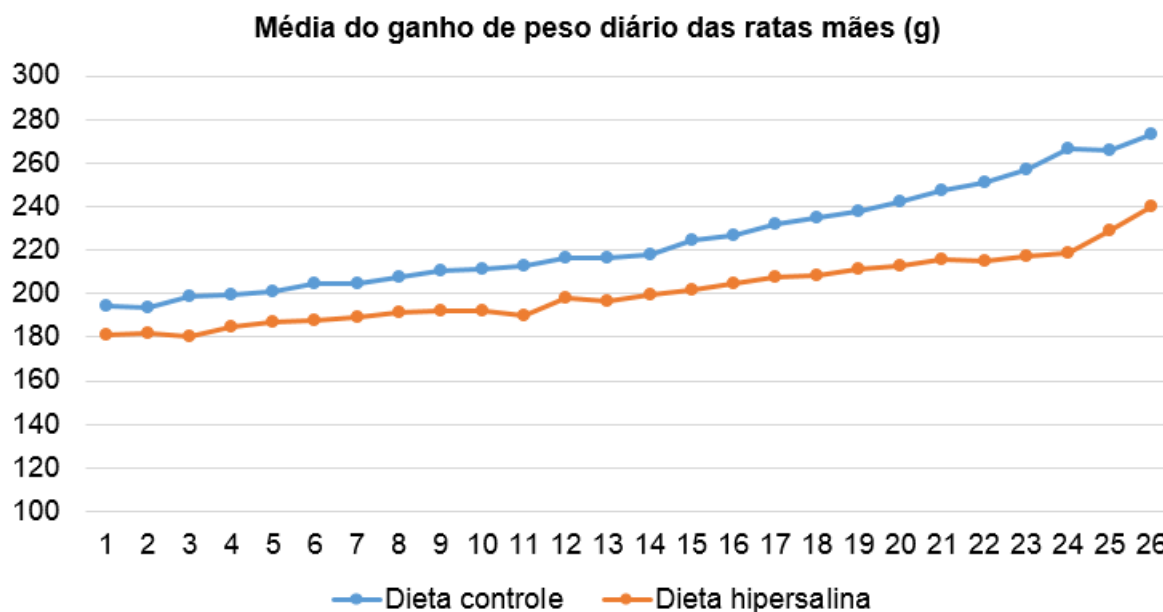


Figura 3. Média de ganho de peso diário das ratas submetidas à dieta controle ou dieta hipersalina durante a gestação. Os valores estão expressos em gramas (g). Os resultados foram avaliados por múltiplos testes *t* de Student.

4.3. Número de filhotes por ninhada e peso ao nascer

O nascimento dos filhotes foi acompanhado a partir do 20º dia da detecção da prenhez e, no PN0, as ninhadas foram pesadas a fim de obter-se o peso médio de cada filhote. A tabela 1 demonstra a análise realizada quanto ao número de filhotes por ninhada e quanto ao peso médio dos filhotes. Os parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 1. Número médio de filhotes por ninhada e peso médio dos filhotes.

Parâmetro	Dieta controle	Dieta hipersalina	Valor de <i>p</i>
Nº de filhotes por ninhada	9,11 ± 2,98	8,86 ± 3,24	0,8728
Peso do filhote (g) PN0	6,79 ± 0,90	7,08 ± 1,07	0,5569

Os dados estão expressos como média ± DP. Os resultados foram avaliados por teste *t* de Student.

Abreviaturas: dia pós-natal 0 (PN0).

4.4. Efeito da dieta materna hipersalina sobre os níveis de espécies reativas no encéfalo da prole

A dieta hipersalina promoveu diferentes modificações nos níveis de espécies reativas medidos através da oxidação da DCFH nas diferentes estruturas encefálicas avaliadas. A prole apresentou níveis elevados de DCFH no cerebelo [$t(8)=2,666;p=0,0285$] e níveis diminuídos no hipocampo [$t(19)=3,788;p=0,0012$], enquanto que as demais estruturas não demonstraram alterações [hipotálamo: $t(19)=0,3243;p=0,7493$, córtex parietal: $t(19)=1,503;p=0,1492$, córtex pré-frontal $t(19)=0,3257;p=0,7482$]. Os resultados referentes a este parâmetro estão apresentados na tabela 2 como o percentual da intensidade de fluorescência obtida na dieta hipersalina em relação ao controle (100%).

Tabela 2. Percentual de variação da intensidade de fluorescência dos níveis de espécies reativas produzidos após dieta hipersalina, avaliados pela oxidação da DCFH.

Amostra	Intensidade de fluorescência (% do controle)		
	Dieta controle	Dieta hipersalina	Valor de <i>p</i>
Hipotálamo	100 ± 10,9 %	97,46 ± 21,4 %	0,7493
Cerebelo	100 ± 8,40 %	115,0 ± 8,91 % *	0,0285
Córtex parietal	100 ± 8,52 %	91,86 ± 14,4 %	0,1492
Córtex pré-frontal	100 ± 13,5 %	102,3 ± 18,1 %	0,7482
Hipocampo	100 ± 8,49 %	86,40 ± 7,86 % **	0,0012

Os dados estão expressos como média ± DP. Os resultados foram avaliados por teste *t* de Student para $n= 8-12$ animais/grupo. * $p<0,05$; ** $p <0,01$

4.5. Efeito da dieta materna hipersalina sobre os níveis de óxido nítrico no encéfalo da prole

Assim como na dosagem dos níveis de espécies reativas, por meio da medida da oxidação do DCFH, a dieta materna hipersalina promoveu diferentes modificações nos níveis de óxido nítrico mensurados através da sonda DAF-FM, por citometria de fluxo, nas amostras encefálicas avaliadas. Os níveis de NO[•] no hipotálamo e córtex pré-frontal da prole aumentaram [hipotálamo: $t(18)=3,884;p=0,0011$, córtex pré-frontal $t(19)=0,3257;p=0,7482$], enquanto que no cerebelo, os níveis de NO[•] diminuíram [$t(18)=2,549;p=0,0202$]. Nas demais estruturas encefálicas, córtex parietal e hipocampo, os níveis de NO[•] não apresentaram alterações [córtex parietal: $t(19)=1,748;p=0,0965$, hipocampo: $t(19)=0,1048;p=0,9176$]. Os dados referentes a este parâmetro estão apresentados na tabela 3 como o percentual da intensidade de fluorescência obtida na dieta hipersalina em relação ao controle (100%).

Tabela 3. Percentual de variação da intensidade de fluorescência dos níveis de óxido nítrico produzidos após dieta hipersalina.

Amostra	Intensidade de fluorescência (% do controle)		
	Dieta controle	Dieta hipersalina	Valor de <i>p</i>
Hipotálamo	100 ± 34,1 %	155,5 ± 29,8 % **	0,0011
Cerebelo	100 ± 18,4 %	82,43 ± 12,6 % *	0,0202
Córtex parietal	100 ± 14,3 %	114,0 ± 20,5 %	0,0965
Córtex pré-frontal	100 ± 13,6 %	112,4 ± 10,6 % *	0,0300
Hipocampo	100 ± 13,5 %	101,0 ± 17,3 %	0,9176

Os dados estão expressos como média \pm DP. Os resultados foram avaliados por teste *t* de Student para $n = 8-12$ animais/grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

4.6. Efeito da dieta materna hipersalina sobre os níveis de superóxido mitocondrial no encéfalo da prole

Os níveis de superóxido produzido pela mitocôndria, medidos através da sonda MitoSox por citometria de fluxo, mostram que a dieta materna hipersalina promoveu diferentes modificações nas diferentes estruturas encefálicas avaliadas. Observou-se um aumento nos níveis de $O_2^{\cdot -}$ mitocondrial no córtex pré-frontal e no hipocampo da prole [córtex pré-frontal: $t(19)=2,720$; $p=0,0136$, hipocampo: $t(19)=2,325$; $p=0,0313$]. No hipotálamo, cerebelo e córtex parietal os níveis permaneceram inalterados [hipotálamo $t(19)=0,6891$; $p=0,4991$, cerebelo: $t(18)=1,092$; $p=0,2892$, córtex parietal: $t(19)=0,1777$; $p=0,8608$]. A tabela 4 demonstra os resultados obtidos por esta análise, expressos como o percentual da intensidade de fluorescência obtida, para a sonda MitoSox, na dieta hipersalina em relação ao controle (100%).

Tabela 4. Percentual de variação da intensidade de fluorescência dos níveis de superóxido mitocondrial após dieta hipersalina.

Amostra	Intensidade de fluorescência (% do controle)		
	Dieta controle	Dieta hipersalina	Valor de <i>p</i>
Hipotálamo	100 \pm 31,9 %	90,46 \pm 31,0 %	0,4991
Cerebelo	100 \pm 17,6 %	107,2 \pm 11,8 %	0,2892
Córtex parietal	100 \pm 08,6 %	101,04 \pm 16,0 %	0,8608
Córtex pré-frontal	100 \pm 16,8 %	119,0 \pm 15,2 % *	0,0136

Hipocampo	100 ± 9,87 %	108,5 ± 6,95 % *	0,0313
------------------	--------------	------------------	--------

Os dados estão expressos como média ± DP. Os resultados foram avaliados por teste *t* de Student para n= 8-12 animais/grupo. **p*<0,05

4.7. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a massa e o potencial de membrana mitocondriais no encéfalo da prole

Na tabela 5 estão representados os valores referentes à massa mitocondrial, percentual da intensidade de fluorescência marcada com a sonda MitoTracker Green. Foi observada alteração apenas na massa mitocondrial do cerebelo, onde os valores diminuíram [t(18)=2,250;p=0,0372]. As demais estruturas, hipotálamo, córtex parietal, córtex pré-frontal e hipocampo não apresentaram alterações significativas [hipotálamo t(17)=0,7764;p=0,4482, córtex parietal t(19)=0,1219;p=0,9043, córtex pré-frontal: t(10)=0,7612;p=0,4641, hipocampo: t(8)=1,962;p=0,0854].

Tabela 5. Percentual de variação da intensidade de fluorescência referente à massa mitocondrial após dieta hipersalina.

Amostra	Intensidade de fluorescência (% do controle)		
	Dieta controle	Dieta hipersalina	Valor de <i>p</i>
Hipotálamo	100 ± 14,8 %	92,16 ± 25,5 %	0,4482
Cerebelo	100 ± 29,1 %	79,12 ± 11,7 % *	0,0372
Córtex parietal	100 ± 12,8 %	100,7 ± 12,5 %	0,9043
Córtex pré-frontal	100 ± 18,1 %	106,6 ± 11,1 %	0,4641
Hipocampo	100 ± 13,8 %	121,2 ± 18,2 %	0,0854

Os dados estão expressos como média \pm DP. Os resultados foram avaliados por teste *t* de Student para $n= 8-12$ animais/grupo. * $p<0,05$

O perfil de variação do percentual da intensidade de fluorescência obtida no encéfalo da prole de ratas alimentadas com dieta hipersalina, na medida do potencial de membrana mitocondrial (Tabela 6) foi similar ao observado no parâmetro de medida da massa mitocondrial. Os valores de potencial de membrana diminuíram no cerebelo [$t(18)=2,477;p=0,0234$], e apresentaram uma tendência à redução no hipotálamo e no hipocampo [hipotálamo $t(17)=1,370;p=0,1886$, hipocampo $t(8)=2,128;p=0,0660$], permanecendo inalterados nas demais estruturas [córtex parietal $t(18)=0,4996;p=0,6234$, córtex pré-frontal $t(10)=0,0064;p=0,9950$].

Tabela 6. Percentual de variação da intensidade de fluorescência referente ao potencial de membrana mitocondrial após dieta hipersalina.

	Intensidade de fluorescência (% do controle)		
	Dieta controle	Dieta hipersalina	Valor de <i>p</i>
<i>Hipotálamo</i>	100 \pm 29,8 %	84,87 \pm 18,4 %	0,1886
<i>Cerebelo</i>	100 \pm 25,1 %	78,65 \pm 13,5 % *	0,0234
<i>Córtex parietal</i>	100 \pm 11,2 %	103 \pm 14,8 %	0,6234
<i>Córtex pré-frontal</i>	100 \pm 22,1 %	100,07 \pm 14,2 %	0,9950
<i>Hipocampo</i>	100 \pm 12,5 %	131,03 \pm 26,9 %	0,0660

Os dados estão expressos como média \pm DP. Os resultados foram avaliados por teste *t* de Student para $n= 8-12$ animais/grupo. * $p<0,05$

4.8. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH no hipotálamo da prole

A figura 4 demonstra os resultados obtidos a partir das análises realizadas no hipotálamo da prole. A dieta hipersalina não promoveu nenhuma alteração na atividade das enzimas antioxidantes SOD (Fig. 4A) [$t(10)=1,096;p=0,2989$], CAT (Fig. 4B) [$t(10)=1,952;p=0,0794$] e GPx (Fig. 4C) [$t(10)=1,713;p=0,1174$], bem como nos níveis de GSH (Fig. 4D) [$t(10)=0,2923;p=0,7761$] nesta estrutura.

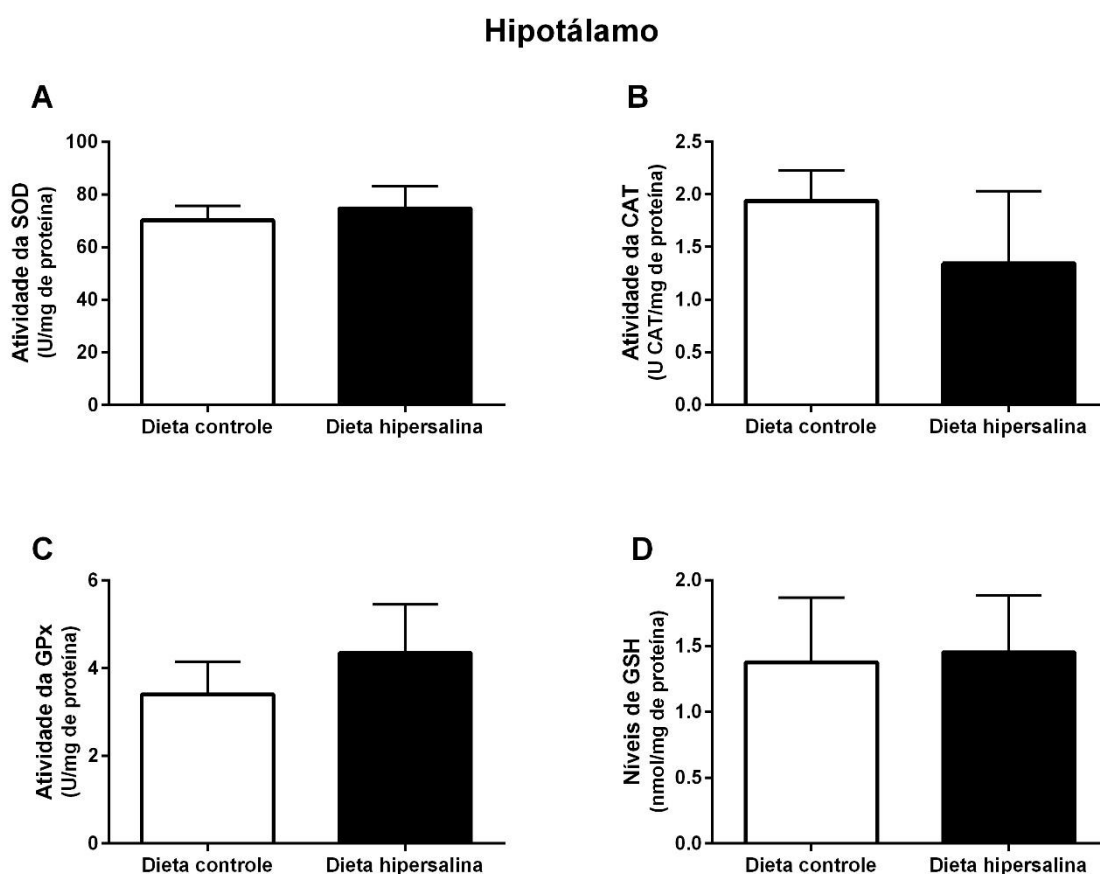


Figura 4. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutaciona-peroxidase (GPx), (C) e nos níveis de glutaciona reduzida (GSH) (D) no hipotálamo da prole (PN7). A análise dos dados foi feita através do teste *t* de Student e os resultados estão expressos em média \pm DP ($n=6$ /grupo).

4.9. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH em cerebelo da prole

A dieta hipersalina ocasionou um aumento na atividade da enzima SOD (Fig. 5A) no cerebelo dos filhotes [$t(10)=3,106;p=0,0111$]. No entanto, não foram observadas alterações significativas nos demais ensaios [CAT: $t(10)=1,551;p=0,1519$, GPx: $t(10)=0,065;p=0,9488$, GSH: $t(10)=1,0696;p=0,1208$].

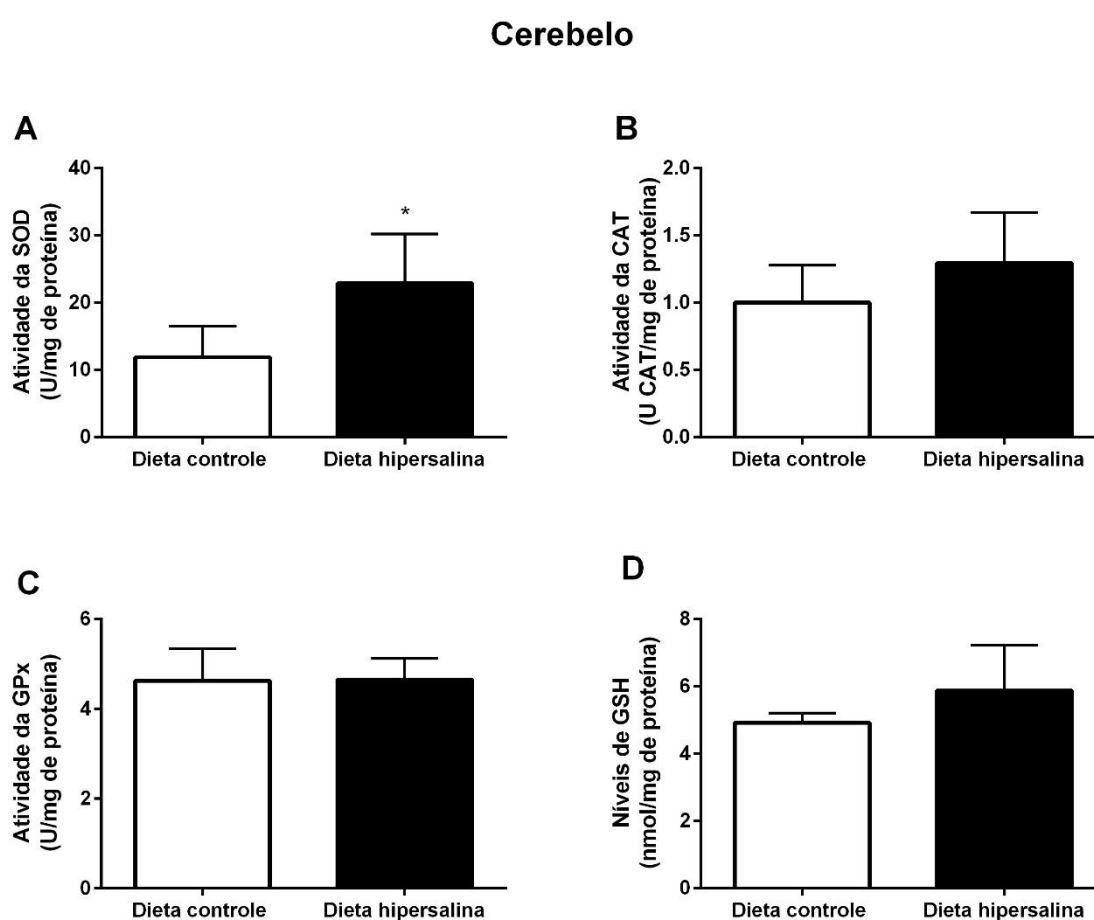


Figura 5. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutiona-peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutiona reduzida (GSH) (D) no cerebelo da prole (PN7). A análise dos dados foi feita através do teste *t* de Student e os resultados estão expressos em média \pm DP ($n=6$ /grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.10. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH no córtex parietal da prole

Observou-se um aumento da atividade da enzima GPx (Fig. 6C) no córtex parietal da prole proveniente de mães submetidas à ingestão de dieta hipersalina na gestação [t(10)=2,278;p=0,0459]. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na atividade das demais enzimas antioxidantes e níveis de GSH [SOD: t(10)=1,445;p=0,1790, CAT: t(10)=0,5974;p=0,5635, GSH: t(10)=0,3369;p=0,7431].

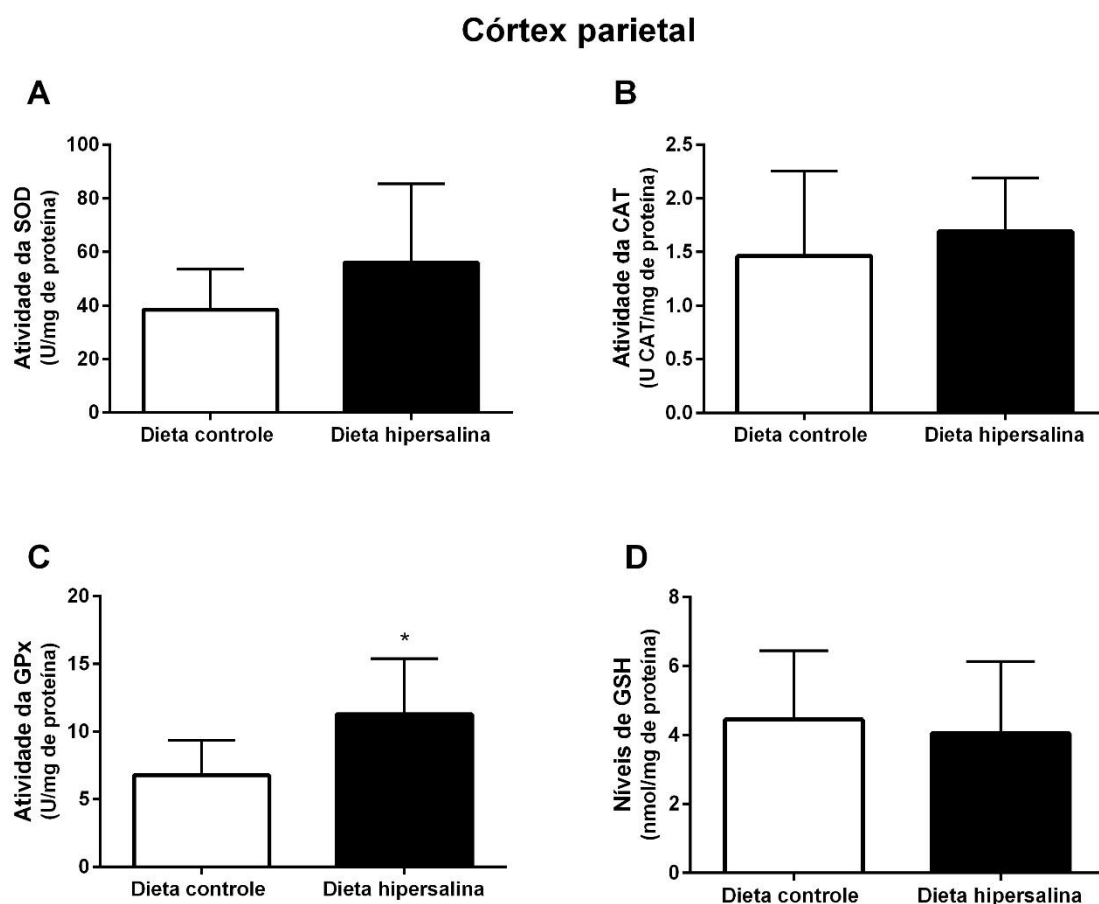


Figura 6. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutatona-peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutatona reduzida (GSH) (D) no córtex parietal da prole (PN7). A análise dos dados foi feita através do teste *t* de Student e os resultados estão expressos em média \pm DP (n=6/grupo). **p* < 0,05 em relação ao grupo controle.

4.11. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH no córtex pré-frontal da prole

A dieta hipersalina proporcionou uma diminuição na atividade da enzima antioxidante CAT (Fig. 7B) no córtex pré-frontal da prole [$t(10)=2,423;p=0,0359$]. Os demais parâmetros avaliados não apresentaram alterações [SOD: $t(10)=1,894;p=0,0874$, GPx: $t(10)=0,7464;p=0,4726$, GSH: $t(10)=1,728;p=0,1148$].

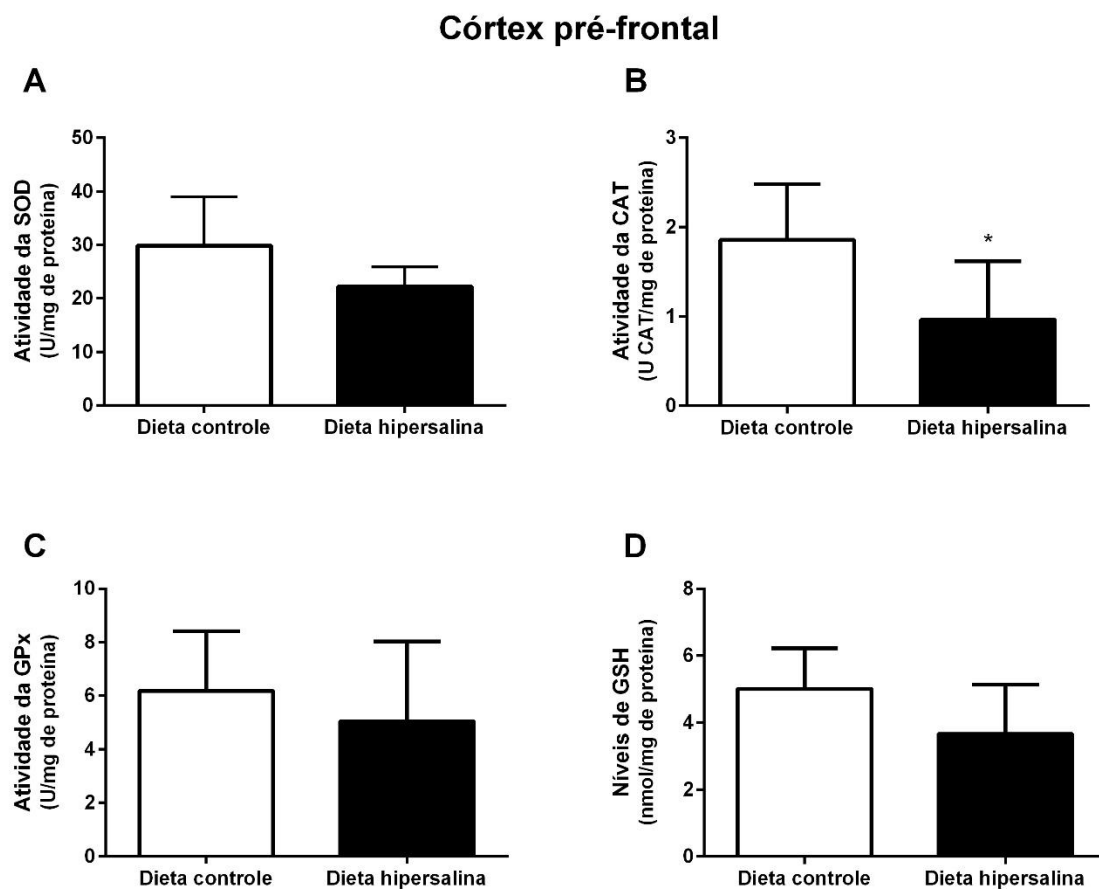


Figura 7. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutaciona-peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutaciona reduzida (GSH) (D) no córtex pré-frontal da prole (PN7). A análise dos dados foi feita através do teste *t* de Student e os resultados estão expressos em média \pm DP ($n=6$ /grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.12. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes e níveis de GSH no hipocampo da prole

A figura 8 apresenta os resultados obtidos a partir das análises realizadas no hipocampo dos filhotes. A dieta hipersalina não promoveu nenhuma alteração na atividade das enzimas antioxidantes SOD (Fig. 8A) [$t(10)=0,7671;p=0,4607$], CAT (Fig. 8B) [$t(10)=0,4570;p=0,6574$] e GPx (Fig. 8C) [$t(10)=1,294;p=0,2247$], bem como nos níveis de GSH (Fig. 8D) [$t(10)=2,075;p=0,0648$] no hipocampo da prole.

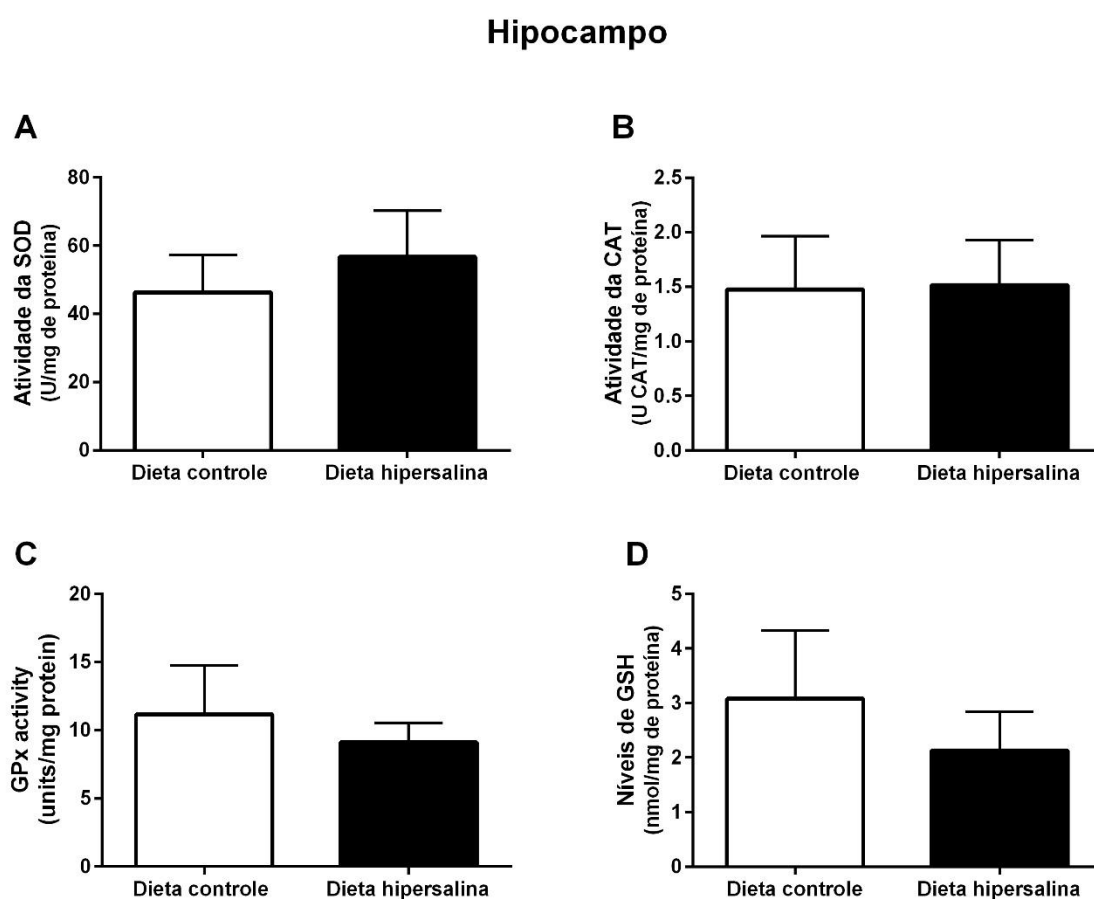


Figura 8. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade das enzimas antioxidantes superóxido-dismutase (SOD) (A), catalase (CAT) (B) e glutaciona-peroxidase (GPx) (C), e nos níveis de glutaciona reduzida (GSH) (D) no hipocampo da prole (PN7). A análise dos dados foi feita através do teste *t* de Student e os resultados estão expressos em média \pm DP ($n=6$ /grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4.13. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade da glicoxalase-1 no encéfalo da prole

A atividade da enzima antioxidante GLO1 não sofreu alteração nas estruturas encefálicas analisadas: cerebelo [$t(10)=1,386;p=0,1958$], córtex parietal [$t(10)=1,623;p=0,1356$], córtex pré-frontal [$t(10)=0,4877;p=0,6362$] e hipocampo [$t(10)=1,104;p=0,2956$].

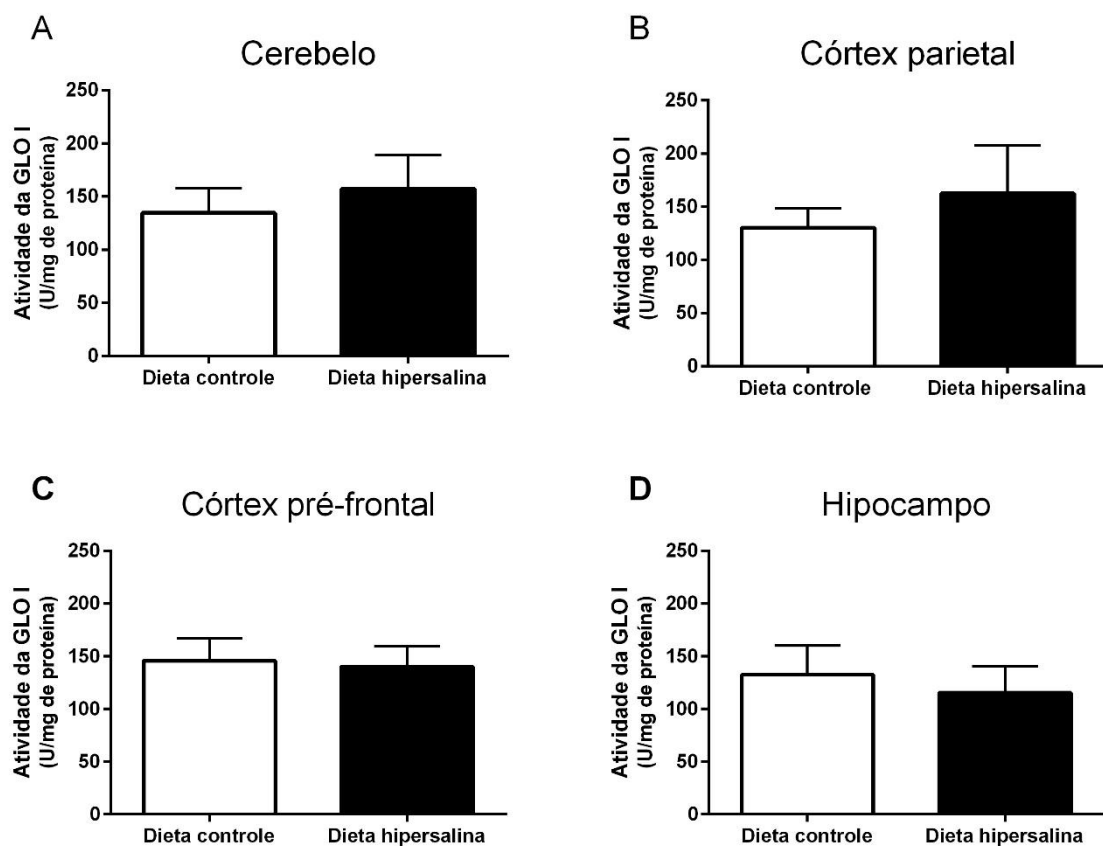


Figura 9. Efeito da dieta materna hipersalina sobre a atividade da enzima antioxidante glicoxalase-1 (GLO1) no cerebelo (A), córtex parietal (B), córtex pré-frontal (C) e hipocampo (D) da prole (PN7). A análise dos dados foi feita através do teste *t* de Student e os resultados estão expressos em média \pm DP ($n=6$ /grupo).

5. DISCUSSÃO

O modelo alimentar que vivenciamos, caracterizado pelo aumento do consumo de produtos industrializados e *fast foods*, acarreta na ingestão excessiva de sal, ou seja, muito acima dos valores recomendados (WHO, 2007). O elevado consumo de sal é um fator de risco para o desenvolvimento de hipertensão, caracterizada pelo aumento da PA. E, assim como dislipidemias, hiperglicemia e elevado índice de massa corporal (IMC), o controle da PA é um dos fatores de risco modificáveis capazes de prevenir as complicações da hipertensão, e que pode ser alcançado a partir de modificações no estilo de vida (Vishram, 2014).

A hipertensão é uma condição clínica onde ocorre a sustentação de níveis elevados de PA, e é considerada o principal fator de risco para morbimortalidade e desenvolvimento de DCV (Tientcheu et al., 2015). Dados epidemiológicos indicam que as DCV são a principal causa de morte em países por todo o mundo e representam um grande problema de saúde pública (Hennis et al., 2002, Lopez et al., 2006, Lawes et al., 2008, Vishram, 2014). Frequentemente, a hipertensão vem acompanhada por outras alterações metabólicas, como diabetes mellitus e dislipidemia. Nesse contexto, a hipertensão é uma das principais responsáveis por complicações na gestação, como o desenvolvimento de hipertensão gestacional, hipertensão crônica ou pré-eclâmpsia (Gongora and Wenger, 2015). Além do risco materno aumentado para o desenvolvimento de DCV no futuro (Garovic et al., 2010), tais complicações gestacionais podem estar relacionadas com o aumento da PA na vida jovem e adulta dos filhos, aumentando o risco desses de desenvolver DCV (Lazdam et al., 2010, Davis et al., 2015).

Evidências demonstram que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese de DCV, bem como de aterosclerose e hipertensão (Montezano and Touyz, 2012, Vassalle et al., 2012, Johnson et al., 2015, Montezano et al., 2015). Além disso, modelos animais demonstraram que a dieta com alto teor de sal é capaz de induzir inflamação (Qi et al., 2015), estresse oxidativo (Su et al., 2015) e hipertensão (Li et al., 2015) em roedores.

Estudos experimentais mostram que a dieta hipersalina pode causar modificações do estado redox no cérebro de ratos (Liu and Chan, 2014, Su et al., 2015). No entanto, não existem evidências acerca de alterações no estado redox no sistema nervoso central de filhotes de ratas submetidas à dieta com alto conteúdo de sal durante a gestação.

Considerando as alterações provocadas no metabolismo decorrente do alto consumo de sal e que a gestação é um período crítico para a programação metabólica fetal, o objetivo deste trabalho foi avaliar o estado redox em diferentes regiões encefálicas da prole de ratas submetidas à dieta com alto conteúdo de cloreto de sódio durante a gestação e a lactação. Embora não tenhamos aferido a PA dos animais nesse trabalho, estudos demonstraram relação entre o aumento da pressão e a disfunção endotelial em ratos submetidos à dieta hipersalina (Leibowitz et al., 2015, Su et al., 2015), bem como em filhotes de ratas prenhas submetidas à dieta rica em sal (Piecha et al., 2012, Gray et al., 2015, Maruyama et al., 2015).

A associação entre estresse oxidativo e hipertensão já é bem conhecida na literatura: parâmetros de dano oxidativo já foram reportados em vasos sanguíneos (Maruyama et al., 2015), rins (Vokurkova et al., 2015, Qiao et al., 2015), hipotálamo (Fujita et al., 2012), na região rostral da medula ventrolateral (Koga et al., 2008),

entre outros (Liu et al., 2014). No presente estudo, foram avaliadas as atividades de enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT, GPx e GLO1, níveis de GSH, produção de espécies reativas e parâmetros mitocondriais, como a massa e o potencial de membrana.

Os níveis de espécies reativas encontrados nas diferentes estruturas cerebrais foram distintos. Embora a produção de espécies reativas tenha diminuído no hipocampo e aumentado no cerebelo dos filhotes, não foram observadas alterações no hipotálamo, córtex parietal e córtex pré-frontal. Liu e colaboradores (2014) avaliaram a influência direta da dieta hipersalina em camundongos, demonstrando aumento dos níveis do radical $O_2^{\cdot-}$ e diminuição da atividade enzimática da SOD, CAT, dos níveis de GSH e da atividade antioxidante total no hipocampo. No presente estudo, os níveis de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial encontraram-se aumentados no córtex pré-frontal e hipocampo dos filhotes. Ao mesmo tempo, foi observada uma diminuição da atividade da CAT no córtex pré-frontal. Os níveis aumentados de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial no hipocampo e no córtex pré-frontal dos filhotes não induziram alterações na atividade da SOD e a ausência de efeito nesse parâmetro pode ser em função de ter sido avaliada a função das enzimas SOD citoplasmática e mitocondrial, sem especificar a isoforma envolvida. Acreditamos que o aumento da atividade, representada pelo potencial de membrana, e massa mitocondriais encontrados no hipocampo estejam associados ao aumento nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial (Kowaltowski et al., 2009). Outros parâmetros devem ser avaliados no futuro, a fim de determinar se essas alterações são compatíveis com biogênese mitocondrial.

A geração de $O_2^{\cdot-}$ pela mitocôndria não é a única fonte desse radical. Seu aumento já foi associado com o aumento da enzima NAD(P)H-oxidase em cérebro

de animais em modelos de hipertensão (Koga et al., 2008, Su et al., 2015, Vokurkova et al., 2015). Observou-se um aumento dos níveis de espécies reativas, especialmente peróxido de hidrogênio avaliado pela oxidação do DCFH, e da atividade da SOD no cerebelo de filhotes de ratas alimentadas com dieta hipersalina em comparação aos filhotes de ratas controle. No entanto, os níveis de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial não sofreram alteração e podem estar relacionados com o aumento da atividade da SOD, visto que ela é responsável pela dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 ; logo, um aumento da sua atividade sugere um aumento da concentração do produto no meio (Indo et al., 2015).

Os níveis de H_2O_2 são controlados por reações redox catalisadas pelas enzimas CAT e GPx. Por outro lado, o H_2O_2 pode reagir rapidamente com o ferro e ser convertido ao radical $\cdot OH$ através da reação de Fenton (Michiels et al., 1994). No presente trabalho, não foram encontradas alterações na atividade das enzimas CAT e GPx no cerebelo. Como visto anteriormente, não existem defesas enzimáticas para eliminar o radical $\cdot OH$ (Ribeiro et al., 2005). Níveis aumentados de H_2O_2 e/ou $\cdot OH$ favorecem o estresse oxidativo e podem ocasionar dano a moléculas importantes como carboidratos, proteínas, lipídios e DNA (Halliwell, 2007). Lembrando que a estabilidade do H_2O_2 lhe confere facilidade de permear membranas permitindo que esta espécie reativa alcance alvos distantes do local onde foi gerada (Barreiros and David, 2006).

No córtex parietal dos filhotes de ratas tratadas com dieta hipersalina não foram encontradas alterações nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial e na atividade da enzima SOD. Por outro lado, a atividade da GPx aumentou. Considerando que a regulação da GPx, localizada no citoplasma e nas mitocôndrias (Townsend et al., 2003), é diretamente afetada pela concentração de H_2O_2 , o aumento da sua

atividade pode estar associada com o aumento dos níveis de substrato no meio (Michiels et al., 1994). Com base nisso, acredita-se que o aumento da atividade da GPx pode ser decorrente de alterações em outras vias metabólicas que geram H_2O_2 .

Interessantemente, os parâmetros de massa e potencial de membrana mitocondrial encontraram-se diminuídos no cerebelo, indicando que existe um menor número de mitocôndrias funcionais, o que pode explicar a ausência de modificação nos níveis de $O_2^{\cdot-}$ produzidos pelas mitocôndrias. Um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que o exercício físico materno proporciona biogênese mitocondrial na prole (Marcelino et al., 2013), e outros estudos apontam associação entre a biogênese mitocondrial e a neurogênese (Cheng et al., 2010, Uittenbogaard et al., 2010, Wilkins et al., 2014). No entanto, este trabalho observou efeitos contrários, sugerindo que a dieta materna com alto teor de sal pode promover disfunção mitocondrial, ao menos em cerebelo.

O NO^{\cdot} desempenha diversos papéis importantes no organismo como a indução da vasodilatação, manutenção da barreira endotelial dos vasos sanguíneos, regulação da apoptose, além de papel como neurotransmissor (Rosselli et al., 1998). O aumento dos seus níveis está associado a adaptações metabólicas em resposta ao exercício físico (Schieber and Chandel, 2014). A prole de ratas que receberam dieta hipersalina apresentou níveis menores de NO^{\cdot} no cerebelo, quando comparados ao controle. Considerando que o cerebelo é responsável pelo controle e aprendizado motor, e que está envolvido com algumas funções cognitivas (Chalimoniuk et al., 2015), estudos demonstraram que em condições de dano oxidativo, o cerebelo pode ter suas funções fisiológicas prejudicadas e, devido sua conexão com outras estruturas cerebrais, como o tronco encefálico e o córtex cerebral, pode difundir o dano a áreas adjacentes (Roostaei et al., 2014).

O H_2O_2 pode ser originado a partir da via do catabolismo das purinas (xantina oxidase), da β -oxidação de ácidos graxos, da NAD(P)H-oxidase, da síntese de prostaglandinas e do metabolismo de xenobióticos (Ribeiro et al., 2005). Koga e colaboradores (2008) demonstraram associação entre a administração de dieta rica em sal e a produção de espécies reativas na região rostral da medula ventrolateral em modelo animal de hipertensão primária. Além disso, os autores encontraram aumento da expressão dos receptores de angiotensina II (ANG II) e da atividade da NAD(P)H-oxidase. Os resultados indicam que a produção aumentada das EROs pode estar relacionada com a ativação da enzima NAD(P)H-oxidase através da angiotensina II (Koga et al., 2008). Em outro estudo, a administração de uma dieta hipersalina (8% NaCl) durante três semanas foi capaz de aumentar os níveis de ANG II no coração e rim de ratos Dahl, sensíveis à ingestão de sódio (Pacurari et al., 2014). A ANG II faz parte do SRA e é produzida em resposta à diminuição dos níveis de PA, estimulando a resposta vasoconstritora. Em contrapartida, indivíduos hipertensos apresentam disfunção nesse sistema, caracterizada por hiperatividade do SRA (Drenjancevic-Peric et al., 2011). Su e colaboradores (2015), além de demonstrarem essa disfunção em um modelo animal de hipertensão, observaram aumento nos níveis de $O_2^{\cdot-}$, aumento da atividade da enzima NAD(P)H-oxidase, diminuição da SOD e aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) no hipotálamo dos animais, sugerindo que o estresse oxidativo esteja associado à disfunção do SRA.

A ANGII não ultrapassa a barreira hematoencefálica em condições fisiológicas e o cérebro possui SRA local que funciona de maneira independente do SRA periférico. No entanto, o sistema nervoso central recebe o sinal periférico da ANG II através de receptores localizados em órgãos circunventriculares (Wright and

Harding, 1994, Irigoyen et al., 2001). Além disso, a permeabilidade da barreira hematoencefálica parece estar alterada em ratos hipertensos, sugerindo que a ANG II poderia ultrapassá-la (Biancardi et al., 2014, Mohammadi and Dehghani, 2014, Zhang et al., 2015).

O hipotálamo apresentou níveis aumentados de NO^{\bullet} . Visto que os níveis de ECA estão aumentados em hipotálamo sugerindo alteração do SRA (Su et al., 2015), o aumento encontrado no hipotálamo neste trabalho pode ser decorrente de uma adaptação contra o desequilíbrio no SRA a fim de normalizar a função do endotélio vascular. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

A enzima CAT é encontrada nos peroxissomos e é responsável por eliminar o H_2O_2 gerado nessa organela, que pode ser proveniente das vias de catabolismo das purinas e da β -oxidação de ácidos graxos (Ribeiro et al., 2005). A diminuição da atividade da CAT observada no córtex pré-frontal dos filhotes pertencentes ao grupo dieta hipersalina sugere um acúmulo dos níveis de H_2O_2 nos peroxissomos, o qual pode ultrapassar a membrana e atingir outros compartimentos celulares. Também observamos um aumento nos níveis de $\text{O}_2^{\bullet-}$ mitocondrial e NO^{\bullet} , os quais podem reagir, formando o radical peroxinitrito (Halliwell, 2007). Os níveis aumentados de EROs e ERNs representam importante risco de dano oxidativo ao tecido, como discutido anteriormente. Neste caso, o dano pode causar alterações no pensamento complexo, no planejamento e execução de ações, funções controladas pelo córtex pré-frontal (Woo, 2014). No entanto, não há evidências do efeito da dieta hipersalina na via de β -oxidação de ácidos graxos no peroxissomo.

O ambiente intrauterino e o período de lactação podem sofrer influência do ambiente externo e, modificações durante o desenvolvimento fetal podem ocorrer (Bale, 2015). Os dados aqui apresentados são os primeiros a demonstrar relação entre dieta hipersalina durante o período de gestação e lactação e alterações no estado redox e disfunção mitocondrial encefálicos da prole. Pode-se atribuir esses resultados à programação metabólica fetal que ocorre durante o desenvolvimento intrauterino; em resposta ao consumo excessivo de sal.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, confirma-se que a alimentação materna influencia o desenvolvimento encefálico fetal através da programação metabólica. A dieta hipersalina demonstrou efeito tecido-dependente, uma vez que diferentes alterações no estado redox da prole foram encontradas para cada estrutura encefálica avaliada. Em resumo, o consumo excessivo de sal durante o período de gestação e lactação demonstrou ter efeito pró-oxidante no encéfalo da prole, modulando os níveis das espécies oxidantes e antioxidantes; além de interferir na função mitocondrial. Nossos dados foram obtidos em modelo experimental animal, entretanto, se puderem ser extrapolados para a condição clínica, acreditamos que deva-se controlar o consumo de sal na gestação e lactação, a fim de prevenir alterações oxidativas e mitocondriais no encéfalo da prole.

7. REFERÊNCIAS

1988. Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion. Intersalt Cooperative Research Group. *BMJ : British Medical Journal*, 297, 319-328.
- AGNEZ-LIMA, L. F., MELO, J. T., SILVA, A. E., OLIVEIRA, A. H., TIMOTEO, A. R., LIMA-BESSA, K. M., MARTINEZ, G. R., MEDEIROS, M. H., DI MASCIO, P., GALHARDO, R. S. & MENCK, C. F. 2012. DNA damage by singlet oxygen and cellular protective mechanisms. *Mutat Res*.
- ANDREADOU, I., FARMAKIS, D., PROKOVAS, E., SIGALA, F., ZOGA, A., SPYRIDAKI, K., PAPALOIS, A., PAPAPETROPOULOS, A., ANASTASIOU-NANA, M., KREMASTINOS, D. T. & ILIODROMITIS, E. K. 2012. Short-term statin administration in hypercholesterolaemic rabbits resistant to postconditioning: effects on infarct size, endothelial nitric oxide synthase, and nitro-oxidative stress. *Cardiovasc Res*, 94, 501-9.
- BALE, T. L. 2015. Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nat Rev Neurosci*, 16, 332-44.
- BALE, T. L., BARAM, T. Z., BROWN, A. S., GOLDSTEIN, J. M., INSEL, T. R., MCCARTHY, M. M., NEMEROFF, C. B., REYES, T. M., SIMERLY, R. B., SUSSER, E. S. & NESTLER, E. J. 2010. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry*, 68, 314-9.
- BARKER, D. J. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*, 311, 171-4.
- BARKER, D. J., BAGBY, S. P. & HANSON, M. A. 2006. Mechanisms of disease: in utero programming in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol*, 2, 700-7.
- BARKER, D. J., WINTER, P. D., OSMOND, C., MARGETTS, B. & SIMMONDS, S. J. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*, 2, 577-80.
- BARREIROS, A. L. B. S. & DAVID, J. M. 2006. ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO. *Quim. Nova*, 29, 113-123.
- BAZRGAR, M., GOUDARZI, I., LASHKARBOLOUKI, T. & ELAHDADI SALMANI, M. 2015. Melatonin ameliorates oxidative damage induced by maternal lead exposure in rat pups. *Physiol Behav*, 151, 178-88.
- BERTRAM, C., TROWERN, A. R., COPIN, N., JACKSON, A. A. & WHORWOOD, C. B. 2001. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology*, 142, 2841-53.
- BIANCARDI, V. C., SON, S. J., AHMADI, S., FILOSA, J. A. & STERN, J. E. 2014. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension*, 63, 572-9.
- BLAUSTEIN, M. P., ZHANG, J., CHEN, L. & HAMILTON, B. P. 2006. How does salt retention raise blood pressure? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 290, R514-23.
- BOREN, S. D. 1976. A few tips in treating venereal disease. *Am Fam Physician*, 14, 105-6.

- BOUCHARD, L., HIVERT, M. F., GUAY, S. P., ST-PIERRE, J., PERRON, P. & BRISSON, D. 2012. Placental adiponectin gene DNA methylation levels are associated with mothers' blood glucose concentration. *Diabetes*, 61, 1272-80.
- BOVERIS, A. 1984. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol*, 105, 429-35.
- BRASIL 2010. Plano de Redução de Sódio em Alimentos Processados. *In: SAÚDE*, M. D. (ed.).
- BRASIL 2011. Termo de Compromisso nº 34 entre o Ministério da Saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e as Associações Brasileiras das Indústrias de Alimentação, das Indústrias de Massas Alimentícias, da Indústria de Trigo e da Indústria de Panificação e Confeitaria, de 13 de Dezembro de 2011. *In: SAÚDE*, M. D. (ed.).
- BRENNAN, K. A., GOPALAKRISHNAN, G. S., KURLAK, L., RHIND, S. M., KYLE, C. E., BROOKS, A. N., RAE, M. T., OLSON, D. M., STEPHENSON, T. & SYMONDS, M. E. 2005. Impact of maternal undernutrition and fetal number on glucocorticoid, growth hormone and insulin-like growth factor receptor mRNA abundance in the ovine fetal kidney. *Reproduction*, 129, 151-9.
- BROWNE, R. W. & ARMSTRONG, D. 1998. Reduced glutathione and glutathione disulfide. *Methods Mol Biol*, 108, 347-52.
- CANANI, R. B., COSTANZO, M. D., LEONE, L., BEDOGNI, G., BRAMBILLA, P., CIANFARANI, S., NOBILI, V., PIETROBELLI, A. & AGOSTONI, C. 2011. Epigenetic mechanisms elicited by nutrition in early life. *Nutr Res Rev*, 24, 198-205.
- CHALIMONIUK, M., JAGSZ, S., SADOWSKA-KREPA, E., CHRAPUSTA, S. J., KLAPCINSKA, B. & LANGFORT, J. 2015. Diversity of endurance training effects on antioxidant defenses and oxidative damage in different brain regions of adolescent male rats. *J Physiol Pharmacol*, 66, 539-47.
- CHEN, P. Y., GANGULY, A., RUBBI, L., OROZCO, L. D., MORSELLI, M., ASHRAF, D., JAROSZEWICZ, A., FENG, S., JACOBSEN, S. E., NAKANO, A., DEVASKAR, S. U. & PELLEGRINI, M. 2013. Intrauterine calorie restriction affects placental DNA methylation and gene expression. *Physiol Genomics*, 45, 565-76.
- CHENG, A., HOU, Y. & MATTSON, M. P. 2010. Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, 2, e00045.
- CHUGH, G., ASGHAR, M., PATKI, G., BOHAT, R., JAFRI, F., ALLAM, F., DAO, A. T., MOWREY, C., ALKADHI, K. & SALIM, S. 2013. A high-salt diet further impairs age-associated declines in cognitive, behavioral, and cardiovascular functions in male Fischer brown Norway rats. *J Nutr*, 143, 1406-13.
- DA COSTA, L. A., BADAWI, A. & EL-SOHEMY, A. 2012. Nutrigenetics and modulation of oxidative stress. *Ann Nutr Metab*, 60 Suppl 3, 27-36.
- DAVIS, E. F., LEWANDOWSKI, A. J., AYE, C., WILLIAMSON, W., BOARDMAN, H., HUANG, R. C., MORI, T. A., NEWNHAM, J., BEILIN, L. J. & LEESON, P. 2015. Clinical cardiovascular risk during young adulthood in offspring of hypertensive pregnancies: insights from a 20-year prospective follow-up birth cohort. *BMJ Open*, 5, e008136.
- DE LA CRUZ, J. P., QUINTERO, L., VILLALOBOS, M. A. & SANCHEZ DE LA CUESTA, F. 2000. Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic rabbits: influence of olive oil administration. *Biochim Biophys Acta*, 1485, 36-44.

- DRENJANCEVIC-PERIC, I., JELAKOVIC, B., LOMBARD, J. H., KUNERT, M. P., KIBEL, A. & GROS, M. 2011. High-salt diet and hypertension: focus on the renin-angiotensin system. *Kidney Blood Press Res*, 34, 1-11.
- DUPONT, J. J., GREANEY, J. L., WENNER, M. M., LENNON-EDWARDS, S. L., SANDERS, P. W., FARQUHAR, W. B. & EDWARDS, D. G. 2013. High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt-resistant humans. *J Hypertens*, 31, 530-6.
- FONSECA, A. B., SOUZA, T. S. N. D., FROZI, D. S. & PEREIRA, R. A. 2011. Modernidade alimentar e consumo de alimentos: contribuições sócio-antropológicas para a pesquisa em nutrição. *Ciência & Saúde Coletiva*, 16, 3853-3862.
- FOOD AND NUTRITION BOARD, I. O. M., NATIONAL ACADEMIES 2004. Dietary Reference Intakes (DRIs): Recommended Intakes for Individuals, Elements.
- FUJITA, M., ANDO, K., KAWARAZAKI, H., KAWARASAKI, C., MURAOKA, K., OHTSU, H., SHIMIZU, H. & FUJITA, T. 2012. Sympathoexcitation by brain oxidative stress mediates arterial pressure elevation in salt-induced chronic kidney disease. *Hypertension*, 59, 105-12.
- GAROVIC, V. D., BAILEY, K. R., BOERWINKLE, E., HUNT, S. C., WEDER, A. B., CURB, D., MOSLEY, T. H., JR., WISTE, H. J. & TURNER, S. T. 2010. Hypertension in pregnancy as a risk factor for cardiovascular disease later in life. *J Hypertens*, 28, 826-33.
- GONGORA, M. C. & WENGER, N. K. 2015. Cardiovascular Complications of Pregnancy. *Int J Mol Sci*, 16, 23905-28.
- GRAY, C., HARRISON, C. J., SEGOVIA, S. A., REYNOLDS, C. M. & VICKERS, M. H. 2015. Maternal salt and fat intake causes hypertension and sustained endothelial dysfunction in fetal, weanling and adult male resistance vessels. *Sci Rep*, 5, 9753.
- GUAN, H., ARANY, E., VAN BEEK, J. P., CHAMSON-REIG, A., THYSSEN, S., HILL, D. J. & YANG, K. 2005. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288, E663-73.
- GUPTA, N., JANI, K. K. & GUPTA, N. 2011. Hypertension: salt restriction, sodium homeostasis, and other ions. *Indian J Med Sci*, 65, 121-32.
- GUYTON, A. C. & HALL, J. E. 2006. *Tratado de Fisiologia Médica*.
- HALES, C. N. & BARKER, D. J. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*, 60, 5-20.
- HALLIWELL, B. 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, 141, 312-22.
- HALLIWELL, B. 2007. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 35, 1147-50.
- HALLIWELL, B. 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci*, 32, 125-30.
- HALLIWELL, B. 2012. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 70, 257-65.
- HALLIWELL, B., CLEMENT, M. V. & LONG, L. H. 2000. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*, 486, 10-3.
- HE, F. J., LI, J. & MACGREGOR, G. A. 2013. Effect of longer-term modest salt reduction on blood pressure. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, CD004937.

- HEAD, E. 2009. Oxidative damage and cognitive dysfunction: antioxidant treatments to promote healthy brain aging. *Neurochem Res*, 34, 670-8.
- HEIJMANS, B. T., TOBI, E. W., STEIN, A. D., PUTTER, H., BLAUW, G. J., SUSSER, E. S., SLAGBOOM, P. E. & LUMEY, L. H. 2008. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 17046-9.
- HENNIS, A., WU, S. Y., NEMESURE, B., LESKE, M. C. & BARBADOS EYE STUDIES, G. 2002. Hypertension prevalence, control and survivorship in an Afro-Caribbean population. *J Hypertens*, 20, 2363-9.
- IANTORNO, M., CAMPIA, U., DI DANIELE, N., NISTICO, S., FORLEO, G. B., CARDILLO, C. & TESAURO, M. 2014. Obesity, inflammation and endothelial dysfunction. *J Biol Regul Homeost Agents*, 28, 169-76.
- IBGE, C. D. T. E. R. 2011. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro.
- INDO, H. P., YEN, H. C., NAKANISHI, I., MATSUMOTO, K., TAMURA, M., NAGANO, Y., MATSUI, H., GUSEV, O., CORNETTE, R., OKUDA, T., MINAMIYAMA, Y., ICHIKAWA, H., SUENAGA, S., OKI, M., SATO, T., OZAWA, T., CLAIR, D. K. & MAJIMA, H. J. 2015. A mitochondrial superoxide theory for oxidative stress diseases and aging. *J Clin Biochem Nutr*, 56, 1-7.
- IRIGOYEN, M. C., CONSOLIM-COLOMBO, F. M. & KRIEGER, E. M. 2001. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Rev Bras Hiperten*, 8, 55-62.
- ISTAPHANOUS, G. K. & LOEPKE, A. W. 2009. General anesthetics and the developing brain. *Curr Opin Anaesthesiol*, 22, 368-73.
- ITO, T., TAKEDA, M., HAMANO, T., KIJIMA, T., YAMASAKI, M., ISOMURA, M., YANO, S., SHIWAKU, K. & NABIKA, T. 2015. Effect of salt intake on blood pressure in patients receiving antihypertensive therapy: Shimane CoHRE Study. *Eur J Intern Med*.
- JEVTOVIC-TODOROVIC, V., HARTMAN, R. E., IZUMI, Y., BENSHOFF, N. D., DIKRANIAN, K., ZORUMSKI, C. F., OLNEY, J. W. & WOZNIAK, D. F. 2003. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*, 23, 876-82.
- JOHNSON, S. A., FIGUEROA, A., NAVAEI, N., WONG, A., KALFON, R., ORMSBEE, L. T., FERESIN, R. G., ELAM, M. L., HOOSHMAND, S., PAYTON, M. E. & ARJMANDI, B. H. 2015. Daily blueberry consumption improves blood pressure and arterial stiffness in postmenopausal women with pre- and stage 1-hypertension: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J Acad Nutr Diet*, 115, 369-77.
- KOGA, Y., HIROOKA, Y., ARAKI, S., NOZOE, M., KISHI, T. & SUNAGAWA, K. 2008. High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res*, 31, 2075-83.
- KOHARYOVA, M. & KOLAROVA, M. 2008. Oxidative stress and thioredoxin system. *Gen Physiol Biophys*, 27, 71-84.
- KOWALTOWSKI, A. J., DE SOUZA-PINTO, N. C., CASTILHO, R. F. & VERCESI, A. E. 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*, 47, 333-43.

- LAFFER, C. L., BOLTERMAN, R. J., ROMERO, J. C. & ELIJOVICH, F. 2006. Effect of salt on isoprostanes in salt-sensitive essential hypertension. *Hypertension*, 47, 434-40.
- LAWES, C. M., VANDER HOORN, S., RODGERS, A. & INTERNATIONAL SOCIETY OF, H. 2008. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet*, 371, 1513-8.
- LAZDAM, M., DE LA HORRA, A., PITCHER, A., MANNIE, Z., DIESCH, J., TREVITT, C., KYLINTIREAS, I., CONTRACTOR, H., SINGHAL, A., LUCAS, A., NEUBAUER, S., KHARBANDA, R., ALP, N., KELLY, B. & LEESON, P. 2010. Elevated blood pressure in offspring born premature to hypertensive pregnancy: is endothelial dysfunction the underlying vascular mechanism? *Hypertension*, 56, 159-65.
- LEIBOWITZ, A., VOLKOV, A., VOLOSHIN, K., SHEMESH, C., BARSHACK, I. & GROSSMAN, E. 2015. Melatonin prevents kidney injury in a high salt diet induced hypertension model by decreasing oxidative stress. *J Pineal Res*.
- LI, H. B., QIN, D. N., SUO, Y. P., GUO, J., SU, Q., MIAO, Y. W., SUN, W. Y., YI, Q. Y., CUI, W., CHENG, K., ZHU, G. Q. & KANG, Y. M. 2015. Blockade of Salusin-beta in Hypothalamic Paraventricular Nucleus Attenuates Hypertension and Cardiac Hypertrophy in Salt-induced Hypertensive Rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 66, 323-31.
- LILLYCROP, K. A., PHILLIPS, E. S., JACKSON, A. A., HANSON, M. A. & BURDGE, G. C. 2005. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr*, 135, 1382-6.
- LIU, L. & CHAN, C. 2014. The role of inflammasome in Alzheimer's disease. *Ageing Res Rev*, 15, 6-15.
- LIU, Y. Z., CHEN, J. K., LI, Z. P., ZHAO, T., NI, M., LI, D. J., JIANG, C. L. & SHEN, F. M. 2014. High-salt diet enhances hippocampal oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Neurobiol Learn Mem*, 114, 10-5.
- LOPEZ, A. D., MATHERS, C. D., EZZATI, M., JAMISON, D. T. & MURRAY, C. J. 2006. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*, 367, 1747-57.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-75.
- LUSHCHAK, V. I. 2014. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*, 224C, 164-175.
- MAILLOUX, R. J. 2015. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and detection of reactive oxygen species. *Redox Biol*, 4, 381-98.
- MALONEY, C. A., GOSBY, A. K., PHUYAL, J. L., DENYER, G. S., BRYSON, J. M. & CATERSON, I. D. 2003. Site-specific changes in the expression of fat-partitioning genes in weanling rats exposed to a low-protein diet in utero. *Obes Res*, 11, 461-8.
- MARCELINO, T. B., LONGONI, A., KUDO, K. Y., STONE, V., RECH, A., DE ASSIS, A. M., SCHERER, E. B., DA CUNHA, M. J., WYSE, A. T., PETTENUZZO, L. F., LEIPNITZ, G. & MATTE, C. 2013. Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats. *Neuroscience*, 246, 28-39.

- MARUYAMA, K., KAGOTA, S., VAN VLIET, B. N., WAKUDA, H. & SHINOZUKA, K. 2015. A maternal high salt diet disturbs cardiac and vascular function of offspring. *Life Sci*, 136, 42-51.
- MATHIAS, P. C., ELMHIRI, G., DE OLIVEIRA, J. C., DELAYRE-ORTHEZ, C., BARELLA, L. F., TOFOLO, L. P., FABRICIO, G. S., CHANGO, A. & ABDENNEBI-NAJAR, L. 2014. Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. *Eur J Nutr*, 53, 711-22.
- MAYNE, S. T. 2003. Antioxidant nutrients and chronic disease: use of biomarkers of exposure and oxidative stress status in epidemiologic research. *J Nutr*, 133 Suppl 3, 933S-940S.
- MCLELLAN, A. C. & THORNALLEY, P. J. 1989. Glyoxalase activity in human red blood cells fractioned by age. *Mech Ageing Dev*, 48, 63-71.
- MICHIELS, C., RAES, M., TOUSSAINT, O. & REMACLE, J. 1994. Importance of S-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 17, 235-48.
- MOHAMMADI, M. T. & DEGHANI, G. A. 2014. Acute hypertension induces brain injury and blood-brain barrier disruption through reduction of claudins mRNA expression in rat. *Pathol Res Pract*, 210, 985-90.
- MOHAN, S. & CAMPBELL, N. R. 2009. Salt and high blood pressure. *Clin Sci (Lond)*, 117, 1-11.
- MONTEZANO, A. C., DULAK-LIS, M., TSIROPOULOU, S., HARVEY, A., BRIONES, A. M. & TOUYZ, R. M. 2015. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers, and novel therapies. *Can J Cardiol*, 31, 631-41.
- MONTEZANO, A. C. & TOUYZ, R. M. 2012. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol*, 28, 288-95.
- MOREIRA, S. A. 2010. Alimentação e comensalidade: aspectos históricos e antropológicos. *Ciência e Cultura*, 62, 23-26.
- NISHIKAWA, T., SASAHARA, T., KIRITOSHI, S., SONODA, K., SENOKUCHI, T., MATSUO, T., KUKIDOME, D., WAKE, N., MATSUMURA, T., MIYAMURA, N., SAKAKIDA, M., KISHIKAWA, H. & ARAKI, E. 2003. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxy-guanosine as a novel biomarker of macrovascular complications in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26, 1507-12.
- O'DONNELL, M. J., YUSUF, S., MENTE, A., GAO, P., MANN, J. F., TEO, K., MCQUEEN, M., SLEIGHT, P., SHARMA, A. M., DANS, A., PROBSTFIELD, J. & SCHMIEDER, R. E. 2011. Urinary sodium and potassium excretion and risk of cardiovascular events. *JAMA*, 306, 2229-38.
- PACURARI, M., KAFOURY, R., TCHOUNWOU, P. B. & NDEBELE, K. 2014. The Renin-Angiotensin-aldosterone system in vascular inflammation and remodeling. *Int J Inflamm*, 2014, 689360.
- PERKINS, A., NELSON, K. J., PARSONAGE, D., POOLE, L. B. & KARPLUS, P. A. 2015. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem Sci*, 40, 435-45.
- PIECHA, G., KOLEGANOVA, N., RITZ, E., MULLER, A., FEDOROVA, O. V., BAGROV, A. Y., LUTZ, D., SCHIRMACHER, P. & GROSS-WEISSMANN, M. L. 2012. High salt intake causes adverse fetal programming--vascular effects beyond blood pressure. *Nephrol Dial Transplant*, 27, 3464-76.

- PINHEIRO, K. A. D. P. N. 2005. História dos hábitos alimentares ocidentais. *Universitas Ciências da Saúde*, 3, 173-190.
- POPKIN, B. M. 2006. Technology, transport, globalization and the nutrition transition food policy. *Food Policy*, 31, 554-569.
- QI, J., YU, X. J., SHI, X. L., GAO, H. L., YI, Q. Y., TAN, H., FAN, X. Y., ZHANG, Y., SONG, X. A., CUI, W., LIU, J. J. & KANG, Y. M. 2015. NF-kappaB Blockade in Hypothalamic Paraventricular Nucleus Inhibits High-Salt-Induced Hypertension Through NLRP3 and Caspase-1. *Cardiovasc Toxicol*.
- QIAO, Y. F., GUO, W. J., LI, L., SHAO, S., QIAO, X., SHAO, J. J., ZHANG, Q., LI, R. S. & WANG, L. H. 2015. Melatonin attenuates hypertension-induced renal injury partially through inhibiting oxidative stress in rats. *Mol Med Rep*.
- REMESAR, X., ANTELO, A., LLIVINA, C., ALBA, E., BERDIE, L., AGNELLI, S., ARRIARAN, S., FERNANDEZ-LOPEZ, J. A. & ALEMANY, M. 2015. Influence of a hyperlipidic diet on the composition of the non-membrane lipid pool of red blood cells of male and female rats. *PeerJ*, 3, e1083.
- RIBEIRO, S. M. R., QUEIROZ, J. H., PELÚZO, M. C. G., COSTA, N. M. B., MATTA, S. L. P. & QUEIROZ, M. E. L. R. 2005. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci. J.*, 21, 133-149.
- ROOSTAEI, T., NAZERI, A., SAHRAIAN, M. A. & MINAGAR, A. 2014. The human cerebellum: a review of physiologic neuroanatomy. *Neurol Clin*, 32, 859-69.
- ROSSELLI, M., KELLER, P. J. & DUBEY, R. K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Hum Reprod Update*, 4, 3-24.
- RUBATTU, S., PAGLIARO, B., PIERELLI, G., SANTOLAMAZZA, C., CASTRO, S. D., MENNUNI, S. & VOLPE, M. 2015. Pathogenesis of target organ damage in hypertension: role of mitochondrial oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 16, 823-39.
- RUILOPE, L. M. & SCHMIEDER, R. 2012. Current status of renal denervation in resistant hypertension. *J Am Soc Hypertens*, 6, 414-6.
- RUSSELL, N. D. & COOPER, M. E. 2015. 50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications. *Diabetologia*, 58, 1708-14.
- SACKS, F. M., SVETKEY, L. P., VOLLMER, W. M., APPEL, L. J., BRAY, G. A., HARSHA, D., OBARZANEK, E., CONLIN, P. R., MILLER, E. R., 3RD, SIMONS-MORTON, D. G., KARANJA, N., LIN, P. H. & GROUP, D. A.-S. C. R. 2001. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group. *N Engl J Med*, 344, 3-10.
- SAISHO, Y. 2014. Glycemic variability and oxidative stress: a link between diabetes and cardiovascular disease? *Int J Mol Sci*, 15, 18381-406.
- SCHIEBER, M. & CHANDEL, N. S. 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*, 24, R453-62.
- SIES, H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*, 4, 180-3.
- SOOKOIAN, S., GIANOTTI, T. F., BURGUENO, A. L. & PIROLA, C. J. 2013. Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach. *Pediatr Res*, 73, 531-42.
- STOCKER, S. D., MONAHAN, K. D. & BROWNING, K. N. 2013. Neurogenic and sympathoexcitatory actions of NaCl in hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 15, 538-46.
- SU, Q., LIU, J. J., CUI, W., SHI, X. L., GUO, J., LI, H. B., HUO, C. J., MIAO, Y. W., ZHANG, M., YANG, Q. & KANG, Y. M. 2015. Alpha lipoic acid

- supplementation attenuates reactive oxygen species in hypothalamic paraventricular nucleus and sympathoexcitation in high salt-induced hypertension. *Toxicol Lett*.
- THORNALLEY, P. J. 2003. Glyoxalase I--structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochem Soc Trans*, 31, 1343-8.
- TIENTCHEU, D., AYERS, C., DAS, S. R., MCGUIRE, D. K., DE LEMOS, J. A., KHERA, A., KAPLAN, N., VICTOR, R. & VONGPATANASIN, W. 2015. Target Organ Complications and Cardiovascular Events Associated With Masked Hypertension and White-Coat Hypertension: Analysis From the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol*, 66, 2159-69.
- TOWNSEND, D. M., TEW, K. D. & TAPIERO, H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother*, 57, 145-55.
- TUOMILEHTO, J., JOUSILAHTI, P., RASTENYTE, D., MOLTCHANOV, V., TANSKANEN, A., PIETINEN, P. & NISSINEN, A. 2001. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. *Lancet*, 357, 848-51.
- TURPIN, C. A., SAKYI, S. A., OWIREDU, W. K., EPHRAIM, R. K. & ANTO, E. O. 2015. Association between adverse pregnancy outcome and imbalance in angiogenic regulators and oxidative stress biomarkers in gestational hypertension and preeclampsia. *BMC Pregnancy Childbirth*, 15, 189.
- TZANETAKOU, I. P., MIKHAILIDIS, D. P. & PERREA, D. N. 2011. Nutrition During Pregnancy and the Effect of Carbohydrates on the Offspring's Metabolic Profile: In Search of the "Perfect Maternal Diet". *Open Cardiovasc Med J*, 5, 103-9.
- UITTENBOGAARD, M., BAXTER, K. K. & CHIARAMELLO, A. 2010. The neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD6 confers tolerance to oxidative stress by triggering an antioxidant response and sustaining the mitochondrial biomass. *ASN Neuro*, 2, e00034.
- UMESAWA, M., ISO, H., DATE, C., YAMAMOTO, A., TOYOSHIMA, H., WATANABE, Y., KIKUCHI, S., KOIZUMI, A., KONDO, T., INABA, Y., TANABE, N., TAMAKOSHI, A. & GROUP, J. S. 2008. Relations between dietary sodium and potassium intakes and mortality from cardiovascular disease: the Japan Collaborative Cohort Study for Evaluation of Cancer Risks. *Am J Clin Nutr*, 88, 195-202.
- VASSALLE, C., BIANCHI, S., BATTAGLIA, D., LANDI, P., BIANCHI, F. & CARPEGGIANI, C. 2012. Elevated levels of oxidative stress as a prognostic predictor of major adverse cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb*, 19, 712-7.
- VISHRAM, J. K. 2014. Prognostic interactions between cardiovascular risk factors. *Dan Med J*, 61, B4892.
- VOKURKOVA, M., RAUCHOVA, H., REZACOVA, L., VANECKOVA, I. & ZICHA, J. 2015. ROS production is increased in the kidney but not in the brain of Dahl rats with salt hypertension elicited in adulthood. *Physiol Res*, 64, 303-12.
- WENDEL, A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 77, 325-33.
- WHO 2007. World Health Organization forum on reducing salt intake in populations: a report of a WHO forum and technical meeting. Paris, France.
- WHO 2012. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva: World Health Organization (WHO).
- WILKINS, H. M., HARRIS, J. L., CARL, S. M., E, L., LU, J., EVA SELFRIDGE, J., ROY, N., HUTFLES, L., KOPPEL, S., MORRIS, J., BURNS, J. M.,

- MICHAELIS, M. L., MICHAELIS, E. K., BROOKS, W. M. & SWERDLOW, R. H. 2014. Oxaloacetate activates brain mitochondrial biogenesis, enhances the insulin pathway, reduces inflammation and stimulates neurogenesis. *Hum Mol Genet*, 23, 6528-41.
- WINTERBOURN, C. C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*, 4, 278-86.
- WOO, T. U. 2014. Neurobiology of schizophrenia onset. *Curr Top Behav Neurosci*, 16, 267-95.
- WRIGHT, J. W. & HARDING, J. W. 1994. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev*, 18, 21-53.
- ZHANG, S., RATTANATRAY, L., MACLAUGHLIN, S. M., CROPLEY, J. E., SUTER, C. M., MOLLOY, L., KLEEMANN, D., WALKER, S. K., MUHLHAUSLER, B. S., MORRISON, J. L. & MCMILLEN, I. C. 2010. Periconceptional undernutrition in normal and overweight ewes leads to increased adrenal growth and epigenetic changes in adrenal IGF2/H19 gene in offspring. *FASEB J*, 24, 2772-82.
- ZHANG, T., FANG, S., WAN, C., KONG, Q., WANG, G., WANG, S., ZHANG, H., ZOU, H., SUN, B., SUN, W., ZHANG, Y., MU, L., WANG, J., WANG, J., ZHANG, H., WANG, D. & LI, H. 2015. Excess salt exacerbates blood-brain barrier disruption via a p38/MAPK/SGK1-dependent pathway in permanent cerebral ischemia. *Sci Rep*, 5, 16548.

ANEXO I – Carta de aprovação da CEUA



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 28100

Título: Alterações do estado redox em encéfalo da prole de ratas Wistar submetidas à dieta com alto conteúdo de sal durante a gestação

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CRISTIANE MATTE - coordenador desde 01/01/2015

DANIELA PEREIRA STOCHER - Outra Função desde 01/01/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 26/01/2015 - Sala I do Gabinete do Reitor - Prédio da Reitoria - Campus do Centro - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de ratos Wistar adultos (40 fêmeas e 20 machos), de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 19 de Fevereiro de 2015

BRUNO CASSEL NETO
Vice Pró-Reitor de Pesquisa