

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

JULIANE SILVA DE FARIAS

**INFLAMAÇÃO MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO AUMENTA O  
ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO E INDUZ HIPERTENSÃO  
NA PROLE ADULTA EM RATOS: POSSIBILIDADE DE PREVENÇÃO  
PELO TRATAMENTO MATERNO COM  $\alpha$ -TOCOFEROL**

RECIFE, 2015

JULIANE SILVA DE FARIAS

**INFLAMAÇÃO MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO AUMENTA O  
ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO E INDUZ HIPERTENSÃO  
NA PROLE ADULTA EM RATOS: POSSIBILIDADE DE PREVENÇÃO  
PELO TRATAMENTO MATERNO COM  $\alpha$ -TOCOFEROL**

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

ORIENTADORA: ANA DURCE OLIVEIRA DA PAIXÃO

CO-ORIENTADOR: LEUCIO DUARTE VIEIRA FILHO

RECIFE, 2015

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso

CRB 1728

**Farias, Juliane Silva de**

**Inflamação materna durante a gestação aumenta o estresse oxidativo placentário e induz hipertensão na prole adulta em ratos: possibilidade de prevenção pelo tratamento materno com alfa-tocoferol/ Juliane Silva de Farias– Recife: O Autor, 2015.**

**72 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Ana Durce Oliveira da Paixão**

**Coorientador: Leucio Duarte Vieira Filho**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2015.**

**Inclui referências e anexo**

**1. Feto- desenvolvimento 2. Vitamina E 3. Hipertensão I. Paixão, Ana Durce Oliveira da (orientadora) II. Vieira Filho, Leucio Duarte (coorientador) III. Título**

[  
JULIANE SILVA DE FARIAS

**INFLAMAÇÃO MATERNA DURANTE A GESTAÇÃO AUMENTA O  
ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO E INDUZ HIPERTENSÃO  
NA PROLE ADULTA EM RATOS: POSSIBILIDADE DE PREVENÇÃO  
PELO TRATAMENTO MATERNO COM  $\alpha$ -TOCOFEROL**

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<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Ana Durce Oliveira da Paixão  
Orientadora

---

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho  
Co-orientador

---

Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Claudia Jacques Lagranha  
Titular Interno 1

---

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva  
Titular Externo 1

---

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira  
Titular Externo 2

Data: 25/02/2015

Dedico esta dissertação à minha família que desde cedo investiu na minha formação e me apoiou em todas as decisões tomadas ao longo da minha trajetória acadêmica.

## AGRADECIMENTOS

À Deus porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.

À minha mãe Hubernice Silva de Farias, meu pai Denilson Gomes de Farias e minha madrastra Jacqueline Maria dos Santos Gomes de Farias pelos ensinamentos passados, investimento financeiro e contribuição para o meu crescimento pessoal.

Aos meus irmãos, avós, tios, primos e os demais integrantes da minha imensa família que não mediram esforços para me ajudar no que fosse preciso durante toda a minha formação.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Ana Durce Oliveira da Paixão, que me acolheu em seu laboratório desde a iniciação científica e vem me orientando com muita dedicação para que eu tenha a melhor formação possível e venha a ser uma boa profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho, ao qual aprendi a admirar e respeitar por todo conhecimento passado e pela paciência com que vem me ajudando, também por acreditar na minha capacidade e sempre me incentivar a buscar algo novo.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiopatologia Renal, Kelly, Natália e Manoel; aos integrantes do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal, Edjair, Regina, Valdilene, Linaldo e Beatriz Soares; aos que já passaram pelo laboratório, Beatriz Veloso, Nelson, Natalie, Bruna, Luís e Daiana; e também ao suporte técnico de Nielson e André. Todos contribuíram de alguma forma para a execução dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Peres da Costa por ter cedido o pletismógrafo.

À Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup>Belmira Lara Silveira Andrade da Costa e todos os integrantes do laboratório de Neurofisiologia pela troca de experiência nas metodologias que foram aplicadas.

Ao Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues pelo acesso ao Laboratório de Biofísica das Membranas.

Aos Professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia.

Aos colegas de turma pela troca de conhecimento durante as disciplinas cursadas.

Aos órgãos de fomento FACEPE, CAPES e CNPq sem eles não seria possível a execução dos experimentos.

Em todas as coisas somos mais que vencedores, por meio daquele que nos amou.  
Romanos, 8:37.

## RESUMO

Perturbações no ambiente intrauterino podem promover alterações no desenvolvimento fetal e programar hipertensão na prole adulta. Um dos fatores que perturbam o ambiente intrauterino é a inflamação materna. O aumento do estresse oxidativo placentário parece estar envolvido nesse processo da programação intrauterina. Dessa forma, neste trabalho foi investigado se a exposição materna ao lipopolissacarídeo (LPS) aumenta marcadores de estresse oxidativo na placenta, no fígado fetal e materno, assim como aumenta a pressão arterial sistólica e marcadores de estresse oxidativo renal na prole adulta. Foram também investigados se o tratamento com  $\alpha$ -tocoferol, em paralelo com o LPS, pode prevenir alterações no estresse oxidativo renal e na pressão arterial. Para isso, ratas Wistar foram tratadas com salina ou LPS nos dias 13, 15, 17 e 19 de gestação. Parte das mães de cada grupo foi tratada diariamente com  $\alpha$ -tocoferol em paralelo com o LPS. Uma parte das mães ( $n = 4-6$  por grupo) teve a gestação interrompida no 20º dia para coleta de placentas, fígado materno e fetal, enquanto a outra parte ( $n = 4-5$  por grupo) teve a gestação a termo para gerar a prole adulta, a qual teve alguns parâmetros funcionais investigados dos 60 aos 150 dias de idade. Aos 150 dias de vida a prole foi sacrificada para avaliação de marcadores do estresse oxidativo no rim. O tratamento materno com LPS aumentou os níveis de malondialdeído (MDA) na placenta, no fígado fetal e no rim da prole adulta. O rim da prole adulta também apresentou elevação na expressão da NOX2, a subunidade enzimática da NADPH oxidase. Na placenta, o aumento de MDA ocorreu em paralelo com elevação do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e de seu receptor do tipo I, o *flt-1*. Possivelmente porque ânions superóxidos ativam sinalizadores intracelulares que ativam a produção de fatores angiogênicos. A prole adulta apresentou pressão arterial sistólica mais elevada, a partir dos 120 dias de idade. O tratamento com  $\alpha$ -tocoferol preveniu elevação do MDA na placenta, fígado fetal e rim do rato adulto. O  $\alpha$ -tocoferol também preveniu elevação de ânions superóxidos dependentes da NADPH oxidase no rim de ratos adultos, assim como preveniu a elevação da pressão arterial. No entanto, o  $\alpha$ -tocoferol não foi capaz de prevenir a elevação dos fatores angiogênicos na placenta. Em resumo, a inflamação materna, induzida por LPS, promove hipertensão na prole adulta, em parte, dependente do estresse oxidativo aumentado na placenta e no rim da prole hipertensa.

Palavras-chave: inflamação, desenvolvimento fetal, estresse oxidativo, função renal, hipertensão



## ABSTRACT

Changes in maternal environment, including maternal inflammation, may affect fetal development and lead to hypertension in adult offspring. Elevation in placental oxidative stress seems to be a crucial agent to program later disease, such as hypertension. This work investigated whether exposure to lipopolysaccharide (LPS) augments oxidative stress in placenta and in maternal and fetal livers, as well as, increases systolic arterial pressure and renal oxidative stress in adult offspring. Furthermore, it was investigated whether  $\alpha$ -tocopherol treatment, inparallel to LPS, could prevent the programmed changes in renal oxidative stress and blood arterial pressure. For this, Wistar female rats were treated with saline or lipopolysaccharide, on days 13, 15, 17 and 19 of gestation. Alongside, a subset of dam groups were daily treated with  $\alpha$ -tocopherol. On gestation day 20, part of dams (n = 4–6 per group) was euthanized to obtain placentas and maternal and fetal livers, while other part of dams (n = 4–5 per group) had the gestation until term to study their offspring. The offspring had systolic blood pressure measured from age of 60 to 150 days. At age of 150 days, the offspring was euthanized to measure markers of oxidative stress in the kidney. Maternal exposure to LPS leads to elevation in the levels of malondialdehyde (MDA) in placenta, fetal liver and in the kidney of adult offspring. The kidney of adult offspring also presented elevation in the expression of NOX2, one enzymatic subunit of NADPH oxidase. In placenta, the elevation in MDA was paralleled by elevation in the levels of angiogenic factors, the vascular endothelial growth factor (VEGF) and its type I receptor, the flt-1. It is known that superoxide anions activates subcellular signals to production of these angiogenic factors. Adult offspring showed elevated systolic blood pressure from 120 days.  $\alpha$ -Tocoferol prevented elevation of MDA in placenta, fetal liver and in the kidney of adult offspring.  $\alpha$ -Tocoferol also prevented elevation in the levels of superoxide anions dependent on NADPH oxidase in the kidney of adult rats offspring, as well as, it prevented the elevation in blood pressure. However,  $\alpha$ -tocopherol was not able to prevent the elevation of angiogenic factors in placenta. In summary, LPS-induced maternal inflammation leads to hypertension in the adult offspring, partially, mediated by increased oxidative stress in the placenta and in the kidney of adult offspring.

Key-words: inflammation, fetal development, oxidative stress, renal function, hypertension.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                           | <b>Página</b> |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>FIGURA 1:</b> Esquema representativo da ativação da NOX2.....          | 16            |
| <b>FIGURA 2:</b> Ativação da resposta inflamatória induzida pelo LPS..... | 21            |

## LISTA DE ABREVIATURAS

Ang II – Angiotensina II

bFGF – Fator de crescimento de fibroblastos básico, do inglês: *basicfibroblastgrowthfactor*

DICs– Doenças isquêmicas do coração

DT2 – Diabetes do tipo 2

EMT – Transição epitélio-mesênquima, do inglês: *epithelial-mesenchymaltransition*

Flt-1- Do inglês: *receptor fms-liketyrosine kinase-1*.

HLA – Antígeno leucocitário humano, do inglês: *humanleukocyteantigen*

IL – Interleucina

LBP – Proteína de ligação ao lipopolissacarídeo, do inglês: *lipopolysaccharidebindingprotein*

LPS –Lipopolissacarídeo

NF-kB –Fator nuclear kappa B, do inglês: *nuclear factorkappaB*

MDA-Malondialdeído

NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase

NO – Óxido nítrico, do inglês: *nitricoxide*

NOX2– NADPH oxidase tipo 2

PF4 – Fator plaquetário4, do inglês: *plateletfactor4*

PKC – Proteína kinase C, do inglês: *proteinkinaseC*

PLGF– Fator de crescimento placentário, do inglês: *placentalgrowthfactor*

RFG – Ritmo de filtração glomerular

ROS – Espécies reativas de oxigênio, do inglês: *reactiveoxygenspecies*

T reg– Células T regulatórias

TGF- $\beta$  –Fator de crescimento transformante  $\beta$ , do inglês: *transforminggrowthfactor $\beta$*

TLR –Receptores Toll-like

TNF- $\alpha$  –Fator de necrose tumoral  $\alpha$ , do inglês: *tumor necrosisfactor $\alpha$*

uNK– Células natural Killer uterina, do inglês:*NaturalKillercellsuterine*

VCAM – Molécula de adesão celular vascular, do inglês: *vascular celladhesionmolecule*

VEGF – Fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês: *vascular endotheliumgrowthfactor*

VEGFR – Receptor do fator de crescimento do endotélio vascular, do inglês: *vascular endotheliumgrowthfactorreceptor*

## SUMÁRIO

|                                                                           | Página    |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1.INTRODUÇÃO .....</b>                                                 | <b>12</b> |
| <b>2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>                                      | <b>12</b> |
| <b>2.1.Programação intrauterina .....</b>                                 | <b>12</b> |
| <b>2.2.Estresse oxidativo .....</b>                                       | <b>14</b> |
| 2.2.1. NADPH oxidase.....                                                 | 15        |
| 2.2.2. Estresse oxidativo e a gestação.....                               | 16        |
| <b>2.3. Placenta e fatores angiogênicos .....</b>                         | <b>18</b> |
| <b>2.4. Inflamação .....</b>                                              | <b>20</b> |
| 2.4.1. Inflamação e gestação.....                                         | 22        |
| <b>2.5. Função renal .....</b>                                            | <b>23</b> |
| 2.5.1. Estresse oxidativo renal.....                                      | 25        |
| <b>2.6. Hipertensão, disfunção renal e programação intrauterina .....</b> | <b>26</b> |
| <b>2.7. Vitamina E .....</b>                                              | <b>27</b> |
| <b>3. OBJETIVO .....</b>                                                  | <b>29</b> |
| <b>3.1. Geral .....</b>                                                   | <b>29</b> |
| <b>3.2. Específicos .....</b>                                             | <b>29</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                  | <b>30</b> |
| <b>ARTIGO .....</b>                                                       | <b>43</b> |
| <b>CONCLUSÕES.....</b>                                                    | <b>70</b> |
| <b>ANEXO A – Carta do Comitê deÉtica em Experimentação Animal.....</b>    | <b>71</b> |

## **1.INTRODUÇÃO**

O desenvolvimento intrauterino representa uma janela na qual o organismo está suscetível a programação de doenças crônicas na vida adulta por eventos adversos. A hipertensão é uma importante questão de saúde pública e representa uma das principais causas de morbimortalidade no mundo. A elevação dos níveis pressóricos pode decorrer de fatores genéticos, farmacológicos e ambientais, bem como, pode ser programada no ambiente intrauterino e induzir alterações da função renal. A elevação do estresse oxidativo é um fator que está presente tanto em mecanismos de retardo do desenvolvimento fetal como em alterações funcionais renais e na hipertensão.

A inflamação materna é um evento adverso que pode perturbar o desenvolvimento intrauterino, e dessa forma, pode induzir elevação dos níveis pressóricos na idade adulta. Esse processo pode envolver alterações no estresse oxidativo durante a janela de desenvolvimento, bem como, no tecido renal na idade adulta.

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1.Programação intrauterina**

Ainda nos primeiros dias de vida, indivíduos que apresentam baixo peso ao nascimento possuem maiores riscos de apresentar hipoglicemia, hipotermia, hipotensão, síndromes respiratórias, acidose arterial umbilical, e um aumento de 20 vezes no risco de morte neonatal (NEGRATO; GOMES, 2013). Por outro lado, a restrição do crescimento fetal também pode refletir tardiamente no desenvolvimento de doenças crônicas. O desenvolvimento da diabetes do tipo 2 (DT2) (QUILTER *et al.*, 2014), hipertensão (PAIXÃO; ALEXANDER, 2013), e doenças isquêmicas do coração (DICs)(HESHMATI; KOUPIL, 2014), na vida adulta, tem sido correlacionado com baixo peso no nascimento. Em 1986, através de estudos demográficos, Dr.Barkerpropôs a hipótese de que a desnutrição ou outros insultos que afetem a vida intrauterina, ou os primeiros anos de vida, poderiam alterar permanentemente a estrutura, fisiologia e metabolismo do corpo (BARKER; OSMOND, 1986). Nesse estudo, Barker sugerea existência de uma correlação entre o aumento da taxa de

mortalidade por DICs no período de 1968–1978 e o aumento da morbimortalidade infantil ocorrido na geração anterior, entre os anos de 1921 e 1925, período em que houve um alto índice de desnutrição em mulheres na idade fértil.

Com base nas proposições de Barker, surgiu a hipótese de programação intrauterina. A programação intrauterina é descrita como perturbações no ambiente intrauterino que promovem alterações do desenvolvimento fetal e que trariam benefícios em curto prazo ao feto (ZANDI-NEJAD *et al.*, 2006). Tais benefícios incluiriam a manutenção de tecidos vitais, como o cérebro e a placenta, no entanto, promoveriam simultaneamente modificações definitivas nas características de crescimento, metabolismo e na fisiologia pós-natal, aumentando os riscos de morbidade tardia (ZANDI-NEJAD *et al.*, 2006). Nesse âmbito, foi proposto o desenvolvimento de um “fenótipo poupador” em indivíduos, cujo ambiente intrauterino se caracteriza por condições de restrição nutricional, que quando expostos a um aumento do aporte nutricional, apresentam comprometimentos de saúde (BATESON *et al.*, 2004). Outra proposição leva em consideração a “resposta preditiva adaptativa”, definida como mudanças homeostáticas fetais que são induzidas na expectativa de futuras mudanças ambientais, ajudando na sobrevivência pós-natal até a vida adulta. A programação intrauterina teria vantagens adaptativas imediatas, porém induziria respostas preditivas adaptativas “inapropriadas” no ambiente pós-natal (GLUCKMAN; HANSON, 2004).

Alterações estruturais e funcionais a nível gênico, celular, tecidual, ou sistêmico são mecanismos que influenciam a programação intrauterina. As modificações epigenéticas, durante o desenvolvimento, alteram a expressão gênica sem mudanças na sequência do DNA (COSTA; PACHECO, 2013). As mais importantes reações epigenéticas são a acetilação e a metilação, que podem induzir diferentes níveis de expressão gênica e, desse modo, afetar a síntese proteica (NEGRATO; GOMES, 2013). Os períodos mais susceptíveis a modificações epigenéticas são a gametogênese e o início da formação embrionária, contudo essas modificações também podem ser observadas nos demais períodos gestacionais (VICKARYOUS; WHITE LAW, 2005).

A programação intrauterina pode acontecer em resposta a diversos fatores, que incluem, condições precárias de oxigenação e nutrição fetal, alterações hormonais, tabagismo, exposição ao etanol, exposição a fármacos e enfermidades maternas (FOWDEN *et al.*, 2006). Todos estes fatores apresentam em comum a elevação do estresse oxidativo (LUO *et al.*, 2006).

## 2.2. Estresse oxidativo

O desequilíbrio entre a produção de espécies reativas do oxigênio (em inglês: *reactiveoxygenspecies*, ROS) e as defesas antioxidantes caracteriza o quadro de estresse oxidativo (SHOJI; KOLETZKO, 2007). Assim, podemos afirmar que o estresse oxidativo pode acontecer de 3 formas: i) quando há um aumento da produção de ROS, sem alteração nas defesas antioxidantes; ii) quando há uma diminuição nas defesas antioxidantes, sem alteração na produção de ROS; ou iii) quando acontece simultaneamente um aumento da produção de ROS e uma diminuição nas defesas antioxidantes.

Espécies reativas do oxigênio (ROS) são compostas por radicais livres do oxigênio (SORG, 2004). Radicais livres são definidos como substâncias químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, o que os confere alta reatividade química (ALZOGHAIBI, 2013). As ROS podem ser originadas de processos como isquemia-reperfusão, ativação de neutrófilos e macrófagos, metabolismo de ácidos graxos livres, metabolismo das prostaglandinas, entre outros (SHOJI; KOLETZKO, 2007), e incluem os ânions superóxidos ( $O_2^-$ ), radical hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radicais hidroperoxila ( $O_2H$ ) e o oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), ozônio ( $O_3$ ), peroxil ( $RO_2$ ), alcoxil ( $RO\cdot$ ) (HALLIWELL, 1996). Quando há uma condição de equilíbrio entre a produção de ROS e a sua neutralização, estas moléculas têm papel benéfico nas funções fisiológicas. Elas são fundamentais na proteção celular de infecções por patógenos invasores, na regulação da função de células cardíacas e vasculares, e também na regulação intracelular da concentração de cálcio (SALIM, 2014). Entretanto, o excesso de ROS pode causar danos em várias moléculas biológicas e em tecidos vitais. Os principais alvos das ROS são ácidos graxos insaturados presentes na membrana, processo conhecido como peroxidação lipídica, mas também podem danificar a estrutura e função proteica, assim como os ácidos nucleicos (ALZOGHAIBI, 2013). Dessa forma, a diminuição das defesas antioxidantes, permite que lesões provocadas por ROS se tornem irreversíveis (KAROWICZ-BILINSKA *et al.*, 2002).

As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase, acatalase e a glutathionaperoxidase. O radical superóxido ( $O_2^-$ ) é convertido a peróxido de hidrogênio pela superóxido dismutase, cujo metabolismo é continuado pela glutathionaperoxidase ou pela catalase (BIRI *et al.*, 2007). Substâncias não enzimáticas também fazem parte das defesas antioxidantes. A glutathiona reduzida (GSH), produzida endogenamente, sequestra ânions superóxidos e é convertida a glutathiona oxidada (GSSG) (BROWNE; ARMSTRONG, 1998).

Além disso, também atuam como antioxidantes não enzimáticos substâncias exógenas como a vitamina E e o  $\beta$ -Caroteno (FREI, 1994).

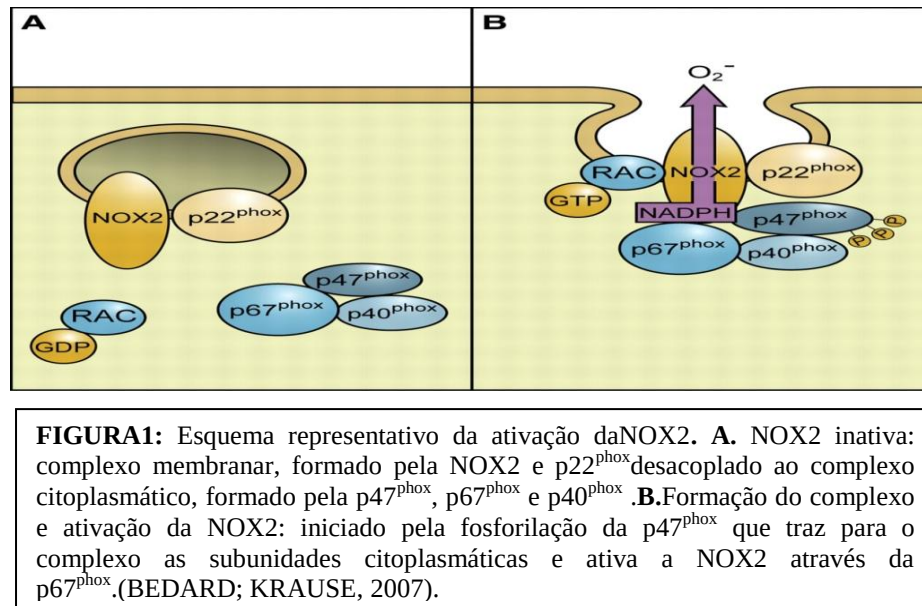
Na célula, as principais fontes de ROS incluem: as mitocôndrias (LOO *et al.*, 2011), a xantina óxido-redutase (BOUEI *et al.*, 2008), e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase ou NOX). Esta última tem como única função a produção de ROS (RADERMACH *et al.*, 2012).

### 2.2.1. NADPH oxidase

A NADPH oxidase está presente em uma ampla variedade de organismos. O complexo enzimático da NADPH oxidase inclui subunidades catalíticas e eletrotransportadoras. Sua família é constituída por 7 diferentes membros de subunidades catalíticas, que incluem as NOXs 1–5, e as dual oxidases 1–2 (COSO *et al.*, 2012). Essas subunidades possuem diferentes localizações subcelulares, bem como, são expressas e reguladas de forma diferente em vários tecidos (BROWN; GRIENGLING, 2009).

A NOX2, também conhecida como gp91<sup>phox</sup>, é o protótipo da subunidade da NADPH oxidase da membrana plasmática e a maior parte do conhecimento sobre essa enzima é baseado em estudos sobre essa isoforma catalítica (para um maior aprofundamento sobre os papéis fisiológicos e fisiopatológicos da NADPH oxidase ver BEDARD; KRAUSE, 2007). Em humanos, a NOX2 é altamente glicosilada possuindo um peso molecular entre 70 e 90 KDa, possui 6 domínios transmembranares, e suas regiões aminoterminal e carboxiterminal estão inseridas no citoplasma. Quando ativada, a NOX2 está ligada à proteína integral de membrana, p22<sup>phox</sup>, e às subunidades citoplasmáticas, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> e p40<sup>phox</sup>. Na Figura 1 é apresentado o processo de ativação da NOX2, que é iniciado pela fosforilação da subunidade citoplasmática p47<sup>phox</sup>, que permite sua interação com a subunidade de membrana p22<sup>phox</sup>. A p47<sup>phox</sup> traz para o complexo as subunidades citoplasmáticas p67<sup>phox</sup> e p40<sup>phox</sup>. Uma vez que o complexo é formado, a p67<sup>phox</sup> permite a ativação do domínio catalítico da NOX2. O funcionamento desse complexo enzimático também é dependente de uma GTPase, a RAC1, que fornece a energia necessária para a produção de superóxido. A geração de superóxidos pela NOX2 ocorre através da transferência de elétrons para o citosol (BEDARD; KRAUSE, 2007).





A produção de ROS proveniente da ativação da NOX2 está envolvida na patogênese de diversas doenças. No sistema nervoso central, sua ativação participa da fisiopatologia de doenças neurodegenerativas, como as deficiências cognitivas relacionadas ao envelhecimento, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (CAHILL-SMITH; LI, 2014). A síndrome cardiorenal pode ser iniciada pelo aumento do estresse oxidativo proveniente da ativação da NOX2 no rim e no coração (RUBATTU *et al.*, 2013). Além disso, a ativação da NOX2 também está envolvida em perturbações do ambiente intrauterino (XIAO *et al.*, 2013).

### 2.2.2. Estresse oxidativo e a gestação

O período gestacional é um evento associado a um aumento fisiológico do estresse oxidativo na região uterina (MARSEGLIA *et al.*, 2014). As ROS têm o papel fisiológico de atuar como molécula de sinalização para induzir a transcrição de genes responsáveis pela diferenciação e proliferação de vários tipos de células durante o desenvolvimento fetal (BURTON, 2009). Por outro lado, o feto apresenta uma baixa capacidade antioxidante (THOMPSON; AL-HASAN, 2012), portanto, é preciso um balanço muito preciso entre produção de ROS e a defesa antioxidante, para que ocorra o desenvolvimento fetal adequado.

O estresse oxidativo pode ser prejudicial tanto na fase de fertilização, quanto nos diversos estágios gestacionais. Gametas femininos e masculinos são extremamente

vulneráveis à ação de moléculas oxidantes (RUDER *et al.*, 2008; AITKEN; DE IULIIS, 2010): por exemplo, a redução da fertilidade masculina tem sido associada a danos no DNA espermático provocados pelo estresse oxidativo (AITKEN; DE IULIIS, 2010). O estresse oxidativo também pode promover alterações epigenéticas no feto. Já foi demonstrado que ROS podem induzir acetilação em resíduos de histona, correlacionados com aumento da expressão da subunidade p65 do fator nuclear kappa B (NF-kB) em células endoteliais aórticas, e desse modo, ativam vias inflamatórias relacionadas a programação da hipertensão, diabetes e de outros componentes da síndrome metabólica, na vida adulta (EL-OSTA *et al.*, 2008).

Além disso, estudos demonstram que ROS provenientes da NADPH oxidase promovem má adaptação da circulação uteroplacentária durante a gestação (XIAO *et al.*, 2013) e estão envolvidas em eventos adversos que podem induzir alta morbidade ao feto, como pré-eclâmpsia (JAUNIAUX *et al.*, 2000). A transferência de oxigênio para o feto é fundamental para o seu desenvolvimento, que pode, dessa forma, ser impactado negativamente por situações de hipóxia. A elevação inadequada do estresse oxidativo na placenta, e a consequente alteração de sua perfusão sanguínea, estão relacionados com restrição do crescimento fetal (PEUCHANT *et al.*, 2004). Outros dados da literatura, demonstram que neonatos com baixo peso ao nascimento apresentam deficiências significantes na sua defesa antioxidante (HRACSKO *et al.*, 2008). Além disso, há associação entre o perfil do estresse oxidativo intrauterino, baixo peso ao nascimento e desenvolvimento de hipertensão (PAIXÃO; ALEXANDER, 2013) e diabetes (SIMMONS, 2006) na vida adulta. Portanto, o estresse oxidativo está intimamente relacionado com a programação intrauterina de doenças na idade adulta. Além disso, o estresse oxidativo placentário também tem sido associado a abortos espontâneos e malformações congênitas (POSTON *et al.*, 2011).

O mecanismo pelo qual o estresse oxidativo induz alteração da perfusão placentária está relacionado ao desequilíbrio entre dois metabólitos do ácido araquidônico, o tromboxano e a prostaciclina. O estresse oxidativo estimula a síntese de tromboxano, que é um vasoconstritor, e ao mesmo tempo inibe a síntese de prostaciclina, que é um vasorrelaxante. Essa alteração diminuiu o fluxo sanguíneo uteroplacentário e compromete a nutrição fetal (WALSH, 2004). É possível também que o elevado estresse oxidativo determine diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico na circulação placentária (YU *et al.*, 2012), o que amplificaria o quadro de vasoconstrição.

Além disso, o fluxo sanguíneo uteroplacentário é determinado pela presença de diversos fatores angiogênicos, que podem ser impactados pelo estresse oxidativo. Por

exemplo, alterações da perfusão placentária na pré-eclâmpsia estão correlacionadas com diminuição da produção do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e vasculogênese alterada (CINDROVA-DAVIES, 2014). A suplementação materna com antioxidantes gera efeitos benéficos sobre a diminuição do estresse oxidativo, bem como, é capaz de estimular a produção desse fator angiogênico e de recuperar a vasculogênese placentária, na pré-eclâmpsia (CINDROVA-DAVIES, 2014).

### **2.3. Placenta e fatores angiogênicos**

A placenta é o eixo de ligação entre a circulação materna e fetal. Ela mantém a homeostase fetal, realizando diversas funções fisiológicas que mais tarde serão exercidas pelo trato gastrointestinal, rim, pulmão e sistema endócrino. As principais funções da placenta são proporcionar uma barreira imunológica ao feto, mediar a transferência de oxigênio, água e alimentos, e produzir e secretar hormônios, citocinas e moléculas de sinalização (JANSSON; THERESA, 2007). As necessidades metabólicas fetais aumentam ao longo da gestação. Os ajustes placentários necessários para suprir essas necessidades ocorrem a nível das vilosidades vasculares placentárias, garantindo assim, a sustentação e o bem-estar do crescimento fetal (CHADDHA *et al.*, 2004).

No início do desenvolvimento placentário, citotrofoblastos extravilosos invadem a artéria espiral uterina da decídua e do miométrio. Essas células fetais invasivas substituem a camada endotelial dos vasos uterinos, transformando-os a partir de vasos de pequena resistência a vasos de capacitância de alto calibre (MAYNARD; KARUMANCHI, 2011). Em humanos, a vilosidade vascular começa a ser formada a partir do 13º dia pós-concepção. Em torno do 32º dia pós-concepção, as vilosidades são invadidas por um mesênquima embrionário que se diferencia em células endoteliais e em células estromais. A partir dessas células, é montada uma rede vascular central que se conecta com o sistema circulatório embrionário. Na 26ª semana de gestação, o desenvolvimento vascular entra na fase final, ocorrendo angiogênese sem ramificação, caracterizada pelo crescimento longitudinal dos capilares superiores (MURTHI *et al.* 2014). Essa adaptação vascular placentária é indispensável para uma adequada relação entre mãe, placenta e feto, ao longo de todo período gestacional.

O controle da vasculogênese e angiogênese é realizado por moléculas pró e antiangiogênicas. Dentre os fatores angiogênicos que participam da angiogênese placentária estão o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento placentário

(PlGF) e o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) (DAKOUANE-GIUDICELLI *et al.*, 2014).

O VEGF é o regulador primário da angiogênese tanto em condições normais, como também em condições patológicas como na cicatrização de feridas, isquemia coronária e crescimento tumoral. Esse fator estimula a permeabilidade vascular bem como a produção e migração de proteases nas células endoteliais (REYNOLDS; REDMER, 2001). Especificamente na placenta, o VEGF regula o crescimento, a vasodilatação e o remodelamento vascular. As ações celulares ativadas pelo VEGF são mediadas pelos receptores VEGFR1 (também denominado receptor fms-like tyrosine kinase-1, Flt-1), VEGFR2 e VEGFR 3 (GOEL; MERCURIO, 2013).

Durante o desenvolvimento vascular placentário, também ocorre a produção de fatores antiangiogênicos como, o fator plaquetário 4 (PF4), o fator de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ), a angiostatina, a endostatina, entre outros (CAPPET *et al.*, 2009). Para que o desenvolvimento vascular placentário ocorra de forma normal, é fundamental que haja um balanço adequado da produção desses fatores antiangiogênicos e dos fatores pró-angiogênicos, principalmente no início da gestação (CAPPET *et al.*, 2009).

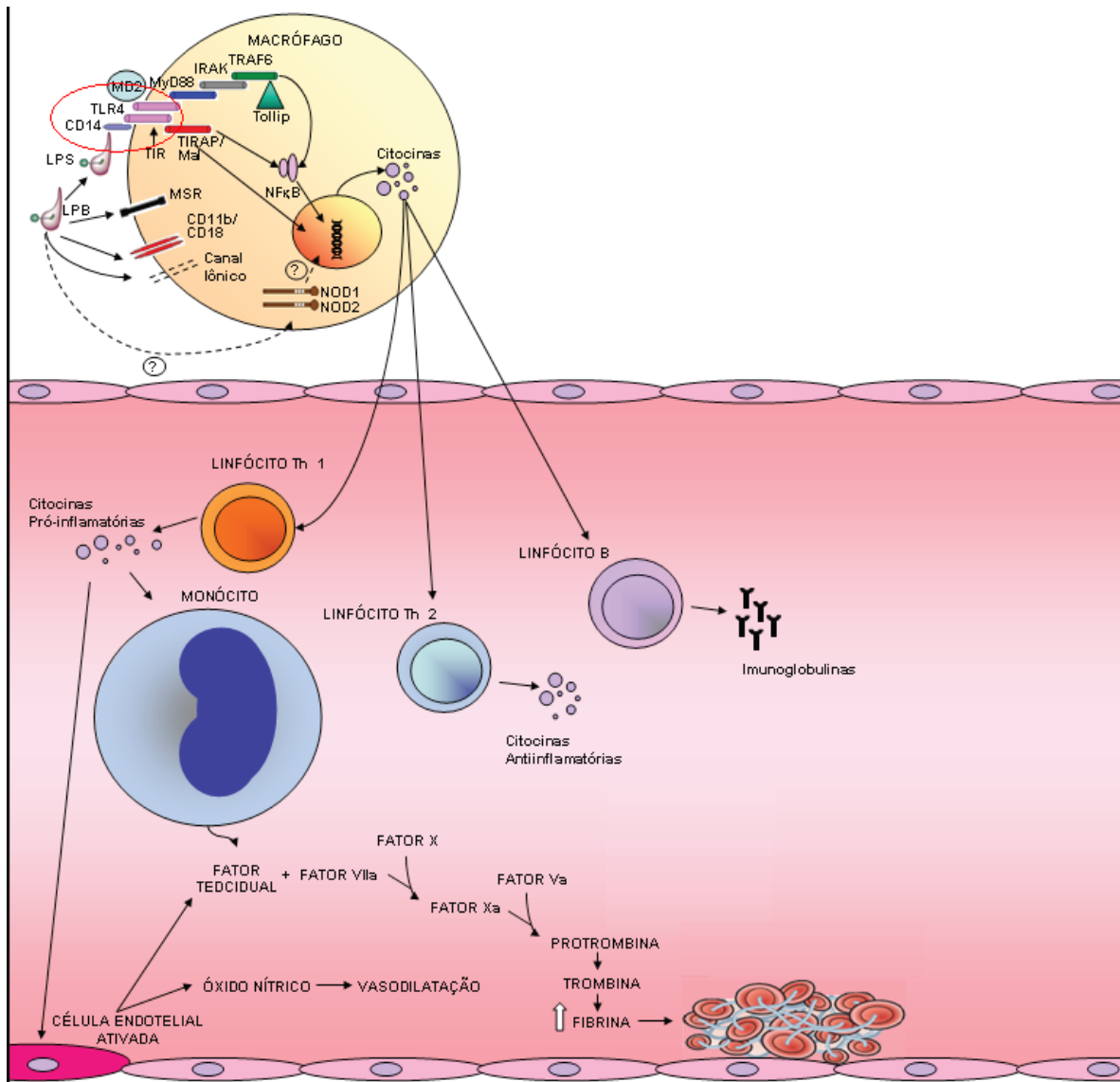
Como ressaltado anteriormente, a pré-eclâmpsia representa um evento materno associado a alterações da perfusão placentária decorrentes de menor produção do VEGF (CINDROVA-DAVIES, 2014). Por outro lado, mulheres que apresentam diabetes mellitus gestacional também apresentam menor expressão do VEGF, e seus receptores, na placenta, bem como apresentam alteração na maturação placentária (MADAZLI *et al.*, 2008). Apesar do VEGF ser essencial para o desenvolvimento embrionário normal, nem sempre a sua expressão aumentada representa um benefício ao feto. Estudos recentes demonstram que a elevação dos níveis de VEGF no início da gestação pode provocar danos vasculares placentários graves e induzir alguns sintomas característicos da pré-eclâmpsia (FANET *et al.*, 2014).

Portanto, eventos adversos que afetam o período gestacional podem promover retardo do desenvolvimento fetal através da elevação do estresse oxidativo e de perturbações na angiogênese placentária. A inflamação no ambiente materno representa um evento adverso capaz de induzir ambos, elevação do estresse oxidativo e disfunção na angiogênese placentária (ANDRAWEEA *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2008).

## 2.4. Inflamação

A inflamação é definida como uma resposta protetora do nosso organismo que é iniciada por uma lesão celular e tem como objetivo final livrar o organismo do agente causador e das consequências desta lesão (ABBAS, 2010). A fase inicial da resposta inflamatória é coordenada pela resposta imune inata e dura geralmente minutos ou horas. Essa fase envolve a detecção do patógeno pelas células imune residentes, principalmente macrófagos, células dendríticas, mastócitos e neutrófilos (SPITSet *al.*, 2013). Essas células reconhecem o patógeno principalmente através dos receptores Toll-Like (TLR) e CD14. A ativação desses receptores gera uma cascata de eventos levando a translocação nuclear do NF- $\kappa$ B que é fator responsável pela expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) e anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) (HENKINet *al.*, 2009). Essas citocinas ativam a resposta imune adaptativa que tem um tempo de atuação entre dias e semanas. Nessa fase, cria-se uma resposta específica dependendo do contexto em que os antígenos são apresentados, ou seja, depende da natureza do patógeno (HARDY *et al.*, 2007). Os linfócitos B são responsáveis pela liberação das imunoglobulinas, facilitando a apresentação do antígeno a células fagocitárias, enquanto os linfócitos T secretam citocinas pró-inflamatórias promovendo um feedback positivo, bem como, secretam interleucinas anti-inflamatórias (RUSSEL, 2006).

Citocinas pró-inflamatórias também ativam neutrófilos e aumentam a expressão de moléculas de adesão celular nos leucócitos e em células endoteliais. Porém, a ativação de neutrófilos não só promove a imobilização e destruição do patógeno, como também aumenta a permeabilidade vascular com consequente edema, enquanto que células endoteliais ativadas liberam óxido nítrico que é um potente vasodilatador. Além disso, a inflamação também atua na cascata de coagulação, que é iniciada através da ativação do fator tecidual na superfície de células endoteliais e monócitos. Embora tenha um papel importante na homeostasia, a coagulação intravascular impede a chegada de oxigênio ao tecido e isso pode agravar o processo inflamatório (HENKINet *al.*, 2009). A Figura 2 ilustra o processo de ativação da resposta inflamatória.



**FIGURA 2:** Ativação da resposta inflamatória induzida pelo LPS. A resposta inflamatória é iniciada pelos receptores TLR e CD14, esses receptores desencadeiam uma cascata de eventos, levando a translocação do NF- κB e a produção de citocinas inflamatórias. Essas citocinas vão ativar linfócitos, neutrófilos, e moléculas de adesão celular, assim como também atua na cascata de coagulação (adaptado de HENKIN *et al.*, 2009).

Um dos fatores que desencadeia respostas inflamatórias é o lipopolissacarídeo (LPS), um componente importante da membrana externa da maioria das bactérias gram-negativas. Pequenas quantidades de LPS no sangue, proveniente de infecções bacterianas, são suficientes para induzir uma potente resposta inflamatória (RHEE, 2014). Inicialmente o LPS se liga a uma glicoproteína produzida pelo fígado do hospedeiro, o LBP (do inglês *Lipopolysaccharidebindingprotein*). O complexo LPS-LBP entra em contato com o receptor CD14 de macrófagos, e este por sua vez, facilita a transferência do LPS-LBP para ativação do TLR4, que inicia a geração do sinal transmembranar responsável pela síntese de citocinas pró-inflamatórias (KIRSTEN, 2008).

O processo inflamatório e a reparação podem ser prejudiciais em algumas situações. Um bom exemplo são as reações de hipersensibilidade secundárias a efeitos de picaduras de insetos, fármacos e outras substâncias tóxicas. A produção de fatores pró-inflamatórios também podem estimular a produção de fatores pró-fibróticos. As reparações mediante fibrose podem afetar órgãos específicos produzindo obstrução e disfunções (ABBAS, 2010).

Diversos estudos já evidenciaram o papel prejudicial da resposta inflamatória induzida por LPS. Lesão pulmonar aguda (YUANet *al.*, 2014), neurotoxicidade (KIMet *al.*, 2014), hipertrofia cardíaca (MAGIet *al.*, 2014) e injúria renal (CASTELLANOet *al.*, 2014) são alguns dos prejuízos provocados pela administração do LPS. A inflamação também pode prejudicar o desenvolvimento da gestação e promover modificações no crescimento fetal (COTECHINIet *al.*, 2014).

#### 2.4.1. Inflamação e a gestação

Do ponto de vista imunológico, o desenvolvimento da gestação só é possível graças à ativação de uma rede imunorregulatória que tem como objetivo desenvolver um estado de tolerância materno-fetal e permitir a implantação e manutenção do embrião/feto até que tenham condições de sobrevivência fora do útero. Entre os fatores envolvidos nessa rede imunorregulatória, destacam-se a progesterona, a expressão diferenciada do antígeno leucocitário humano (HLA) pelas células trofoblásticas, o controle da citotoxicidade direta das células Natural Killer uterinas (uNK) e a atividade das células T regulatórias (T reg) (MICHELONet *al.*, 2006).

Infecções maternas são motivos de preocupação durante a gestação porque induzem um processo inflamatório e podem interferir nessa rede imunorregulatória (RASHEED, 1994). Além disso, apesar do patógeno, em si, não ultrapassar a barreira placentária, o processo inflamatório estimulado impacta o ambiente fetal (ASHDOWet *al.*, 2006): a produção de citocinas pró-inflamatórias induzidas pelo patógeno no soro materno está correlacionada com o aumento dessas citocinas no líquido amniótico e na circulação fetal (BELLOSESKYet *al.*, 2006). As citocinas possuem um papel importante no desenvolvimento normal da gestação, participando do processo de implantação, placentação, ativação uterina e amadurecimento cervical (VIANNA, 2009), porém, na presença de infecção materna, a dinâmica entre essas

citocinas é alterada e há uma elevação da produção de citocinas pró-inflamatórias, que podem induzir um retardo do desenvolvimento fetal (ORSI; TRIBE, 2008).

Estudos já demonstraram que a administração experimental de LPS em animais gestantes pode promover reabsorção embrionária (AISEMBERG *et al.*, 2007), partos prematuros (OLGUN *et al.*, 2014), prejuízos ao desenvolvimento cerebral do feto (OSKVIG *et al.*, 2012), doenças fetais intrauterinas (XU *et al.*, 2007), bem como, induzir efeitos teratogênicos (ZHAO *et al.*, 2008). Xu *et al.* (2007) demonstraram que as doenças fetais intrauterinas induzidas pela inflamação estavam correlacionadas com o aumento dos níveis de TNF- $\alpha$  e elevação do estresse oxidativo, da mesma forma, que Zhao *et al.* (2008) correlacionou os efeitos teratogênicos fetais ao aumento do estresse oxidativo, tanto na placenta, quanto no feto. Dessa forma, fica claro que há o envolvimento do estresse oxidativo nos prejuízos fetais induzidos pela inflamação materna.

Apesar de já ter sido evidenciada a correlação entre a inflamação materna, o estresse oxidativo e o retardo do crescimento intrauterino (ZHAO *et al.*, 2014), a repercussão da inflamação materna na programação intrauterina ainda é pouco compreendida, principalmente nos aspectos relacionados a função renal e a regulação da pressão arterial.

## 2.5. Função renal

As principais funções do rim são: a) manter o equilíbrio hídrico e eletrolítico do corpo (BONNY *et al.*, 2013); b) promover o balanço ácido-base; c) excretar restos metabólicos (LAYTON, 2012); d) regular a pressão arterial sanguínea (IVY; BAILEY, 2014); e) regular a produção de células vermelhas do sangue (NAGAI *et al.*, 2014); e f) regular o metabolismo ósseo através da produção de vitamina D ativa (WHITE, 2012).

O tecido renal desempenha parte dessas funções através da formação da urina, cuja etapa inicial depende da filtração glomerular, que por sua vez, é dependente, dentre outros fatores, do fluxo sanguíneo renal e da resistência das arteríolas aferente e eferente (AIRES, 2008). Além disso, o processo normal de filtração glomerular é dependente da seletividade da barreira de filtração glomerular à passagem de proteínas plasmáticas de alto peso molecular, como a albumina (AIRES, 2008).

Desse modo, uma das maneiras da função renal ser quantificada é através da avaliação do ritmo de filtração glomerular (RFG). O RFG normal em homens é de aproximadamente  $130 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ , e em mulheres  $120 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ , contudo, esses valores variam de acordo com



o tamanho do rim e massa corporal, e além disso, a variação diurna, a ingestão de proteínas e o exercício físico também alteram o RFG (SANDILANDS *et al.*, 2013). O padrão ouro para determinar o RFG é o clearance da inulina, porém esse método exige um procedimento complexo para sua utilização. Na rotina clínica, o método mais utilizado para medir o RFG é o clearance de creatinina (CURRIE; DELLES, 2014a).

Outra maneira de avaliação da função renal consiste na mensuração da excreção de proteína na urina, que serve como indicador de lesão glomerular (CURRIE *et al.*, 2014b). Danos a nível glomerular aumentam a permeabilidade renal para proteínas plasmáticas, resultando em maior excreção de proteínas na urina. A proteinúria tem sido utilizada não só como um marcador de doença renal, mas também como preditor de morbimortalidade cardiovascular (HILLEGEE *et al.*, 2002). Seu aumento pode ser um fator de risco independente de alterações do RFG (TONELLI *et al.*, 2011). Portanto, a avaliação da doença renal envolve principalmente a quantificação do RFG, bem como, a quantificação de proteína excretada na urina. A maior importância de um ou de outro achado depende do contexto clínico (POLKINGHORNE, *et al.*, 2014).

Um dos fatores que podem comprometer a função renal em adultos são alterações que acontecem ainda na nefrogênese. Em 2005, Luyckx e Brenner mostraram que a redução do número de néfrons durante a nefrogênese, inicialmente, não prejudicaria a taxa de filtração glomerular. Esse efeito seria decorrente de respostas compensatórias que consistem em expansão da área de superfície glomerular dos néfrons (hipertrofia glomerular) e hiperfiltração glomerular (LUYCKX; BRENNER, 2005). Contudo, essa resposta adaptativa torna-se prejudicial com o tempo, porque a hiperfiltração glomerular perturba o mecanismo de autorregulação renal, gera hipertensão intraglomerular, ativa processos inflamatórios e fibróticos, e finalmente, induz lesão da barreira de filtração glomerular e proteinúria (HELAL *et al.*, 2012). Esses eventos induzem retenção de sódio, e consequentemente, hipertensão arterial.

Embora a nefrogênese em humanos inicie por volta da 9ª semana, 60% dos néfrons são formados no terceiro trimestre de gestação. A completa formação dos néfrons acontece por volta da 36ª semana, e estes néfrons permanecem durante toda a vida (CARMODY; CHARLTON, 2013). Já nos roedores, a nefrogênese continua a ocorrer após o nascimento, até aproximadamente 2 semanas de vida (LASAITIENE *et al.*, 2006).

Mesmo em indivíduos saudáveis, o número de néfrons funcionais diminui gradualmente ao longo do tempo, o que acarreta em diminuição gradual do RFG. Porém, quando a nefrogênese é comprometida, os néfrons perdem sua função mais rapidamente

(CARMODY;CHARLTON, 2013). Além da redução do número de néfrons, condições adversas durante a nefrogênese podem programar eventos moleculares tais como: mudanças no transporte tubular de sódio e aumento do estresse oxidativo renal (PAIXÃO; ALEXANDER, 2013).

#### 2.5.1. Estresse oxidativo renal

A disfunção renal é frequentemente associada com níveis elevados de estresse oxidativo (CACHOFEIRO *et al.*, 2008). Alguns fatores que induzem o aumento do estresse oxidativo renal são a isquemia-reperfusão (CANBEK *et al.*, 2014) e a sepse (PINTO *et al.*, 2012). Também tem sido demonstrado um aumento do estresse oxidativo renal em animais que foram submetidos a diferentes modelos de insultos intrauterinos, como má-nutrição materna (MAGALHÃES *et al.*, 2006) e insuficiência placentária (OJEDA *et al.*, 2007).

A geração de ROS no rim geralmente acontece em respostas a estímulos da angiotensina II (Ang II) (GORIN *et al.*, 2004) e aldosterona (MIYATA *et al.*, 2005) sobre a NADPH oxidase. No rim, ROS tem papel fisiológico na regulação da hemodinâmica renal e na modulação da função tubular. Na regulação do fluxo sanguíneo renal, ROS podem atuar limitando a ação vasorrelaxante óxido nítrico (NO) (WILCOX, 2003), ou ainda, através de efeitos diretos, aumentando a resistência das arteríolas renais (MEYER *et al.*, 2014). Por outro lado, o excesso de ROS ainda pode induzir transição epitélio-mesenquimal (EMT) (YOSHIKAWA *et al.*, 2007), apoptose de células mesangiais (LODHA *et al.*, 2002), hipertrofia celular (GORIN *et al.*, 2004) e aumento da reabsorção tubular de sódio (FENG *et al.*, 2012).

O estresse oxidativo ativa fatores pró-fibróticos e pró-inflamatórios, dentre eles o TGF- $\beta$ . O TGF- $\beta$  está envolvido no processo de apoptose das células mesangiais (LODHA *et al.*, 2002), e também é o indutor da EMT, principal responsável pela fibrose renal (YOSHIKAWA *et al.*, 2007). A EMT é caracterizada pela perda de células epiteliais e aumento dos miofibroblastos que induzem fibrose renal pela produção excessiva de matriz extracelular (IWANO *et al.*, 2002). Essas repercussões das ROS sobre a função do tecido renal confirmam a hipótese de que o estresse oxidativo renal é um potente fator na indução da hipertensão (PAIXÃO; ALEXANDER, 2013).

## 2.6. Hipertensão, disfunção renal e programação intrauterina

A hipertensão arterial é uma doença crônica grave que representa a principal causa de morbimortalidade em todo o mundo (CHOBANIAN *et al.*, 2011). Ela tem sido associada com diversas complicações fatais na maioria dos sistemas do organismo (KANNEl 2000). A sua natureza é complexa e multifatorial, envolvendo fatores genéticos, fisiológicos e ambientais. Muitas alterações funcionais podem contribuir para a elevação da pressão arterial como: o aumento do débito cardíaco e da resistência periférica (JULIUS *et al.*, 1971); diminuição da produção e/ou responsividade de vasodilatadores (GILES *et al.*, 2012); inflamação e reações imunológicas (MULLER *et al.*, 2001); elevação do estresse oxidativo (PAIXÃO; ALEXANDER, 2013); ativação do sistema nervoso simpático (ZUBCEVIC *et al.*, 2011); ativação do SRAA (SAVOIA *et al.*, 2011) e disfunção renal (SINGH *et al.*, 2010).

O envolvimento do estresse oxidativo na hipertensão tem sido largamente investigado. Estudos com pacientes hipertensos e com modelos animais de hipertensão demonstram uma associação entre a hipertensão e o excesso de ROS no ambiente vascular (TOUYZ 2004), assim como, uma diminuição da defesa antioxidante (BRIONES; TOUYZ, 2010). Terapias antioxidantes tem sido eficazes na normatização da pressão arterial (HAMZA; DYCK, 2014).

A função renal e a pressão arterial estão claramente correlacionadas, tanto em condições fisiológicas, quanto patológicas. Cerca de 80% dos pacientes com doença renal crônica desenvolvem hipertensão (SANTOS *et al.*, 2012), bem como, a hipertensão é o maior fator de risco para a progressão da doença renal (PALM; NORDQUIST, 2011). O risco de desenvolvimento de doença renal crônica também tem sido correlacionada como baixo peso ao nascimento (KAZANCIOĞLU *et al.*, 2013). Diferentes modelos de perturbação intrauterina, como a diabetes materna, a obesidade materna e a exposição fetal a drogas podem alterar a nefrogênese e prejudicar a função renal em longo prazo (HSU *et al.*, 2014; YAN *et al.*, 2014; ZAFFANELLO *et al.*, 2010). A disfunção renal, por sua vez, vai aumentar os riscos de desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares.

Múltiplas alterações renais podem contribuir para o desenvolvimento e estabelecimento da hipertensão arterial, dentre elas podemos chamar atenção para diminuição do RFG, aumento da reabsorção tubular de sódio e aumento do estresse oxidativo tissular.

Todas essas alterações renais podem ser programadas durante o desenvolvimento fetal em condições adversas (PAIXÃO; ALEXANDER, 2013), e assim, fazerem parte da etiologia da hipertensão induzida no ambiente intrauterino. Por exemplo, a diminuição do RFG proveniente de alterações no SRA (CROWLEY; COFFMAN, 2012); o aumento da reabsorção tubular de sódio proveniente de uma maior ativação das bombas de sódio ( $\text{Na}^+ + \text{K}^+$ )-ATPase e  $\text{Na}^+$ -ATPase na membrana apical (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2009); e a elevação do estresse oxidativo renal (Biet *et al.*, 2014) são eventos que podem ser programados intrauterinamente. Terapias antioxidantes também têm sido eficazes na normatização da pressão arterial através de recuperação da disfunção renal provocada por ROS (HAMZA; DYCK, 2014).

Tendo em vista que o estresse oxidativo desempenha um papel fundamental na programação intrauterina de doenças cardiorrenais, agentes antioxidantes, como a vitamina E, podem ser fundamentais na prevenção de alterações renais e hipertensão programadas durante o desenvolvimento fetal.

## 2.7. Vitamina E

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel e é considerada como elemento nutricional essencial. Ela é, provavelmente, o mais antigo antioxidante conhecido. A vitamina E é encontrada em muitos alimentos, e suas principais fontes são: soja, amendoim, algodão, girassol, ervilhas, grão de bico, lentilhas, trigo, aveia, arroz integral, manteiga e ovo (RODRIGUES, 1997).

O termo vitamina E não representa um único composto, ele engloba oito substâncias diferentes, as quais pertencem a dois grupos de compostos lipossolúveis. O primeiro grupo é derivado do tocol e apresenta uma cadeia lateral saturada contendo 16 átomos de carbono. Esse grupo inclui o  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol e o  $\delta$ -tocoferol. O segundo grupo de substâncias com atividade biológica são derivadas do tocotrienol apresentando uma cadeia lateral insaturada contendo 16 átomos de carbono, e inclui o  $\alpha$ -tocotrienol, o  $\beta$ -tocotrienol, o  $\gamma$ -tocotrienol e o  $\delta$ -tocotrienol (WANKENNE, 2014). De todos esses compostos, o  $\alpha$ -tocoferol é o que possui a maior atividade biológica (SINGH *et al.*, 2005) e é o mais encontrado no organismo (WANG; QUINN, 1999).

Além da função antioxidante, a vitamina E também exerce outras funções no organismo. Por exemplo, ela atua na sinalização celular relacionada a proteína kinase C

(PKC) (COOK-MILLS, 2013): o  $\alpha$ -tocoferol inibe a proliferação de células musculares lisas diminuindo a atividade da PKC. A vitamina E também atua na infertilidade, prevenindo a perda de espermatozoides em homens e a incapacidade de retenção do zigoto em mulheres (BRIGELIUS-FLOHE; TRABER, 1999). Adicionalmente, essa vitamina possui função na estabilização das estruturas de membranas (WANG; QUINN, 1999), através da formação de complexos com moléculas desestabilizantes, como lisofosfatidil colina e ácido palmítico, na estrutura da membrana plasmática, o que garante a manutenção das características anfipáticas e prevenção de lesões na membrana. Outras ações da vitamina E incluem: regulação da atividade de proteínas que contêm o grupamento heme (NAIR, 1972); ação moduladora da resposta imunológica (WANG; QUINN, 1999); proteção de proteínas que contêm selênio (CAYGILL *et al.*, 1971); e participação na cadeia transportadora de elétrons (NASON; LEHMAN, 1956).

A ação antioxidante da vitamina E se baseia no sequestro de superóxidos (LIEBLER *et al.*, 1993) de forma rápida e não enzimática, bem como, na diminuição da expressão da NADPH oxidase e aumento da atividade da enzima superóxido dismutase (CHEN *et al.*, 2001).

No processo inflamatório, o  $\alpha$ -tocoferol regula os níveis de ROS e a PKC, que participam da transdução de sinais responsáveis pela ativação de moléculas de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), uma das moléculas de adesão responsáveis pelo recrutamento de leucócitos (COOK-MILLS, 2013). Além disso, o  $\alpha$ -tocoferol, através da sua ação antioxidante, impede que altos níveis de superóxidos, gerados por granulócitos e monócitos, causem danos teciduais (COOK-MILLS; MCCARY, 2010).

Em relação a programação intrauterina, já foi visto que a suplementação com vitamina E durante a gestação produziu efeitos benéficos sobre angiogênese placentária (KASIMANICKAM *et al.*, 2012). Dados do nosso laboratório mostraram que tratamento materno com  $\alpha$ -tocoferol, em fêmeas submetidas a desnutrição intrauterina durante a gestação, previne a elevação do estresse oxidativo placentário (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2011a,b) e reprograma alterações renais e hipertensão arterial na vida adulta programadas pelo estresse oxidativo materno (VIEIRA-FILHO *et al.*, 2014).

Com base nas evidências supramencionadas, processos inflamatórios que ocorram durante o período gestacional podem perturbar a função placentária, promover retardo do desenvolvimento fetal e programar hipertensão na vida adulta. A elevação do estresse oxidativo pode estar envolvido tanto no mecanismo do retardo do desenvolvimento do feto como no desenvolvimento da doença crônica na vida adulta e pode depender de alterações na

produção de espécies reativas do oxigênio dependente da NADPH oxidase. Além disso, é provável que um tratamento antioxidante sirva como abordagem preventiva dessas alterações.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Investigar, em ratos, se processos inflamatórios durante a gestação promovem retardo do desenvolvimento fetal e programam hipertensão na prole adulta, bem como, se a elevação do estresse oxidativo na placenta e no rim adulto está envolvido nessas alterações. Além disso, investigar se a administração materna de  $\alpha$ -tocoferol é capaz de prevenir as alterações induzidas/programadas pela inflamação.

#### 3.2. Específicos

- a) Avaliar se a administração de LPS, em ratas prenhes, induz retardo do desenvolvimento fetal, através de avaliações ponderais.
- b) Avaliar se a administração de LPS, em ratas prenhes, eleva o estresse oxidativo na placenta, no fígado materno e no fígado do feto.
- c) Avaliar se a administração de LPS, em ratas prenhes, induz elevação dos níveis pressóricos nos descendentes machos adultos.
- d) Avaliar se a administração de LPS, em ratas prenhes, induz elevação do estresse oxidativo renal nos descendentes machos adultos.
- e) Avaliar, em ratos, se o tratamento materno com  $\alpha$ -tocoferol previne os efeitos da administração materna de LPS sobre o desenvolvimento fetal, bem como, sobre as alterações do estresse oxidativo renal e níveis pressóricos induzidas nos descendentes machos adultos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. Inflamação aguda e crônica. In: ROBBINS & COTRAN. *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010, p. 43-78.
- AIRES, M.M. Hemodinâmica Renal. In: AIRES, M.M. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2008, p. 708-729.
- AISEMBERG, J. *et al.* Nitric oxide mediates prostaglandins' deleterious effect on lipopolysaccharide-triggered murine fetal resorption. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.104, n.18, p.7534–7539, 2007.
- AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, v.16, n.1, p.3–13, 2010.
- ALZOGHAIBI M.A. Concepts of oxidative stress and antioxidant defense in Crohn's disease. *World Journal of Gastroenterol*, v. 19, n.39, p. 6540–6547, 2013.
- ANDRAWEERA, P.H. *et al.* The interaction between the maternal BMI and angiogenic gene polymorphisms associates with the risk of spontaneous preterm birth. *Molecular Human Reproduction*, v.18, n.9, p. 459–465, 2012.
- ARMITAGE, M.E. *et al.* Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *Journal of molecular medicine (Berlin)*, v. 87, n.11, p. 1071–1076, 2009.
- ASHDOWN, H. *et al.* The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: Implications for schizophrenia. *Molecular Psychiatry - Nature*, v. 11, n.11, p. 47–55, 2006.
- BARKER, D.J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, v.1, n.1, p.1077–1081, 1986.
- BATESON, P. *et al.* Developmental plasticity and human health. *Nature* v.430, n.6998, p.419–421, 2004.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.H. The NOX Family of ROS Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, v.87, n.1, p.245–313, 2007.



BELOOSESKY, R..et al. N-acetyl cysteine suppresses amniotic fluid and placenta inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide in rats. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 194, n.1, p. 268–273, 2006.

BI, J. et al. Sex-specific effect of antenatal betamethasone exposure on renal oxidative stress induced by angiotensins in adult sheep. *American Journal Physiology Renal Physiology*, v.307, n.11, p.F1013–1022, 2014.

BIRI, A. et al. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, v. 64, n.4, p. 187–192, 2007.

BONNY, O.et al. Molecular bases of circadian rhythmicity in renal physiology and pathology. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.28, n.28, p.2421–2431, 2013.

BOUEIZ, A.; DAMARLA, M.; HASSOUN, P.M. Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders. *TheAmerican JournalofPhysiology - Lung CellularandMolecular Physiology*, v. 294, n.5,p. L830–840, 2008.

BRIGELIUS-FLOHE, R.; TRABER, M.G. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, v.13, n.10, p. 1145–1155, 1999.

BRIONES, A.M.; TOUYZ, R.M. Oxidative stress and hypertension: current concepts. *Current Hypertensive Reproduction*, v. 12, n.2, p. 135–142, 2010.

BROWN, D.I.; GRIENDLING, K.K.NoX proteins in signal transduction. *Free Radical Biology & Medicine*, v.47, n.9, p.1239–1253, 2009.

BROWNE, R.W.; ARMSTRONG, D. Reduced Glutathione and Glutathione Disulfide. *Free Radical and Antioxidant Protocols*, –Springer. v. 108, n.10, p.347-352, 1998.

BURTON, G. J. Oxygen, the Janus gas; its effects on human placental development and function.*Journal of Anatomy*, v. 215, n.1, p. 27–35, 2009.

CACHOFEIRO, V. et al. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney International*, v.74, n.516, p.S4–S9, 2008.

CAHILL-SMITH, S.; LI, J.M. Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.78, n.3, p.441–453, 2014.

CANBEK, M. *et al.* The examination of protective effects of gallic acid against damage of oxidative stress during induced-experimental renal ischemia-reperfusion in experiment. *Bratisl Lek Listy*, v. 115, n.115, p. 557–562, 2014.

CAPP, C. *et al.* The Role of Vascular Endothelial Growth Factor In Tumor. *Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre-HCPA*, v. 29, n.1, p.51–59, 2009.

CARMODY, M.D.; CHARLTON, J.R. Short-Term Gestation, Long-Term Risk: Prematurity and Chronic Kidney Disease. *Pediatrics*, v.131, n.6, p.1168–1179, 2013.

CASTELLANO, G. *et al.* Endothelial dysfunction and renal fibrosis in endotoxemia-induced oliguric kidney injury: possible role of LPS binding protein. *Critical Care*, v.18, n.5, p.520, 2014.

CAYGILL, C.P.; LUCY, J.A.; DIPLOCK, A.T. The effect of vitamin E on the intracellular distribution of the different oxidation states of selenium in rat liver. *Biochemical Journal*, v. 125, n.2, p. 407–416, 1971.

CHADDHA, V. *et al.* Developmental biology of the placenta and the origins of placental insufficiency. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, v.9, n.5, p.357–369, 2004.

CHEN, X. *et al.* Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH-oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension*, v. 38, n.2, p. 606–611, 2001.

CHOBANIAN, A.V. Mixed messages on blood pressure goals. *Hypertension*, v.57, n.1, p.1039–1040, 2011.

CINDROVA-DAVIES, T. The therapeutic potential of antioxidants, ER chaperones, NO and H<sub>2</sub>S donors, and statins for treatment of preeclampsia. *Frontiers in Pharmacology*, v.5, n.1, p.119, 2014.

COOK-MILLS, J.M. Isoforms of Vitamin E Differentially Regulate PKC $\alpha$  and Inflammation: A Review. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, v.4, n.137, p.1000137, 2013.

COOK-MILLS J.M.; MCCARY C.A. Isoforms of Vitamin E Differentially Regulate Inflammation. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders*, v. 10, n.4, p. 348–366, 2010.

COSO, S. *et al.* NADPH Oxidases as Regulators of Tumor Angiogenesis: Current and Emerging Concepts. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 16, n.11, p. 11, 2012.

COSTA, E. B. O.; PACHECO, C. Epigenetics: gene expression regulation at transcriptional level and its implications. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*, v. 34, n.2, p. 125–136, 2013.

COTECHINI, T. *et al.* Inflammation in rat pregnancy inhibits spiral artery remodeling leading to fetal growth restriction and features of preeclampsia. *The Journal of Experimental Medicine*, v.211, n.1, p.165–179, 2014.

CROWLEY, S.D.; COFFMAN, T.M. Recent advances involving the renina angiotensin system. *Experimental Cell Research*, v.318, n.1, p.1049–1056, 2012.

CURRIE, G.; DELLES, C. Proteinuria and its relation to cardiovascular disease. *International Journal of Nephrology and Renovascular Disease*, v.7, n.1, p. 13–24, 2014a.

CURRIE, G.; MCKAY, G.; DELLES, C. Biomarkers in diabetic nephropathy: Present and future. *World Journal of Diabetes*, v. 5, n.6, p. 763–76, 2014b.

DAKOUANE-GIUDICELLI, M.; ALFAIDY, N.; MAZANCOURT, P. Netrins and Their Roles in Placental Angiogenesis. *BioMed Research International*, v. 2014, n.1, p.7, 2014.

EL-OSTA, A. *et al.* Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia. *Journal Experimental Medicine*, v.205, n.10, p.2409–2417, 2008.

FAN, X. *et al.* Endometrial VEGF induces placental sFLT1 and leads to pregnancy complications. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n.11, p.4941–4952, 2014.

FENG, D. *et al.* Increased expression of NAD(P)H oxidase subunit p67(phox) in the renal medulla contributes to excess oxidative stress and salt-sensitive hypertension. *Cell Metabolic*, v.15, n.1, p. 201–208, 2012.

FOWDEN, A.L.; GIUSSANI, D.A.; FORHEAD, A.J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology*, v. 21, n.1, p. 29–37, 2006.

FREI B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *American Journal of Medicine*, v.97, n.3, p. 5S–13S, 1994.

GILES, T.D. *et al.* Impaired Vasodilation in the Pathogenesis of Hypertension: Focus on Nitric Oxide, Endothelial-Derived Hyperpolarizing Factors, and Prostaglandins. *The Journal of Clinical Hypertension*, v. 14, n.4, p. 198–205, 2012.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v.15, n.4, p.183–187, 2004.

GOEL, H.L.; MERCURIO, A.M. VEGF targets the tumour cell. *Nature reviews. Cancer*, v.13, n.1, p. 871–882, 2013.

GORIN, Y. *et al.* Angiotensin II induced ERK1/ERK2 activation and protein synthesis are redox dependent in glomerular mesangial cells. *Biochemical Journal*, v.381, n.1, p.231–239, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochemical Society Transactions*, v. 24, n.4, p.1023–7, 1996.

HAMZA, S.M.; DYCK, J.R.B. Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol. *Frontiers in Physiology*, v. 5, n.1, p.292, 2014.

HARDY, R.R.; KINCADE, P.W.; DORSHKIND, K. The protean nature of cells in the B lymphocyte lineage, *Immunity*, v. 26, n.6 p.703–714, 2007.

HELAL, I. *et al.* Glomerular hyperfiltration: definitions, mechanisms and clinical implications. *Nature Reviews Nephrology*, v.8, n.1, p. 293–300, 2012.

HENKIN, C.S. *et al.* Sepsis: uma visão atual. *Scientia Medica*, v. 19, n.3, p. 135–145, 2009.

HESHMATI, A.; KOUPII, L. Placental weight and foetal growth rate as predictors of ischaemic heart disease in a Swedish cohort. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, v.5, n.3, p.164–70, 2014.

HILLEGE, H.L. *et al.* Urinaryalbuminexcretionpredictscardiovascular and noncardiovascular mortality in generalpopulation. *Circulation*, v.106, n.14, p. 1777–1782, 2002.

HRACSKO, Z. *et al.* Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intra-uterine growth retardation. *Redox Report*, v. 13, n.1, p. 11–16, 2008.

HSU, C.W. *et al.* Prenatal risk factors for childhood CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.25, n.9, p.2105–2111, 2014.

IVY, J.R.; BAILEY, M.A. Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. *Journal Physiology*, v. 592, n.8, p.3955–3967, 2014.

IWANO, M. *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *Journal Clinical Investigation*, v. 110, n.3, p. 341–350, 2002.

JANSSON, T.; THERESA, L. Powell Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical Science*, v. 113, n.1, p 1–13, 2007.

JAUNIAUX, E. *et al.* Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure. *The American Journal of Pathology*, v. 157, n.6, p.2111–2122, 2000.

JULIUS, S. *et al.* Relationship Between Cardiac Output and Peripheral Resistance in Borderline Hypertension. *Circulation*, v.43, n.1, p.382–390, 1971.

KANNEL, W.B. Fifty year of Framingham Study contributions to understanding hypertension. *Journal of Human Hypertension*, v.14, n.14, p. 83–90, 2000.

KAROWICZ-BILINSKA, A.; SUZIN, J.; SIEROSZEWSKI, P. Evaluation of oxidative stress indices during treatment in pregnant women with intrauterine growth retardation. *Medical Science Monitor*, v. 83, n.58, p. CR211–CR216, 2002.

KASIMANICKAM, R.K. *et al.* Effect of tocopherol supplementation during last trimester of pregnancy on mRNA abundances of interleukins and angiogenesis in ovine placenta and uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.10, n.4, p.4, 2012.

KAZANCIOĞLU, R. Risk factors for chronic kidney disease: an update. *Kidney International Supplements*, v.3, n.4, p.368–371, 2013.

KIM, B.W. *et al.* Attenuation of inflammatory-mediated neurotoxicity by Saururus chinensis extract in LPS-induced BV-2 microglia cells via regulation of NF-kappaB signaling and antioxidant properties. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n.1, p. 502, 2014.

KIRSTEN, T.B. *et al.* Prenatal lipopolysaccharide reduces social behavior in male offspring. *Neuroimmunomodulation*, v. 17, n.1, p.240–251, 2008.

LASAITIENE, D. *et al.* Further insights into the role of angiotensin II in kidney development. *Clinical Physiology Function Imaging*, v.26, n.4, p.197–204, 2006.

LAYTON, A.T. Modeling Transport and Flow Regulatory Mechanisms of the Kidney. *ISRN Biomathematics*, v. 2012, n.1, p.170594, 2012.

LIEBLER, D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 23, n.1, p. 147–169, 1993.

LODHA, S. *et al.* Angiotensin II -induced mesangial cell apoptosis: Role of oxidative stress. *Molecular Medicine*, v.8, n.1, p. 830–840, 2002.

LOOR, G. *et al.* Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia/reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1813, n.7, p.1382–1394, 2011.

LUO, Z. C. *et al.* Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Medical Hypotheses*, v. 66, p. 38–44, 2006.

LUYCKX, V.A.; BRENNER, B.M. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney International Supplements*, v.97, n.1, p.S68–S77, 2005.

MADAZLI, R. *et al.* The incidence of placental abnormalities, maternal and cord plasma malondialdehyde and vascular endothelial growth factor levels in women with gestational diabetes mellitus and nondiabetic controls. *Gynecologic and obstetric investigation*, v.65, n.1, p.227–232, 2008.

MAGALHÃES, J.C. *et al.* Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Experimental Physiology*, v. 91, n.3, p.611–619, 2006.

MAGI, S. *et al.* Gram-negative endotoxin lipopolysaccharide induces cardiac hypertrophy: Detrimental role of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *European Journal of Pharmacology*, v.746, n.1, p.31–40, 2014.

MARSEGLIA, L. *et al.* Oxidative Stress-Mediated Aging during the Fetal and Perinatal Periods. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2014, n.1, p.8, 2014.

MAY J.M. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *The Journal of the Federation of American Societies Experimental Biology*, v.13, n.1, p.995–1006, 1999.

MAYNARD, S.E; KARUMANCHI, S.A. Angiogenic Factors and Preeclampsia. *Seminars in Nephrology*, v. 31, n.1, p. 33–46, 2011.

MEYER, M.R.; BARTON, M.; PROSSNITZ, E.R. Functional heterogeneity of NADPH oxidase-mediated contractions to endothelin with vascular aging. *Life Science*, v.118, n.2, p.226–231, 2014.

MICHELON, T. *et al.* Imunologia da gestação. *Revista da associação médica do Rio Grande do Sul*, v. 50, n.2, p.145–15, 2006.

MIYATA, K. *et al.* Aldosterone stimulates reactive oxygen species production through activation of NADPH oxidase in rat mesangial cells. *Journal American Society Nephrology*, v.16, n.1, p. 2906–2912, 2005.

MULLER, D.N., KVAKAN, H.; LUFT, F.C. Immune-related effects in hypertension and target-organ damage. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*. v.20, n.1, p.113–117, 2011.

MURTHI, P.; ABUMAREE, M.; KALIONIS, B. Analysis of homeobox gene action may reveal novel angiogenic pathways in normal placental vasculature and in clinical pregnancy disorders associated with abnormal placental angiogenesis. *Frontiers in Pharmacology*, v.5, n.1, p.33, 2014.

NAGAI, T. *et al.* Reevaluation of erythropoietin production by the nephron. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 449, n.2, p. 222–228, 2011.

NAIR, P.P. Vitamin E and metabolic regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 203, n.1, p. 53–61, 1972 .

NASON, A.; LEHMAN, I.R. The role of lipides in electron transport. II. Lipide cofactor replaceable by tocopherol for the enzymatic reduction of cytochrome c. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 222, n.1, p. 511–530, 1956.

NEGRATO, C. A; GOMES, M.B. Low birth weight: causes and consequences. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, v.5, n.1, p. 49, 2013.

OJEDA, N.B. *et al.* Testosterone contributes to marked elevations in mean arterial pressure in adult male intrauterine growth restricted offspring. *The American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative*, v. 292, n.1, p. R758–R763, 2007.

OLGUN, N.S.; HANNA, N.; REZNIK, S.E. BQ-123 prevents LPS-induced preterm birth in mice via the induction of uterine and placental IL-10. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 14, n.1, p. S0041–0034, 2014.

ORSI, N. M.; TRIBE, R. M. Cytokine Networks and the Regulation of Uterine Function in Pregnancy and Parturition. *Journal of Neuroendocrinology*, v. 20, n.4, p. 462–469, 2008.

OSKVIG, D.B. *et al.* Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 26, n.1, p. 623–634, 2012.

PAIXÃO, A.D.; ALEXANDER, B.T. How the Kidney Is Impacted by the Perinatal Maternal Environment to Develop Hypertension. *Biology of Reproduction*, v. 89, n.6, p. 1–10, 2013.

PALM, F.; NORDQUIST, L. Renal oxidative stress, oxygenation, and hypertension. *American Journal Physiology Regulation Integrative and Comparative Physiology*, v. 301, n.5, p. R1229–1241, 2011.

PEUCHANT, E. *et al.* Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clinical Biochemistry*, v. 37, n.4, p. 293–298, 2004.

PINTO, C.F. *et al.* A sepse como causa de lesão renal aguda: modelo experimental. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 46, n.1, p. 86–90, 2012.



POLKINGHORNE, K.R. Estimated Glomerular Filtration Rate versus Albuminuria in the Assessment of Kidney Function: What's More Important? *Clinical Biochemistry*, v.35, n.2, p.66–73, 2014.

POSTON, L. *et al.* Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 94, n.6, p.1980S–1985S, 2011.

QUILTER, C.R.*et al.* Impact on offspring methylation patterns of maternal gestational diabetes mellitus and intrauterine growth restraint suggest common genes and pathways linked to subsequent type 2 diabetes risk. *The FASEB Journal*, v.28, n.11, p.4868–4879, 2014.

RADERMACHER, K.A. *et al.* Neuroprotection after stroke by targeting NOX4 as a source of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*, v.18, n.1, p.1418–1427, 2012.

RASHEED, F.N. Maternal infections influence infection susceptibility in childhood. *Medical Hypotheses*, v.42, n.1, p.76–80, 1994.

REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Angiogenesis in the Placenta. *Biology of Reproduction*, v.64, n.4, p.1033–1040, 2001.

RHEE, S. H. Lipopolysaccharide: Basic Biochemistry, Intracellular Signaling, and Physiological Impacts in the Gut. *Intestinal Research*, v.12, n.2, p.90–95, 2014.

RODRIGUES, G.P. Funciones de la vitamina E en la nutrición humana. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, v. 11, n.1, p.46–57, 1997.

RUBATTU, S. *et al.* Pathogenesis of chronic cardiorenal syndrome: is there a role for oxidative stress? *The International Journal of Molecular Sciences*, v.14, n.11, p. 23011–23032, 2013.

RUDER, E.H. *et al.* Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reproduction Update*, v.14, n.4, p.345–357, 2008.

RUSSEL, J.A. Management of sepsis. *The New England Journal of Medicine*, v.13, n.1, p.1699–1713, 2006.

SALIM S. Oxidative Stress and Psychological Disorders. *Current Neuropharmacology*, v. 12, n.2, p. 140–147, 2014.

SANDILANDS, E.A. *et al.* Measurement of renal function in patients with chronic kidney disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 76, n.4, p.504–515, 2013.

SANTOS, P.C.; KRIEGER, J.E.; PEREIRA, A.C. Renin-angiotensin system, hypertension, and chronic kidney disease: pharmacogenetic implications. *Journal Pharmacology Science*, v. 120, n.2, p.77–88, 2012.

SAVOIA, C. *et al.* Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v.13, n.1, p.e11, 2011.

SHOJI, H.; KOLETZKO, B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 10, n.3, p. 324–328, 2007.

SINGH, M.; MENSAH, G.A.; BAKRIS, G. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiology Clinical*, v. 28, n.4, p. 545–559, 2010.

SINGH, U.; DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. *Annual Review of Nutrition*, v. 25, n.1, p. 151–174, 2005.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, v. 327, n.7, p.649–662, 2004.

SPITS, H. *et al.* Innate lymphoid cells – a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, v.13, n.1, p.145–149, 2013.

THOMPSON L.P; AL-HASAN, Y. Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. *Journal of Pregnancy*, v. 2012, n.1, p. 8, 2012.

TONELLI, M. *et al.* Using proteinuria and estimated glomerular filtration rate to classify risk in patients with chronic kidney disease: a cohort study. *Annals of Internal Medicine*, v.154, n.13, p.12–21, 2011.

TOUYZ, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*, v. 44, n.1, p.248–252, 2004.

VIANNA P. Imunorregulação da Gestação: Rumo ao Sucesso. Agosto de 2009. 188f. Tese-Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS. 2009.

VICKARYOUS, N.; WHITELAW, E. The role of the early embryonic environment on epigeotype and phenotype. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 17, n.1, p. 335–340, 2005.

VIEIRA-FILHO, L.D. *et al.* Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. *Pediatric Nephrology*, v. 26, n.1, p. 2019–2029, 2011b.

VIEIRA-FILHO, L.D. *et al.* Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. *Clinical Experimental Pharmacology Physiology*, v. 36, n.1, p. 1157–1163, 2009.

VIEIRA-FILHO, L.D. *et al.* Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal  $\alpha$ -tocopherol during lactation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 505, n.1, p. 91–97, 2011a.

VIEIRA-FILHO, L.D. *et al.* Renal molecular mechanisms underlying altered Na handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *British Journal of Nutrition*, v. 111, n.11, p. 1932–1944, 2014

WALSH, S.W. Eicosanoids in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 70, n.1, p. 223–232, 2004.

WANG, X.; QUINN, P.J. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research*, v. 38, n.1, p. 309–336, 1999.

WANKENNE M. A. A vitamina E e seus componentes. *Revista Aditivos e Ingredientes*, v. 180, n.1, p. 34–39, 2014

WHITE, J.H. Regulation of intracrine production of 1,25-dihydroxyvitamin D and its role in innate immune defense against infection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 523, n.1, p. 58–63, 2012.

WILCOX, C.S. Redox regulation of the afferent arteriole and tubuloglomerular feedback. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 179, n.3, p. 217–223, 2003.

XIAO, D. *et al.* Chronic hypoxia during gestation enhances uterine arterial myogenic tone via heightened oxidative stress. *PLoS One*, v. 8, n.9, p. e73731, 2013.

XU, D.X. *et al.* Effects of low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on LPS-induced intra-uterine fetal death and preterm labor. *Toxicology*, v.234, p. 167–175, 2007.

YAN, J. *et al.* Long-term effects of maternal diabetes on blood pressure and renal function in rat male offspring. *PLoS One*, v.9, n.2, p.e88269, 2014.

YOSHIKAWA, M. *et al.* Inhibition of histone deacetylase activity suppresses epithelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- $\beta$ 1 in human renal epithelial cells. *Journal American Society Nephrology*, v. 18, n.1, p.58–65, 2007.

YU, J.; FENG, L.; HU, Y.; ZHOU, Y. Effects of SAC on oxidative stress and NO availability in placenta: Potential benefits to preeclampsia. *Placenta*, v.33, n.6, p. 487–494, 2012.

YUAN, Q. *et al.* Attenuating effect of Ginsenoside Rb1 on LPS-induced lung injury in rats. *Journal of Inflammation*, v.11, n.1, p.40, 2014.

ZAFFANELLO, M. *et al.* Long-term effects of neonatal drugs on the kidney. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, v. 23, n.3, p.87–89, 2010.

ZANDI-NEJAD, K.; LUYCKX, V.A.; BRENNER, B.M. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming. *Hypertension*, v. 47, n.3, p. 502–508, 2006.

ZHAO, L.; YUAN-HUA, C.; HUA, W. *et al.* Reactive Oxygen Species Contribute to Lipopolysaccharide-Induced Teratogenesis in Mice. *Toxicological Sciences* v. 103, n.1, p. 149–157, 2008.

ZHAO, M. *et al.* Folic acid supplementation during pregnancy protects against lipopolysaccharide-induced neural tube defects in mice. *Toxicology Letters*, v.224, n.1, p.201–208, 2014.

ZUBCEVIC, J. *et al.* Autonomic-immune-vascular interaction: an emerging concept for neurogenic hypertension. *Hypertension*, v.57, n.6, p.1026–1033, 2011.

**ARTIGO**

Manuscrito formatado de acordo com as normas do *American Journal of Obstetrics & Gynecology*

Intrauterine programming of hypertension in male rats by maternal exposure to lipopolysaccharide involves elevation of placental oxidative stress and is prevented by  $\alpha$ -tocopherol treatment

Juliane S. Farias, Leucio D. Vieira-Filho, Nelson G. Barros, Edjair V. Cabral, Manoel M. Lima-Filho, Bruna R. M. Sant' Helena, Regina S. Aires, Valdilene S. Ribeiro, Ana D. Paixão.

The authors report no conflict of interest.

Financial support: The present study was supported by CNPq, FACEPE and CAPES.

Financial supporters had no involvement in the design and analysis of the study or in the writing of this article.

## Abstract

**OBJECTIVES:** This study investigated whether maternal exposure to lipopolysaccharide increases markers of oxidative stress in placenta and in the fetal liver. Furthermore, the study investigated markers of oxidative stress in the kidney of adult offspring and whether  $\alpha$ -tocopherol administered in parallel with lipopolysaccharide prevents programmed hypertension. **STUDY DESIGN:** Wistar female rats were treated with saline or lipopolysaccharide obtained from *E.coli*, on days 13, 15, 17 and 19 of gestation. At the same time, a subset of dam groups were treated daily with  $\alpha$ -tocopherol from the 13<sup>th</sup> day of gestation. On gestation day 20, part of the dams from each group was euthanized to obtain placenta and fetal liver. The male offspring had systolic blood pressure measured from age 60 to 150 days. **RESULTS:** Lipopolysaccharide led to elevated levels of malondialdehyde in maternal liver, placenta, fetal liver and kidney of adult rat offspring. Adult offspring showed higher levels of NADPH-oxidase 2 (gp91phox) in the kidney and higher levels of systolic blood pressure.  $\alpha$ -tocopherol reduced levels of p47<sup>phox</sup> in the placenta and reduced superoxide anions in the adult kidney, as well as preventing the increment of systolic blood pressure. **CONCLUSIONS:** Maternal exposure to an inflammatory agent, such as lipopolysaccharide, leads to increased oxidative stress in the kidney and hypertension in the adult offspring, perhaps triggered by increased oxidative stress in the placenta. Thus, early administered  $\alpha$ -tocopherol may have a long-term antihypertensive effect.

**Key words:**  $\alpha$ -tocopherol, fetal development, hypertension, kidney, maternal inflammation, placental oxidative stress.

**Condensed sentence:** Maternal inflammation programs, renal oxidative stress and hypertension.

## INTRODUCTION

Maternal inflammation during the perinatal period may program late diseases in the offspring. Experimental evidence points hypertension as one of the chronic diseases programmed by maternal inflammation.<sup>1,2</sup> In addition, clinical reports point to neurological diseases.<sup>3</sup>

Lipopolysaccharide (LPS), an endotoxin derived from the cell wall of Gram-negative bacteria, has proven to be particularly useful in the production of experimental maternal inflammation during pregnancy.<sup>1,4,5,6</sup> Although there is controversy regarding its ability to cross placenta,<sup>7,8</sup> there are some reports showing LPS ability to induce production of inflammatory interleukins that are present in maternal serum,<sup>7,9</sup> in placenta<sup>7,9</sup> and in the fetal serum<sup>7,10</sup> or in fetal brain.<sup>11</sup>

Besides an increment in inflammatory interleukins, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), the subcellular signaling that is triggered by LPS via toll like receptor 4 (TLR4) includes the activation of endothelial and placental NADPH oxidase (NOX)2, also known as gp91phox, to produce superoxide anions.<sup>12</sup> NOX2 activation and TNF- $\alpha$  production share common subcellular signaling, such as Rac1. In addition, superoxide dependent Rac1 is a common downstream to the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) which may promote placental angiogenesis.<sup>13</sup>

Although it is known that LPS increases lipid peroxidation in serum of pregnant rats,<sup>14</sup> it is not known whether the placenta is able to prevent the increment in oxidative stress to safeguard fetal development. Increased placental lipid peroxidation seems paralleled by a similar profile in the kidneys from offspring, at least up to the start of adulthood.<sup>15,16,17</sup> Increased oxidative stress in the fetal offspring has been correlated with delayed renal development<sup>18</sup> and augmentation of positive cells to angiotensin II in the kidneys at adulthood.<sup>19</sup> In line with a possible role of placental oxidative stress in maternal inflammation-induced hypertension, there is one report showing that the kidneys from



offspring exhibit a reduced number of nephrons and increased number of positive cells to AngII.<sup>20</sup>

The aim of the present study was first to investigate whether LPS: (i) increases lipid peroxidation and markers of angiogenesis in placenta; and (ii) increases lipid peroxidation in fetal liver. Secondly, the study investigated whether reducing placental lipid peroxidation by  $\alpha$ -tocopherol could prevent offspring hypertension and its underlying renal function alterations.

## MATERIALS AND METHODS

### **Ethical considerations**

The protocols and procedures for this study were approved by the Committee for Experimental and Animal Ethics at the Federal University of Pernambuco n°23076.015422/2012-43.

### **Materials**

Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4,  $\alpha$ -tocopherol, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, l-cysteine, trypsin type II-S inhibitor, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), sodium dodecylsulphate (SDS), anti-NOX2 antibody, bovine serum albumin (BSA), Tris, Ponceau Red, Folin&Ciocalteu's phenol reagent, lucigenin, thiobarbituric acid,  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (NADPH), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), ethylene glycol-bis (2-aminoethylether) N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), acrylamide, N,N'-Methylenebis(acrylamide), N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, ammonium persulfate and glycine were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Commercial kits for creatinine measurement were from Labtest (Lagoa Santa, MG, Brazil) and sodium pentobarbital was purchased from

Cristália(ProdutosQuímicosFarmacêuticos, Itapira, SP, Brazil). Trichloroacetic acid (TCA), sucrose, EDTA, sodium chloride and potassium chloride were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Nitrocellulose blotting membrane, Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody and ECL Prime Western blotting system were purchased from GE Healthcare (Buckinghamshire, UK). Anti-VEGF, anti-VEGF receptor fms-like tyrosine kinase-1(flt-1), and anti-p47<sup>phox</sup> antibodies were obtained from Santa-Cruz Biotechnologies (Dallas, TX, USA). All other reagents were of the highest purity available.

### **Animals**

Female Wistar rats, aged 90 days and weighing 200–250g, were considered pregnant by the presence of spermatozoids in the vaginal smear. They were housed in individual cages at 21°C, under a 12h light-12h dark cycle, with free access to water and standard chow, and randomly assigned to the experimental groups. Physiological 0.9% NaCl solution (1 mL/kg) or LPS (0.5 mg/kg) were intraperitoneally administered at days 13, 15, 17 and 19 of pregnancy to control dams (C, n=20) and LPS dams (L, n=18), respectively. From the 13<sup>th</sup> to the 20<sup>th</sup> pregnancy day corn oil,  $\alpha$ -tocopherol vehicle (V, 1 mL/kg, p.o), was administered by gavage to part of each group, while  $\alpha$ -tocopherol (T, 350 mg/kg, p.o) was administered to the other part. Thus, four groups of mothers were constituted: CV (n=11), LV (n=10), CT (n=9) and LT (n=8). On the 20<sup>th</sup> pregnancy day, mothers of each group (CV, n=6; LV, n=5; CT, n=5; LT, n=4) had the pregnancy interrupted to harvest the placentas and the livers of fetuses, while the remaining dams (CV, n=5; LV, n=5; CT, n=4; LT, n=4) had pregnancy at term to evaluate the adult offspring.

To end the pregnancy at day 20, dams were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg), intraperitoneally administered. The labyrinth and trophospongium from placentas corresponding to male fetuses were harvested and weighed. Immediately, the placental tissue

was adequately prepared to evaluate protein expression of NADPH oxidase subunits or to measure lipid peroxidation. Maternal hepatic tissue was evaluated in terms of lipid peroxidation to match with placenta, while fetal hepatic tissue had this parameter evaluated to match with placental tissue. Lipid peroxidation and NADPH oxidase subunits expression were evaluated in pools prepared from two placentas/fetal livers, and one or two pools were obtained from each mother.

Offspring born from mothers whose pregnancy was completed were culled to 8 pups at birth. They were weaned at age of 21 days and maintained from then in collective cages containing four rats with free access to standard diet and tap water until the age of 150 days. CV (n=15), LV (n=13), CT (n=11) and LT (n=10) had tail-cuff systolic blood pressure (SBP), diet and water intake, creatinine clearance and proteinuria measured at 60, 90, 120 and 150 days of age. At age of 150 days, lipid peroxidation in the kidney and liver, and expression of NOX2 in the kidney cortex were additionally evaluated.

### **Lipid peroxidation and levels of reduced glutathione in maternal and offspring tissues**

Lipid peroxidation and reduced glutathione (GSH) were assessed in placenta, maternal liver and fetal liver, as well as in the liver and kidney of adult rats. Lipid peroxidation was measured as the level of malondialdehyde (MDA), according to previous reports<sup>21</sup> with some modifications. Tissues were homogenized in 150 mM KCl, 1g tissue:5 mL solution. For the standard curve, 1,1,3,3-tetraethoxy-propane was used. Levels of GSH were assessed as non-protein sulfhydryl groups according to Sedlak J, Lindsay RH; 1968.<sup>22</sup> L-cysteine was used for the standard curve. Both the MDA and GSH results were corrected for protein concentration. The assays were performed in duplicate.

### **Immunodetection of NADPH oxidase subunits and angiogenic factors**

Labyrinth and trophospongium isolated from placentas, as well as adult renal tissue were homogenized into ice bath, using a tissue grinder, coupled to a rotor IKA RW20, at 1,200 rpm for 2 min. The solution was phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, supplemented with 0.15 mg/mL trypsin type II-S inhibitor and 1 mM PMSF. Samples of tissue homogenate containing 80 µg of protein were submitted to separation in polyacrylamide gel (PAGE) columns containing SDS. Then, they were transferred to nitrocellulose membranes at 350 mA. Non-specific binding was prevented by incubating the membranes in 5% BSA or in 5% non-fat dry milk, diluted in Tris buffered saline solution containing 0.1% Tween 20 (TBS-T), at room temperature for 1 hour. VEGF was immunodetected with antibody C-1, a mouse monoclonal antibody raised against aminoacids 1-140 of VEGF of human origin (1:5,000 dilution). Flt-1 was immunodetected with antibody C-17, a polyclonal antibody raised against a peptide mapping at the C-terminus of human flt-1 (1:5,000 dilution). The NOX2 protein expression was immunodetected using anti-NOX2 antibody (1:5,000 dilution), a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 150-166 of human NOX2, while p47<sup>phox</sup> expression was assessed by p47<sup>phox</sup> (H-195) antibody (1:5,000 dilution), a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 196-390 of p47<sup>phox</sup> of human origin. The membranes were probed overnight at 4°C for VEGF, gp91<sup>phox</sup> and p47<sup>phox</sup>, and 1 h for flt-1, with gentle stirring. The membranes were washed three times with TBS-T and exposed for 1h to peroxidase-conjugated secondary antibody (1:10,000 dilution) at room temperature, washed and visualized using ECL. Densitometric analyses were performed using Scion Image for Windows (version Alpha 4.0.3.2, Scion Corporation) and normalized according to the protein load, visualized at Ponceau Red staining.

### **Evaluation of systolic blood pressure and some renal functional parameters**

Systolic blood pressure (SBP) was measured by tail-cuff pletysmography (IITC Life Science B60-7/16'', Life Science Instruments, Woodland Hills, CA) in conscious rats at ages of 60, 90, 120 and 150 days. The animals were acclimated to the experimental conditions to obtain tail-cuff SBP for three consecutive days. To obtain an average measurement, the procedure in each rat was repeated for three or five times. Diet and water intake, creatinine clearance and 24-h proteinuria ( $U_{\text{Prot}}$ ) were also evaluated at each of the ages in which SBP was obtained. Metabolic cages (Tecniplast Gazzada Sarl, Buguggiate, Italy) were used to collect 24-h urine samples to measure proteinuria and creatinine. Blood samples were obtained from the caudal artery for creatinine measurements.

### **Superoxide anions production and NADPH oxidase activity**

Superoxide anions ( $\text{O}_2^-$ ) from the renal cortex of 150-day-old rats were measured according to a previous report.<sup>23</sup> Tissues were homogenized into RIPA buffer (50mM Tris, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% triton X-100, 1% deoxycholate, 1% SDS, supplemented with a protease inhibitor cocktail) in a ratio of 1 g tissue to 7 mL of volume. The homogenate was centrifuged (NT805, Novatecnica, Piracicaba, SP) at 12,000  $\times g$ , 4°C for 12 min. The supernatant was diluted in saline phosphate buffer (PBS, pH 7.4), in a ratio of 1 mL:10mL. The solution was heated to 37°C and after adding 10  $\mu\text{M}$  of lucigenin, chemiluminescence was measured for 10 min (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finland). Chemiluminescence was measured in the absence and presence of 100 $\mu\text{M}$  NADPH. The assays were performed in triplicate.

## **Analytical Methods**

Protein in tissue samples and in urine was measured by Folin phenol reagent.<sup>24</sup> Serum creatinine was determined using a commercial kit.

## **Statistical Analyses**

Statistical differences among the four experimental groups were assessed by two-way ANOVA followed by Bonferroni test. The protein expression data of the experimental groups was compared to the CV group using one sample *t* test. These analyses were performed using GraphPad Prism 5 (Version 5.01, GraphPad Software, Inc.). The means were considered different when  $P < 0.05$ .

## **RESULTS**

### **Markers of oxidative stress and angiogenesis during fetal development**

The levels of MDA were higher in maternal liver, placenta and fetal liver of animals treated with LPS (see group LV Figure 1, A), while groups CT and LT showed the same levels of MDA as the CV group. In contrast, the levels of GSH were lower in the liver and placenta of dams treated with LPS (see group LV, Figure 1, B). Surprisingly,  $\alpha$ -tocopherol diminished GSH in the maternal liver of the control group (see CT vs. CV group) and was not able to increase GSH in the liver of the LPS treated group (see LT vs. LV group). In placenta, GSH was the same for the CT and CV groups, as well as for the LT and LV groups. None of the treatments were able to change GSH in the fetal liver.

Placental protein levels of VEGF and one of its receptors, the flt-1, increased in the LV and LT groups compared to CV, while in CT these angiogenic factors were unaltered (Figures 1, C and D).

The placental expression of NOX2 was unaltered in all studied groups (Figure 1, E). However, expression of p47<sup>phox</sup>, one cytosolic subunit of NADPH oxidase, decreased in the placenta of the LV, CT and LT groups compared to the CV group. P47<sup>phox</sup> expression in LT was lower than in the LV group (Figure 1, F).

### **Maternal outcome**

Maternal weight gain during pregnancy was not affected by LPS administration (Table 1). On the other hand, while  $\alpha$ -tocopherol lowered maternal weight gain in the control group (compare CT vs. CV, Table 1), it increased weight gain in LPS dams (compare LT vs. LV, Table 1). Moreover, LV and LT groups presented higher food intake during gestation than CV and CT, respectively. Albeit  $\alpha$ -tocopherol had affected maternal weight gain, this treatment did not change maternal food intake during gestation.

At gestation day 20, placental weight was similar between the CV and LV groups. While  $\alpha$ -tocopherol treatment diminished placental weight in the LPS group (LT), it did not affect control rats (compare CT vs. CV group). Fetal body and kidney weights were lower in LV compared to the CV group, however, the renal weight index was similar among all groups. At birth, LV rats still presented lower body weight than the CV group, while  $\alpha$ -tocopherol treatment recovered the body weight of the LT group to the levels of the CV group. At weaning, body weight was similar among all groups.

### **Adult offspring general data**

Body weight gain from age of 60 to 150 days, evaluated every 30 days, is presented in Table 2. At 60 days of age, body weight was similar among all experimental groups. However, from 90 days of age onward, a lower body weight was observed in LT compared to LV rats. At age of 150 days, kidney weight was also lower in LT compared to the LV group. However, the

renal weight index was similar among all groups. No differences were observed from the dietary and water intake from experimental groups. Thus, only data regarding the CV group is presented. Dietary intake for the CV group evaluated at age of 30, 60, 90, 120 and 150 was  $17.5 \pm 0.4$ ,  $10.3 \pm 0.4$ ,  $8.0 \pm 0.3$ ,  $7.0 \pm 0.3$  and  $7.4 \pm 0.2$  g/100 g per 24 h, respectively, while water intake was  $36.9 \pm 5.4$ ,  $19.6 \pm 2.8$ ,  $13.2 \pm 0.5$ ,  $11.2 \pm 0.4$ , and  $12.3 \pm 0.6$  mL/100 g per 24 h.

### **Markers of oxidative stress in the kidney/liver and renal function in adult offspring**

When compared to the CV group, MDA levels increased in the kidney of the adult LV group, but not in the liver (Figure 2, A). Prenatal treatment with  $\alpha$ -tocopherol did not prevent MDA increment (compare LT vs. LV groups, Figure 2, A). Similarly, prenatal treatment with  $\alpha$ -tocopherol did not change MDA levels neither in the kidney nor in the liver of control rats (compare CT vs. CV group, Figure 2, A). Basal levels of superoxide anions in the kidney were unaltered in the LV and CT groups, but they were undetectable in the LT group (Figure 2, B). After NADPH stimulation, superoxide anions were higher in the LV than in the CV group, but similar between LT and LV groups. Expression of NOX2 in the kidney increased in the LV compared to the CV group (Figure 2, C). LT and LV groups showed the same levels of NOX2 expression. The levels of GSH were the same for all groups in kidney and liver (Figure 2, D).

24-hour proteinuria and creatinine clearance, evaluated from age of 60 to 150 days every 30 days, were similar among groups (Table 2).

### **Offspring blood pressure along growth and at adulthood**

SBP was similar among all groups at ages of 60 and 90 days. At 120 and 150 days, SBP was higher in the LV than in the CV group and lower in the LT than in the LV group (Figure 3).



## COMMENT

Increased LPS-induced MDA in maternal liver was observed in placenta, and in the fetal liver and the kidney of adult offspring. Albeit the parallel supplementation with  $\alpha$ -tocopherol had prevented the increase in MDA levels in the triplet maternal liver-placenta-fetal liver, it was not able to prevent MDA increment in the kidney of adult rats (Figure 2, A). However, the clue of prenatal treatment with  $\alpha$ -tocopherol was seen through the lower levels of p47<sup>phox</sup> in the placenta (Figure 1, F) and the undetectable levels of basal superoxide anions in the kidney of adult offspring treated with LPS, group LT (Figure 2, B). These findings point to the role of renal NADPH oxidase in maternal LPS-induced hypertension, as well as the long-term antihypertensive role of an early preventive treatment for programmed hypertension.

Increased levels of MDA in maternal and fetal liver corroborate with other reports showing that maternal inflammation is somehow transferred to offspring. LPS-induced cytokines produced in the downstream of TLR4 represent one pathway for the transferring of maternal inflammation to the fetus.<sup>4,5,6</sup> There was a straight relationship between placental MDA levels and expression of VEGF, and its type 1 receptor, the flt-1. The antibodies employed for VEGF and flt-1 assessed their cell bound isoforms. VEGF isoforms assessed were 188 and 165, which present domains to bind heparan sulfate proteoglycans in the extracellular matrix,<sup>25</sup> while the antibody for flt-1 assessed the C terminus cytoplasmic region.<sup>26</sup> The soluble form of flt-1, the sflt-1, is known for its role in reducing the physiological action of VEGF, normally in preeclampsia.<sup>27</sup> On the other hand, flt-1 is accountable for VEGF and placental growth factor physiological effects.<sup>26</sup> LPS subcellular signal includes Rac1 activation, a required NADPH oxidase subunit that is also necessary for the VEGF effect.<sup>13</sup>

It has been shown that increased reactive oxygen species in endothelial cells increase the expression of VEGF and its type 2 receptor.<sup>28</sup> Increased levels of flt-1 induced by LPS

and/or increased lipid peroxidation is in line with findings showing abundant amounts of *flt-1* transcripts in the spongiotrophoblast cells from the 8<sup>th</sup> pregnancy day onwards.<sup>29</sup>  $\alpha$ -Tocopherol ineffectiveness to reduce VEGF and the *flt-1* expressions that were increased by LPS, might be due to the dichotomy of subcellular signaling.  $\alpha$ -Tocopherol acts through  $p47^{phox}$ <sup>30</sup> whereas LPS acts through Rac.<sup>13</sup>

Increasing anti-oxidant defense attenuates the presence of LPS-induced inflammatory cytokines in maternal circulation and amniotic fluid.<sup>9,14</sup> As expected from the anti-oxidant action of  $\alpha$ -tocopherol, reduction in lipid peroxidation in maternal tissues occurred without any increment in GSH, which was reduced by the LPS effect (Figure 1, B). Furthermore,  $\alpha$ -tocopherol led to a significant reduction in the expression of  $p47^{phox}$  in the group treated with LPS. This finding was surprising, since it is known that  $\alpha$ -tocopherol inhibits superoxide production in monocytes by impairing the assembly of  $p47^{phox}$  to the NOX2 membrane subunit, by inhibition of its phosphorylation as a result of PKC decreased activity.<sup>30</sup> The striking reduction in the placental  $p47^{phox}$  subunit, had repercussion on the basal levels of superoxide anions in the adult kidney.

Increased markers of oxidative stress in the kidney of adult rats had a fundamental role on the elevation of SBP, seen at ages of 120 and 150 days (Figure 2, A, B, C). Some mechanisms are due to superoxide anions increasing blood pressure. Elevated levels of superoxide anions in the renal medulla reduce medullary blood flow and increase sodium reabsorption that may sustain hypertension.<sup>31,32</sup> Moreover, superoxide anions reduce local nitric oxide levels<sup>33</sup> that can increase sodium reabsorption in the ascending limb of Henle.<sup>34</sup> There was no synchrony between the effect of  $\alpha$ -tocopherol on MDA levels (Figure 2, A) and basal levels superoxide production (Figure 2, B) in the adult kidney. The levels of basal superoxide were undetectable in LT, while MDA levels were not significantly reduced in the same group. The mismatch between these two markers of oxidative stress might be due to the

short half-life of superoxide anions and the longer half-life of MDA.<sup>35</sup> However, SBP was lower in LT than in the LV group. Similarly, perinatal inhibition of NF-kB has long-term antihypertensive effects on spontaneously hypertensive rats.<sup>36</sup> NF-kB is one of the transcription factors triggered by reactive oxygen species.<sup>37</sup> In conjunction, these findings show the importance of superoxide anions to mediate maternal inflammation-induced hypertension.

In summary, maternal exposure to an inflammatory agent, such as lipopolysaccharide, leads to increased oxidative stress in the kidney and hypertension in the adult offspring, which may be partially triggered by increased oxidative stress in placenta. Thus, early administered  $\alpha$ -tocopherol can have a long-term antihypertensive effect.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Professor Carlos Peres da Costa for his assistance in the plethysmography experiments and Nielson Torres de Mello for his technical support.

#### REFERENCES

1. Wei YL, Li XH, Zhou JZ. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28(5):651-6. DOI:10.1111/j.1745-7254.2007.00593.x.
2. Liao W, Wei Y, Yu C, Zhou J, Li S, Pang Y, Li G, Li X. Prenatal exposure to zymosan results in hypertension in adult offspring rats. *ClinExpPharmacol Physiol.* 2008; 35(12):1413-8. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2008.05062.x.
3. Strickland AD. Prevention of cerebral palsy, autism spectrum disorder, and attention deficit-hyperactivity disorder. *Med Hypotheses.* 2014; 82(5):522-8. DOI: 10.1016/j.mehy.2014.02.003.

4. Bell MJ, Hallenbeck JM, Gallo V. Determining the fetal inflammatory response in an experimental model of intrauterine inflammation in rats. *Pediatr Res*. 2004;56(4):541-6. DOI:10.1203/01.PDR.0000139407.89883.6B.
5. Boles JL, Ross MG, Beloosesky R, Desai M, Belkacemi L. Placental-mediated increased cytokine response to lipopolysaccharides: a potential mechanism for enhanced inflammation susceptibility of the preterm fetus. *J Inflamm Res*. 2012; 5:67-75. DOI: 10.2147/JIR.S32108.
6. Cotechini T, Hopman WJ, Graham CH. Inflammation-induced fetal growth restriction in rats is associated with altered placental morphometrics. *Placenta*. 2014; 35(8):575-81. DOI: 10.1016/j.placenta.2014.05.002.
7. Ashdown H, Dumont Y, Ng M, Poole S, Boksa P, Luheshi GN. The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Mol Psychiatry*. 2006;11(1):47-55. DOI:10.1038/sj.mp.4001748.
8. Kohmura Y, Kirikae T, Kirikae F, Nakano M, Sato I. Lipopolysaccharide (LPS)-induced intra-uterine fetal death (IUFD) in mice is principally due to maternal cause but not fetal sensitivity to LPS. *Microbiol Immunol*. 2000; 44(11):897-904. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2000.tb02581.x.
9. Beloosesky R, Gayle DA, Amidi F, Nunez SE, Babu J, Desai M, Ross MG. N-acetylcysteine suppresses amniotic fluid and placenta inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide in rats. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 194(1):268-73. DOI: 10.1016/j.ajog.2005.06.082.
10. Beloosesky R, Weiner Z, Khativ N, Maravi N, Mandel R, Boles J, Ross MG, Itskovitz-Eldor J. Prophylactic maternal n-acetylcysteine before lipopolysaccharide suppresses fetal inflammatory cytokine responses. *Am J Obstet Gynecol*. 2009; 200(6):665.e1-5. DOI: 10.1016/j.ajog.2009.01.032.

- 11.** Beloosesky R, Weiner Z, Ginsberg Y, Ross MG. Maternal N-acetyl-cysteine (NAC) protects the rat fetal brain from inflammatory cytokine responses to lipopolysaccharide (LPS). *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012;25(8):1324-8. DOI: 10.3109/14767058.2011.632793.
- 12.** Zhang T, Lu X, Beier F, Feng Q. Rac1 activation induces tumour necrosis factor- $\alpha$  expression and cardiac dysfunction in endotoxemia. *J Cell Mol Med.* 2011;15(5):1109-21. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01095.x.
- 13.** Li SM, Zeng LW, Feng L, Chen DB. Rac1-dependent intracellular superoxide formation mediates vascular endothelial growth factor-induced placental angiogenesis in vitro. *Endocrinology.* 2010;151(11):5315-25. DOI: 10.1210/en.2010-0178.
- 14.** Awad N, Khatib N, Ginsberg Y, Weiner Z, Maravi N, Thaler I, Ross MG, Itskovitz-Eldor J, Beloosesky R. N-acetyl-cysteine (NAC) attenuates LPS-induced maternal and amniotic fluid oxidative stress and inflammatory responses in the preterm gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 2011; 204(5):450.e15-20. DOI: 10.1016/j.ajog.2011.01.030.
- 15.** Magalhães JC, da Silveira AB, Mota DL, Paixão AD. Renal function in juvenile rats subjected to prenatal malnutrition and chronic salt overload. *Exp Physiol.* 2006; 91(3):611-9. DOI: 10.1113/expphysiol.2005.032995.
- 16.** Silva LA, Veira-Filho LD, Barreto IS, Cabral EV, Vieyra A, Paixão AD. Prenatal undernutrition changes renovascular responses of nimesulide in rat kidneys. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011; 108(2):115-21. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2010.00625.x.
- 17.** Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, Santos FT, Luzardo R, Oliveira FS, Paixão AD, Vieyra A. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal  $\alpha$ -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys.* 2011;505(1):91-7. DOI: 10.1016/j.abb.2010.09.025.

18. Vieira-Filho LD, Cabral EV, Santos FT, Coimbra TM, Paixão AD. Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. *PediatrNephrol*. 2011; 26(11):2019-29. DOI: 10.1007/s00467-011-1908-8.
19. Vieira-Filho LD, Cabral EV, Farias JS, Silva PA, Muzi-Filho H, Vieyra A, Paixão AD. Renal molecular mechanisms underlying altered Na<sup>+</sup> handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br J Nutr*. 2014; 111(11): 1932-1944. DOI: 10.1017/S0007114513004236.
20. Hao XQ, Zhang HG, Li SH, Jia Y, Liu Y, Zhou JZ, Wei YL, Hao LY, Tang Y, Su M, Li XH. Prenatal exposure to inflammation induced by zymosan results in activation of intrarenal renin-angiotensin system in adult offspring rats. *Inflammation*. 2010; 33(6):408-14. DOI: 10.1007/s10753-010-9199-y.
21. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979; 95(2):351-8. DOI: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
22. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*. 1968; 25(1):192-205. DOI: 10.1016/0003-2697(68)90092-4.
23. Attia DM, Verhagen AM, Stroes ES, van Faassen EE, Gröne HJ, De Kimpe SJ, Koomans HA, Braam B, JolesJA. Vitamin E alleviates renal injury, but not hypertension, during chronic nitric oxide synthase inhibition in rats. *J Am SocNephrol*. 2001; 12:2585–93. DOI: 1046-6673/1212-2585.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1):265-75.
25. Ruhrberg C, Gerhardt H, Golding M, Watson R, Ioannidou S, Fujisawa H, Betsholtz C, Shima DT. Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control

- blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* 2002; 16(20):2684-98. DOI: 10.1101/gad.242002.
- 26.** Vieira JM, Ruhrberg C, Schwarz Q. VEGF receptor signaling in vertebrate development. *Organogenesis.* 2010;6(2):97-106. DOI: 10.4161/org.6.2.11686.
- 27.** Goel A, Rana S. Angiogenic factors in preeclampsia: potential for diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013; 22(6):643-50. DOI: 10.1097/MNH.0b013e328365ad98.
- 28.** González-Pacheco FR, Deudero JJ, Castellanos MC, Castilla MA, Alvarez-Arroyo MV, Yagüe S, Caramelo C. Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: protective role of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291(3):H1395-401. DOI: 10.1152/ajpheart.01277.2005.
- 29.** Dumont DJ, Fong GH, Puri MC, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman ML. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn.* 1995; 203(1):80-92. DOI: 10.1002/aja.1002030109.
- 30.** Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot-Pocidalo MA, Leger CL. Alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J Biol Chem.* 1998;273(49):32801-5. DOI: 10.1074/jbc.273.49.32801.
- 31.** Mori T, Cowley AW Jr, Ito S. Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: physiological role of angiotensin II-induced oxidative stress in renal medulla. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100(1):2-8. DOI: 10.1254/jphs.FMJ05003X2.
- 32.** Feng D, Yang C, Geurts AM, Kurth T, Liang M, Lazar J, Mattson DL, O'Connor PM, Cowley AW Jr. Increased expression of NAD(P)H oxidase subunit p67(phox) in the renal medulla contributes to excess oxidative stress and salt-sensitive hypertension. *Cell Metab.* 2012; 15(2):201-8. DOI: 10.1016/j.cmet.2012.01.003.

33. Evans RG, Fitzgerald SM. Nitric oxide and superoxide in the renal medulla: a delicate balancing act. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2005; 14(1):9-15. DOI: 10.1097/00041552-200501000-00003.
34. Evans RG, Majid DS, Eppel GA. Mechanisms mediating pressure natriuresis: what we know and what we need to find out. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32(5-6):400-9. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2005.04202.x.
35. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81-128. DOI: 10.1016/0891-5849(91)90192-6.
36. Koeners MP, Braam B, Joles JA. Perinatal inhibition of NF-kappaB has long-term antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2011;29(6):1160-6. DOI: 10.1097/HJH.0b013e3283468344.
37. Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor kappaB by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2001; 276(7):5197-203. DOI: 10.1074/jbc.M009160200.



TABLE 1

General maternal and offspring data

|                                    | CV                       | LV                       | CT                       | LT                       |
|------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Maternal weightgain, g</b>      | 103 ± 4 <sup>a</sup>     | 94 ± 3 <sup>a</sup>      | 83 ± 2 <sup>b</sup>      | 110 ± 1 <sup>c</sup>     |
| <b>Maternal food intake, g/day</b> | 17.7 ± 0.8 <sup>a</sup>  | 21.7 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 18.7 ± 0.5 <sup>a</sup>  | 22.3 ± 1.4 <sup>b</sup>  |
| <b>Placental weight, g</b>         | 0.63 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.64 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.65 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.56 ± 0.02 <sup>b</sup> |
| <b>Fetal body weight, g</b>        | 4.4 ± 0.1 <sup>a</sup>   | 3.7 ± 0.2 <sup>b</sup>   | 4.0 ± 0.1 <sup>a</sup>   | 4.1 ± 0.1 <sup>ab</sup>  |
| <b>Fetal renal weight, mg</b>      | 39 ± 1 <sup>a</sup>      | 34 ± 2 <sup>b</sup>      | 36 ± 1 <sup>a</sup>      | 35 ± 1 <sup>ab</sup>     |
| <b>Fetal renal weight index, %</b> | 0.87 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.93 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.91 ± 0.03 <sup>a</sup> | 0.87 ± 0.02 <sup>a</sup> |
| <b>Body weight at birth, g</b>     | 6.68 ± 0.16 <sup>a</sup> | 6.22 ± 0.09 <sup>b</sup> | 6.63 ± 0.13 <sup>a</sup> | 6.70 ± 0.05 <sup>a</sup> |
| <b>Body weight at weaning, g</b>   | 56 ± 1 <sup>a</sup>      | 53 ± 3 <sup>a</sup>      | 58 ± 2 <sup>a</sup>      | 50 ± 3 <sup>a</sup>      |

Results are presented as mean ± SEM. CV are control dams and fetuses treated with  $\alpha$ -tocopherol vehicle; LV are dams and fetuses treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol vehicle; CT are control dams and fetuses treated with  $\alpha$ -tocopherol; LT are dams and fetuses treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol. Means not sharing the same letters are different.  $P < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

**TABLE 2****Offspring body weight and renal function during development**

|                                           | CV                       | LV                       | CT                        | LT                       |
|-------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 60 days of age                            |                          |                          |                           |                          |
| Body weight, g                            | 241 ± 5 <sup>a</sup>     | 253 ± 4 <sup>a</sup>     | 257 ± 4 <sup>a</sup>      | 235 ± 11 <sup>a</sup>    |
| Creatinine clearance, mL/100 g per minute | 0.51 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.56 ± 0.03 <sup>a</sup> | 0.56 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.54 ± 0.05 <sup>a</sup> |
| Proteinuria, mg/100 g per 24 h            | 35 ± 4 <sup>a</sup>      | 32 ± 3 <sup>a</sup>      | 41 ± 5 <sup>a</sup>       | 34 ± 5 <sup>a</sup>      |
| 90 days of age                            |                          |                          |                           |                          |
| Body weight, g                            | 333 ± 8 <sup>a</sup>     | 334 ± 9 <sup>a</sup>     | 335 ± 7 <sup>a</sup>      | 293 ± 10 <sup>b</sup>    |
| Creatinine clearance, mL/100 g per 24 h   | 0.48 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.47 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.47 ± 0.07 <sup>a</sup>  | 0.47 ± 0.07 <sup>a</sup> |
| Proteinuria, mg/100 g per 24 h            | 31 ± 2 <sup>a</sup>      | 33 ± 3 <sup>a</sup>      | 29 ± 3 <sup>a</sup>       | 25 ± 3 <sup>a</sup>      |
| 120 days of age                           |                          |                          |                           |                          |
| Body weight, g                            | 397 ± 6 <sup>a</sup>     | 387 ± 13 <sup>a</sup>    | 380 ± 12 <sup>a</sup>     | 343 ± 7 <sup>b</sup>     |
| Creatinine clearance, mL/100 g per 24 h   | 0.37 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.37 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.40 ± 0.02 <sup>a</sup>  | 0.35 ± 0.04 <sup>a</sup> |
| Proteinuria, mg/100 g per 24 h            | 21 ± 2 <sup>a</sup>      | 21 ± 2 <sup>a</sup>      | 21 ± 2 <sup>a</sup>       | 18 ± 1 <sup>a</sup>      |
| 150 days of age                           |                          |                          |                           |                          |
| Body weight, g                            | 412 ± 9 <sup>a</sup>     | 400 ± 14 <sup>a</sup>    | 382 ± 2 <sup>ab</sup>     | 360 ± 10 <sup>b</sup>    |
| Creatinine clearance, mL/100 g per 24 h   | 0.39 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.38 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.43 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.41 ± 0.03 <sup>a</sup> |
| Proteinuria, mg/100 g per 24 h            | 22 ± 2 <sup>a</sup>      | 20 ± 1 <sup>a</sup>      | 21 ± 1 <sup>a</sup>       | 23 ± 2 <sup>a</sup>      |
| Kidney weight, g                          | 1.40 ± 0.05 <sup>a</sup> | 1.43 ± 0.08 <sup>a</sup> | 1.28 ± 0.04 <sup>ab</sup> | 1.19 ± 0.03 <sup>b</sup> |
| Kidney weight index, %                    | 0.34 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.35 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.34 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.33 ± 0.01 <sup>a</sup> |

Results are presented as mean ± SEM. CV are control rats in development treated with  $\alpha$ -tocopherol vehicle during in utero life; LV are rats in development that were treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol vehicle during in utero life; CT are control rats in development treated with  $\alpha$ -tocopherol during in utero life; LT are rats in development that were treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol during in utero life. Means not sharing the same letters are different.  $P < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Bonferroni test.

## Figure captions

### FIGURE 1

#### Markers of oxidative stress and angiogenesis during fetal development

**A**, Malondialdehyde (MDA) levels in the triplet maternal liver-placenta-fetal liver. **B**, Reduced glutathione (GSH) in the triplet maternal liver-placenta-fetal liver. Expressions of VEGF at **C** and flt-1 at **D** in labyrinth and trophospongium isolated from placentas. Expressions of NOX2 at **E** and p47<sup>phox</sup> at **F** in in the same placental regions. The insets in **C**, **D**, **E** and **F** are representative immunodetections in a single gel. Values are mean  $\pm$  SEM. MDA and GSH results were compared using two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Protein expressions in **C**, **D**, **E** and **F** were analyzed using one sample *t* test to contrast the several groups against the the CV group. CV, control dams treated with  $\alpha$ -tocopherol vehicle; LV, dams treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol vehicle; CT, control dams treated with  $\alpha$ -tocopherol; LT, dams treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol. Means not sharing the same letters are different,  $P < 0.05$ .

### FIGURE 2

#### Markers of oxidative stress in tissues of adult offspring

**A**, Malondialdehyde (MDA) in kidney and liver. **B**, basal and NADPH-dependent superoxide anions in the kidney, measured by using a luminometer, expressed as relative light units (RLU). Basal levels of superoxide were not detected (ND) in the LT group. **C**, Expression of NOX2 in the kidney. **D**, Reduced glutathione (GSH) in kidney and liver. The inset in C is a representative immunodetection in a single gel. Values are mean  $\pm$  SEM. MDA, RLU and GSH results were compared using two-way ANOVA followed by Bonferroni test. NOX2 expression was analyzed using one sample *t* test to contrast the several groups against the CV group. CV, offspring of control dams treated with  $\alpha$ -tocopherol vehicle; LV, offspring of

dams treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol vehicle; CT, offspring of control dams treated with  $\alpha$ -tocopherol; LT, offspring of dams treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol. Means not sharing the same letters are different,  $P < 0.05$ .

### FIGURE 3

#### **Systolic blood pressure (SBP) during growth**

SBP was measured by tail-cuff plethysmography. The data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $P < 0.05$ , two-way ANOVA followed by Bonferroni test. CV, offspring of control dams treated with  $\alpha$ -tocopherol vehicle; LV, offspring of dams treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol vehicle; CT, offspring of control dams treated with  $\alpha$ -tocopherol; LT, offspring of dams treated with LPS and  $\alpha$ -tocopherol. Means not sharing the same letters are different.

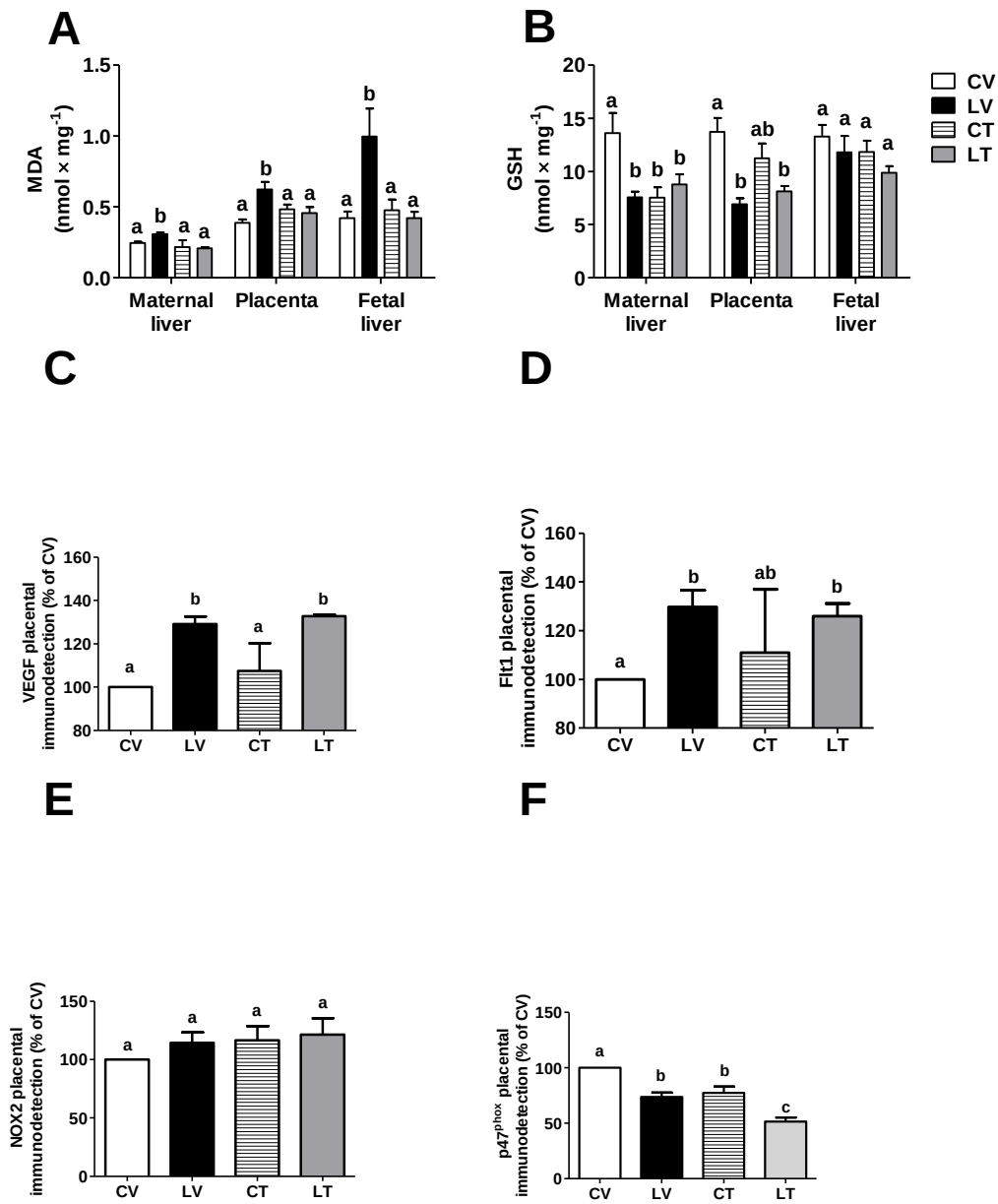


FIGURE 1. Farias *et al.*, 2015.

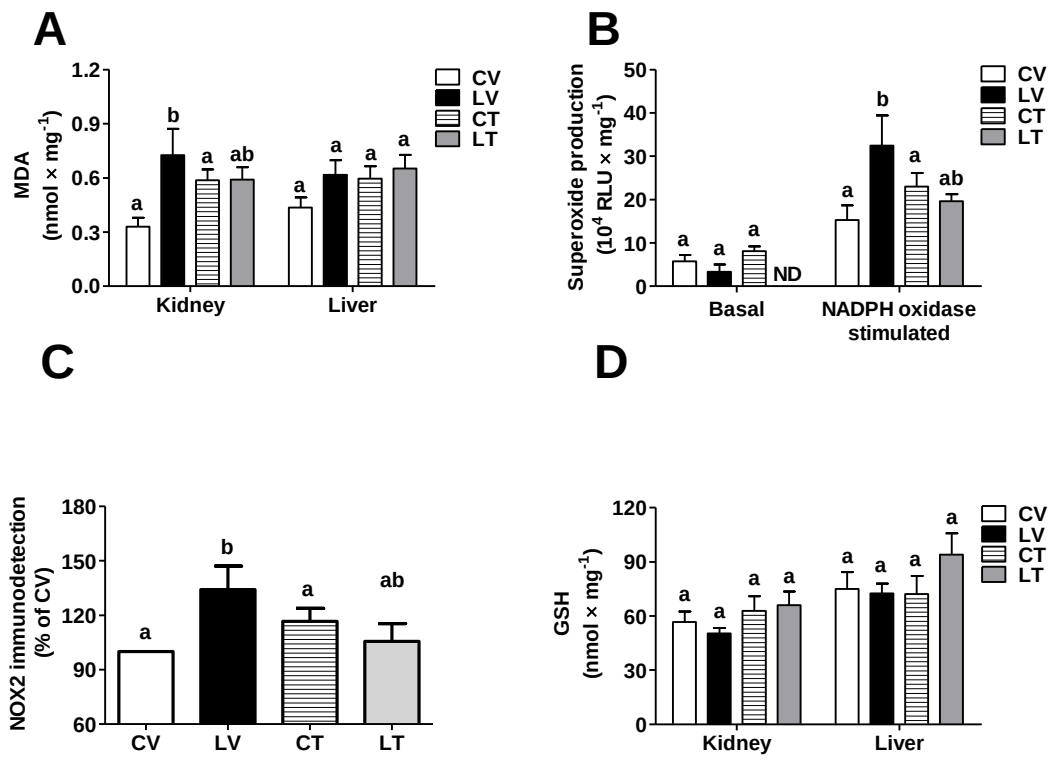


FIGURE 2. Farias *et al.*, 2015.

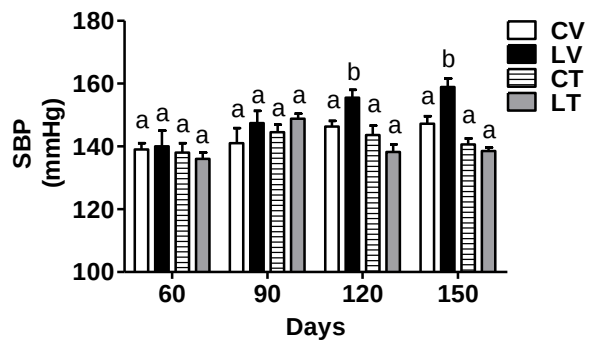


FIGURE 3. Farias *et al.*, 2015.

## CONCLUSÕES

A inflamação materna induziu retardo do desenvolvimento fetal, elevação da peroxidação lipídica no fígado materno, na placenta e no fígado fetal, bem como programou elevação da peroxidação lipídica renal na vida adulta. A peroxidação lipídica renal esteve associada com elevação da expressão proteica e da atividade da NOX2, e pode ser um dos mecanismos envolvidos na elevação dos níveis pressóricos induzidos pela inflamação materna.

O tratamento materno com  $\alpha$ -tocoferol preveniu o aumento do estresse oxidativo placentário e a elevação da pressão arterial, na vida adulta, induzidos pela inflamação materna. O efeito protetor do  $\alpha$ -tocoferol parece envolver, além de seu efeito antioxidante direto, um efeito modulador da expressão proteica na placenta da subunidade p47<sup>phox</sup> da NADPH oxidase.



## ANEXO A – Carta do Comitê de Ética em Experimentação Animal

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 06 de agosto de 2012.

Ofício nº 459/12

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profª. Ana Durce Oliveira da Paixão**  
Departamento de Fisiologia e Farmacologia  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.015422/2012-43

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Estresse oxidativo placentário em ratos e disfunção renal na prole adulta: uma possibilidade de prevenção**".

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE; Animais: Ratos; Linhagem: Wistar; Sexo: machos e fêmeas; Idade e Peso: Fêmeas (90 dias e  $\pm 200g$ ), Machos (18º dia de vida fetal =  $\pm 2g$ ; 1 dia de vida =  $\pm 7g$ ; 90 dias =  $\pm 350g$ ; Número de animais previsto no protocolo: 336

Atenciosamente,

Presidente do CEEA

CCB: Integrar para desenvolver