

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PROGRAMAÇÃO FETAL INDUZIDA PELA
EXPOSIÇÃO MATERNA À SOBRECARGA DE SÓDIO E
SEUS EFEITOS SOBRE A FUNÇÃO VASCULAR DA
PROLE ADULTA**

JULIANA SANTOS DA ROCHA

Prof. FABIANO ELIAS XAVIER

RECIFE 2014

Catálogo na Fonte:
Elaine Barroso
CRB 1728

Rocha, Juliana Santos

Programação fetal induzida pela exposição materna à sobrecarga de sódio e seus efeitos sobre a função vascular da prole adulta/ Juliana Santos Rocha– Recife: O Autor, 2014.

77 f.: il., fig., tab.

Orientador: Fabiano Elias Xavier

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2014.

Inclui bibliografia

1. Sódio 2. Hipertensão I. Xavier, Fabiano Elias (orientador) II. Título

572.52382

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-275

Juliana Santos da Rocha

“Programação fetal induzida pela exposição materna à sobrecarga de sódio e seus efeitos sobre a função vascular da prole adulta”

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier
Presidente

Profa.Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão

Profa.Dra.Luiza Antas Rabêlo

Profa.Dra.Dayane Aparecida Gomes

Data: 28/ 02/ 2014

A Deus

Meu esposo

Minha família

Pelo incentivo, apoio, compreensão, confiança e amor durante esses anos de estudo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por estar sempre ao meu lado me dando força e ajudando em minhas escolhas.

Ao meu esposo pelo companheirismo e apoio.

Ao meus pais, por me ensinar valores humanos e apoiar em minha vida profissional.,assim como ao meu irmão pela ajuda e torcida.

Ao professor Fabiano Elias Xavier, por ter me aceito como aluna desde a iniciação científica e pela sua orientação neste estudo.

A professora Glória Isolina pelos conselhos profissionais.

A todos os meus amigos que fazem o LFFCV e o LRV: Geórgia Leal, Hicla, Juliana Dantas, Luciana Veloso, Fabiano Ferreira, Francine, Diego Queiroz, Odair, Marcelo, Geórgia Félix, Rebeca, Jean, Mayra, professora Cristina e professor Alex.Em especial à Fernanda Elizabeth, pela amizade, dedicação e ajuda na montagem dos experimentos.

Ao técnico de laboratório José Antônio e a Veterinária Cláudia pelo cuidado com os animais em estudo. Ao secretário de pós-graduação Djalma Silva pela paciência e disponibilidade para ajudar.

A todos os professores e amigos da pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização desse trabalho, meu eterno OBRIGADO.

*Não te mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não te
atemorizes, nem te espantes; porque o Senhor teu Deus está
contigo, por onde quer que andares.”
(Josué 1:9)*

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de uma dieta rica em sódio durante a gestação e lactação sobre função vascular (mecanismos contráteis e de relaxamento) da prole adulta e os possíveis mecanismos envolvidos. Para isto ratas Wistar foram alimentadas com dieta rica em sódio (HS: 8 % de NaCl), com concentração moderada de sódio (MS: 4% de NaCl) ou concentração normal de sódio (1,3% de NaCl) durante o período de gestação e lactação. Após 24 semanas de vida a prole destas ratas foi submetida a experimentos de medida da pressão arterial; de avaliação do relaxamento a acetilcolina, de contração induzida à fenilefrina, angiotensina I e angiotensina II em anéis de aorta isolados, de medida dos níveis de peroxidação lipídica e glutathione reduzida e de avaliação da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA). A pressão arterial não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados. O grupo MS não apresentou alterações no relaxamento à acetilcolina nem na resposta contrátil a fenilefrina comparada ao grupo NS. Uma diminuição do relaxamento à acetilcolina e uma hiper-reatividade vascular à fenilefrina foram observados nas aortas do grupo HS, comparado ao grupo NS. A pré-incubação dos anéis de aorta com tempol, apocinina e ou indometacina reverteu às alterações vasculares presentes nestes animais. A contração vascular a angiotensina II foi inalterada entre os grupos, enquanto a contração à angiotensina I foi maior no grupo HS. Os níveis de peroxidação lipídica e glutathione reduzida não apresentaram diferenças significativas. A atividade da enzima conversora de angiotensina foi aumentada no grupo HS. Estes resultados em conjunto demonstram que a sobrecarga de sódio materna foi capaz de promover alterações vasculares na prole adulta, a qual parece ser mediada através do aumento da formação de radicais livres derivados da NAD(P)H oxidase e de prostanóides derivados da ciclooxigenase. Esses mecanismos são potencializados possivelmente com o envolvimento do sistema renina angiotensina local.

Palavras Chaves: programação fetal, hipertensão, disfunção endotelial, sobrecarga de sódio

ABSTRACT

High sodium intake is associated with a greater risk of hypertension and other cardiovascular disease in susceptible people. In this study mechanisms underlying perinatal sodium overload-programmed vascular dysfunction (contractile and relaxation responses) were investigated. Dams were fed a diet with normal sodium content (NS, 1.3% NaCl), moderate (MS, 4% NaCl) or high (HS, 8% NaCl) during pregnancy and lactation periods. Blood pressure, acetylcholine-induced relaxation, phenylephrine- and angiotensin I and II-induced contraction, lipid peroxidation, reduced glutathione levels and angiotensin converting enzyme (ACE) activity were performed in aorta from 6-month-old NS, MS and HS offspring. Blood pressure was similar in all groups. Relaxation to acetylcholine was impaired, while the phenylephrine-induced contraction was increased, in HS aorta compared to NS. Aortic relaxation and contraction were not altered in MS group. Pre-treatment with Tempol, Apocinin or Indomethacin restored acetylcholine and phenylephrine responses in aorta from HS group. Contraction to angiotensin I was increased, while response to angiotensin II remained unmodified in HS aorta compared to NS. Aortic TBARS malondialdehyde and reduced glutathione levels were similar in HS compared to NS. Aortic ACE activity was increased in the offspring HS group compared to NS. All together, these results demonstrate that maternal sodium overload programmed vascular dysfunction in the offspring. These vascular changes seem to be produced by a NAD(P)H oxidase-dependent oxidative stress and by an enhanced formation of vasoconstrictor prostanoids. These mechanisms are possibly stimulated by angiotensin II in the aortic wall, whose production is increased in the HS group.

Keywords: fetal programming, hypertension, vascular dysfunction, sodium overload

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 Papel do Sódio nas Doenças Cardiovasculares.....	14
2.2 Consumo de sódio e programação fetal de doenças cardiovasculares...	16
2.3 Sistema Vascular.....	18
2.4 Endotélio Vascular.....	19
2.4.1 Fatores Vasodilatadores Derivados do Endotélio.....	20
2.4.2 Produtos derivados do metabolismo da ciclooxigenase.....	23
2.4.3 Espécies Reativas de Oxigênio.....	25
2.4.4 Angiotensina II.....	27
2.5 Disfunção Endotelial em decorrência do consumo elevado de sódio....	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos.....	31
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ARTIGO.....	40
Abstract.....	41
1. Introduction.....	42
2. Material and methods.....	44
2.1 <i>Animals</i>	44
2.2 <i>Arterial blood pressure measurement in conscious rats</i>	45
2.3 <i>Vascular Reactivity Study</i>	45
2.4 <i>Measurement of lipid peroxidation</i>	46

2.5 Assessment of the levels of reduced glutathione.....	47
2.6 Measurement of aortic angiotensin converting enzyme (ACE) activity....	48
2.7 Chemical compounds.....	48
2.8 Statistical analysis.....	49
3. Results.....	50
3.1 Vascular response to KCl, phenylephrine, angiotensin I and II, and endothelium-dependent and endothelium-independent relaxations.....	50
3.2 Aortic TBARS and reduced glutathione.....	52
3.3 Aortic ACE activity.....	52
4. Discussion.....	53
Acknowledgements.....	57
Conflict of interest.....	58
References.....	59
Legends for figures.....	67
6- CONCLUSÕES.....	77

1 INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos indicam que as condições do ambiente intra-uterino durante os períodos críticos de desenvolvimento podem causar uma predisposição ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (BARKER *et al.*, 1986). A premissa deste conceito é de que o feto se adapta ao seu ambiente. Especificamente, o desenvolvimento do feto é capaz de detectar a condição do ambiente materno e otimiza futuras respostas metabólicas reprogramando seu genoma. Inicialmente esta reprogramação favorece a sobrevivência e sucesso reprodutivo, mas potencialmente causa uma predisposição para o aparecimento de doenças em fases posteriores da vida (GLUCKMAN *et al.*, 2007).

O grupo liderado pelo Prof. David Barker foi o primeiro a demonstrar essas observações. Nas regiões da Inglaterra e do País de Gales foi evidenciado uma associação entre as condições sócias demográficas e o maior índice de mortalidade de crianças nascidas entre 1921 e 1925, bem como a incidência de doenças cardiovasculares entre 1968 e 1978. Baseado nestas observações, trabalhos publicados por este grupo têm sugerido que o feto apresenta períodos críticos do desenvolvimento (BARKER *et al.*, 1989; BARKER *et al.*, 2007) e que distúrbios que possam ocorrer durante esses períodos, poderiam “programar” ou produzir alterações no metabolismo, estrutura e função de órgãos e tecidos na vida adulta (BARKER *et al.*, 1998). Esta hipótese ficou conhecida como *Hipótese de Barker* ou *Teoria da origem fetal das doenças do adulto*. Esta teoria afirmava que a má nutrição durante o desenvolvimento fetal seria a origem de altas taxas de mortalidade na próxima geração. Além de que o feto responderia à desnutrição

com mudanças permanentes em sua fisiologia e metabolismo, e estas levariam a doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta (BARKER *et al.*, 1994). Embora inicialmente grande parte dos estudos epidemiológicos e experimentais tenha dado maior ênfase ao efeito da desnutrição materna sobre a “programação fetal” de algumas doenças na vida adulta, atualmente, vários estudos demonstrando que a exposição fetal a outras situações, como à hiperglicemia materna (HOLEMANS *et al.*., 1999, RAMOS-ALVES *et al.*, 2012), aos glicocorticoides (MACKINTOSH *et al.*, 1985 , KHORRAM *et al.*, 2013) ou ao excesso de sódio (CONTRERAS *et al.*, 1993, CABRAL *et al.*, 2012) tem uma contribuição importante para o aparecimento de complicações desde a vida intrauterina até a vida adulta. O ambiente intrauterino é de extrema importância para o desenvolvimento fetal. As interações complexas que ocorrem entre a mãe e o feto, o fornecimento de macro e micronutrientes, oxigênio e sinais endócrinos são críticos nesta fase inicial da vida (BARKER *et al.*, 2001). Distúrbios no fornecimento destes componentes geram impactos não apenas sobre o crescimento do feto, mas também, podem ter consequências adversas na saúde da prole adulta (BARKER *et al.*, 2001). A noção que existem períodos críticos de desenvolvimento é conhecido desde a 1920 (STOCKARD *et al.*, 1920). Os eventos que ocorrem durante estes períodos podem ter consequências que repercutem muito além da infância. O conceito que os eventos no início da vida podem estar vinculados a doenças crônicas degenerativas como a diabetes e distúrbios cardiovasculares, que não costumam aparecer até meia-idade ou mais tarde é importante porque, de acordo com Barker, representa “um novo ponto de partida para a pesquisa com doenças cardiovasculares e metabólicas (BARKER

et al.,1993). Desta forma, várias evidências mostram que doenças crônicas como hipertensão arterial podem ser desencadeadas em parte por eventos ocorridos na vida intrauterina (BAKER *et al.*, 1986).

A sobrecarga de sódio (Na^+) durante a gestação tem sido apontada como um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão arterial na prole adulta (CONTRETAS *et al.*,2000). Hazon *et al.* (1988) utilizaram ratos da linhagem Brattelboro e demonstraram que os animais cujas mães receberam uma dieta rica em sódio durante a gestação estavam expostos a um fluido amniótico com concentrações maiores de sódio quando comparados aos que receberam uma dieta considerada normossódica. Embora muitos estudos tenham observado alterações nos sistemas cardiovascular da prole de mães alimentadas com dietas com alta carga sódica, tais como pressão arterial elevada, estes resultados não foram consistentemente relatados (RAMOS *et al.*, 2012) . Por exemplo, o estudo publicado por Porter *et al.* (2007) não observou aumento da pressão arterial entre os filhos de mães alimentadas com uma dieta rica em sódio durante a gravidez. Desta forma, é necessária a realização de novos estudos a fim de investigar a relação entre a exposição a sobrecarga de sódio materna e as alterações cardiovasculares da prole adulta.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Papel do Sódio nas Doenças Cardiovasculares

Um dos fatores relacionados à gênese e/ou manutenção da hipertensão arterial é o consumo elevado de sódio, tendo em vista que este íon participa de diversos mecanismos sinalizadores relacionados ao controle da pressão arterial (MENETON *et al.*, 2005). Além dos efeitos sobre a pressão arterial, o excesso de sódio na dieta tem sido associado com o desenvolvimento de acidentes vasculares cerebrais, de hipertrofia ventricular esquerda e de doenças renais (HE *et al.*, 2010). Em 2005, foi fundada na Inglaterra a *World Action on Salt & Health* (WASH), uma instituição que tem a missão de melhorar a saúde das populações em todo o mundo através da realização de uma redução gradual da ingestão de sódio. A WASH trabalha para incentivar as empresas de alimentos multinacionais a reduzir o sódio em seus produtos e com os governos de diferentes países destacando a necessidade de uma estratégia de redução do consumo de sódio na população. (WASH, 2005). No Brasil, o consumo de sódio excede largamente a recomendação máxima para esse nutriente. Sarno *et al.* (2013) realizaram uma estimativa do consumo de sódio, baseado nos dados da Pesquisa de Orçamento Familiares (POF), realizada no Brasil no período de 2008 a 2009. A quantidade diária de sódio disponível para consumo nos domicílios brasileiros foi de 4,5 gramas por pessoa, excedendo assim, em mais de duas vezes o limite recomendado para ingestão desse nutriente.

Recentemente, o Ministério da Saúde do Brasil assinou um acordo para a redução do teor de sódio nos alimentos industrializados. Este é o quarto acordo do tipo, que desta vez prevê a redução do ingrediente nos laticínios, embutidos e refeições prontas. A meta é baixar a quantidade de sódio em até 68% em quatro anos a fim de reduzir os riscos causados pelo alto consumo de sódio, como mencionados anteriormente (ANVISA, 2013).

Os mecanismos pelos quais o sódio eleva a pressão arterial não são totalmente entendidos. No entanto, há muitas evidências de que indivíduos que desenvolvem pressão arterial elevada teria um defeito na capacidade dos rins de excretar sódio (MENETON *et al.*, 2005). Outra evidência é que a capacidade de tornar o sódio retido osmoticamente inativo na pele e outros compartimentos extracelulares pode estar prejudicada (TITZE *et al.*, 2003). A ingestão excessiva de sódio pode saturar o sistema tampão de sódio que, em indivíduos com hipertensão arterial, pode ser menor do que o normal (TITZE *et al.*, 2002).

A Ingestão de sódio de diferentes populações em todo o mundo obteve notoriedade na comunidade científica através da publicação do Dr. Louis Dahl em 1960, mostrando uma relação linear positiva entre a prevalência de hipertensão arterial e a ingestão de sódio (DAHL *et al.*, 2005). Além disso, ele observou uma forte correlação entre a taxa de mortalidade por acidente vascular cerebral no Japão e o alto consumo de sódio (BROWN *et al.*, 2009).

2.2. Consumo de sódio e programação fetal de doenças cardiovasculares

A partir das observações encontradas pelo grupo do Dr. Barker na década de 80 a cerca dos eventos ocorridos durante a vida uterina, foram sendo desenvolvidos muitos estudos mostrando quais fatores poderiam “programar” o desenvolvimento de doenças crônicas, como a hipertensão arterial, na vida adulta (Barker *et al.*, 1986). Dentre os fatores que podem ocasionar o desenvolvimento destas doenças pode-se citar a desnutrição ou exposição a alguns fatores nutricionais durante a vida intrauterina e perinatal. Contreras *et al.* (2000) investigaram a influência, em longo prazo, de uma sobrecarga de cloreto de sódio na dieta sobre a pressão arterial e frequência cardíaca de ratos Sprague Dawley. O estudo demonstrou que a exposição a níveis elevados deste íon no início do desenvolvimento conduz a um aumento sustentado da pressão artéria na idade adulta (CONTRERAS *et al.*, 2000). Além desse estudo, Ding *et al.* (2010) investigaram o papel da sobrecarga de sódio no período gestacional sobre o desenvolvimento cardíaco fetal. Foi oferecida uma dieta com 8% de NaCl a ratas Spragye-Dawley do 3º ao 21º dia de gestação. Com esta exposição ocorreram mudanças estruturais nos corações dos fetos, tais como: maior peso da massa cardíaca, desorganização das miofibrilas e menor tamanho da mitocôndria. Strazzullo *et al.* (2001) observaram que uma ingestão crônica elevada de sódio na dieta é seguida por um desarranjo nos mecanismos de inibição simpática central e, em seguida, por um tônus simpático periférico maior. Estes, por sua vez, podem gerar sensibilidade ao Na^+ , afetando o transporte tubular renal de sódio e água e assim a hemodinâmica renal.

Em um estudo realizado por Silva *et al.* (2003) com animais oriundos de mães submetidas à uma dieta teor de sódio com, baixo, alto ou normal durante a gestação e lactação foi observado que os animais oriundos de mães submetidas à dieta rica em sódio apresentaram elevação da pressão arterial, diminuição do peso corporal, aumento de angiotensina II, sem alteração da renina plasmática, na massa renal ou no número glomérulos. A prole adulta oriundo das mães alimentadas com restrição de sódio apresentou uma resposta normal do sistema renina-angiotensina, com um aumento esperado na atividade plasmática da renina. Em um estudo realizado por Cabral *et al.* (2012), evidenciou-se que a sobrecarga materna de sódio promove alterações em transportadores renais de sódio e na sua regulação, bem como lesões estruturais graves na prole adulta. Estas alterações foram caracterizadas por aumento de expressão e atividade da Na^+/K^+ ATPase, proteína quinase C, e A, aumento do estresse oxidativo, maior infiltração de macrófagos, aumento da deposição de colágeno e de angiotensina II. Além disso, Cardoso *et al.* (2009) demonstraram que a sobrecarga de sódio a partir da fase pré-natal até o desmame leva a alterações no metabolismo lipídico e na função renal dos filhotes. Além destes efeitos funcionais, Piecha *et al.* (2012) avaliaram os efeitos da exposição à sobrecarga materna de sódio sobre alguns aspectos morfológicos da vasculatura da prole. A espessura da parede das artérias centrais apresentou-se significativamente maior na prole de mães alimentadas com uma dieta rica em sódio. Ademais, a análise histológica detalhada destas artérias revelou que o aumento da deposição de colágeno, como marcador de fibrose foi o principal componente responsável por essa maior

espessura da parede. Além disso, nestes animais a pressão arterial não foi diferente do grupo controle.

Os estudos anteriormente citados reiteram a importância da investigação da programação fetal das alterações cardiovasculares induzidas pela exposição à sobrecarga de sódio, a fim de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos para que no futuro isso possa servir de dados para programa de prevenção e/ou tratamento destas alterações. Especial atenção deve ser dada à participação do sistema vascular na patogênese das complicações cardiovasculares associadas à sobrecarga de sódio, uma vez que, este sistema representa um dos principais alvos para o desenvolvimento de doenças como a hipertensão arterial, o acidente vascular cerebral, o infarto do miocárdio, dentre outras, que correspondem a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo.

2.3 Sistema Vascular

A parede arterial é composta por três camadas claramente distintas: uma interior (íntima), constituída por células endoteliais e uma lâmina própria, uma média, constituída de músculo liso orientadas transversalmente, e outra mais externa, chamada camada adventícia, composta de tecido conjuntivo. Cada uma dessas exerce papel diferente sobre o suporte mecânico da parede arterial, a função metabólica e a interação com os elementos do sangue (MARTINEZ-LEMUS *et al.*, 2012).

A camada adventícia é a camada mais externa da parede vascular. Esta é constituída de um tecido conjuntivo denso composto de fibroblastos, vasos

sanguíneos e linfáticos, nervos, células progenitoras e imunológicas, tornando a adventícia um dos compartimentos mais complexos e heterogêneos da parede do vaso. Em resposta hormonal, inflamatória ou estresse ambiental, tais como hipóxia/isquemia e distensão vascular, as células residentes da adventícia (fibroblastos, células do sistema imunológico e células progenitoras) são muitas vezes as primeiras células da parede vascular a serem ativados (STENMARK *et al.*, 2013).

A camada média, a mais espessa, é composta basicamente por células musculares lisas e fibras elásticas, fibras reticulares e proteoglicanos. Esta é responsável pelo aumento ou redução do diâmetro do vaso, o que resulta, respectivamente, do relaxamento e da contração vasculares. Neste processo, as células que a compõem recebem os sinais químicos provenientes do endotélio, dos terminais nervosos ou do interstício (CUNHA *et al.*, 2000), assim como são capazes de responder a estímulos mecânicos como o estiramento da parede.

A camada íntima, por sua vez, encontra-se em contato direto com o sangue e é composta por uma única camada de células endoteliais. Estas células sintetizam e liberam diferentes mediadores (discutidos a seguir) que interferem em processos fisiológicos e patológicos relacionados à homeostase vascular (MARTINEZ-LEMUS *et al.*, 2012).

2.4. Endotélio Vascular

O endotélio vascular representa uma camada monocelular que reveste a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos. Ele constitui uma interface ativa

estrategicamente situada entre a circulação e o restante da parede vascular. Tem papel crucial na regulação do tônus vascular, na estrutura dos vasos, na regulação do fluxo sanguíneo, na perfusão tissular e na proteção contra espasmo, trombose e aterogênese (BLATOUNI *et al.*, 2001). Entre as múltiplas funções biológicas do endotélio, as relacionadas à vasomotricidade incluem: 1) a síntese de substâncias vasodilatadoras, antiproliferativas e antiagregantes plaquetárias como, o óxido nítrico ($\bullet$ NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (PGI_2); 2) e a síntese de substâncias vasoconstritoras, promotoras do crescimento celular e ativadoras plaquetárias, tais como, a endotelina-1, os endoperóxidos cíclicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (a prostaglandina H_2 e o tromboxano A_2), os leucotrienos, a angiotensina II e as espécies reativas de oxigênio (VIRDIS *et al.*, 2010).

2.4.1 Fatores Vasodilatadores Derivados do Endotélio

O $\bullet$ NO é um dos mediadores vasoprotetores mais importantes secretados pelo endotélio. Esta substância é um gás solúvel, radical livre, sintetizado de maneira contínua pelas células endoteliais através da enzima NO sintase (eNOS). Esta enzima catalisa a produção do $\bullet$ NO a partir do aminoácido L-arginina e o transforma em $\bullet$ NO e L-citrulina (BIAN *et al.*, 2008). A ativação da eNOS é mediada por diversos agonistas, como a acetilcolina, a bradicinina, o íonoforo de cálcio, as catecolaminas, a angiotensina II, e por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento, os quais via trifosfato de inositol (IP_3), causam aumento

da concentração intracelular de Ca^{2+} , formando o complexo Ca^{2+} -calmodulina que ativa a eNOS (LOSCALZO *et al.*, 1995).

O $\bullet\text{NO}$ induz relaxamento da musculatura lisa vascular estimulando a guanilato ciclase solúvel, com consequente aumento da produção de monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e ativação da proteinocinase dependente do GMPc (PKG). O aumento da atividade da PKG reduz o influxo de Ca^{2+} através do sarcolema, bem como a liberação de Ca^{2+} de seus depósitos intracelulares (retículo sarcoplasmático), aumentando o sequestro do íon. A PKG pode ainda aumentar a atividade de canais para o K^+ , produzindo hiperpolarização, o que reduz a entrada de Ca^{2+} do meio extracelular, levando a mais vasodilatação (RAPAPORT *et al.*, 1983).

O $\bullet\text{NO}$ também atua como modulador do crescimento da parede vascular através da inibição da proliferação de células musculares lisas, da produção basal de colágeno, da divisão celular e da produção de matriz extracelular estimuladas pela endotelina-1 e/ou angiotensina II, além de estimular a apoptose, através de mecanismos dependentes do GMPc (POLLMAN *et al.*, 1996).

A prostaciclina é uma das substâncias vasodilatadoras derivadas do endotélio. Ela é um eicosanoide derivado do ácido araquidônico, que é liberado dos fosfolípidios da membrana endotelial pela fosfolipase A_2 (PLA_2). Através da reação catalizada pela ciclooxygenase formam-se os endoperóxidos PGG_2 e PGH_2 . Este último, através da ação da prostaciclina sintetase origina a PGI_2 (NEEDLEMAN *et al.*, 1986). A contribuição da prostaciclina para a vasodilatação dependente de endotélio é usualmente pequena. Sua ação depende da presença de receptores específicos na parede das células musculares lisas vasculares. A

estimulação dos receptores da prostaciclina leva a uma estimulação da adenilil ciclase produzindo um aumento de AMP cíclico e estimulação da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) no músculo liso vascular. A PKA tem um efeito semelhante à PKG, podendo ativar canais de K^+ sensíveis ao ATP induzindo hiperpolarização e estimula a saída de Ca^{2+} do citosol inibindo a maquinaria contrátil (CARVALHO *et al.*, 2001).

Embora tanto o óxido nítrico quanto a prostaciclina apresentam efeitos relaxantes derivados do endotélio por mecanismos dependentes de cGMP e AMPc, respectivamente, um conjunto considerável de provas sugerem que um mecanismo celular adicional deve existir que medeia o relaxamento derivado do endotélio (MCGUIRE *et al.*, 2001). Este ficou conhecido por Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio. A natureza química deste fator endotelial ainda suscita várias interrogações. A vasodilatação induzida por este composto ocorre com a participação ativa dos canais para o potássio dependentes de Ca^{2+} (K_{Ca}), especialmente os de baixa (SK_{Ca}) e média (IK_{Ca}) condutância (FÉLÉTOU *et al.*, 2009) .

A transmissão da hiperpolarização gerada nas células endoteliais para as células musculares lisas parece ocorrer através das junções mioendoteliais. A baixa concentração do K^+ no espaço intercelular (entre o endotélio e as células musculares lisas) ou ainda a liberação de um fator difusível ainda não identificado, induziria ativação da bomba de sódio (Na^+/K^+ ATPase) e/ou dos canais para K^+ nos miócitos vasculares, levando assim à hiperpolarização destas células. A hiperpolarização impede a ativação os canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem

e gera uma diminuição da concentração citosólica do Ca^{2+} livre e o relaxamento vascular (BUSSE *et al.*, 2002).

2.4.2. Produtos derivados do metabolismo da ciclooxygenase

A observação inicial de que contrações dependentes do endotélio poderiam ser evitadas por inibidores da ciclooxygenase sugeriu a idéia de que os produtos desta enzima, ou seja, os prostanóides eram prováveis candidatos como fatores vasoconstrictores derivados do endotélio (LUESCHE *et al.*, 1986).

Estímulos como estiramento da parede vascular e agonistas, elevam a concentração de cálcio intracelular no endotélio e o aumento deste íon ativa a fosfolipase A_2 e a consequente formação do ácido araquidônico a partir de fosfolipídeos da membrana, a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina. O ácido araquidônico é metabolizado pela ciclooxygenase produzindo o endoperóxido cíclico (PGH_2) que servirá de substrato para a produção das prostaglandinas E_2 (PGE_2), $F_{2\alpha}$ (PGF_2), da PGI_2 e do tromboxano A_2 (TxA_2) (VANHOUTTE *et al.*, 2005; AUCH-SCHWELK *et al.*, 1990). O ácido araquidônico pode ainda ser oxidado pelas lipoxigenases e originar o ácido 15-s-hidroieicosatetraenóico (15-HETE), uma substância que capaz de produzir contração vascular (VANHOUTTE *et al.*, 1990)

O tromboxano A_2 é produzido principalmente por plaquetas, mas também por monócitos/ macrófagos e células endoteliais (THOMAS *et al.*, 2003). Suas ações envolvem agregação plaquetária, contração vascular e proliferação de células do músculo liso vascular. O TxA_2 medeia os seus efeitos através da

ligação ao receptor TP, um receptor acoplado à proteína G, expresso em diversos tipos de células hematopoiéticas, incluindo as plaquetas e monócitos, bem como em células endoteliais, fibroblastos, e células musculares lisas vasculares (HIRATA *et al.*, 1996).

Estudos publicados por nosso laboratório mostrou melhora no relaxamento induzido por acetilcolina ao inibir o receptor de tromboxano em artéria mesentérica de resistência da prole de mães submetidas à diabetes materno, sugerindo a participação deste prostanóide na disfunção vascular observada nesse modelo de programação fetal (RAMOS-ALVES *et al.*, 2012)

A PGE_2 é o prostanóide no corpo humano mais abundante. Existem três enzimas envolvidas na síntese desta prostaglandina, uma é citossólica (cPGES) e as outras duas são ligados à membrana (mPGES-1 e -2). Destas três, a cPGES e a mPGES -2 são constitutivas, enquanto a mPGES -1 é regulada por estímulos inflamatórios (FÉLÉTOU *et al.*, 2011). A PGE_2 se liga a quatro subtipos de receptores: EP1, EP2, EP3 e EP4, os quais apresentam múltiplos efeitos vasculares. Os subtipos EP1 e EP3 medeiam vasoconstrição, enquanto os subtipos EP2 e EP4 mediam vasodilatação. Os receptores EP também podem influenciar a agregação de plaquetas, migração de monócitos e macrófagos, proliferação e migração de células do músculo liso vascular e produção vascular de citocinas. (NOREL *et al.*, 2007).

A $PGF_{2\alpha}$, outro prostanóide vasoconstrictor, participa da modulação do tônus vascular ao ligar-se ao receptor FP, um receptor acoplado às proteínas que quando estimulado ativa a fosfolipase C com consequente aumento intracelular de IP_3 e cálcio (ABRAMOVITZS *et al.*, 1994). Este prostanóide seria o responsável pela contração dependente do endotélio aumentada em anéis de

aorta de animais durante o envelhecimento (WONG *et al.*, 2009). Vários autores demonstraram que prostanóides vasoconstritores derivados do metabolismo da ciclooxigenase constitutiva (COX-1) ou induzível (COX-2) são mediadores importantes da disfunção endotelial na hipertensão arterial (GRAHAM *et al.*, 2009), na prole de animais diabéticos (RAMOS-ALVES *et al.*, 2012), e no tabagismo (MCADAM *et al.*, 2005). Nestes estudos tem sido observado um aumento da expressão de COX-2 e da participação de prostanóides desta isorforma da COX em artérias de diferentes modelos de hipertensão e de pacientes hipertensos (TIAN *et al.*, 2012). O aumento da expressão da COX-2 encontrada na hipertensão foi revertido pelo tratamento com antagonistas do receptor AT1 (ÁLVAREZ *et al.*, 2007), o que sugere a participação da Angiotensina II neste efeito. Em apoio a isso, estudos *in vitro* demonstraram que a Angiotensina II induz a expressão da COX-2 e a produção de prostanóides em diferentes tipos de células vasculares (WONG *et al.*, 2011).

2.4.3 Espécies Reativas de Oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são uma classe de moléculas derivado do metabolismo oxidativo e são caracterizadas por elevada reatividade química e incluem radicais livres, tais como o superóxido (O_2^-), o ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxil ($\bullet OH$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). Além deste, pode-se incluir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ozônio (O_3) e o ácido hipocloroso ($HOCl$) que apesar de não serem radicais livres, apresentam grande poder oxidante e contribuem assim para o estresse oxidativo (ZHOU *et al.*, 2013).

As EROs são produzidos no sistema vascular por vários sistemas enzimáticos, incluindo a ciclooxygenase, a lipoxigenase, o citocromo P450 , a xantina oxidase (XO), a mieloperoxidase (MPO), a óxido nítrico sintase (NOS) e da NAD(P)H-oxidase esta última é uma das mais importantes fontes destas espécies, tanto em células endoteliais como em células do músculo liso (TANIYAMA *et al.*, 2003).

Há um aparente paradoxo entre o papel das EROs como biomoléculas essenciais na regulação de muitas funções celulares e como sub-produtos tóxicos do metabolismo que podem ser, pelo menos em parte, relacionadas às diferenças nas concentrações de EROs produzidos (HERNANZ *et al.*, 2014). Assim, em baixas concentrações intracelulares, as ROS têm um papel chave na regulação fisiológica do tônus vascular, crescimento celular, adesão, diferenciação e apoptose. Entretanto, excessivos níveis de ROS podem estar associados com o desenvolvimento de várias doenças cardiovasculares (PENDYALA *et al.*, 2010).

Muitas funções do endotélio são afetadas pelas EROs, principalmente pelo ânion superóxido; o efeito mais conhecido deste ânion é a diminuição do relaxamento dependente do endotélio em consequência da diminuição da biodisponibilidade do •NO na parede do vaso (CAI *et al.*, 2000).

Quando o ânion superóxido reage com o óxido nítrico, o vasorrelaxamento se torna prejudicado, ocorre apoptose das células endoteliais, provocando uma falha na continuidade do endotélio que favorece o aparecimento de fenômenos trombóticos promovendo a adesão de diferentes células no endotélio. Adicionalmente, o produto desta reação, o ONOO⁻, é um potente agente oxidante com importantes efeitos biológicos, como a nitrosilação de proteínas (MUNZEL *et al.*, 1997).

Além disso, as espécies reativas de oxigênio também modulam a estrutura vascular na hipertensão por deposição crescente de proteínas da matriz extracelular, como o colágeno e a fibronectina. A atividade do ânion superóxido e do H_2O_2 vascular influencia ainda a atividade de metaloproteinases 2 e 9, que promovem a degradação da membrana e da elastina, respectivamente (RAJAGOPALAN *et al.*, 1996).

2.4.4. Angiotensina II

A angiotensina II também é produzida dentro da parede vascular e desempenha um papel importante na regulação da função e da estrutura desta parede. A Angiotensina II é um potente vasoconstritor que também tem ações mitogênicas, pró-inflamatórias e pró-fibróticas. Estes efeitos são produzidos por um conjunto de vias de sinalização, muitas das quais envolvem as EROs, em especial o $O_2^{\cdot-}$ e o H_2O_2 (TOUYZ *et al.*, 2000; LEMARIÉ *et al.*, 2010).

A maior parte da angiotensina II é gerada em duas etapas sequenciais: conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, o qual é subsequentemente convertido pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em angiotensina II. A ECA também é responsável pelo catabolismo de vários peptídeos biologicamente importantes (por exemplo, a substância P e a bradicinina) em metabolitos inativos. A produção de angiotensina II também pode ocorrer através do metabolismo de outras enzimas, tais como o ativador de plasminogênio tecidual, a catepsina G e a quimase (JOHNSTON *et al.*, 1997).

A angiotensina II atua através de dois receptores diferentes: receptor tipo 1 (AT_1) e o receptor tipo 2 (AT_2). Estes dois receptores foram inicialmente

identificados através de suas propriedades farmacológicas e bioquímicas e, posteriormente, clonados. O receptor AT_1 medeia à maioria dos efeitos conhecidos da angiotensina II, que incluem: vasoconstrição, crescimento celular, geração de radicais livres, inflamação, hipertrofia cardíaca, estimulação da secreção de aldosterona, dentre outros. O receptor AT_2 apresenta geralmente efeitos opostos e contrabalança os efeitos mediados por estimulação de receptores AT_1 , como: vasodilatação, inibição da proliferação e crescimento celular, etc. (LEMARIÉ *et al.*, 2010). A angiotensina II induz ativação de cascatas altamente reguladas de transdução de sinal intracelular que levam a efeitos vasculares de curto prazo, tais como contração, e efeitos biológicos de longo prazo, tais como o crescimento celular, migração, deposição de matriz extracelular e inflamação (TOUYZ *et al.*, 2000). A ligação do receptor sobre a superfície da membrana celular externa induz a interação entre o receptor e efector sobre a superfície interna da membrana celular através de proteínas G (proteínas heterotriméricas compostos de subunidades α , β e γ) (UNGER *et al.*, 1999). Em algumas situações patológicas, esta sinalização induzida pela angiotensina II no endotélio vascular e em células musculares lisas vasculares induz um aumento da produção de EROs, inflamação, alterações de reatividade vascular, crescimento celular (ITOH *et al.*, 1993; GRIENDLING *et al.*, 1994; ÁLVAREZ *et al.*, 2007), todos os quais se combinam para, finalmente, causar doenças, tais como hipertensão arterial, aterosclerose, acidentes vasculares cerebrais, insuficiência cardíaca, doença renal crônica, dentre outros.

2.5. Disfunção Endotelial em decorrência do consumo elevado de sódio

Estudos em pacientes hipertensos têm sugerido que tanto a alta ingestão de sódio como a sensibilidade ao sódio está associada com alterações da função vascular, caracterizada, dentre outras coisas, pelo prejuízo na função endotelial (MIYOSHI *et al.*, 1997, BRAGULAT *et al.*, 2001). Outros estudos demonstram que estas alterações na função endotelial induzida pela sobrecarga de sódio ocorrem independentemente dos efeitos desta sobrecarga sobre a pressão arterial. (BOEGEHOLD *et al.*, 1993; BRAGULAT *et al.*, 2001; NURKIEWICZ *et al.*, 2007).

Boegehold *et al.* (1993) demonstraram um prejuízo no relaxamento dependente do endotélio induzido por acetilcolina, mas não ao nitroprussiato de sódio, na rede arteriolar de ratos normotensos alimentados com dieta rica em sódio, sugerindo uma menor disponibilidade do •NO nos vasos destes animais. Corroborando estes resultados, Lenda *et al.* (2000) observaram que o consumo elevado de sódio conduz a um aumento da geração de EROs em artérias da musculatura estriado esquelética de ratos, o que por sua vez reduziu a biodisponibilidade de óxido nítrico. Além destas alterações Santos *et al.* (2006) demonstraram que ratos alimentados com dieta rica em sódio durante 4 semanas apresentam aumento da resposta contrátil à fenilefrina e aumento da atividade da enzima conversora de angiotensina.

Resultados semelhantes sobre a função endotelial têm sido também descritos em humanos. Estudos publicados por Tzemos *et al.* (2008) e Dickinson *et al.* (2011) demonstraram que em humanos a ingestão aumentada de sódio pode produzir reduções agudas na função endotelial independentemente das

alterações na pressão arterial. A ingestão elevada de sódio também está associada com o aumento do ácido úrico (Forman *et al.*, 2012), o qual tem sido associado com um risco aumentado de doença cardiovascular e mortalidade (Kato *et al.*, 2005). Um estudo mais recente publicado por DuPont *et al.* (2013) corroboram estes estudos. Estes autores demonstraram que indivíduos resistentes ao sódio, e, portanto normotensos, quando expostos a uma dieta rica em sódio apresentam redução do relaxamento dependente do endotélio (DuPont *et al.* 2013).

Apesar de todas as evidências acima relatadas, até o presente não existe trabalhos mostrando o efeito do alto consumo de sódio durante a gravidez e lactação sobre a função vascular da prole adulta.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar o efeito de uma dieta com concentração elevada de sódio, durante a gestação e lactação, sobre função vascular (mecanismos contráteis e de relaxamento) da prole adulta de mães submetidas a tais condições e os possíveis mecanismos envolvidos.

3.2. Específicos

- Avaliar o efeito de uma dieta hiperssódica (NaCl: 4 ou 8%) materna na pressão arterial e frequência cardíaca da prole adulta.

- Avaliar nestes animais possíveis alterações no relaxamento dependente e independente do endotélio e na contração induzida por estimulação alfa-adrenérgica em anéis de aorta torácica;

- Estudar a participação de espécies reativas de oxigênio nas alterações vasculares observadas;

- Avaliar a participação dos prostanóides derivados das ciclooxygenases sobre as alterações acima citadas;

- Avaliar nestas arteriais a participação do sistema-renina-angiotensina..

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMOVITZS M, BOIE Y, NGUYEN T, THOMAS H. RUSHMORE, BAYNEL MA, METTERS L KM , SLIPETZ L DM , GRYGORCZYK L R. Cloning and Expression of a cDNA for the Human Prostanoid FP Receptor. *J Biol Chem*. **269**: 2632-2636, 1994.

ÁLVAREZ Y, PÉREZ-GIRÓN JV, HERNANZ R, BRIONES AM, GARCÍA-REDONDO A, BELTRÁN A, ALONSO MJ, SALAICES M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2- derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* .**321**: 381–388, 2007.

AUCH-SCHWELK, W., KATUSIC, Z.S, VANHOUTTE, P.M. Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium-dependent contractions. *Hypertension*, **15**, 699–703, 1990.

ANVISA. Anvisa vai monitorar alimentos quem devem reduzir presença de sal. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu++noticias+anos/2013+noticias/anvisa+vai+monitorar+alimentos+quem+devem+reduzir+presenca+de+sal> at Accessed ,January 14, 2014.

BAKER, DJ, OSMOAD C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* .**1**: 1077-1081, 1986.

BARKER DJ, WINTER PD, OSMOND C, MARGETTS B, SIMMONDS SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. **2**: 577-580, 1989.

Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci* .**95**: 115-128, 1998.

BARKER DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med*. **261**: 412-417, 2007.

BARKER DJP. Mothers, Babies, and Disease in Later Life. *BMJ*, 1994.

BARKER DJP. The intrauterine origins of cardiovascular disease. *Acta Paediatr. Scand*. **391**: 93–99, 1993.

BARKER DJ. The malnourished baby and infant. *Br Med J*. **60**: 69-88, 2001.

BIAN K, DOURSOUT MF, MURAD F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens* .**10**: 304-310, 2008.

BLATOUNI M. Endotélio e Hipertensão Arterial. *Rev Bras Hipertens*. **8**: 328-338, 2001.

BRAGULAT E, SIERRA AL, ANTONIO MT, COCA A. Endothelial Dysfunction in Salt-Sensitive Essential Hypertension. *Hypertension*. **37**: 444-448, 2001.

BROWN JI, TZOULAKI I, CANDEIAS V, ELLIOTT P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol*. **38**: 791–813, 2009.

BOEGEHOLD MA. Effect of dietary salt on arteriolar nitric-oxide in striated muscle of normotensive rats. *Am J Physiol*. **264**: H1810-H1816, 1993.

BUSSE R, EDWARDS G, FÉLÉTOU M, FLEMING I, VANHOUTTE PM, WESTON AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci*. **23**: 374-380, 2002.

CAI H, HARRISON DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*. **87**: 840-844, 2000.

CABRAL EV, VIEIRA-FILHO LD, SILVA PA, NASCIMENTO WS, AIRES RS. Perinatal Na⁺ Overload Programs Raised Renal Proximal Na⁺ Transport and Enalapril-Sensitive Alterations of Ang II Signaling Pathways during Adulthood. *Plos One*. **7**: e43791, 2012.

CARDOSO HD, CABRAL EV, VIEIRA-FILHO LD, VIEIRA A, PAIXÃO AD. Fetal development and renal function in adult rats prenatally subjected to sodium overload. *Pediatric Nephrology*. **24**: 1959-1965, 2009.

CARVALHO MHC, NIGRO D, LEMOS VS, TOSTES RCA, FORTES ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens* **8**: 76-88, 2001.

CONTRERAS RJ, WONG DL, HENDERSON R, CURTIS KS, SMITH JC. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. *Physiology & Behavior*. **71**: 173-181, 2000.

CONTRERAS RJ. High NaCl intake of rat dams alters maternal behavior and elevates blood pressure of adult offspring. *Am J Physiol*. **264**: 296-304, 1993.

CUNHA RS, FERREIRA AVL. Sistema renina-angiotensina-aldosterona e lesão vascular hipertensiva. *Rev Bras Hipertens*. **3**: 282-292, 2000.

DA SILVA AA, DE NORONHA IL, DE OLIVEIRA IB, MALHEIROS DM, HEIMANN JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. **13**: 133-139, 2003.

DAHL LK. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. *Int J Epidemiol*. **34**: 967-972, 2005.

DING Y, LV J, MAO C, ZHANG H, WANG A, ZHU L, ZHU H, XU Z. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes. Institute for Fetal Origin-Diseases. *J Hypertens.* **28**: 1290-1297, 2010.

DOS SANTOS L, GONÇALVES MV, VASSALLO DV, OLIVEIRA EM, ROSSONI LV. Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds: Endothelial modulation. *Life Sciences.* **78**: 2272–2279, 2006.

DUPONT JJ, GREANEY JL, WENNER MM, LENNON-EDWARDS SL, SANDERS PW, FARQUHAR WB, EDWARDS DG. High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt –resistant humans. *J Hypertens.* **31**: 530-536, 2013.

DICKINSON KM, CLIFTON PM, KEOGH JB. Endothelial function is impaired after a high-salt meal in healthy subjects. *Am J Clin Nutr.* **93**: 500-510, 2011.

FÉLÉTOU M, HUANG Y, AND VANHOUTTE PM. Endothelium mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *Br J Pharmacol.* **164**: 894–912, 2011.

FÉLÉTOU M, VANHOUTTE PAUL M. EDHF: an update. *Clinical Science.* **117**: 139–155, 2009.

FUJIWARA N, OSANAI T, KAMADA T, KATOH T, Takahashi K, Okumura K. Study on the relationship between plasma nitrite and nitrate level and salt sensitivity in human hypertension modulation of nitric oxide synthesis by salt intake. *Circulation.* **101**: 856-861, 2000.

FORMAN JP, SCHEVEN L, DE JONG PE, BAKKER SJ, CURHAN GC, GANSEVOORT RT.. Association between sodium intake and change in uric acid, urine albumin excretion, and the risk of developing hypertension. *Circulation.* **125**: 3108-3116, 2012

GLUCKMAN PD, LILLYCROP KA, VICKERS MH, PLEASANTS AB, PHILLIPS ES, ET AL. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**: 12796–12800, 2007.

GRIENDLING KK, MINIERE CA, OLLERESHAW JD, ALEXANDER RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* **74**: 1141–1148, 1994.

HAZON N, PARKER C, LEONARD R, HENDERSON IW. Influence of an enriched dietary sodium chloride regime during gestation and suckling and postnatally on the ontogeny of hypertension in the rat. *J. Hypertens.* **6**: 517-524, 1988.

HE FJ, MACGREGOR GA. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. *Prog Cardiovasc Dis*. **52**: 363-382, 2010.

HERNANZ R , BRIONES AM , SALAICES M , ALONSO MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clinical Science*. **126**: 111–121, 2014.

HIRATA T, USHIKUBI F, KAKIZUKA A, OKUMA M, NARUMIYA S. Two thromboxane A2 receptor isoforms in human platelets. *J Clin Invest*. **97**: 949–956, 1996.

HOLEMANS K, GERBER RT, MEURRENS K, DE CLERCK F, POSTON L, VAN ASSCHE FA. Streptozotocin diabetes in the pregnant rat induces cardiovascular dysfunction in adult offspring . *Diabetologia*. **42**: 81-89

ITOH H, MOKOYAMA M, PRATT RE, GIBBONS G, DZAU VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth responses to angiotensin II. *J Clin Invest*. **91**: 399–403, 1993.

JOHNSTON CI, RISVANIS J. Preclinical pharmacology of angiotensin II receptor antagonists: update and outstanding issues. *Am J Hypertens*. **10**: 306-310, 1997.

KATO M, Hisatome I, Tomikura Y, Kotani K, Kinugawa T, Ogino K, Ishida K, Igawa O, Shigemasa C, Somers VK. Status of endothelial dependent vasodilation in patients with hyperuricemia. *Am J Cardiol*. **96**: 1576-1578, 2005

KHORRAM O, GHAZI R, CHUANG TD, HAN G, NAGHI J, NI Y, PEARCE WJ. Excess Maternal Glucocorticoids in Response to In Utero Undernutrition Inhibit Offspring Angiogenesis. *Reprod Sci*. **00**: 1-11, 2013

LEMARIÉ CA, SCHIFFRIN EL. The angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular disease. Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System. *J Am Soc Nephrol* .**16**: 2545–2556, 2010.

LEND A DM, SAULS BA, BOEGEHOLD MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium dependent dilation in rats fed high salt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **279**: 7–14, 2000.

LOSCALZO J, WELCH G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovascular Dis*. **38**: 87-104, 1995.

LUESCHER TF, VANHOUTTE PM. Endothelium-dependent contractions to acetylcholine in the aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. **8**: 344–348, 1986.

MACKINTOSH D, BAIRD-LAMBERT J, DRAGE D, BUCHANAN N. Effects of prenatal glucocorticoids on renal maturation in newborn infants. *Dev Pharmacol Ther.* **8**: 107-114, 1985.

MARTINEZ-LEMUS LA. The Dynamic Structure of Arterioles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* **110**: 5–11, 2012.

MCADAM BF, BYRNE D, MORROW JD, OATES JA. Contribution of cyclooxygenase-2 to elevated biosynthesis of thromboxane A2 and prostacyclin in cigarette smokers. *Circulation.* **112**: 1024-1029, 2005.

MCGUIRE JJ, DING H, TRIGGLE CR. Endothelium-derived relaxing factors: a focus on endothelium-derived hyperpolarizing factor(s). *J Physiol Pharmacol.* **79**: 443-470, 2001.

MENETON P, JEUNEMAITRE X, DE WARDENER HE, MACGREGOR GA. Links Between Dietary Salt Intake, Renal Salt Handling, Blood Pressure, and Cardiovascular Diseases. *Physiol Rev.* **85**: 679–715, 2005.

MIYOSHI A, SUZUKI H, FUJIWARA M, MASAI M, IWASAKI T. Impairment of endothelial function in salt-sensitive hypertension in humans. *Am J Hypertens.* **10**: 1083–1090, 1997.

MÜNZEL T, JUST H, HARRISON DG: The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. *Herz.* **22**: 158-172, 1997.

NEEDLEMAN P, TURK J, JAKSCHIK BA, MORRISON AR, LEFKOWITH JB. Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem.* **55**: 69-102, 1986.

NURKIEWICZ TR, BOEGEHOLD MA. High salt intake reduces endothelium-dependent dilation of mouse arterioles via superoxide anion generated from nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **292**: 1550–1556, 2007.

NOREL X. Prostanoid receptors in the human vascular wall. *Sci Wor J.* **7**: 1359-1374, 2007.

PENDYALA S, NATARAJAN V. Redox regulation of Nox proteins. *Respir Physiol Neurobiol.* **174**: 265–271, 2010.

PIECHA G, KOLEGANOVA N, RITZ E, MÜLLER A, FEDOROVA OV, BAGROV AY, LUTZ D, SCHIRMACHER P, GROSS-WEISSMANN ML. High salt intake causes adverse fetal programming-vascular effects beyond blood pressure. *Nephrol Dial Transplant.* **27**: 3464-3476, 2012.

POLLMAN MJ, YAMADA T, HORIUCHI M, GIBBONS GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res.* **79**: 748-756, 1996.

PORTER JP, KING SH, HONEYCUTT AD. Prenatal high-salt diet in the Sprague–Dawley rat programs blood pressure and heart rate hyperresponsiveness to stress in adult female offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. **293**: 334–342, 2007.

RAJAGOPALAN S, MENG XP, RAMASAMY S, HARRISON DG, GALIS ZS. Reactive oxygen species produced by macrophage derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J. Clin. Invest*. **98**: 2572–2579, 1996.

RAMOS DR, COSTA NL, KAREN L.L. JANG, OLIVEIRA IB, DA SILVA AA, HEIMANN JC, LUZIA N.S. FURUKAWA. Maternal high-sodium intake alters the responsiveness of the renin–angiotensin system in adult offspring. *Life Sciences*. **90**: 785–792, 2012.

RAMOS-ALVES FE, DE QUEIROZ DB, SANTOS-ROCHA J, DUARTE GP, XAVIER FE. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *Br J Pharmacol*. **166**: 2198–2208, 2012.

RAPAPORT RM, DRAZNIN MB, MURAD F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature*. **306**: 174–176, 1983.

SARNO F, CLARO RM, LEVYI RB, BANDONI DH, MONTEIRO CA. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009. *Rev Saúde Pública*. **47**: 571–578, 2013.

STENMARK KR, YEAGER ME, EL KASMI KC, NOZIK-GRAYCK E, GERASIMOVSKAYA EV, LI M, RIDDLE SR, FRID MG. The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol*. **75**: 23–47, 2013.

STOCKARD CR. Developmental rate and structural expression: an experimental study of twins, “double monsters” and single deformities, and the interaction among embryonic organs during their origin and development. *Am. J. Anat*. **28**: 115–277, 1920.

STRAZZULLO P, BARBATO A, VUOTTO P, GALLETTI F. Relationships between salt sensitivity of blood pressure and sympathetic nervous system activity: a short review of evidence. *Clin Exp Hypertens*. **23**: 25–33, 2001.

TANIYAMA Y, GRIENDLING KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. **42**: 1075–1081, 2003.

THOMAS DW, ROCHA PN, NATARAJ C, ROBINSON LA, SPURNEY RF, KOLLE R BH, COFFMAN TM. Proinflammatory actions of thromboxane receptors to enhance cellular immune responses. *J Immunol.* **171**: 6389–6395, 2003.

TZEMOS N, LIM PO, WONG S, STRUTHERS AD, MACDONALD TM. Adverse cardiovascular effects of acute salt loading in young normotensive individuals. *Hypertension.* **51**: 1525-1530, 2008

TIAN XY, WONG WT, LEUNG FP, ZHANG Y, WANG YX, LEE HK, NG CF, CHEN ZY, YAO X, AU CL, LAU CW, VANHOUTTE PM, COOKE JP, AND HUANG Y. Oxidative stress-dependent cyclooxygenase- 2-derived prostaglandin f(2a) impairs endothelial function in renovascular hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal.* **16**: 363–373, 2012.

TITZE J, KRAUSE H, HECHT H, DIETSCH P, RITTWEGER J, LANG R, KIRSCH KA, HILGERS KF. Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the Dahl model. *Am J Physiol Renal Physiol.* **283**: 134–141, 2002

TITZE J, LANG R, ILIES C, SCHWIND KH, KIRSCH KA, DIETSCH P, LUFT FC, HILGERS KF. Osmotically inactive skin Na⁺ storage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* **285**: 1108–1117, 2003.

TOUYZ RM, SCHIFFRIN EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Ver.* **52**: 639-672, 2000.

UNGER T .The angiotensin type 2 receptor: Variations on an enigmatic theme. *J Hypertens.* **17**: 1775–1786, 1999.

VANHOUTTE PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Adv Nephrol Necker Hosp.* **103**: 405-411, 1990.

VIRDIS A, GHIADONI L, TADDEI S. Human endothelial dysfunction: EDCFs. *Eur J Physiol.* **459**: 1015-1023, 2010.

VANHOUTTE PM ,FELETOU M, TADDEI S. Endothelium-dependent contractions in hypertension. *Br J Pharmacol.* **144**: 449-458, 2005.

WASH- World Action. on Salt and Health. at: <http://www.worldactiononsalt.com/worldaction/index.html>_ Accessed January ,31,2014.

WONG SL, LAU CW, WONG WT, XU A, AU CL, NG CF, NG SS,GOLLASCH M, YAO X, AND HUANG Y. Pivotal role of protein kinase C delta in angiotensin II-induced endothelial cyclooxygenase-2 expression: a link to vascular inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **31**: 1169–1976, 2011

WONG SL, LEUNG FG , LAU CW , CHAK LEUNG AU, YUNG LMOOI, XIAOQIANG YAO, ZHEN-YU CHEN, PAUL M. VANHOUTTE, MAIK GOLLASCH, YU HUANG. Cyclooxygenase-2–Derived Prostaglandin F₂ Mediates Endothelium-Dependent Contractions in the Aortae of Hamsters With Increased Impact During Aging. *Circ Res.* **104**: 228-235, 2009.

ZHOU Y , YAN H , M GUO , ZHU J , Q XIAO , ZHANG L . Reactive oxygen species in vascular formation and development. *Oxid Med Cell Longev.* **2013**: 1-14, 2013

Artigo a ser submetido no periódico: *Vascular Pharmacology*

Sodium overload in the pregnant rats induces vascular dysfunction in adult offspring

Juliana Santos-Rocha, Diego B. de Queiroz, Fernanda .E. Ramos-Alves, Odair A. Silva, Francine G. de Sá, Rocha, M.A, Gloria P. Duarte, Fabiano E. Xavier.

Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

Corresponding author: Fabiano E. Xavier, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rêgo, Cidade Universitária, 50670-901, Recife Brazil. E-mail: fabianoxavier@ufpe.br, fabiano.exavier@gmail.com

Keywords: fetal programming, hypertension, vascular dysfunction, sodium overload

Abstract

High sodium intake is associated with a greater risk of hypertension and other cardiovascular disease in susceptible people. In this study mechanisms underlying perinatal sodium overload-programmed vascular dysfunction (contractile and relaxation responses) were investigated. Dams were fed a diet with normal sodium content (NS, 1.3% NaCl), moderate (MS, 4% NaCl) or high (HS, 8% NaCl) during pregnancy and lactation periods. Blood pressure, acetylcholine-induced relaxation, phenylephrine- and angiotensin I and II-induced contraction, lipid peroxidation, reduced glutathione levels and angiotensin converting enzyme (ACE) activity were performed in aorta from 6-month-old NS, MS and HS offspring. Blood pressure was similar in all groups. Relaxation to acetylcholine was impaired, while the phenylephrine-induced contraction was increased, in HS aorta compared to NS. Aortic relaxation and contraction were not altered in MS group. Pre-treatment with Tempol, Apocinin or Indomethacin restored acetylcholine and phenylephrine responses in aorta from HS group. Contraction to angiotensin I was increased, while response to angiotensin II remained unmodified in HS aorta compared to NS. Aortic TBARS malondialdehyde and reduced glutathione levels were similar in HS compared to NS. Aortic ACE activity was increased in the offspring HS group compared to NS. All together, these results demonstrate that maternal sodium overload programmed vascular dysfunction in the offspring. These vascular changes seem to be produced by a NADPH oxidase-dependent oxidative stress and by an enhanced formation of vasoconstrictor prostanoids. These mechanisms are possibly stimulated by angiotensin II in the aortic wall, whose production is increased in the HS group.

1. Introduction

In the last decades, the incidence of cardiovascular diseases (CVD) has been increasing worldwide. In the early 20th century, it was responsible for less than 10% of deaths around the entire world, while at the beginning of the 21st century it already accounts for almost 50% and 25% of deaths in developed and developing countries, respectively [1]. In most countries, the increased incidence of CVD has been attributed in part to environmental factors such as diet, smoking and reduced physical training [1]. On the other hand, the susceptibility to CVD may also be acquired *in utero* through changes in uterine environment. *Fetal programming* refers to the observations that disturbances during the critical period of development can cause lifelong changes in the structure and function of the organism leading to diseases in later [2]. This concept comes from epidemiological studies by Barker and colleagues who evidenced an inverse relationship between low weight at birth and development of CVD in adulthood [2-4]. However, other maternal status that produces adverse environment to fetal development, including sodium overload, also increases the risk of metabolic and cardiovascular diseases in the offspring [5].

High sodium intake is associated with a greater risk of hypertension and other cardiovascular and kidney diseases in susceptible people [6-8]. In grown experimental animals, high salt intake causes myocardial fibrosis, left ventricular hypertrophy and vascular remodeling [7], which is independent of its well-known ability to increase arterial pressure in some individuals [8]. Fetal exposure to sodium overload can also result in renal and/or cardiovascular changes and increased risk of hypertension in adult life [9-11]. This exposure impairs the

offspring's nephrogenesis, reducing the nephron number [12], produces glomerulosclerosis [13] and increases proteinuria [14]. Moreover, these offspring also present cardiac remodeling, which is characterized by concentric left ventricular hypertrophy [15]. Although many studies have observed increased blood pressure in the offspring from dams fed a high-sodium diet, these findings have not been consistently reported. For instance, the study by Porter *et al.* (2007) [16] or Cabral *et al.* [9] did not observe increased blood pressure among the offspring of mothers fed a high-sodium diet during pregnancy and lactation periods.

Vascular endothelial dysfunction plays an important role in the development/ maintenance of cardiovascular diseases, including hypertension [17]. We [18, 19] and others [20] have demonstrated that endothelial dysfunction may be programmed *in utero*, which can contribute to development of hypertension in the offspring. In rats and human the elevated dietary salt intake impairs the vasodilator response to acetylcholine, a marker of endothelial dysfunction [21]. This effect of the high-salt diet is independent of changes in blood pressure and could occur either because the production of vasodilator substances by the endothelium is impaired or because the vessels liberate vasoconstrictor substances in response to vasoactive stimuli that normally relax the blood vessels [21, 22]. Whether maternal exposure to sodium overload causes similar effects on endothelial function in the offspring is unknown.

Thus, the present work was designed to evaluate the effect of a diet with a high sodium concentration (NaCl, 4% or 8%) during pregnancy and lactation on

vascular function (contractile and relaxation mechanisms) of adult offspring from dams subjected to such conditions and the possible mechanisms involved.

2. Material and methods

All procedures used in this study conforms with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996) and were approved by the Ethics Committee of the *Centro de Ciências Biológicas* from the *Universidade Federal de Pernambuco*. Wistar rats were obtained from colonies maintained at the Animal Quarters of the *Departamento de Fisiologia e Farmacologia* of the *Universidade Federal de Pernambuco*. Rats were housed at a constant room temperature humidity and a light cycle (12:12 h light-dark), with free access to standard or high-sodium rat chow and tap water.

2.1. Animals

Virgin female Wistar rats were kept in cages with male rats in a 3:1 ratio to be mated. Evidence of copulation was accomplished by the presence of sperm in vaginal smear and 24 hours after that observation was considered the first day of gestation. In this study we used only rats that were 24 weeks of age. The animals were divided in three groups for the experiments: offspring from dams that fed a normosodic diet (NS: 1,3% NaCl; 3,92kcal/g; 57,04% carbohydrate; 24,6% protein and 7,3% fat), offspring from dams that fed a moderate sodium (MS: 4% NaCl; 3,86kcal/g; 57,72% carbohydrate; 25,2% protein and 6% fat) and offspring from dams that fed a high-salt diet (HS: 8% NaCl; 3,86kcal/g; 57,08% carbohydrate;

25,7% protein and 6,1% fat). Diet was consumed by female rats during pregnancy and lactation.

2.2. Arterial blood pressure measurement in conscious rats

Rats were anesthetized with ketamine, xylazine, and acetopromazin mixture (64.9, 3.2, and 0.78 mgkg⁻¹, respectively, i.p.) and allowed to breathe room air spontaneously. The right carotid artery was cannulated with a polyethylene catheter (PE-50 with heparinized saline) that was exteriorized in the midscapular region. After 24 h, arterial pressure and heart rate were measured in conscious animals by a pressure transducer (model MLT844, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia) and recorded using an interface and software for computer data acquisition (ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Heart rate was determined from the intra-beat intervals.

2.3. Vascular Reactivity Study

Rats were anesthetized with ketamine, xylazine and acetopromazin mixture (64.9; 3.2 and 0.78 mg.Kg⁻¹, respectively, i.p.) and killed by exsanguination. The thoracic aorta were carefully removed and placed in cold oxygenated Krebs-Henseleit bicarbonate buffer. The buffer consisted of (in mM): NaCl 118, KCl 4.7, NaHCO₃ 25; CaCl₂.2H₂O 2.5, glucose 11, KH₂PO₄ 1.2, 1.2 and EDTA MgSO₄.7H₂O 0.01) Arterial segments were mounted between two steel hooks in isolated tissue chambers containing 5 ml of gassed (95% O₂ and 5% CO₂) KHB, at pH 7.4 and 37°C. The thoracic aortic rings were subjected to a resting tension of 1 g (aortic), which was readjusted every 15 min during 45 min of stabilization, period

before drug administration. The isometric tension was recorded by using an isometric force displacement transducer (Leticia Scientific Instruments, TRI-210, Panlab, S.L., Barcelona, Spain) connected to a data acquisition system (Powerlab, ADInstruments, Bella Vista, Australia).

Vessels were initially exposed twice to 75 mmol/L KCl to check their functional integrity. After 30 min, rings were contracted with concentration of phenylephrine inducing 50-70% of the contraction induced by KCl. Acetylcholine (0.1 nmol/L to 10 μ mol/L) or sodium nitroprusside (SNP, 1 nmol/L to 10 μ mol/L) was then added to assess endothelium-dependent or -independent relaxation, respectively. After 60 min, cumulative concentration–response curves for phenylephrine (0.1 nmol/L to 30 μ mol/L), angiotensin I (1 nmol/L to 10 μ mol/L) or angiotensin II (1 nmol/L to 10 μ mol/L) were generated. In certain experiments, the endothelium was removed by gently rubbing the intimal surface with a stainless steel rod. The effectiveness of endothelium removal was confirmed by the absence of relaxation to acetylcholine (1 μ mol/L) in rings precontracted with phenylephrine. Additionally, concentration–response curves were performed to assess the effects of the non-selective COX inhibitor, indomethacin (Indo, 10 mmol/l), the superoxide dismutase mimetic, tempol (10 μ mol/L), or the NADPH oxidase inhibitor, apocinin (100 μ mol/L). All drugs were added 30 min before generating the concentration-response curve.

2.4. Measurement of lipid peroxidation

Lipid peroxidation was assessed by measuring the thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), assayed by malondialdehyde (MDA) levels, in aorta

homogenate, as described by Ohkawa *et al.*, (1979) [23]. For each 1 g of aortic tissue was added 5 mL of EDTA-1.15% KCl and homogenized for 30 seconds. Then 50mL were transferred to a tube containing 950 μ L of solution of thiobarbituric acid (TBA) 0.8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 8.1% acetic acid and 20% water, and incubated in a water bath at 95° C for 60 minutes. Subsequently, the vials were immediately cooled on ice to block vessel containing the reaction. Then, 0.25 ml of distilled water and 1.25 ml of n-butanol were added homogenizing vortexed for 30 seconds. The tubes were centrifuged for 10 minutes at 4000 rpm and reading the organic phase was performed. The absorbance was measured at 532 nm in a microplate reader (Varioskan flash, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland). The results were expressed as η mol MDA/ mg protein.

2.5. Assessment of the levels of reduced glutathione

The level of reduced glutathione (GSH) levels in aortic tissue was performed according the method described by Sedlak & Lindsay (1968) [24]. Tissue samples were homogenized in KCl buffer, 1.15% EDTA. For each 400 μ L of homogenate were added 400 μ L of KCl-EDTA and 400 μ L of trichloroacetic acid (TCA) 10% and centrifuged for 20 minutes at 2400 rpm at 4° C for protein precipitation. Then, 100 μ L sample of the supernatant was transferred to a tube containing 400 μ L of Tris-EDTA buffer, 400 μ L of distilled water and 100 μ L of ditionitrobenzóico acid (DTNB). After 5 minutes the reaction was read in a in a microplate reader (Varioskan flash, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland) at 412nm. The results were expressed as η mol GSH / mg protein.

2.6 .Measurement of aortic angiotensin converting enzyme (ACE) activity

ACE activity was evaluated by fluorimetric assay, adapted by Friedland and Silverstein (1976) [25]. The thoracic aorta was collected and stored at -80° C temperature after sacrifice of the animal until the moment of its use for the determination of ACE activity. Aortic samples (homogenized at 4°C in PBS, pH 7.4 solutions) were incubated at 37°C for 15 minutes with 40 µL of buffer containing substrate Hip-His-Leu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The reaction was stopped by adding 190µl of 0.34 mmol/L NaOH. The dipeptide- Hipuril-Histidil-Leucin was detected by adding 17µl o-phthaldehyde (OPTA) in 2% methanol (mass/ volume in methanol). Fluorescence was measured in a spectrofluorometer plate reader (Varioskan flash, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finland), with excitation filters at 350 nm and emission at 520 nm and normalized by protein concentration. Results were expressed by ηmol/ ml/ min/ mg protein.

2.7. Chemical compounds

Drugs used were phenylephrine hydrochloride, acetylcholine, sodium nitroprusside, apocynin, indomethacin and TEMPOL (Sigma, St. Louis, MO, USA). For experiments “in vitro”, stock solutions (10 mmol/L) of drugs were made in distilled water, except indomethacin that was dissolved in ethanol. These solutions were kept at -20°C, and appropriate dilutions were made on the day of the experiment.

2.8 Statistical analysis

Relaxation responses to acetylcholine and sodium nitroprusside were expressed as the percentage of relaxation of the maximum contractile response induced by phenylephrine. Phenylephrine contractile responses were expressed as a percentage of the maximum response produced by KCl.

All values are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M.) of the number of rats used in each experiment. Results were analyzed using Student's t-test, one way or "two-way" ANOVA. When ANOVA showed a significant treatment effect, Bonferroni's post hoc test was used to compare individual means (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

3. Results

Dams that were fed a diet containing 4% or 8% NaCl presented increased water intake (Pregnancy: NS: 15.4 ± 0.56 ; MS: 25.3 ± 1.05 ; HS: 38.8 ± 0.23 mL, $P < 0.05$; Weaning: NS: 43.1 ± 3.67 ; MS: 48.1 ± 7.79 ; HS: 67.9 ± 9.31 mL, $P < 0.05$) and diuresis (results not shown) compared to control dams. The diary sodium intake was increased in dams that were fed a moderate or high sodium diet during pregnancy and lactation periods, compared to dams that received normosodic diet (Pregnancy: NS: 39.1 ± 3.59 , MS: 121 ± 4.40 , HS: 261 ± 9.07 mg, $P < 0.05$; Weaning NS: 72.4 ± 16.5 , MS: 255 ± 43.8 , HS: 481 ± 70.1 mg, $P < 0.05$). Gestation occurred normally, and the rats delivered spontaneously at term (21 days of gestation). Dams fed a moderate or high sodium diet gave birth to similar pups than control dams (results not shown).

The birth body weight of offspring was not affected by maternal high sodium diet (NS: 5.7 ± 0.10 ; MS: 5.6 ± 0.25 ; HS: 5.9 ± 0.09 g, $P > 0.05$). However, from the twenty-first week of age the HS group showed an increase in body weight compared to MS and NS (Figure 1A).

In this study there were no significant differences in systolic or diastolic blood pressure among the three groups studied (Figure 1B and C).

3.1. Vascular response to KCl, phenylephrine, angiotensin I and II, and endothelium-dependent and endothelium-independent relaxations

KCl (75 mmol/L) evoked similar contractions in the aorta from NS, MS and HS rats (NS: 1.50 ± 0.06 ; MS: 1.55 ± 0.07 ; HS: 1.59 ± 0.10 g, $P > 0.05$). Acetylcholine induced endothelium-dependent vasodilator responses that were impaired in aorta

from HS than NS (Figure 2A). In MS group, relaxation to acetylcholine remained unmodified (Figure 2A). In both groups, relaxation induced by sodium nitroprusside was comparable (Figure 2C). Phenylephrine induced a concentration-dependent contraction in aortic rings from both NS, MS and HS groups, which was increased in segments from HS, compared to NS and MS groups (Figure 2B). In MS group, contraction to phenylephrine was similar to NS group (Figure 2B). As the responses to acetylcholine and phenylephrine were not modified in the MS group, the following experiments were performed only in the HS group and compared to the NS group.

Incubation with Tempol did not alter relaxation to acetylcholine in aorta from NS (Figure 3A). On the other hand, in aorta from HS, Tempol increased this relaxation (Figure 3B). In HS group, pretreatment of aorta with Tempol resulted in a reduction of the concentration–response curve to phenylephrine (Figure 3D) while in segments from NS, contractile response to phenylephrine remained unmodified (Figure 3C). Similar results were observed when arteries were pretreated with apocinin (Figure 4A-D).

In NS aorta, acetylcholine-induced vasodilatation was not modified by indomethacin (Figure 5A). By contrast, the altered response to acetylcholine was normalized by indomethacin in aorta from HS group (Figure 5B). Indomethacin reduced the phenylephrine-induced contraction only in arteries from HS group (Figure 5C and D)

Angiotensin I induced a concentration-dependent contraction in aorta from both NS and HS (Figure 6A). In HS aorta this contraction was higher compared to

NS (Figure 6A). Vasoconstriction produced by angiotensin II was similar in both NS and HS group (Figure 6B).

3.2 .Aortic TBARS and reduced glutathione

Figure 7 show that perinatal sodium overload did not change TBARS levels in aorta from adult offspring.

3.3. Aortic ACE activity

The aortic ACE activity was increased in offspring from dams fed a high-sodium diet compared with control (Figure 8).

4. Discussion

Increasing evidences have indicated that exposure to sodium overload *in utero* is a significant risk factor for the development of renal and cardiovascular alterations. [26, 27]. Various studies have demonstrated that this exposure leads to the development of hypertension [10, 11]. However, the underlying mechanism of this “fetal programming” is not completely known. This study showed still unreported evidence that exposure to maternal sodium overload during the prenatal and lactation periods produced vascular changes in the adult offspring, although no changes in blood pressure were detected.

Alterations of the blood pressure have been demonstrated in offspring exposed to maternal sodium overload. However, these are quite controversial. The blood pressure in these offspring has been shown to be enhanced [10] or unaltered [9]. Reasons for these differences are not clear. Although we did not detect increased blood pressure in offspring from dams fed a high salt diet (8% NaCl), these animals present vascular dysfunction, which was characterized by an impairment of endothelium-dependent relaxation and an endothelium-mediated increase in vasoconstriction to alpha-adrenergic stimulation. Exposure to maternal diet containing moderate sodium concentration (4% NaCl) was unable to develop of vascular changes in the adult offspring.

It is still debatable whether endothelial dysfunction is consequence of hypertension or can precede the onset of high blood pressure as a primary defect that may possibly be involved in its pathogenesis [28]. In the current study and in a previous study from our group [18], impaired endothelium-dependent vasodilation is present in normotensive rats. Similarly, Bharani *et al.* [29] have reported impaired brachial artery flow mediated dilatation amongst normotensive offspring

with parental hypertension compared to controls. Taken all together, these studies suggest that endothelial dysfunction possibly precedes hypertension and might have a role in the pathogenesis of this disease. Our results are also consistent with previous studies showing that sodium overload might affect cardiovascular function independently of changes in blood pressure [30, 31].

Studies in animals and humans have revealed that the key feature of the blood pressure-independent effect of sodium overload in endothelial function is a reduction in nitric oxide (NO) bioavailability that limits endothelium-dependent dilation. This effect is related with increased levels of reactive oxygen species (ROS), generated by NAD(P)H oxidase, xanthine oxidase or uncoupled endothelial NO synthase [32]. To investigate the participation of ROS on acetylcholine and phenylephrine responses we used the permeable superoxide dismutase mimetic tempol and measured aortic MDA. In aorta from HS, pre-treatment with tempol restored both the acetylcholine-induced relaxation and phenylephrine-induced contraction to similar levels to that in NS, indicating that ROS contribute to the endothelial dysfunction in aorta from HS, despite no changes in MDA. The reason for the levels of this oxidative stress marker have not changed in HS group is unknown. However, we can attribute this result due to the unspecific method used, considering that many other substances that occur in biological materials also react with thiobarbituric acid [33]. In order to investigate the source of ROS in aorta from HS, we analyzed the phenylephrine and acetylcholine responses in the presence of the NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin. In presence of this drug, the contractile response to phenylephrine and the acetylcholine-induced relaxation in aorta from HS group was recovered similarly to observed in presence of tempol. This implies the involvement of

NAD(P)H oxidase in ROS generation in the offspring from dams fed a high-sodium diet during pregnancy and lactation periods.

Oxidative stress has been also suggested to induce COX activity [34, 35] or upregulate COX-2 expression [36, 37]. In addition, some authors have previously demonstrated that COX-derived products induce ROS production [38, 35]. These COX-derived products, *per se* or by increasing ROS generation, contribute to the reduction in endothelium-dependent vasodilator and enhanced the vasoconstrictor responses observed in various vascular bed [18, 39, 40]. Thus we investigated the involvement of COX pathway in vascular alterations observed in HS group. Indomethacin was able to restore both acetylcholine and phenylephrine responses in aorta from HS group, indicating the involvement of COX in vascular changes observed. Owing to the importance of both oxidative stress and prostanoids in the vascular wall, the reciprocal regulation of these mediators might have a critical role in several pathologies through a harmful self-perpetuating cascade [41]. Recently, Martínez-Revelles *et al.*, [42] demonstrate that there is a crucial vicious circle between ROS and COX-2-derived prostanoids in arterial wall. Both NAD(P)H oxidase and mitochondrion-derived ROS participate in the increased COX-2 expression and activity. In addition, COX-2 derivatives modulate ROS generation by affecting NAD(P)H oxidase [39].

It is well established that angiotensin II increases vascular NAD(P)H oxidase activity and ROS production [43]. In addition, in arterial wall angiotensin II induces COX-2 expression and prostanoids production in both endothelial, smooth muscle and adventitial cells [44, 42]. Moreover, it has been reported that perinatal sodium overload leads to renin angiotensin system over-activity during adulthood [11]. Based on these observations we assessed the role of the vascular

angiotensin II-generating system in HS group, we determined the angiotensin converting enzyme activity in aortic tissue and examined the vasoconstrictor response to angiotensin II. Although the vasoconstrictor responses elicited by angiotensin II in the HS aorta were similar to those obtained in the NS group, the angiotensin I responses were significantly potentiated in the aorta of HS group, suggesting an increase in vascular formation of angiotensin II. These results are consistent with the increased ACE activity found in vascular tissue of HS group. Collectively these results suggest that angiotensin II could be involved in vascular alterations observed in the offspring from dams fed a high-sodium diet during pregnancy and lactation periods. However, additional studies are needed to further elucidate the mechanisms that trigger these salt-induced deficits in endothelial function, and to further clarify how angiotensin II may be involved in this effect.

In summary, the present study demonstrates that maternal sodium overload programmed vascular dysfunction in the offspring. These vascular changes seem to be produced by a NADPH oxidase-dependent oxidative stress and by an enhanced formation of vasoconstrictor prostanoids. These mechanisms are possibly stimulated by angiotensin II in the aortic wall, whose production is increased in the HS group.

Acknowledgements

We are grateful to José Antonio de Albuquerque for his technical assistance. Juliana Santos-Rocha was supported by a master degree fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Diego B. de Queiroz and Fernanda E. Ramos Alves was supported by a doctoral degree fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Odair A. Silva was supported by a doctoral degree fellowship from Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (Facepe). Gloria P. Duarte and Fabiano E. Xavier are recipients of research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest.

None

References

- [1] WHO (World Health Organization). Integrated Management of Cardiovascular Risk. Geneva: WHO CVD Program, 2002.
- [2] Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 2004;23:588-595.
- [3] Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ* 1995; 311:171–174.
- [4] Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002;31:1235-9.
- [5] Vidonho AF Jr, da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa LN, Campos RR, de Toledo Bergamaschi CM, Carpinelli AR, Quintão EC, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. *Pediatr Res* 2004;56:842-8.
- [6] Strazzullo P, D'Elia L, Kandala NB, Cappuccio FP. Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 2009;24:339-67.
- [7] Varagic J, Frohlich ED, Díez J, Susic D, Ahn J, González A, B López. Myocardial fibrosis, impaired coronary hemodynamics, and biventricular

dysfunction in salt-loaded SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:1503–9.

[8] Frohlich ED. The salt conundrum: a hypothesis. *J Hypertens* 2007;50:161–6.

[9] Cabral EV, Vieira-Filho LD, Silva PA, Nascimento WS, Aires RS. Perinatal Na⁺ Overload Programs Raised Renal Proximal Na⁺ Transport and Enalapril-Sensitive Alterations of Ang II Signaling Pathways during Adulthood. *Plos One* 2012;7:e43791.

[10] Contreras RJ, Wong DL, Henderson R, Curtis KS, Smith JC. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. *Physiol Behav* 2000;71:173–81.

[11] da Silva AA, de Noronha IL, de Oliveira IB, Malheiros DM, Heimann JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2009;13:133–9.

[12] Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Becker LE, Müller A, Weckbach M, Nyengaard JR, Schirmacher P, Gross-Weissmann ML. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. *Am J Physiol Renal Physiol* 2011;301:344–54.

[13] Marin ECS, Balbi APC, Francescato HDC, Alves da Silva CG, Costa RS, et al. Renal structure and function evaluation of rats from dams that received increased

sodium intake during pregnancy and lactation submitted or not to 5/6 nephrectomy. *Renal Fail* 2008;30:547–55.

[14] Cardoso HD, Cabral EV, Vieira-Filho LD, Vieyra A, Paixão AD. Fetal development and renal function in adult rats prenatally subjected to sodium overload. *Pediatr Nephrol* 2009;4:1959–65.

[15] Alves-Rodrigues PT, Veras MM, Rosa KT, de Castro I, Furukawa LN, Oliveira IB, Souza RM, Heimann JC. Salt intake during pregnancy alters offspring's myocardial structure *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011;23:1-6.

[16] Porter JP, King SH, Honeycutt AD. Prenatal high-salt diet in the Sprague–Dawley rat programs blood pressure and heart rate hyperresponsiveness to stress in adult female offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007;293:334–4.

[17] Panza JA, Quyyumi AA, Brush JEJ, Epstein SE. Abnormal endothelium dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 1990;323:22–7.

[18] Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE. Effect of age and COX-2-derived prostanoids on the progression of adult vascular dysfunction in the offspring of diabetic rats. *Br J Pharmacol* 2012;166:2198–208

- [19] Ramos-Alves FE, de Queiroz DB, Santos-Rocha J, Duarte GP, Xavier FE. Increased cyclooxygenase-2-derived prostanoids contributes to the hyperreactivity to noradrenaline in mesenteric resistance arteries from offspring of diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7:e0593
- [20] do Franco MC, Dantas AP, Akamine EH, Kawamoto EM, Fortes ZB, Scavone C, Tostes RC, Carvalho MH, Nigro D. Enhanced oxidative stress as a potential mechanism underlying the programming of hypertension in utero. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002;40:501–9.
- [21] Zhu J, Mori T, Huang T, Lombard JH. Effect of high salt diet on NO release and superoxide production in rat aorta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286: 575–83.
- [22] Lenda DM, Sauls BA, and Boegehold MA. Reactive oxygen species may contribute to reduced endothelium-dependent dilation in rats fed high salt. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 200;279:7–14.
- [23] Ohkawa H, Ohishi Í, Yagi Ê. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 1979;95:351-8.
- [24] Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25:192-205.

- [25] Friedland J, Silverstein E. A sensitive fluorimetric assay for serum angiotensin-converting enzyme. *Am J Clin Pathol* 1976;66:416-24.
- [26] Cardoso HD, Cabral EV, Vieira-Filho LD, Vieyra A, Paixão AD. Fetal development and renal function in adult rats prenatally subjected to sodium overload. *Pediatr Nephrol* 2009;24:1959–65.
- [27] Ding Y, Lv J, Mao C, Zhang H, Wang A, Zhu L, Zhu H, Xu Z. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes., *China J Hypertens* 2010;28:1290-7.
- [28] Dharmashankar K, Widlansky ME. Vascular Endothelial Function and Hypertension: Insights and Directions. *Curr Hypertens Rep* 2010;12:448–55.
- [29] Bharani A, Jain N, Jain A, Deedwania P. Endothelium-dependent vasodilation is impaired in healthy offspring of hypertensive parents. *Indian Heart J* 2011;63: 255-8.
- [30] DuPont JJ, Greaney JL, Wenner MM, Lennon-Edwards SL, Sanders PW, Farquhar WB, Edwards DG. High dietary sodium intake impairs endothelium-dependent dilation in healthy salt-resistant humans. *J Hypertens* 2013;31:530-6.
- [31] Piecha G, Koleganova N, Ritz E, Müller A, Fedorova OV, Bagrov AY, Lutz D, Schirmacher P, Gross-Weissmann ML. High salt intake causes adverse fetal

programming--vascular effects beyond blood pressure Nephrol Dial Transplant 2012;27:3464-76.

[32] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress.-Circ Res 2000;87:840-4.

[33] Moore K, Roberts LJ. Measurement of Lipid Peroxidation Free Radic Res 1998;28:659-71.

[34] Kiritoshi S, Nishikawa T, Sonoda K, Kukidome D, Senokuchi T, Matsuo T, Matsumura T, Tokunaga H, Brownlee M, Araki E. Reactive oxygen species from mitochondria induce cyclooxygenase-2 gene expression in human mesangial cells: potential role in diabetic nephro pathy. Diabetes 2003;52:2570-7.

[35] García-Redondo AB, Briones AM, Avendanõ MS, Hernanz R, Alonso MJ, Salaices M. Losartan and tempol treatments normalize the increased response to hydrogen peroxide in resistance arteries from hypertensive rats. J Hypertens 2009;27:1814–22.

[36] Feng L, Xia Y, Garcia GE, Hwang D, Wilson CB. Involvement of reactiveoxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factoralpha, and lipopolysaccharide. Clin Invest 1995;95:1669-75

[37] Wong WT, Tian XY, Chen Y, Leung FP, Liu L, Lee HK, Ng CF, Xu A, Yao X, Vanhoutte PM, Tipoe GL, Huang Y. Bone morphogenic protein-4 impairs endothelial function through oxidative stress-dependent cyclooxygenase-2 upregulation: implications on hypertension. *Circ Res* 2010;107: 984–91.

[38] Tang EH, Leung FP, Huang Y, Feletou M, So KF, Man RY, Vanhoutte PM. Calcium and reactive oxygen species increase in endothelial cells in response to releasers of endothelium derived contracting factor. *Br J Pharmacol* 2007;151:15–23.

[39] Alvarez Y, Briones AM, Balfagón G, Alonso MJ, Salaices M. Hypertension increases the participation of vasoconstrictor prostanoids from cyclooxygenase-2 in phenylephrine responses. *J Hypertens* 2005;23:767–77

[40] Adeagbo AS, Zhang X, Patel D, Joshua IG, Wang Y, Sun X, Igbo IN, Oriowo MA. Cyclo-oxygenase-2, endothelium and aortic reactivity during deoxycorticosterone acetate salt-induced hypertension. *J. Hypertens* 2005;23:1025–36.

[41] Hernanz R, Briones AM, Salaices M, Alonso MJ. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. *Clin Sci* 2014;126:111–21.

[42] Martínez-Revelles S, Avendaño MS, García-Redondo AB, Alvarez Y, Aguado A, Pérez-Girón JV, Redondo LG, Esteban V, Redondo JM, Alonso MJ, Briones

AM, Salaices M. Reciprocal Relationship Between Reactive Oxygen Species and Cyclooxygenase-2 and Vascular Dysfunction in Hypertension. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:51-65.

[43] Griending KK, Miniere CA, Ollereshaw JD and Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;74:1141–8.

[44] Álvarez Y, Pérez-Girón JV, Hernanz R, Briones AM, García- Redondo A, Beltrán A, Alonso MJ, Salaices M. Losartan reduces the increased participation of cyclooxygenase-2- derived products in vascular responses of hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;321:381–8.

Legends for figures

Figure 1. (A) Weekly monitoring of body weight, (B), systolic blood pressure (PAS), (C) diastolic blood pressure (PAD) and (D) mean arterial pressure (PAM) in offspring from dams fed a normosodic (NS), moderate (MS) or high salt diet (HS). The results are expressed as mean $\pm$ SEM. ANOVA (two-way): *P <0.05.

Figure 2. (A) Endothelium-dependent relaxation induced by acetylcholine, (B) concentration-dependent contraction to phenylephrine and (C) Concentration-response curve to sodium nitroprussiate (SNP) in aorta from offspring from dams fed a normosodic (NS) or high salt diet (HS).. Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 6-8 rats in each group.

Figure 3. Effect of tempol on the endothelium-dependent vasodilation induced by acetylcholine (A, B) and contraction phenylephrine (C, D) in aorta from offspring from dams fed a normosodic (NS) or high salt diet (HS). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 6-8 rats in each group.

Figure 4. Effect of apocinin on the endothelium-dependent vasodilation induced by acetylcholine (A, B) and contraction phenylephrine (C, D) in aorta from offspring from dams fed a normosodic (NS) or high salt diet (HS). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 6-8 rats in each group.

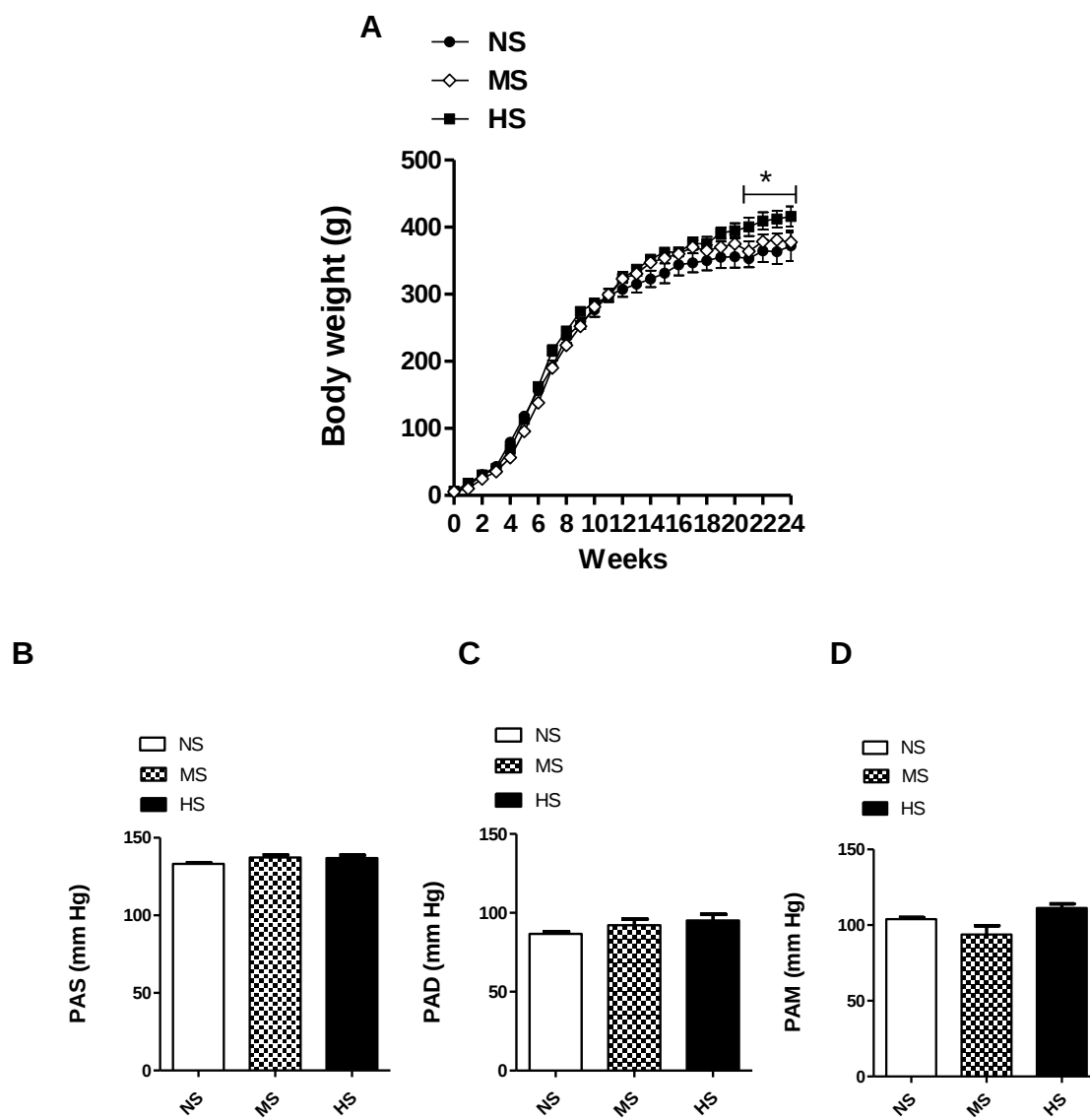
Figure 5. Effect of indomethacin on the endothelium-dependent vasodilation induced by acetylcholine (A, B) and vasoconstriction to phenylephrine (C, D) in

aorta from offspring from dams fed a normosodic (NS) or high salt diet (HS). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 6-8 rats in each group.

Figure 6. Concentration-response curve to Angiotensin I (A) and Angiotensin II (B) in endothelium-intact aorta from offspring from dams fed a normosodic (NS) or high salt diet (HS). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 6-8 rats in each group.

Figure 7. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (A) and reduced glutathione levels (B) in aorta from offspring from dams fed a normosodic (NS) or high salt diet (HS). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 6 rats in each group.

Figure 8. Angiotensin converting enzyme (ACE) activity in aorta from offspring from dams fed a normosodic (NS) or high salt diet (HS). Results are expressed as mean $\pm$ SEM. N = 6 rats in each group. t-test: *P<0.05.

**Figure 1**

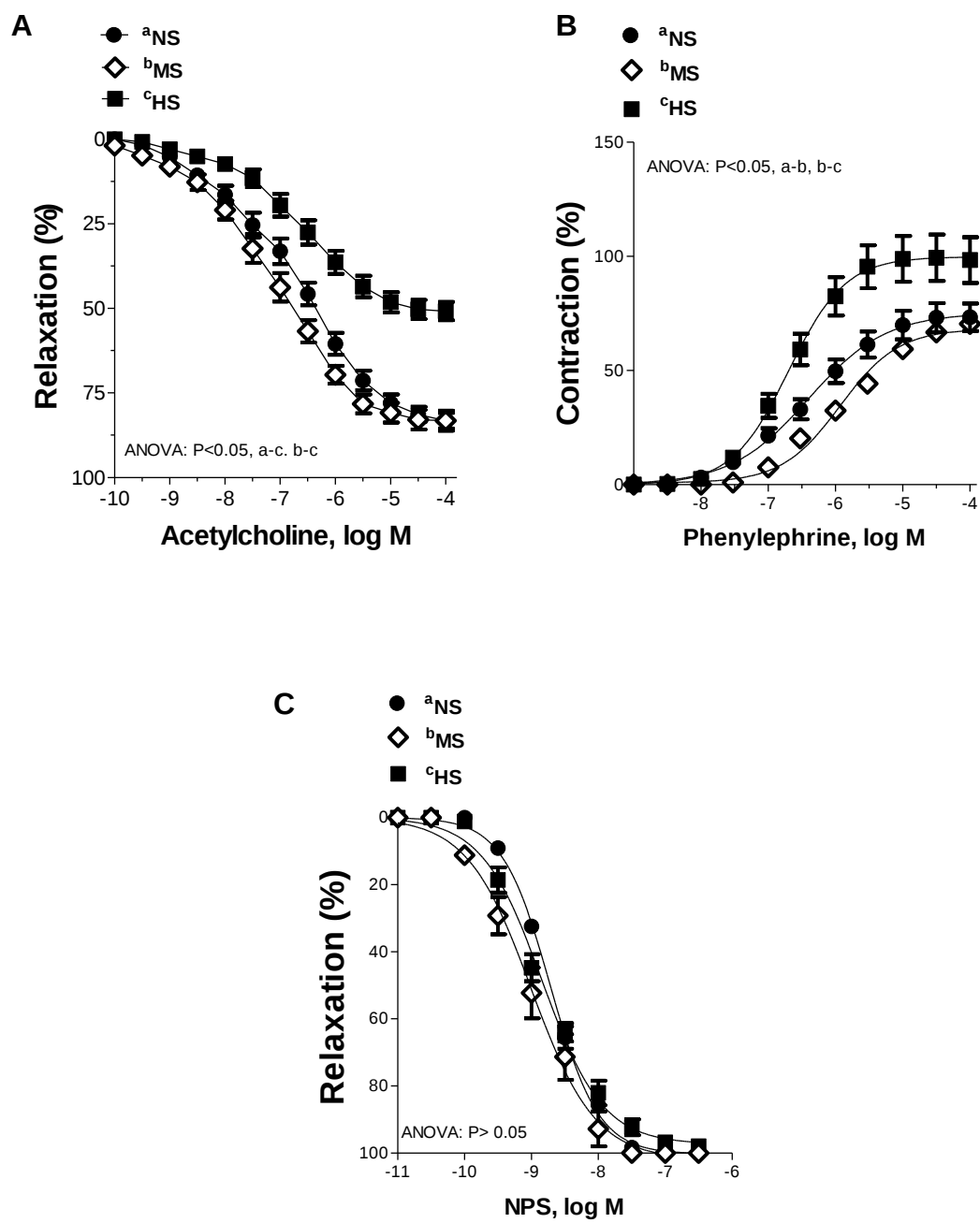


Figure 2

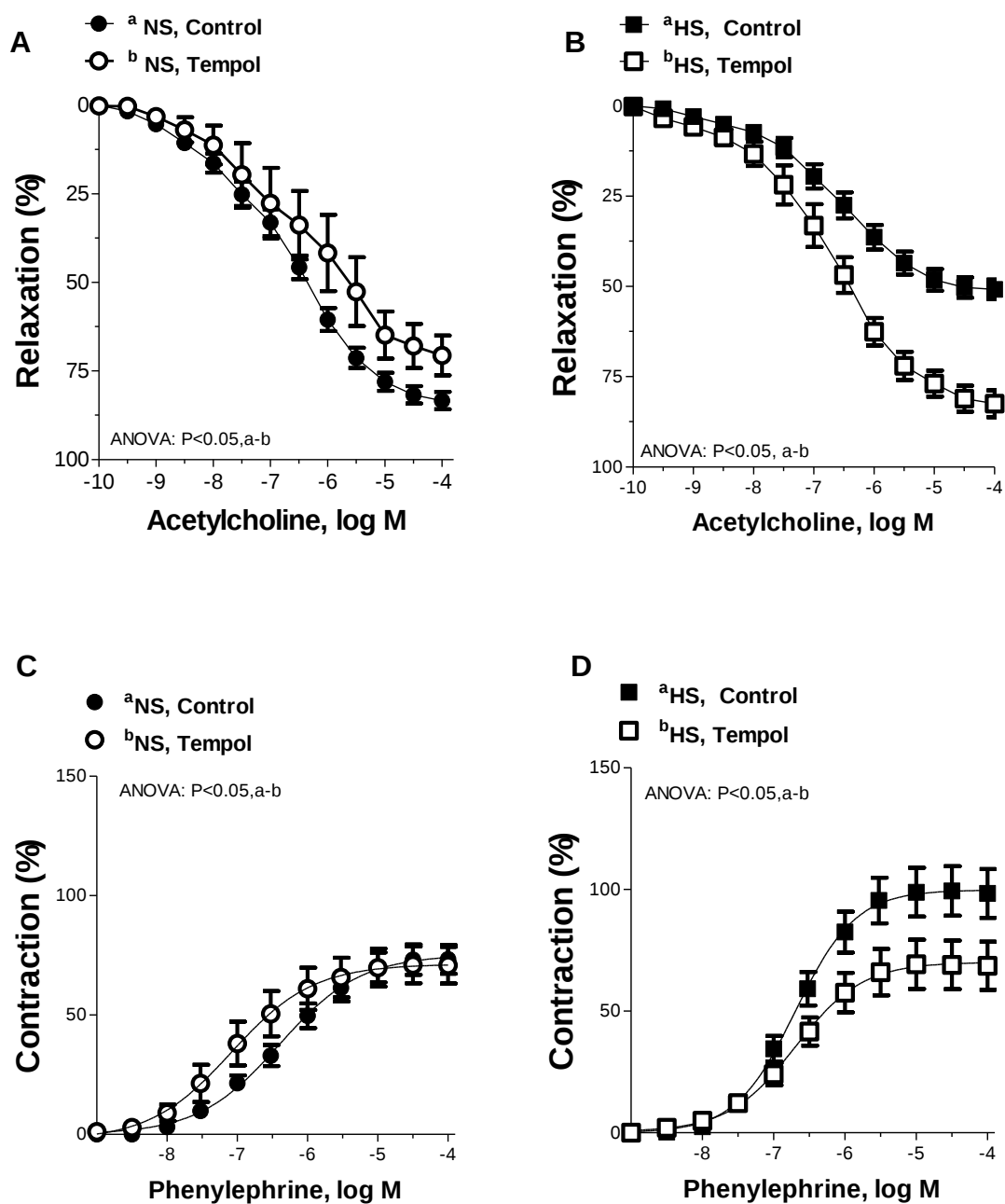


Figure 3

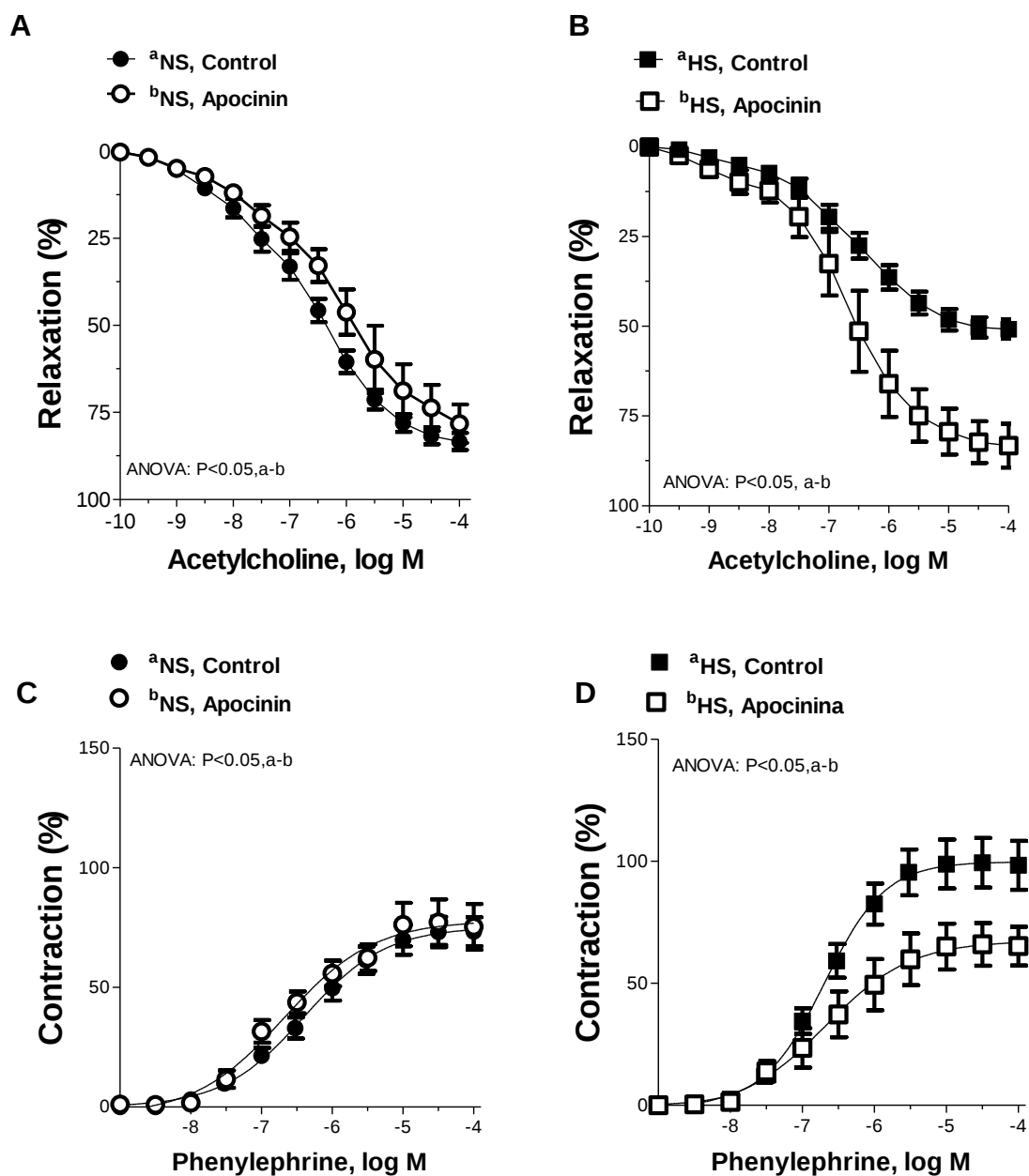


Figure 4

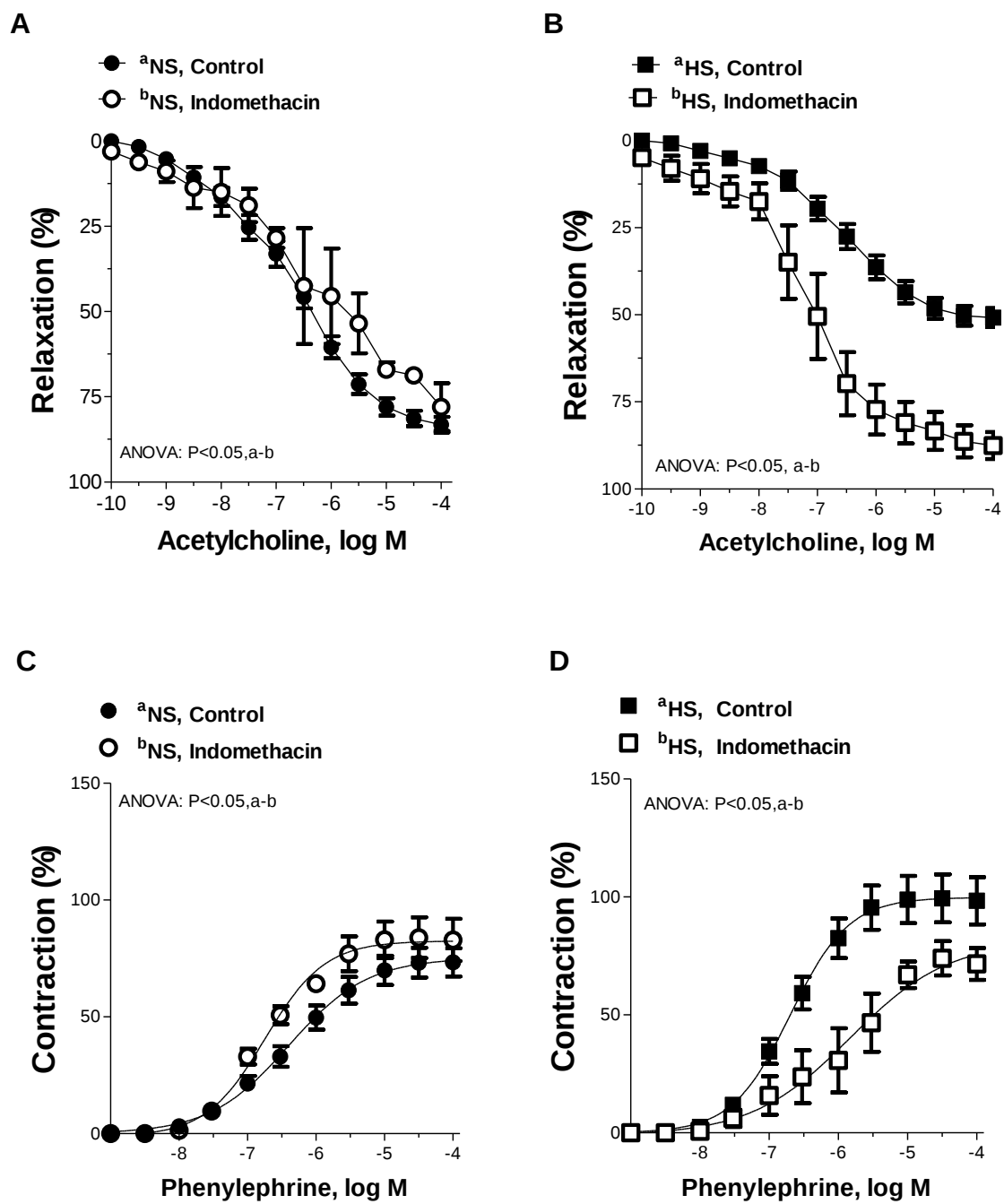


Figure 5

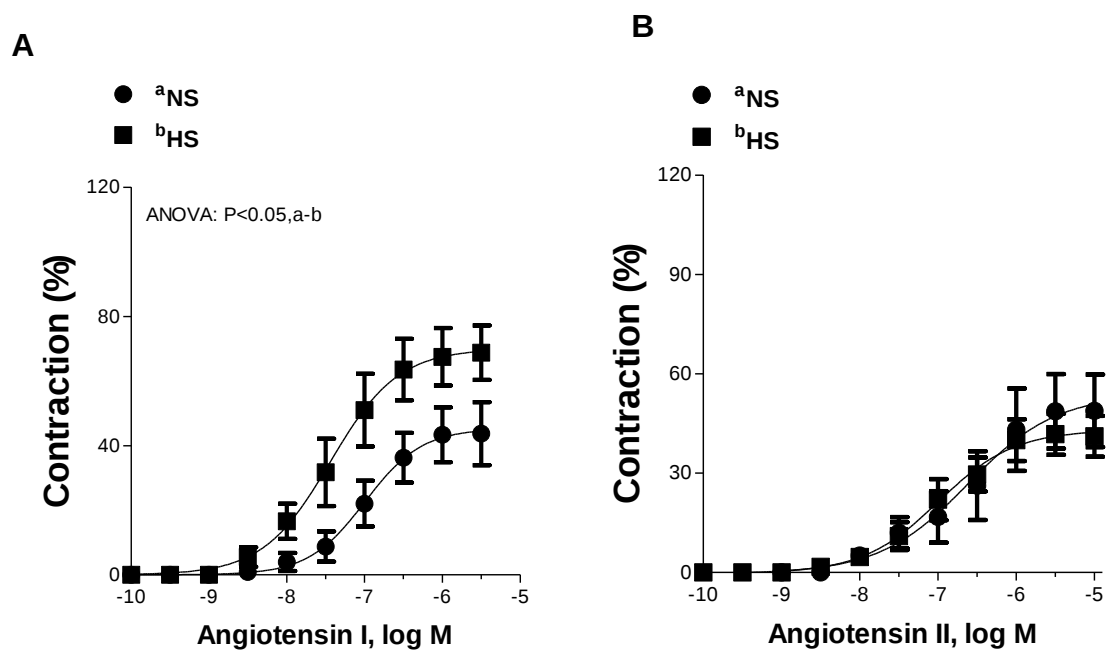


Figure 6

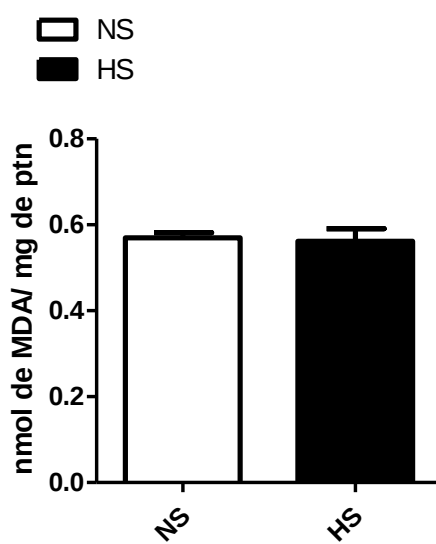


Figure 7

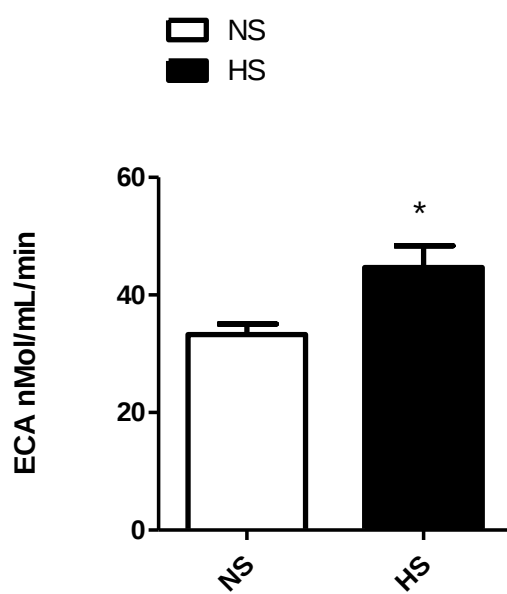


Figure 8

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente estudo demonstram que a sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação programa a disfunção vascular na prole adulta. Estas alterações vasculares parecem ser decorrentes de uma aumento da produção de espécies reativas de oxigênio através da via da NADPH-oxidase e por uma formação aumentada de prostanóides vasoconstritores derivados da ciclooxigenase. Estes mecanismos são possivelmente estimulados pela angiotensina II na parede da aorta, cuja produção é aumentada na prole exposta à sobrecarga de sódio materna.