

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

DAIANNA ROSSE MARTINS GONÇALVES

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO DIETÉTICA MATERNA OU DE ANTIOXIDANTES
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO: REPERCUSSÃO SOBRE
INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO FETAL**

RECIFE

2013

DAIANNA ROSSE MARTINS GONÇALVES

**EFEITOS DA RESTRIÇÃO DIETÉTICA MATERNA OU DE ANTIOXIDANTES
SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO: REPERCUSSÃO SOBRE
INDICADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO FETAL**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão

RECIFE

2013

Catálogo na fonte

Teresa Lucena

CRB 1419

Gonçalves, Daianna Rosse Martins

Efeitos da restrição dietética materna ou de antioxidantes sobre o estresse oxidativo placentário: repercussão sobre indicadores de estresse oxidativo no fígado fetal./ Daianna Rosse Martins Gonçalves – Recife: O Autor, 2013.

40 folhas : il., fig., tab.

**Orientadora: Ana Durce Oliveira da Paixão
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Biologia Vegetal,
2013.**

Inclui bibliografia e apêndice

**1. Desenvolvimento fetal 2. Fígado 3. Restrição dietética 4.
Estresse oxidativo. Paixão, Ana Durce Oliveira da (orientadora) II.
Título**

616.07

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-157

DAIANNA ROSSE MARTINS GONÇALVES

Efeitos da restrição dietética materna ou de antioxidantes sobre o estresse oxidativo placentário: repercussão sobre indicadores de estresse oxidativo no fígado fetal

Aprovada em 27 de fevereiro de 2013.

Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE
Orientadora

Profa. Dra. Célia Maria Machado Castro
Departamento de Medicina Tropical - UFPE
Avaliador

Prof. Dr. João Henrique Costa Silva
Universidade Federal de Pernambuco
Avaliador

Prof. Dr. Rubem Carlos Guedes
Departamento de Nutrição - UFPE
Avaliador

Prof. Dr. Fabiano Elias Xavier
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE
Suplente

Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE
Suplente

À razão da minha vida, meu filho querido Emmanuel Gonçalves Secundes e a minha grande amiga e companheira Aline Nath Michaelsen com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus por nunca ter me deixado desistir nos momentos mais difíceis...

À Profa. Dra. Ana Durce Oliveira da Paixão, pela brilhante orientação, ensinamentos e paciência.

A todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal. Em especial a Leucio Duarte Vieira-Filho, pois sem ele seria impossível o desenvolvimento deste trabalho. A Luís Paulo Nogueira, Natalie Emanuelle Ribeiro e Silva e Regina Souza Aires por todo companheirismo, amizade e ensinamentos.

A todo o quadro de funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

A todos os meus amigos, em especial a Aline Nath Michaelsen por toda força, companheirismo e amor e a Juliana Caroline do Nascimento Silve Lima por nunca me deixar desistir.

Aos meus eternos mestres Carol Virgínia Góis Leandro e Daniel Lambertz, os primeiros a despertar a sede do saber em minha vida.

Ao CNPq, pela bolsa que financiou o desenvolvimento deste trabalho.

**“O empreendimento de uma nova ação
traz uma nova força”**

Evenius

RESUMO

É sabido que existe uma correlação entre o estresse oxidativo na placenta e em alguns órgãos da prole após o nascimento, como os rins e o endotélio vascular. Neste estudo, investigamos se o estado antioxidante materno influencia os indicadores de estresse oxidativo na placenta e no fígado fetal. Ratas Wistar grávidas foram tratadas com α -tocoferol, tempol ou com restrição diária de dieta para esgotar as reservas antioxidantes. O fígado materno, a placenta e o fígado fetal foram coletados no 20º dia de prenhez, quando a gravidez foi interrompida após anestesia materna. O estresse oxidativo foi avaliado através dos níveis de malondialdeído (MDA) e da glutathiona reduzida (GSH). Os antioxidantes administrados não afetaram o peso placentário nem o peso corpóreo fetal nas mães controles. O tempol ou tempol + α -tocoferol recuperaram o peso corpóreo fetal nas mães submetidas à restrição dietética. Enquanto o α -tocoferol reduziu os níveis de malondialdeído (MDA) na placenta das ratas controle (44%, $p < 0,05$), este antioxidante ou o tempol aumentaram (136 e 340%, respectivamente, $p < 0,05$) os níveis de MDA na placenta de mães com restrição dietética, apesar de a restrição dietética *per se* ter reduzido os níveis de MDA (48%, $p < 0,05$). O tempol ou o tempol + α -tocoferol foram capazes de aumentar (20 e 49%, respectivamente, $p < 0,05$) os níveis de glutathiona reduzida (GSH) na placenta de ratas controle, no entanto, o tempol + α -tocoferol diminuíram (42%, $p < 0,05$) os níveis de GSH na placenta de mães restritas. Os níveis de MDA apresentaram-se aumentados (72%, $p < 0,05$) no fígado fetal de mães restritas tratadas com tempol, assim como, o GSH apresentou-se diminuído (32%, $p < 0,05$) no fígado fetal de mães restritas tratadas com tempol + α -tocoferol. Embora o α -tocoferol tenha diminuído a peroxidação lipídica da placenta, ele não alterou o padrão de estresse oxidativo no fígado fetal. O tempol reduziu os níveis de estresse oxidativo na placenta e no fígado fetal de mães controles, no entanto teve efeito simetricamente oposto nas mães submetidas à restrição dietética. Assim, um paralelo no padrão de estresse oxidativo entre placenta e fígado fetal foi observado apenas nas mães tratadas com tempol.

Palavras chaves: desenvolvimento fetal, restrição dietética, estresse oxidativo, tempol, α -tocoferol

ABSTRACT

There is a correlation between oxidative stress in placenta and in some organs of offspring after birth, as kidneys and vascular endothelium. It was investigated whether maternal antioxidant status influences makers of the oxidative stress in the placenta and in fetal liver. Pregnant Wistar dams were treated with α -tocopherol, tempol or daily diet intake restriction to deplete antioxidant reservoir. Maternal liver, placenta and fetal liver were withdrawn at the 20th pregnancy day, when the pregnancy was interrupted in anesthetized dams. Oxidative stress was evaluated by the levels of malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH). The antioxidants did not affect placental or fetal body weight in control rats. Tempol or tempol + α -tocopherol recovered fetal body weight of dietary restricted fetuses. While α -tocopherol reduced malonyldialdehyde (MDA) in placenta of control rats, α -tocopherol or tempol increased MDA levels in the placenta of dietary restricted dams, in spite of the dietary restriction *per se* had reduced the levels of MDA. Tempol or tempol + α -tocopherol were capable to increase the levels of reduced glutathione (GSH) in the placenta of control rats, but tempol + α -tocopherol reduced the levels of GSH in the placenta of dietary restricted mothers. MDA was increased in the fetal liver of restricted dams treated with tempol, as well as, GSH was diminished in the fetal liver of restricted dams treated with tempol + α -tocopherol. Although α -tocopherol had diminished placental lipid peroxidation, it did not change fetal liver oxidative pattern. Tempol reduced placental and fetal liver oxidative stress in control dams, but it had a symmetrically contrary effect in dietary restricted dams. Thus, a parallel in pattern of oxidative stress between placenta and fetal liver was seen only in dams treated with tempol.

Keywords: fetal development, dietary restriction, oxidative stress, tempol, α -tocopherol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 PROGRAMAÇÃO INTRAUTERINA DE DOENÇAS NA IDADE ADULTA	10
1.2 INDICADORES DO DESENVOLVIMENTO FETAL: PESO PLACENTÁRIO E FETAL	12
1.3 ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO E DESENVOLVIMENTO FETAL	13
1.4 AGENTES ANTIOXIDANTES	15
2 JUSTIFICATIVA	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 GERAL	18
3.2 ESPECÍFICOS	18
4 REFERÊNCIAS	19
5 RESULTADOS	26
5.1 ARTIGO: ASSOCIATION BETWEEN MATERNAL ANTIOXIDANT STATUS AND FETAL LIVER OXIDATIVE STRESS IN RATS	26
6 CONCLUSÃO	40

1 INTRODUÇÃO

1.1 PROGRAMAÇÃO INTRAUTERINA DE DOENÇAS NA IDADE ADULTA

Perturbações na alimentação materna durante a gravidez podem programar modificações estruturais e fisiológicas permanentes no desenvolvimento fetal (BARKER *et al.*, 1995., ROBINSON *et al.*, 1999; SYMONDS *et al.*, 2001). Embora estas adaptações ocorram para sustentar o desenvolvimento fetal no útero, na vida extra-uterina, estudiosos no assunto comprovam que essas alterações repercutem de forma importante em implicações patológicas na vida adulta (BARKER & CLARK *et al.*, 1997; MCMILLEN *et al.*, 2001).

O processo pelo qual insultos precoces em estágios críticos do desenvolvimento levam a mudanças permanentes na estrutura do tecido e sua função é conhecida como programação intrauterina (LUCAS *et al.*, 1991). Esta síndrome é bem demonstrada experimentalmente em um vasto número de espécies, utilizando uma variedade de técnicas para comprometer o ambiente intrauterino e alterar desenvolvimento fetal (MCMILLEN *et al.*, 2005). A indução de retardo do crescimento intrauterino pelo estresse materno, administração de glicocorticóides, hipóxia, manipulação dietética e insuficiência placentária levam a anormalidades no metabolismo e doenças cardiovasculares em ratos, ovelhas, porcos, cavalos e primatas (FOWDEN *et al.*, 2005; MCMILLEN *et al.*, 2005). Estudos em animais também demonstraram que o tempo, duração, e natureza exata do insulto durante a gravidez são importantes para determinar um padrão de crescimento intrauterino que resulta em respostas fisiológicas específicas (BERTRAM *et al.*, 2005). Estas investigações mostram que uma grande variedade de tecidos e sistemas, podem ser programados *in útero* com consequências adversas.

Perturbações ambientais também estão diretamente conectadas com a programação em várias fases do desenvolvimento. Durante o período de pré-implantação, nutrientes, O₂, e níveis hormonais afetam o desenvolvimento do ovócito e blastocisto, com consequências para a distribuição de células entre o trofoblasto e a massa celular interna. A ocorrência de alterações antes da implantação é susceptível de afetar muitas linhagens de células, embora as mesmas sofram adaptações que favorecem a gestação, tal como supra-regulação de

nutrientes da placenta e transporte de O₂, poderão compensar os defeitos iniciais e não afetar o peso ao nascer.

Uma vez que se inicia o crescimento placentário, os efeitos da programação de sinais ambientais podem ser mediados através de mudanças no desenvolvimento da mesma (GODFREY *et al.*, 2002). Durante a organogênese, as perturbações ambientais podem discretamente causar defeitos estruturais que reduzem permanentemente a capacidade funcional de órgãos. Se as alterações ocorrem durante a gametogênese, o potencial reprodutivo da próxima geração pode ser prejudicado (RHIND *et al.*, 2001). Durante a fase de crescimento fetal rápido, redução no fornecimento, absorção e utilização de nutrientes influenciam o crescimento do tecido e podem mudar o ciclo de proliferação e diferenciação celular com inúmeras consequências para o número total de células (FOWDEN *et al.*, 1998; HARDING *et al.*, 1995).

Tendo em vista que os órgãos se desenvolvem em momentos diferentes, o momento em que ocorrem as alterações no ambiente materno é importante na determinação da especificidade dos efeitos programados. No final da gestação, há um período crítico de maturação fetal, durante o qual, muitos tecidos são submetidos a mudanças na preparação para a vida extra-uterina (FOWDEN *et al.*, 1998).

Embora a sequência de mudanças no desenvolvimento seja muito semelhante em todas as espécies de mamíferos, há diferenças no seu momento preciso entre os animais. Em espécies altriciais, ou seja, animais que são imaturos ao nascimento, por exemplo, ratos e coelhos, vários dos sistemas fisiológicos conhecidos por serem programados no útero continuam se desenvolvendo após o nascimento. O período de desenvolvimento da plasticidade celular, portanto, estende-se após o nascimento, nestas espécies, em contraste com as espécies precoces, por exemplo, humanos, ovelhas, porcos, as quais são fisiologicamente mais adiantadas no seu desenvolvimento no nascimento (FOWDEN *et al.*, 1998).

A nefrogênese, por exemplo, no rato começa no 12º dia pós-concepção e termina em torno do 10º dia de vida pós-natal (TUFRO-MCREDDIE *et al.*, 1995). Já na espécie humana, ela começa na quarta semana pós-concepção e termina em torno da 28ª para 36ª semana (ver revisão LUYCKX & BRENNER, 2010). Assim, em ratos a nefrogênese pode ser afetada ainda na vida pós-natal, enquanto na espécie humana não, exceto quanto se trata de nascimentos prematuros (LUYCKY *et al.*, 2010; SUTHERLAND *et al.*, 2011).

Tendo em vista que a placenta é responsável pelo suprimento adequado de oxigênio e nutrientes para o feto, é através dela que também se processa a programação intrauterina. Diminuição do fluxo sanguíneo uteroplacentário quer seja por diminuição do débito cardíaco, quer seja por vasoconstrição comprometem a nutrição fetal (ROSSO *et al.*, 1980; AHOKAS *et al.*, 1983). O estresse oxidativo aumentado na placenta pode induzir vasoconstrição, em parte porque diminui a biodisponibilidade de óxido nítrico (KAY *et al.*, 2000). Adicionalmente, o estresse oxidativo aumentado, *per se*, pode comprometer o desenvolvimento fetal, em parte através de mecanismos epigenéticos (DRAKE *et al.*, 2012). Existem evidências de que a desnutrição materna, induzida por uma dieta multideficiente e rica em carboidratos, a dieta básica regional, padronizada pelo Departamento de Nutrição da UFPE (TEODOSIO *et al.*, 1990), aumenta o estresse oxidativo na placenta, bem como no fígado fetal (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2009). Assim como há evidências de que 35% de restrição dietética induzem alterações epigenéticas que levam à disfunção endotelial pulmonar em camundongos (REXHAIJ *et al.*, 2011).

1.2 INDICADORES DO DESENVOLVIMENTO FETAL: PESO PLACENTÁRIO E FETAL

De acordo com REGNAULT (2002) e CROSS (2006), uma gestação saudável dependerá de eventos adequados e coordenados entre o organismo da mãe e o conceito, resultando numa invasão trofoblástica e placentação adequada. Sendo, portanto a formação desta estrutura, a placenta, um processo dinâmico e fundamental para a manutenção e desenvolvimento embrionário/fetal, e assim destacando o papel crucial do desenvolvimento placentário ligado diretamente ao desenvolvimento fetal (MELLOR *et al.*, 1983; KELLY *et al.*, 1992; FOWDEN *et al.*, 2006; MYATT *et al.*, 2006; JANSSEN *et al.*, 2007). Pois a placenta forma a interface entre a circulação materno-fetal e, como tal, é essencial para a nutrição e oxigenação fetal.

O fornecimento de nutrientes da placenta para o feto depende do seu tamanho, morfologia e fluxo sanguíneo. O peso placentário, assim como o peso fetal, também é um indicador de desenvolvimento fetal. (CAMPBELL *et al.*, 1996; MARTYN *et al.*, 1995; RUTLAND *et al.*, 2007). O tamanho da placenta, sua morfologia e eficiência no transporte nutricional possuem uma importante influência

sobre a função metabólica e endócrina fetal, como a manutenção dos níveis normais de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1(IGF-1) (OWENS *et al.*, 1989) o qual desempenha um importante papel no suprimento de nutrientes referentes ao desenvolvimento fetal (GLUCKMAN *et al.*, 1995; COAN *et al.*, 2008).

Durante a gravidez normal, a placenta passa por uma série de alterações fisiológicas, regulados por fatores angiogênicos e hormonais. O estabelecimento e funcionamento placentário dependem também de uma vascularização adequada. Onde a vasculogênese, processo de formação de novo de vasos sanguíneos a partir de células precursoras do mesoderma, e angiogênese, que é a criação de novos vasos para um suprimento de sangue pré-existente são de extrema importância no momento da placentação. Ambos são essenciais para a troca materno-fetal. Esses processos são controlados por diversas moléculas, destacando-se, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e angiopoietina que são proteínas fundamentais para o desenvolvimento placentário (CHARNOCK-JONES *et al.*, 2004; FERRARA *et al.*, 2004). Alguns estudos mostram que redução da expressão do receptor de VEGF em placentas indica uma deficiência na transferência de nutrientes materno-fetal (REDMER *et al.*, 2004).

1.3 ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO E DESENVOLVIMENTO FETAL

Durante o desenvolvimento placentário, deficiência na invasão trofoblástica implica em oxigenação inadequada do espaço interviloso na fase inicial da gravidez e na persistência das características primárias das artérias uterinas espiraladas, que mantêm sua elevada resistência. Nesse caso, o sangue banha as vilosidades coriônicas na forma de “jatos intermitentes” e de alta pressão. Assim, o fluxo sanguíneo útero-placentário simula o que acontece em casos de lesão por isquemia-reperfusão (I/R) (BURTON *et al.*, 2009; CINDROVA-DAVIES *et al.*, 2009). Entre outras alterações, esse tipo de injúria é marcado pela produção exacerbada espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês reactive oxygen species) e de espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês reactive nitrogen species), sempre que as moléculas de oxigênio são reintroduzidas no tecido após o momento isquêmico. Tanto as ROS quanto as RNS constituem moléculas de radicais livres geradas principalmente na mitocôndria celular, e no conjunto são chamados de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo se eleva quando o balanço entre a produção de radicais livres e a produção de fatores anti-oxidantes é prejudicado. Radicais livres de oxigênio induzem a peroxidação lipídica que levam a danos celulares. O malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos da peroxidação lipídica. Os peróxidos lipídicos inibem a síntese de prostaciclina e aumentam a agregação das plaquetas. A peroxidação de lipídios por ROS/RNS pode ser dividida em três etapas, início, progressão e término. O MDA e o 4-hidroxinonenal, um outro produto da peroxidação lipídica, inativam fosfolipídios, proteínas e DNA e promovem ligações cruzadas entre estas moléculas (LOUREIRO et al., 2002). As enzimas anti-oxidantes, glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), podem prevenir a peroxidação lipídica. Quando os mecanismos anti-oxidantes são esgotados, as membranas celulares são irreversivelmente danificadas (KAROWICZ-BILINSKA et al., 2002).

De acordo com CHO (1981) e STRUBELT (1981), a restrição alimentar está associada com uma depleção marcante nos sistemas antioxidantes no tecido hepático. A desnutrição materna durante a gravidez induz na prole disfunção endotelial, caracterizada por aumento da atividade da NADPH oxidase (FRANCO et al., 2003).

O estresse oxidativo que é associado com o ambiente intrauterino desfavorável pode exacerbar o efeito da desnutrição sobre o crescimento fetal. Além de afetar o crescimento, o estresse oxidativo placentário promove efeitos persistentes e irreversíveis na organogênese fetal (FRANCO et al., 2004; AHN et al., 2007; DENNERY et al., 2007). O estresse oxidativo pode levar à produção placentária de grande quantidade de fatores antiangiogênicos, como o receptor solúvel de VEGF, o sFlt-1 (soluble fms-like tyrosin). O sFlt-1 é um receptor solúvel que se forma por uma truncagem da porção transmembrana do Flt-1. Dessa forma, o sFlt-1 se liga às moléculas de VEGF e PlGF circulantes e impede que esses fatores angiogênicos se liguem aos seus receptores comuns na membrana celular (WANG et al., 2009).

A nefrogênese é afetada pelo estresse oxidativo induzido pela desnutrição materna. O número de néfrons, e, por conseguinte, a área de filtração glomerular, são diminuídos (VIEIRA-FILHO et al., 2011). Estes fatores contribuem com a hipertensão induzida pela desnutrição materna (MYRIE et al., 2011; VAN ABELEN et al., 2012).

1.4 AGENTES ANTIOXIDANTES

A vitamina E é um termo genérico que se refere aos tocoferóis e tocotrienóis (α , β , δ , γ tocoferol e α , β , δ , γ tocotrienol). Todos estes compostos consistem de um núcleo cromanol com uma cadeia alifática lateral. Há 60 anos estuda-se as propriedades da vitamina E contra doenças cardiovasculares, o que se atribui à sua capacidade antioxidante. O potencial antioxidante dos tocoferóis em meio biológico é diferente, sendo $\alpha \gg \gamma > \delta > \beta$ (MUNTEANU et al., 2004). Estudos in vitro demonstraram a capacidade superior do α -tocoferol de prevenir a peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), principais responsáveis pelo transporte de ácidos graxos e colesterol do fígado para os tecidos periféricos (THOMAS et al., 2000).

Por outro lado, o tempol, um mimético da SOD, é visto como um potente nitróxido que atua na proteção de células e tecidos contra a ação exacerbada de ROS (KRISHNA et al., 1998; LI et al., 2006). HIGASHI (2002) vem elucidando o efeito renovascular e sobre a restauração de níveis plasmáticos de produtos da peroxidação lipídica do tempol. Muitos estudos têm mostrado o efeito direto do tempol na diminuição dos níveis de ROS nos tecidos. (BESWICK et al, 2001; DOBRIAN et al, 2001; PARK et al, 2002).

O tratamento materno com α -tocoferol, durante a amamentação, previne alterações moleculares no rim de ratos submetidos à desnutrição intrauterina (referência). Quando administrado durante a gravidez, ou seja, em paralelo com a desnutrição, o α -tocoferol previne a oligonefrenia (VIEIRA-FILHO et al., 2011). Alguns modelos experimentais in vitro e in vivo ressaltam a importância da vitamina E na regulação da expressão do VEGF (ZHANG et al., 2004; DAGHINI et al., 2007). De acordo com RODRIGUEZ (2005), a vitamina E promove angiogênese placentária através da diminuição de radicais livres. Por outro lado, estudos in vitro ressaltam a capacidade do α -tocoferol de prevenir a peroxidação lipídica de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as quais são responsáveis pelo transporte de ácidos graxos e colesterol do fígado para os tecidos periféricos (THOMAS et al., 2000), o que melhoraria a nutrição fetal.

2 JUSTIFICATIVA

Com base nas evidências apresentadas, a desnutrição materna eleva o estresse oxidativo placentário e na prole adulta, órgãos como os rins e o endotélio vascular apresentam estresse oxidativo aumentado. Neste trabalho propomos investigar se o estresse oxidativo do fígado fetal tem correlação com os marcadores de estresse oxidativo no fígado materno e na placenta

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Investigar o efeito da restrição dietética materna ou de antioxidantes sobre o estresse oxidativo placentário, bem como sobre indicadores de estresse oxidativo no fígado materno e fetal.

3.2 ESPECÍFICOS

- Mensurar, na placenta de ratas grávidas mantidas com 50% de restrição dietética ou com α -tocoferol e tempol, os seguintes parâmetros: níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), níveis de glutathione reduzida (GSH);
- Mensurar, no fígado materno e fetal, os níveis de TBARS e GSH.

4 REFERÊNCIAS

- AHN Y. M, KIM Y. J, PARK H, PARK B, LEE H. Prenatal vitamin C status is associated with placental apoptosis in normal-term human pregnancies. **Placenta**. v. 28, p. 31–38, 2007.
- AHOKAS R. A, ANDERSON G. D, LIPSHITZ J .Effect of dietary restriction, during the last week only or throughout gestation, on cardiac output and uteroplacental blood flow in pregnant rats. **J. Nutr.** v.113, p.1766–1776. 1983
- BARKER D. J. P. Mothers, babies and disease in later life. London. **B. M. J Publishing Group**. p. 14-36.1994.
- BARKER D. J. P. Fetal origins of coronary heart disease. **B. M. J.** v. 311, p. 171–174,1995.
- BARKER D. J. P, CLARK P M. Fetal undernutrition and disease in later life. **Rev. Reprod.** v. 2, p. 105–112. 1997.
- BERTRAM C. E. AND HANSON M. A. Annual models and programming of metabolic syndrome. **Br. Med. Bull.** v. 60, p. 103–12, 2005.
- BESWICK R. A, ZHANG H, MARABLE D, CATRAVAS J. D, HILL WD, and Webb RC Long-term antioxidant administration attenuates mineralocorticoid hypertension and renal inflammatory response. **Hypertension**. v. 37, p. 781–786. 2001.
- BURTON G. J, CHARNOCK-JONES D. S, JAUNIAUX E. Regulation of vascular 24.growth and function in the human placenta. **Reproduction**. v. 138, p. 895-902. 2009.
- CAMPBELL D. M, HALL M. H, BARKER D. J. P, CROSS J, SHIELL AW & GODFREY K. M. Diet in pregnancy and the offspring's blood pressure 40 years later. **Br. J. Obstet. Gynaecol.** v. 103, p. 273-280, 1996.
- CLARKE L, HEASMAN L, JUNIPER D. T & SYMONDS M. E .Maternal nutrition in early-mid gestation and placental size in sheep. **Br. J. Nutr.** v. 79, p. 359–364, 1998.

CHARNOCK-JONES D. S, KAUFMANN P, MAYHEW T. M. Aspects of human fetoplacentalvasculogenesis and angiogenesis, I: molecular regulation. **Placenta**. v. 25, p. 103–113, 2004.

CHEN Y, PEARLMAN A, LUO Z, AND WILCOX C. S Hydrogen peroxide mediates a transient vasorelaxation with tempol during oxidative stress. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** v. 293, p. H2085–H2092, 2007b.

CHO, E. S., SAHYOUN, N. & STEGINK, L. D. Tissue glutathione as a cysteine reservoir during fasting and refeeding of rats. **J. Nutr.** v.111, p. 914–922, 1981.

CINDROVA-DAVIES T. GABOR THAN AWARD Lecture 2008: pre-eclampsia 25. – from placental oxidative stress to maternal endothelial dysfunction. **Placenta**. v. 30, p. A:S55-65, 2009.

COAN P. M, FOWDEN A. L, CONSTANCIA M, FERGUSON SMITH A. C, BURTON G. J & SIBLEY C. P .Disproportional effects of *Igf2* knockout on placental morphology and diffusional exchange characteristics in the mouse. **J. Physiol.** v. 586, p. 5023–5032, 2008b.

CROSS, J. C. Placental function in development and disease. **Reprod. Fertil. Dev.** v. 18, p. 71-6, 2006.

DAGHINI, E., ZHU, X. Y., VERSARI, D., BENTLEY, M. D., NAPOLI, C., LERMAN, A., AND LERMAN, L. O. Antioxidant vitamins induce angiogenesis in the normal pig kidney. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.** v. 293, p. F371–F381, 2007.

DENNERY P. A. Effects of oxidative stress on embryonic development. Birth Defects Research Part C: **Embryo. Today**. v. 81, p. 155–162, 2007.

DOBRIAN A. D, SCHRIVER S. D, AND PREWITT R. L .Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. **Hypertension**. v. 38, p. 361–366, 2001.

DRAKE A. J, MCPHERSON R. C, GODFREY K. M; COOPER C, LILLYCROP K.A, HANSON M. A, MEEHAN R. R, SECKL J. R, REYNOLDS R. M. An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and foetal growth. **Clin. Endocrinol.** v. 77, n. 6, p. 808-15, 2012.

FRANCO, M. C. P; DANTAS, A. P. V; AKAMINE, E. H; KAWAMOTO, E. M; FORTES, Z B; SCAVONE, C; TOSTES, R C A; CARVALHO, M H C; NIGRO, D. Enhanced Oxidative Stress As a Potential Mechanism Underlying the Programming of Hypertension *In Utero*. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v. 40, n. 4, p. 501–509, 2002.

FRANCO M. C, AKAMINE E. H, D I MARCO G. S, CASARINI D. E, FORTES Z. B, TOSTES R. C, CARVALHO M. H, NIGRO D. NADPH oxidase and enhanced superoxide generation in intrauterine undernourished rats: involvement of the renin–angiotensin system. **Cardiovasc. Res.** v. 59, p. 767–775, 2003.

FRANCO M. C, FORTES Z B, AKAMINE E. H, KAWAMOTO E. M, DE BRITTO L. R, MUSCARA M. N, TEIXEIRA S. A, TOSTES R. C, CARVALHO M. H, NIGRO D. Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in micro vessels of intrauterine undernourished rats. **J. Physiol.** v. 558, p. 239–248, 2004.

FRANCO, M. C. P; AKAMINE, E. H; REBOUÇAS, N; CARVALHO, M. H. C; TOSTES, R. C. A; NIGRO, D; FORTES, Z. B. Long-term effects of intrauterine malnutrition on vascular function in female offspring: Implications of oxidative stress. **Life Sci.** v. 80, p. 709–715, 2007.

FERRARA N, LECOUTER J, LIN R, PEALE F. EG-VEGF and Bv8: a novel family of tissue-restricted angiogenic factors. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1654, p. 69–78, 2004.

FOWDEN A. L, GIUSSANI DA, AND FORHEAD A. J. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. **Early. Hum. Dev.** v. 81, p. 723, 2005.

FOWDEN A. L, LI J, AND FORHEAD A. J. Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance. **Proc. Nutr. Soc.** v. 57, p. 113–122, 1998.

FOWDEN AL, GIUSSANI DA, FORHEAD AJ. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. **Physiology.** v. 21, p. 29–37, 2006.

FOWDEN A. L, FORHEAD A. J, COAN P. M, BURTON G. J. The placenta and intrauterine programming. **J. Neuroendocrinol.** v. 20, p. 439–450, 2008.

GEORGE E. M, COCKRELL K, ADAIR T. H, GRANGER J. P. Regulation of sFlt-1 and VEGF secretion by adenosine under hypoxic conditions in rat placental villous

explants. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 299, n. 6, p. R1629-33, 2010.

GODFREY K. M. The role of the placenta in fetal programming—a review. **Placenta.** v. 23, p. S20–S27, 2002.

GLUCKMAN P. AND HANSON M. *The Fetal Matrix: Evolution*, **Dev. Dis.** v. 98, n. 8, p. 130-131, 2005.

HARDING J.E AND JOHNSON B. Nutrition and fetal growth. **Reprod. Fertil. Dev.** v.7, p. 538–547, 1995.

HIGASHI Y, SASAKI S, NAKAGAWA K, MATSUURA H, OSHIMA T, AND CHAYAMA K. Endothelial function and oxidative stress in renovascular hypertension. **N. Engl. J. Med.** v. 346, p. 1954–1962, 2002.

JANSSON T, POWELL T. L. Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. **Clin. Sci.** v. 113, p. 1–13, 2007.

KAY, H. H.; GRINDLE, K. M; MAGNESS, R. R. Ethanol exposure induces oxidative stress and impairs nitric oxide availability in the human placental villi: a possible mechanism of toxicity. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 182, p. 682-688, 2000.

KAROWICZ-BILINSKA A, SUZIN J, SIEROSZEWSKI P: Evaluation of oxidative stress indices during treatment in pregnant women with intrauterine growth retardation. **Med. Sci. Monit.** v. 83, p. CR211–CR216, 2002.

KASIMANICKAM R. K, KASIMANICKAM V. R, RODRIGUEZ J. S, PELZER K D, SPONENBERG P. D, THATCHER C. D. Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. **Reprod. Biol. Endocrinol.** v. 12, n. 8, p. 86, 2010.

KELLY R. W. Nutrition and placental development. **Proc. Nutr. Soc. Aust.** v.17, p. 203– 211, 1992.

KRISHNA M. C, DEGRAFF W, HANKOVSKY O, SÁR CP, KÁLAI T, JEKO J, RUSSO A, and Mitchell JB .Studies of structure-activity relationship of nitroxide free radicals and their precursors as modifiers against oxidative damage. **J. Med. Chem.** v. 41, p. 3477–3492, 1998.

LI W. G, ZHANG X. Y, WU Y. J, GAO M. T, AND ZHENG R. L .The relationship between structure and antioxidative activity of piperidinenitroxides. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 58, p. 941–949, 2006.

LOUREIRO, A. P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G.; **Quim. Nova.** v. 25, p. 777, 2002.

LOWRY O. H; ROSEBROUGH N. J.; FARR A. L.; RANDALL R. J.; J. Protein Measurement with Folin Phenol Reagent. **Biol. Chem.** v. 193, p. 265–275, 1951.

LUCAS A. Programming by early nutrition in man. **Ciba Found. Symp.** v.156, p.38–50, 1991.

LUYCKX V. A, BRENNER B. M. The clinical importance of nephron mass. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 21, n.6, p. 898-910, 2010.

MARSAL K. Intrauterine growth restriction. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.** v. 14, p. 127–135, 2002.

MARTYN C. N, BARKER D. J, JESPERSEN S, GREENWALD S, OSMOND C & BERRY C .Growth in utero, adult blood pressure, and arterial compliance. **Br. Heart** v. 73, n. 2, p. 116-21, 1995.

MCMILLEN I. C, ADAMS M. B, ROSS J. T, COULTER C. L, SIMONETTA G, OWENS J. A, ROBINSON J. S & EDWARDS L. J. Fetal growth restriction: adaptations and consequences. **Reproduction.** v. 122, p. 195–204, 2001.

MCMILLEN I AND ROBINSON J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiol.** v. 85, p. 571–633, 2005.

MELLOR D. J. Nutritional and placental determinants of fetal growth rate in sheep and consequences for the newborn lambs. **Br. Vet. J.** v. 139, p. 307–310, 1983.

MYATT L. Placental adaptive responses and fetal programming. **J. Physiol.** v. 572, p. 25–30, 2006.

MYRIE S. B.; MCKNIGHT L. L.; VAN VLIET B. N.; BERTOLO R. F.; Low birth weight is associated with reduced nephron number and increased blood pressure in

adulthood in a novel spontaneous intrauterine growth-restricted model in Yucatan miniature Swine. **Neonatology**. v. 100, n. 4, p. 380-6, 2011.

MUNTEANU, A.; ZINGG, J. M.; AZZI, A. Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality? **J. Cell. Mol.** v. 8, p. 59, 2004.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric Acid reaction. **Anal. Biochem.** v. 95, p. 351-358, 1979.

OWENS J. A, OWENS P. C & ROBINSON J. S. Experimental growth retardation: metabolic and endocrine aspects. In Experimental Fetal Growth Retardation. **Ithaca: Per. Press.** p. 263-286, 1989.

PATEL K, CHEN Y, DENNEHY K, BLAU J, CONNORS S, MENDONCA M, TARPEY M, KRISHNA M, MITCHELL J. B, WELCH W. J, et al. Acute antihypertensive action of nitroxides in the spontaneously hypertensive rat. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 290, p. R37–R43, 2006.

PARK J. B, TOUYZ R. M, CHEN X, AND SCHIFFRIN E. L .Chronic treatment with a superoxide dismutase mimetic prevents vascular remodeling and progression of hypertension in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Am. J. Hypertens.** v. 15, p. 78–84, 2002.

REDMAN C. W, SACKS G. P, SARGENT I. L. Preeclampsia: an excessive 26. maternal inflammatory response to pregnancy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v.180, p. 499-506, 1999.

REDMER D.A, WALLACE J. M, REYNOLDS L. P. Effect of nutrient intake during pregnancy on fetal and placental growth and vascular development. **Domest. Anim. Endocrinol.** v. 27, p. 199–217, 2004.

REGNULT T. R. H, GALAN H. L, PARKER T. A, ANTHONY R. V., Placental development in normal compromised pregnancies- a review. **Placenta**. v. 23, p. 119-29, 2002.

REXHAJ E, Bloch J, Jayet PY, Rimoldi S. F, Dessen P, Mathieu C, Tolsa J. F, Nicod P, Scherrer U, Sartori C. Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms. **Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.** v. 301, n. 1, p. H247-52, 2011.

RHIND S. M, RAE M. J, AND BROOKS A. N. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. **Reproduction**. v. 122, p. 205–214, 2001.

ROBINSON J. J, SINCLAIR K. D & MCEVOY T. G .Nutritional effects on fetal growth. **Animal Science**. v. 68, p. 315–331, 1999.

RODRIGUEZ, J. A., NESPEREIRA, B., PEREZ-ILZARBE, M., EGUINO, E., AND PARAMO, J. A. Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL. **Cardiovasc. Res**. v. 65, p. 665–673, 2005.

ROSSO P; KAVA R.Effects of food restriction on cardiac output and blood flow to the uterus and placenta in the pregnant rat. **J. Nutr**. v.110, p.2350–2354, 1980.

RUTLAND C. S, LATUNDE-DADA A. O; THORPE A, PLANT R, LANGLEY-EVANS S & LEACH L. Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta. **Placenta**. v. 28, p. 734–742, 2007.

SAINTONGE J, ROSSO P. Placental blood flow and transfer of nutrient analogs in large, average, and small guinea pig littermates. **Pediatr. Res**. v. 15, p. 152–156, 1998.

SEDLAK J, LINDSAY R. H, Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal.Biochem**. v. 25, p. 192–205, 1968.

SUTHERLAND M. R, GUBHAJU L, MOORE L, KENT A. L, DAHLSTROM J. E, HORNE RS, HOY W. E, BERTRAM J. F, BLACK M. J. Accelerated maturation and abnormal morphology in the preterm neonatal kidney. **J. Am. Soc. Nephrol**. v. 22, n. 7, p. 1365-74, 2011.

SYMONDS M. E, BUDGE H, STEPHENSON T & MCMILLEN I. C. Fetal endocrinology and development - manipulation and adaptation to long-term nutritional and environmental challenges. **Reproduction**. v. 121, p. 853–862, 2001.

TAM, T. K. B.; LAMARCA, B; ARANY, M; COCKRELL, K; FOURNIER, L; MURPHY, S; MARTIN, J. N. J. R; GRANGER, J. P Role of reactive oxygen species during hypertension in response to chronic antiangiogenic factor (sFlt-1) excess in pregnant rats. **Am. J. Hypertens**. v. 24, n. 1, p. 110-3, 2011.

TEODÓSIO N. R.; LAGO E. S.; ROMANI S. A. M.; GUEDES R. C. A. A Regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch. Latinoam. Nutr.** v. 40, n. 4, p. 533-47, 1990.

THOMAS, S. R.; STOCKER, R. Molecular action of vitamin E in lipoprotein oxidation: Implications for atherosclerosis. **Free. Radic. Biol. Med.** v. 28, p. 1795, 2000.

TUFRO-MCREDDIE A, ROMANO LM, HARRIS JM, FERDER L, GOMEZ RA. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. **Am. J. Physiol.** v. 269, p. 110-5, 1995.

VIEIRA-FILHO, L. D; LARA, L. S; SILVA, P. A; LUZARDO, R; EINICKER-LAMAS, M; CARDOSO, H. D; PAIXÃO, A. D. O; VIEYRA, A. Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v. 36, p. 1157-1163, 2009.

VIEIRA-FILHO, L. D.; LARA, L. S.; SILVA, P. A.; SANTOS, F. T. J. ; LUZARDO, R; OLIVEIRA, F. S. T.; PAIXÃO, A. D. O. ; VIEYRA, A. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal -tocopherol during lactation. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 505, p. 91-97, 2011.

VAN ABEELLEN A. F.; VEENENDAAL M. V.; PAINTER R. C.; DE ROOIJ S. R.; THANGARATINAM S.; VAN DER POST J. A.; BOSSUYT P. M.; ELIAS S. G.; UITERWAAL C. S.; GROBBEE D. E.; SAADE G. R.; MOL B. W.; KHAN K. S.; ROSEBOOM T. J. The fetal origins of hypertension: a systematic review and meta-analysis of the evidence from animal experiments of maternal undernutrition. **J. Hypertens.** v. 30, n. 12, p. 2255-67, 2012.

WANG A, RANA S, KARUMANCHI S. A. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. **Physiology.** (Bethesda). v. 24, n. 3, p. 147-58, 2009.

YONEYAMA Y, SAWA R, SUZUKI S, DOI D, YONEYAMA K, OTSUBO Y, ARAKI T: Relationship between plasma malondialdehyde levels and adenosine deaminase activities in preeclampsia. **Clin. Chim. Acta.** v. 322, p. 169–173, 2002.

ZHANG, B., TANAKA, J., YANG, L., SAKANAKA, M., HATA, R., MAEDA, N., AND MITSUDA, N. Protective effect of vitamin E against focal brain ischemia and neuronal death through induction of target genes of hypoxia-inducible factor-1. **Neuroscience.** v. 126, p. 433–440, 2004.

5 ARTIGO

ASSOCIATION BETWEEN MATERNAL ANTIOXIDANT STATUS AND FETAL LIVER OXIDATIVE STRESS IN RATS

Short title: Placental and fetal liver oxidative stress

Daianna R. M. Gonçalves¹, Leucio D. Vieira-Filho¹, Natalie E. Ribeiro²,
Luís Paulo N. C. Borges¹, Regina S. Aires¹, Ana Durce O. da Paixão¹

This study was performed in Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670 901, Recife, Pernambuco, Brasil.

¹Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof.^o Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670 901, Recife, Pernambuco, Brasil.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

Adress for correspondence: Ana Durce O. da Paixão. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof.^o Moraes Rego, nº 1235, Cidade Universitária, CEP 50670 901, Recife, Pernambuco, Brasil. Tel.: (81) 2126 8530, Fax: (81) 2126 8976, Email: adpaixao@ufpe.br

Abstract

There is a correlation between oxidative stress in placenta and in some organs of offspring after birth, as kidneys and vascular endothelium. It was investigated whether maternal antioxidant status influences makers of the oxidative stress in the placenta and in fetal liver. Pregnant Wistar dams were treated with α -tocopherol, tempol or daily diet intake restriction to deplete antioxidant reservoir. The antioxidants did not affect placental or fetal body weight in control rats. Tempol or tempol + α -tocopherol recovered fetal body weight of dietary restricted fetuses. While α -tocopherol reduced malondialdehyde (MDA) in placenta of control rats, α -tocopherol or tempol increased MDA levels in the placenta of dietary restricted dams, in spite of the dietary restriction per se had reduced the levels of MDA. Tempol or tempol + α -tocopherol were capable to increase the levels of reduced glutathione (GSH) in the placenta of control rats, but tempol + α -tocopherol reduced the levels of GSH in the placenta of dietary restricted mothers. MDA was increased in the fetal liver of restricted dams treated with tempol, as well as, GSH was diminished in the fetal liver of restricted dams treated with tempol + α -tocopherol. Although α -tocopherol had diminished placental lipid peroxidation, it did not change fetal liver oxidative pattern. Tempol reduced placental and fetal liver oxidative stress in control dams, but it had a symmetrically contrary effect in dietary restricted dams. Thus, a parallel in pattern of oxidative stress between placenta and fetal liver was seen only in dams treated with tempol.

Key Words: fetal development: oxidative stress: placenta

Prenatal undernutrition programs renal dysfunction^(1,2) and in some conditions leads to hypertension at adult life ^(3,4). We have seen that maternal undernutrition by employing a multideficient diet rich in carbohydrates leads to increased placental and hepatic oxidative stress ⁽⁵⁾. Moreover, by using this multideficient diet, the oxidative stress is increased in the kidney of the offspring⁽⁵⁻⁷⁾. Increased radical oxygen species (ROS) in the placenta may reduce the blood distribution to utero-placental circulation once there are reports showing that undernutrition leads to reduced utero-placental blood flow not even correlated to reduced cardiac output ^(8,9). Thus reduced placental blood flow is one way to exacerbate poor fetal nutrition when maternal nutrition is not appropriate. Antioxidant such as α -tocopherol, besides its antioxidant effect modulates signal transduction and gene expression⁽¹⁰⁻¹²⁾ that may result in placental angiogenesis^(13,14) and in amelioration of fetal nutrition. While, tempol, a mimetic of superoxide dismutase is known only for its antioxidant properties, but is known to ameliorate fetal growth and survival ⁽¹⁵⁾.

In this work it was investigated the hypothesis that maternal antioxidant status influences makers of the oxidative stress in the placenta and in the fetal liver. Dietary intake restriction was employed to induce maternal undernutrition, while α -tocopherol and tempol were administered to improve antioxidant status.

Material and Methods

Materials. (+)- α -Tocopherol acetate, 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (tempol), thiobarbituric acid, L-cysteine and 1,1,3,3, - tetraethoxy-propane, were purchased from Sigma-Aldrich. All other reagents were of the highest purity available.

Animals

Wistar rats were used throughout the study. The experimental procedures were approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Pernambuco. 70-days old female rats, weighing 210 to 250 g, were randomly separated to be mated at age of 90 days, when they were designed to receive ad libitum standard diet (Purina Agribands, Paulinia, SP, Brazil), the control dams (C) or to receive 50% restriction of the average daily food consumption of the

ad libitum-fed controls, the restricted dams (R), from the first pregnancy day, detected by vaginal plug. Corn oil, the α -tocopherol vehicle (V, 1 ml/kg, body weight daily by gavage), α -tocopherol (Toc, 350 mg/kg body weight daily by gavage, Ref¹⁶), tempol (T, 30 mg/kg body weight daily, dissolved in drinking water, Ref¹⁷) or both antioxidant, Toc and T were administered, during all pregnancy, until 20th pregnancy day. On depending of the parallel treatment with anti-oxidant, C and R dams were designated CV (n = 5), RV(n = 5), CToc (n = 5), RToc (n = 4), CT(n = 4), RT(n = 5), CTocT (n = 4) and RTocT (n = 3). Diet and water intake were measured daily to ensure, respectively, the 50% restriction and the prescribed tempol treatment. Pregnancy was interrupted at 20 pregnancy day under pentobarbital anesthesia (50 mg/kg body weight i.p.) to obtain the maternal livers, the placentas corresponding to fetal male and their respective male fetuses. The tissues were immediately weighted and transferred to 1.15% KCl (w/v) solution in ice bath. The fetuses were weighted and their livers were promptly harvested and also transferred to 1.15% KCl (w/v) solution in ice bath.

Measurement of oxidative stress markers

The tissues were homogenised into 1.15% KCl(w/v) solution (1g tissue/5 ml) by using a tissue grinder IKA RW20, at 1,200 rpm for 2 min, into ice bath. The levels of MDA were measured according to⁽¹⁸⁾, modified. Briefly, the homogenate reacted with thiobarbituric acid in the presence of acetic acid and SDS, for 60 min, at 100 °C. After chilling, butanol was added to the reaction, the tubes were centrifuged and the supernatant was used to measure the color at 535 nm. The standard curve was carried out using 1,1,3,3, - tetraethoxy-propane. Levels of reduced glutathione (GSH) were assessed by non-protein sulfhydryl groups⁽¹⁹⁾. TCA 5% (w/v) was used to precipitate protein in tissue homogenates (1g tissue/5 ml KCl 1.1% w/v). The protein-free supernatant was used to react to 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) into a Tris-EDTA buffer solution, pH 8.9, for 5 min, at room temperature. The standard curve was carried out using L-cysteine and the absorbance was read at 412 nm. Both MDA and GSH results were corrected for protein concentration that was measured by using the Folin phenol method⁽²⁰⁾.

Statistical analysis

The results are presented as the mean $\pm$ SEM. Differences between two groups were assessed using unpaired Student “t” test and between more than three groups using one-way ANOVA followed by a Newman–Keuls test. GraphPad Prism 5 software (Version 5.01, GraphPad Software) was used for all statistical analyses. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

The maternal dietary restriction reduced drastically the body weight gain during pregnancy, but the antioxidants, administered separately or simultaneously were not capable to ameliorate to change the pattern of body weight gain (table 1). The fetal body weight was also reduced by the maternal dietary restriction, however tempol or tempol administered simultaneously to α -tocopherol were capable to recovery the fetal body weight (Table 1, compare RV vs. CV, RT vs. RV and RTocT vs. RV). Otherwise, the placental weight was affected neither by the dietary restriction nor by the antioxidants (Table 1).

The maternal dietary restriction led to reduced MDA levels in placenta (Table 2, see RV vs.CV). Regarding the antioxidants, α -tocopherol reduced MDA in the placenta of control dams (compare CToc vs. CV, Table 2), but increased in the placenta of restricted dams (compare RToc vs. RV, Table 2). Either tempol increased MDA in placenta of restricted dams (compare RT vs.RV, Table 2). Similarly, both antioxidants administered simultaneously reduced MDA in placenta of control dams (compare CTocT vs. CV, Table 2), but increased in restricted dams (compare RTocT vs. RV, Table 2). The MDA levels in fetal liver were unchanged, except for in restricted fetuses treated with tempol that were increased as in the placenta (compare RT vs. RV, Table 2) and in control fetuses treated with both antioxidants that were also increased (compare CTocT vs. CV), different from that pattern in placenta. One of the endogenous antioxidant defense, the levels of GSH, were augmented in the placenta of control dams treated with tempol and also in that treated with tempol plus α -tocopherol (compare CT vs. CV and CTocT vs. CV, Table 2), but they were lowered in the placenta of restricted dams treated with both antioxidants (compare RTocT vs. RT, Table 2). The GSH levels were affected only in liver of restricted fetuses treated with both antioxidants; they were reduced (compare RTocT vs. RV, Table 2).

The oxidative stress markers were measured in the maternal liver (Table 3) as positive control against the placenta. However, the pattern of oxidative stress was shown very different between these organs. Dietary restriction as well as α -tocopherol led to increased levels of MDA (compare RV vs. CV, CToc vs. CV and RToc vs. CV, Table 3). Similarly, tempol led to elevated levels of MDA, only in restricted dams (compare RT vs. CV and CT, Table 3). However, when α -tocopherol and tempol were administered simultaneously they reduced the levels of MDA in the liver of restricted dams (compare RTocT vs. RV, Table 3). On the other hand, one of the endogenous antioxidant defense, the levels of GSH, were increased in the liver of dams treated with tempol or with tempol plus α -tocopherol (compare CT vs. CV and CTocT vs. CV, Table 3), while they were reduced in the liver of restricted dams treated with both antioxidants (RTocT vs. RV, Table 3).

Discussion

These results show that different from maternal undernutrition induced by a multideficient diet plentiful of carbohydrates⁽⁵⁾, dietary restriction reduces lipid peroxidation in the placenta. Nevertheless, these placentas become vulnerable to lipid peroxidation when α -tocopherol and tempol were administered. However, the fetuses were benefitted with body weight increase induced by tempol or by tempol plus alpha-tocopherol, but not by α -tocopherol. Although this is different from what happened with another undernutrition pattern, the present finding is in line with reports that dietary restriction can reduce free radicals production⁽²¹⁻²⁴⁾, even there is also evidence that antioxidant defense is reduced under starvation⁽²⁵⁾ or food deprivation⁽²⁶⁾. Increment of MDA in the placentas of restricted dams upon α -tocopherol is based on the fact that avoiding lipid peroxidation, the molecule of α -tocopherol becomes oxidized and must be reduced, but this does not happen in the absence of an appropriate endogenous antioxidant defense. As seen in Table 2, GSH, that infers glutathione peroxidase activity, was not increased and certainly the other components of defense squad – superoxide dismutase, catalase and vitamin C – were irreversible affected by undernutrition. Regarding tempol, it was used in the present study one dosage (30 mg/kg/day) reported to reduce superoxide production in placenta of pregnant rats treated with an antiangiogenic factor that had any effect

in untreated pregnant rats⁽¹⁷⁾. Furthermore, there is finding showing that tempol dosage from 20 to 60 mg/kg/day, in a rat preeclamptic model, increases acetylcholine vasodilator effect⁽²⁷⁾, though it is known that in elevated concentration tempol exhibits pro-oxidant effect (see a review²⁸). Since there is evidence that, *in vitro*, vitamin C is capable to prevent pro-oxidant effect of tempol⁽²⁹⁾, it is likely that undernutrition have exhausted antioxidant capability of tempol, even though it is known that the rat is able to synthesise the necessary vitamin C under ideal nutritional condition. The nutritional background seems so crucial that placentas of control dams treated with α -tocopherol plus tempol had increased levels of GSH, while that of restricted dams had lowered levels of GSH.

Despite tempol had increased the placental MDA, the body weight gain in fetuses indicates that it ameliorated fetal nutrition in detriment of dams undernutrition, whose did not show any change in body weight gain under its treatment. The tempol is a cell-permeable ampholyte that is transferred throughout the placenta and has been shown to ameliorate vascular dysfunction in the offspring of undernourished dams⁽³⁰⁾. One trace that this antioxidant crossed the placenta is the increased MDA levels in the restricted fetal liver. Differently, α -tocopherol did not recovery fetal body weight, different from a previous observation in our Laboratory by using a multideficient diet⁽³¹⁾, nor changed MDA in fetal liver, likely on account of a poor transfer across the placenta⁽³²⁾.

Even though the levels of MDA and GSH in the maternal liver were measured as a counterpoint to these parameters in the placenta, there was any synchronization regarding the oxidative stress markers between these two organs. The increased levels of MDA in undernourished dams are in accordance with findings that undernutrition could increase ROS production^(31,32), however α -tocopherol increasing MDA in control dams is unclear, once in a previous study of the Laboratory⁽³³⁾ it has been shown that when administered during lactation it diminishes MDA in the maternal liver.

In summary, although α -tocopherol had diminished placental lipid peroxidation, it did not change fetal liver oxidative pattern. Tempol reduced placental and fetal liver oxidative stress in control dams, but it had a symmetrically contrary effect in dietary restricted dams. Thus, a parallel in pattern of oxidative stress between placenta and fetal liver was seen only in dams treated with tempol.

Table 1. Maternal and fetal data weight

	Maternal weight gain,g			Fetal body weight, g			Placenta weight, g		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n
CV	83.7	11.5	5	4.19	0.17	10	0.54	0.01	10
RV	34.7	6.3*	5	3.05	0.07*	8	0.49	0.14	8
CToc	105.1	4.5	5	3.89	0.17	10	0.50	0.01	10
RToc	17.2	6.8*	4	3.31	0.12	12	0.47	0.02	12
CT	135.0	13.0	4	3.80	0.06	7	0.52	0.02	7
RT	32.0	4.2*	5	3.65	0.07†	12	0.54	0.02	12
CTocT	87.8	10.5	4	4.17	0.09	9	0.55	0.01	12
RTocT	26.8	1.0*	3	3.41	0.13†	7	0.60	0.02	7

CV, CToc, CT and CTocT are offspring of control dams, treated during pregnancy, respectively, with α -tocopherol vehicle (V), α -tocopherol (Toc), tempol (T) or α -tocopherol + tempol (Toc + T); RV, RToc, RT and RTocT are offspring of dams maintained during pregnancy under 50% dietary restriction and treated in parallel with the same antioxidants as the control group. $P < 0.05$: * vs. CV, †vs. RV.

Table 2. Oxidative stress markers in maternal placenta and in the fetal liver

	MDA, nmol/mg protein						GSH, nmol/mg protein					
	Placenta			Fetal Liver			Placenta			Fetal Liver		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n
CV	0.74	0.06	6	0.60	0.05	10	14.28	0.4	5	18.53	1.6	10
RV	0.38	0.06*	6	0.73	0.09	9	15.44	1.4	5	18.38	2.3	9
CToc	0.41	0.04*	10	0.55	0.03	10	15.58	1.2	5	16.55	0.6	10
RToc	0.90	0.19‡	11	0.78	0.08	9	16.33	3.2	4	16.59	0.7	9
CT	1.05	0.27	7	0.68	0.13	7	17.40	4.0*	4	17.63	0.6	7
RT	1.69	0.19	13	1.25	0.15‡	13	12.02	1.3	5	20.02	2.2	13
CTocT	0.57	0.03*	8	0.78	0.04*	8	20.90	1.1*	4	23.50	2.0	8
RTocT	0.81	0.12‡	7	0.60	0.03	7	8.90	0.2‡	3	12.88	0.5‡	7

See description of groups in Table 1. P < 0.05: * vs. CV, † vs. CT, ‡ vs. RV.

Table 3. Oxidative stress markers in maternal liver

	MDA, nmol/mg protein			GSH, nmol/mg protein		
	Mean	SEM	n	Mean	SEM	n
CV	0.29	0.02	3	14.28	0.38	5
RV	0.41	0.03*	5	15.44	1.45	5
CToc	0.41	0.01*	5	15.58	1.20	5
RToc	0.44	0.04*	5	16.33	3.23	4
CT	0.32	0.05	3	17.40	3.99*	4
RT	0.73	0.03*†	5	12.02	1.33	5
CTocT	0.23	0.04	4	20.90	1.06*	4
RTocT	0.20	0.01‡	3	8.90	0.20‡	3

See description of groups in Table 1. P < 0.05: * vs. CV, † vs. CT, ‡ vs. CV.

REFERENCES

1. Merlet-Bénichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M, *et al.* (1994) Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. *PediatrNephrol.* **8**,175–180.
2. Lucas SR, Costa Silva VL, Miraglia SM, *et al.* (1997) Functional and morphometric evaluation of offspring kidney after intrauterine undernutrition. *Pediatr Nephrol.* **11**, 719-23.
3. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson A A. (1999) Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. *Life Sci.* **64**, 965-74.
4. Paixão AD, Maciel CR, Teles MB, *et al.*(2001) Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age.*Biol Neonate.* **80**, 239-46.
5. Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, *et al.* (2009) Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **36**,1157-63.
6. Magalhães JC, da Silveira AB, Mota DL, *et al.* (2006) Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Exp Physiol.* **91**, 611-9.
7. Silva LA, Veira-Filho LD, Barreto IS, *et al.* (2011) Prenatal undernutrition changes renovascular responses of nimesulide in rat kidneys. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.***108**, 115-21.
8. Rosso P, Kava R. (1980) Effects of food restriction on cardiac ouput and blood flow to the uterus and placenta in the pregnant rat. *J Nutr.***110**, 2350-4.
9. Ahokas RA, Anderson GD, Lipshitz J. (1983) Effect of dietary restriction, during the last week only or throughout gestation, on cardiac output and uteroplacental blood flow in pregnant rats. *J Nutr.***113**, 1766-76.

10. Stäubli B, Boscoboinik D, Tasinato A, *et al.* (1994) Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D-alpha-tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem.* **226**, 393-402.
11. Azzi A. Molecular mechanism of alpha-tocopherol action. (2007) *Free Radic Biol Med.* **43**, 16-21.
12. Rimbach G, Moehring J, Huebbe P, *et al.* (2010). Gene-regulatory activity of alpha-tocopherol. *Molecules.* **15**, 1746-61.
13. Kasimanickam RK, Kasimanickam VR, Rodriguez JS, *et al.* (2010) Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. *Reprod Biol Endocrinol.* **8**:86.
14. Zingg JM, Meydani M, Azzi A. (2012) α -Tocopheryl phosphate--an activated form of vitamin E important for angiogenesis and vasculogenesis? *Biofactors.* **38**, 24-33.
15. Hoffmann DS, Weydert CJ, Lazartigues E, *et al.* (2008) Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor feto-placental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. *Hypertension.* **51**, 1058-65.
16. Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, *et al.* (2011) Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys.* **505**, 91-7.
17. Tam KB, Lamarca B, Arany M, *et al.* (2011) Role of reactive oxygen species during hypertension in response to chronic antiangiogenic factor (sFlt-1) excess in pregnant rats. *Am J Hypertens.* **24**, 110-3.
18. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* **95**, 351-8.
19. Sedlak J, Lindsay RH. (1968) Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* **25**, 192-205.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, *et al.* (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* **193**, 265-75.

21. Lee DW, Yu BP. (1990) Modulation of free radicals and superoxide dismutases by age and dietary restriction. *Aging (Milano)*. **2**, 357-62.
22. Sohal RS, Ku HH, Agarwal S, *et al.* (1994) Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ageing Dev.* **74**, 121-33.
23. Chung HY, Kim HJ, Kim JW, *et al.* (2001) The inflammation hypothesis of aging: molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci.* **928**, 327-35.
24. Bhattacharya A, Lawrence RA, Krishnan A, *et al.* (2003) Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice. *J Am Coll Nutr.* **22**, 388-99.
25. Grattagliano I, Vendemiale G, Caraceni P, *et al.* (2000) Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed a choline-deficient diet. *J Nutr.* **130**, 2131-6.
26. Domenicali M, Caraceni P, Vendemiale G, *et al.* (2001) Food deprivation exacerbates mitochondrial oxidative stress in rat liver exposed to ischemia-reperfusion injury. *J Nutr.* **131**, 105-10.
27. Talebianpoor MS, Mirkhani H. (2012) The effect of tempol administration on the aortic contractile responses in rat preeclampsia model. *ISRN Pharmacol.* **2012**, 187-208.
28. Wilcox CS, Pearlman A. (2008) Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev.* **60**, 418-69.
29. May JM, Qu ZC, Juliao S, *et al.* (2005) Ascorbic acid decreases oxidant stress in endothelial cells caused by the nitroxide tempol. *Free Radic Res.* **39**, 195-202.
30. Rexhaj E, Bloch J, Jayet PY, *et al.* (2011) Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **301**, H247-52.

31. Vieira-Filho LD, Cabral EV, Santos FT, *et al.*(2011) Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(11):2019-29.
32. Debier C, Larondelle Y. (2005) Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. *Br J Nutr.* **93**, 153-74.
33. Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, *et al.* (2011) Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys.***505**, 91- 7.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi observado que a restrição dietética diminuiu o peso fetal, possivelmente pela restrição de nutrientes, pois os níveis de TBARS na placenta indicam que não houve vasoconstrição placentária. Mostrando-nos que a restrição nutricional não provoca necessariamente vasoconstrição placentária por aumento do estresse oxidativo. Além disso, eles indicam que, na ausência de suprimento nutricional adequado, agentes antioxidantes podem exacerbar o estresse oxidativo.