

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO E FETAL: AÇÃO
ANTIOXIDANTE DA SEMENTE DA *MORINGA OLEIFERA* E
DE UMA DE SUAS LECTINAS, A WSMoL**

ALANA CAROLINA COSTA VERAS

ORIENTADORA: ANA DURCE OLIVEIRA DA PAIXÃO

**RECIFE
2017**

ALANA CAROLINA COSTA VERAS

**ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO E FETAL: AÇÃO
ANTIOXIDANTE DA SEMENTE DA *MORINGA OLEIFERA* E
DE UMA DE SUAS LECTINAS, A WSMoL**

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

Orientador: Ana Durce Oliveira da Paixão

**RECIFE
2017**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Veras, Alana Carolina da Costa

Estresse oxidativo placentário e fetal: ação antioxidante da semente da *Moringa oleifera* e de uma de suas lectinas, a WSMoL / Alana Carolina da Costa Veras- Recife: O Autor, 2017.

64 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Durce Oliveira da Paixão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Bioquímica e Fisiologia, 2017.

Inclui referências

1. Antioxidantes 2. Feto-desenvolvimento 3. Estresse oxidativo I. Paixão, Ana Durce Oliveira da (orientadora) II. Título

572

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-269

ALANA CAROLINA COSTA VERAS

ESTRESSE OXIDATIVO PLACENTÁRIO E FETAL: AÇÃO
ANTIOXIDANTE DA SEMENTE DA *MORINGA OLEIFERA* E DE
UMA DE SUAS LECTINAS, A WSMoL

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

Banca Examinadora:

Ana Durce Oliveira da Paixão
Universidade Federal de Pernambuco

Cláudia Jacques Lagranha
Universidade Federal de Pernambuco

Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco

Teresinha Gonçalves da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Data: 13/02/2017

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, aos meus pais Carlos e Mônica, ao meu irmão Leonardo, ao meu namorado Alessandro e a todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus, que me dá força e paciência para seguir em frente, que me acalma e me levanta nas horas difíceis.

Aos meus familiares, em especial meus pais Carlos e Mônica, meu irmão Leonardo e meu namorado Alessandro, por todo carinho, dedicação e compreensão.

À professora e orientadora dessa pesquisa, Ana Durce Oliveira da Paixão, por doar seu tempo e conhecimento para construção desse trabalho.

Ao professor Leucio Duarte, por todo o apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia e Laboratório de Fisiopatologia Renal pela amizade, cumplicidade, ajuda e incentivo, em especial a Laryssa Nascimento, a melhor aluna de iniciação científica.

Ao laboratório de Bioquímica de Proteínas, em nome da Professora Patrícia Paiva pela colaboração na execução do trabalho.

Aos integrantes do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, do Departamento de Bioquímica e do Departamento de Biofísica pelo auxílio e disponibilidade para uso de equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, pela formação acadêmica e em especial a Djalma por sempre ser solícito e atencioso na resolução dos problemas.

À Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de cursar o mestrado em Bioquímica e Fisiologia.

Por fim, às instituições de fomento, em especial ao CNPq pela bolsa concedida durante o curso de mestrado.

“Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte duas ou três
lagartas se quiser conhecer as borboletas”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

O estresse oxidativo elevado no ambiente materno, durante o período perinatal, pode determinar distúrbios funcionais na prole. O tratamento materno com lipopolissacarídeos (LPS) desencadeia respostas orgânicas similares às desencadeadas por um processo inflamatório, inclusive com elevação do estresse oxidativo. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi investigar a ação antioxidante do extrato aquoso de sementes de *Moringa oleífera* (EASMO) e de uma de suas lectinas, a WSMoL, em ratas submetidas ao tratamento com LPS durante a prenhez. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE, sob o número 23076.009437/2015-15. Ratas Wistar, aos 90 dias de idade, foram acasaladas e após a detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal foram randomicamente separadas em gaiolas individuais e distribuídas em grupo controle tratado com salina (0,5 mL/kg, sc, n=8), grupo controle tratado com EASMO (200 mg/kg, po., n=7), grupo tratado com LPS (0,5 mg/kg, sc, n=9) e grupos tratados com LPS mais EASMO (n=8), WSMoL (1,1 mg/kg, po., n=9) e tempol (T, 18 mg/kg, po, n=6). A salina e o LPS foram administrados nos dias 13, 15, 17 e 19 de gestação, enquanto que os tratamentos com EASMO, WSMoL e tempol foram administrados a partir do 13º até o 19º dia da gestação. No 20º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (60 mg/kg, ip) para coleta de placentas, fígados materno e fetal e rim fetal. O estresse oxidativo foi avaliado através dos níveis de malondialdeído (MDA), pela produção de ânion superóxido (O_2^-) e pelos níveis de glutathiona reduzida (GSH). A análise estatística foi realizada através do teste “t” de Student para comparação entre o grupo controle e tratado com LPS e através de ANOVA one-way, seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos tratados com LPS e os demais tratamentos. As diferenças foram consideradas significantes para $P < 0,05$. O processo inflamatório desencadeado pelo LPS elevou os níveis de MDA no fígado materno e fetal, na urina materna e na placenta, bem como elevou O_2^- na placenta e no rim fetal. O EASMO e a WSMoL reduziram os níveis de MDA e O_2^- nestes órgãos, enquanto que o T reduziu apenas os níveis de MDA no fígado materno e placenta. O LPS reduziu os níveis de GSH no fígado fetal, enquanto a WSMoL teve efeito contrário no fígado materno. Estes dados demonstram que o EASMO e a WSMoL têm ação antioxidante quando administrados *in vivo*, portanto, podem afetar o desenvolvimento fetal.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. *Moringa oleífera*. Desenvolvimento fetal.

ABSTRACT

Maternal environment, during pregnancy, may imprint diseases at adult life. Maternal treatment with lipopolysaccharides (LPS) leads to reactions similar to an inflammatory process, including with increment in oxidative stress. This work aimed to investigate whether aqueous soluble extract from *Moringa oleifera* seeds (AEMOS) and its water soluble lectin, the WSMoL, have antioxidant action in pregnant rats treated with LPS and whether they affect fetal oxidative stress status. The experimental protocol was approved by the Committee for Experimental and Animal Ethics at the Federal University of Pernambuco (No. 23076.009437/2015-15). Wistar rats were mated at age of 90 days and the first pregnancy day was identified by the presence of spermatozoids. At 13th, 15th, 17th and 19th pregnancy days, control dams were treated with physiological saline (0.5 mL/kg, sc), while LPS dams were treated with LPS (0.5 mg/kg, s.c.). From the 13th to 19th pregnancy days, dams treated with LPS were additionally treated with AEMOS (200 mg/kg, by gavage), WSMoL (1.1 mg/kg, by gavage) or tempol (18 mg/kg, dissolved in drinking water). Pregnancy was interrupted at day 20 under sodium tiopental anesthesia to withdraw placentas corresponding to male fetuses, maternal liver and male fetuses. Markers of oxidative stress were malondialdehyde (MDA), superoxide anion (O_2^-) and reduced glutathione (GSH). Statistical analysis was performed by the Student "t" test and one-way ANOVA followed by the Student-Newman-Keuls. $P < 0.05$ was considered different. The LPS treatment increased MDA in maternal liver, maternal urine, placenta and fetal liver, as well as it elevated O_2^- in placenta and fetal kidney. AEMOS and WSMoL reduced MDA and O_2^- in these organs, while tempol reduced MDA only in the maternal liver and placenta. LPS reduced the levels of GSH in the fetal liver, while WSMoL had a contrary effect in maternal liver. The present data show that AEMOS and WSMoL have antioxidant effect when administered in vivo, therefore they can affect fetal development.

Key words: Oxidative stress. *Moringa oleifera*. Fetal development.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo inflamatório desencadeado pelo LPS	17
Figura 2: <i>Moringa oleifera</i> Lamarck	20
Figura 3: Taxonomia da <i>Moringa oleifera</i>	20
Figura 4: Esquema representativo da atividade hemaglutinante das lectinas..	24
Figura 5: Caracterização estrutural da lectina WSMoL	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química das sementes da <i>Moringa oleifera</i>	22
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

EASMO	Extrato aquoso de sementes de <i>Moringa oleifera</i>
GSH	Glutathione reduzida
GSHPx	Glutathione Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MDA	Malondialdeído
MO	<i>Moringa oleifera</i>
NFκB	Fator nuclear κB
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TLR4	Receptor do tipo Toll-like-4
TNF	Fator de necrose tumoral
TRLs	Receptores do tipo Toll-like
WSMoL	Lectina solúvel em água do extrato de sementes da <i>Moringa oleifera</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Geral	16
2.2 Específicos	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 Programação Intrauterina e Desenvolvimento Fetal.....	17
3.2 Inflamação induzida por lipopolissacarídeo.....	17
3.3 Estresse Oxidativo	20
3.3.1. Estresse Oxidativo na gestação	20
3.4 <i>Moringa oleifera</i>.....	21
3.4.1 Origem	21
3.4.2 Características	22
3.4.3 Extrato das sementes da <i>Moringa oleifera</i>	24
3.5 Lectina	25
3.5.1 Conceito	25
3.5.2 Características	25
3.5.3 Classificação.....	26
3.5.4 WSMoL	27
REFERÊNCIAS	29
ARTIGO.....	39
CONCLUSÃO	63
ANEXO A – CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXP. ANIMAL	64

1 INTRODUÇÃO

Alterações do ambiente materno perinatal são capazes de determinar disfunções renais que propiciam a ocorrência de hipertensão e doença renal crônica na prole durante a idade adulta (PAIXÃO e ALEXANDER, 2013). O estresse oxidativo placentário tem se configurado um elo entre o meio ambiente materno e os distúrbios funcionais renais (VIEIRA-FILHO et al., 2009; 2011; 2014), uma vez que a diminuição do estresse oxidativo placentário tem sido correlacionada com prevenção de distúrbios funcionais na prole.

Inflamação materna induzida pelo LPS, endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, aumenta estresse oxidativo na soro materno (AWAD et al., 2011) e programa hipertensão na prole adulta (WEI et al., 2007).

O alfa-tocoferol tem propriedades antioxidantes reconhecidas e é capaz de reverter alterações produzidas pelo ambiente pró-oxidativo materno (VIEIRA-FILHO et al., 2011; 2014). No entanto, esta substância é capaz de programar hipertensão na prole de mães que não foram submetidas a alterações pró-oxidantes (VIEIRA-FILHO et al., 2014). Assim, novas manobras antioxidantes parecem necessárias, estimulando a busca de agentes que sejam capazes de reprogramar alterações produzidas pelo ambiente materno e que não sejam capazes de induzir, *per se*, efeitos indesejáveis.

A *Moringa oleifera* (MO) Lamark (Moringaceae) é uma planta originária do norte da Índia e hoje cultivada na Ásia, África e Américas Central e do Sul. Várias partes da *Moringa oleifera* têm aplicações na medicina popular. Esta planta apresentam componentes ácidos fenólicos e flavonoides que inibem a toxicidade produzida por tetracloreto de carbono, através da diminuição dos níveis de peróxidos de lipídeos e elevação dos níveis de glutathione reduzida e superóxido dismutase (VERMA et al., 2009). Suas sementes, além de apresentarem propriedades nutritivas (OLIVEIRA et al., 1999) e uso medicinal (OGBUNUGAFOR et al., 2011; FAROOQ et al., 2012), contêm proteínas solúveis úteis para o tratamento de águas residuais (BHUPATWAT et al., 2007; FERREIRA et al., 2011; LEA, 2014).

Algumas proteínas da *Moringa oleifera* são lectinas, que têm propriedades para aglutinar moléculas de carboidratos. Por sua vez, a WSMoL (do inglês *water-soluble Moringa oleifera lectin*) é uma lectina isolada a partir do extrato aquoso das sementes da *Moringa oleifera* do ponto de vista medicinal, o extrato aquoso das sementes da *Moringa oleifera* e WSMoL apresentam atividade anti-inflamatória reduzindo os mediadores inflamatórios induzidos por lipopolissacarídeo (ARAUJO et al., 2013) e apresentam atividade antioxidante

discreta *in vitro* (SANTOS et al., 2012), enquanto que o extrato tem efeito antioxidante e leva a efeitos benéficos na fibrose hepática em ratos (HAMZA, 2010). Juntos, esses achados apontam para efeitos do extrato aquoso das sementes da *Moringa oleifera* e da WSMoL, que merecem investigações quando administrados *in vivo*, especialmente no que se refere ao desenvolvimento fetal, uma vez que a AEMOS foi preconizado para purificar a água em algumas populações em desenvolvimento (LEA, 2014) e a WSMoL é conhecida como parcialmente responsável pelo efeito de clarificação da água (FERREIRA et al., 2011; FREITAS et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar ação antioxidante do extrato aquoso de sementes de MO e da lectina WSMoL sobre o estresse oxidativo de órgãos materno e fetais, em ratas submetidas à inflamação induzida por LPS durante a prenhez.

2.2 Específicos

Avaliar os níveis de MDA em órgãos maternos e fetais, após processo inflamatório durante a prenhez.

Avaliar o nível de produção de ânion superóxido em órgãos maternos e fetais, após processo inflamatório durante a prenhez.

Avaliar os níveis de GSH em órgãos maternos e fetais, após processo inflamatório durante a prenhez.

Comparar efeitos do tratamento com o extrato aquoso das sementes da *Moringa oleifera* e com a lectina WSMoL, com o tempol, antioxidante mimético da superóxido dismutase.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Programação Intrauterina e Desenvolvimento Fetal

Denomina-se programação fetal, o processo pelo qual a estimulação ou o insulto num período crítico do desenvolvimento implica em consequências a longo prazo (SIMMONS, 2007; DEVASKAR e THAMOTHARAN, 2007; YAJNIK, 2010; YAN E YANG, 2013). Fisher et al (2012) apontam que um ambiente intrauterino adverso pode ocorrer por diversas razões como subnutrição materna, doença materna ou estresse psicológico. Essas alterações podem tornar um indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento de doenças na vida adulta.

Barker et al (1989) formularam a hipótese de que variações nos fatores ambientais no início da vida, podem levar a adaptações no crescimento e metabolismo capazes de aumentar o risco para doenças crônicas na vida adulta, tais como doença cardiovascular (BARKER et al., 2005), hipertensão arterial (LAW et al., 2002), resistência à insulina, diabetes tipo 2 (BARKER et al., 1999; ERIKSSON et al., 2002), obesidade (RAVELLI et al., 1999; PILGAARD et al., 2011) e doença renal crônica na prole durante a idade adulta (PAIXÃO e ALEXANDER, 2013).

McLean et al (2016) afirmam que o ambiente intrauterino influencia o desenvolvimento de um determinado fenótipo metabólico na descendência. No entanto, o mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não são totalmente compreendidos (REMACLE et al., 2007). Por outro lado, sabe-se que o ambiente pós natal também desempenha um papel preponderante na programação da susceptibilidade da descendência a determinadas doenças (FISHER., et al., 2012).

Conforme já mencionado, são várias as condições maternas que podem afetar o desenvolvimento fetal, inclusive processos inflamatórios (AWAD et al., 2011; WEI et al., 2007).

3.2 Inflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS)

Segundo Abbas (2011), a resposta imunológica é uma reação aos componentes de microrganismos, a macromoléculas e a substâncias químicas reconhecidas como elementos estranhos pelo organismo. Essas respostas compreendem quatro componentes: os estímulos inflamatórios; os sensores que os detectam; a produção de mediadores inflamatórios induzidos pelos sensores e os tecidos alvo que serão afetados pela resposta inflamatória (MEDZHITOV, 2010).

A resposta imune ocorre em um processo integrado que possui componentes que diferem pela especificidade, sendo classificada como resposta imune inata e/ou adaptativa (MEDZHITOV, 2008). A imunidade inata consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que existem previamente à infecção e respondem rapidamente ao desafio imunológico (ABBAS, 2011). Enquanto que, a resposta adaptativa é uma resposta específica e de longa duração devido a uma exposição a antígenos (MEDZHITOV, 2010).

Os principais componentes celulares da imunidade inata são os neutrófilos, monócitos e macrófagos (MEDZHITOV, 2008). Esses, por sua vez, expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (PALM et al., 2009; AKIRA, 2011) capazes de reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) (STROWIG et al., 2010; CHAN et al., 2012). Os receptores do tipo Toll (TRLs) são um exemplo de PRRs (BUCHANAN et al., 2010) e o LPS bacteriano é um exemplo de PAMP, capaz de desencadear os mecanismos da resposta imune inata ao ser reconhecido por receptores do tipo Toll-4 em várias células que participam da resposta imunológica (HAWIGER, 2001). Por outro lado, os componentes celulares da resposta adaptativa são os linfócitos e os mediadores inflamatórios produzidos por estas células (ABBAS, 2011).

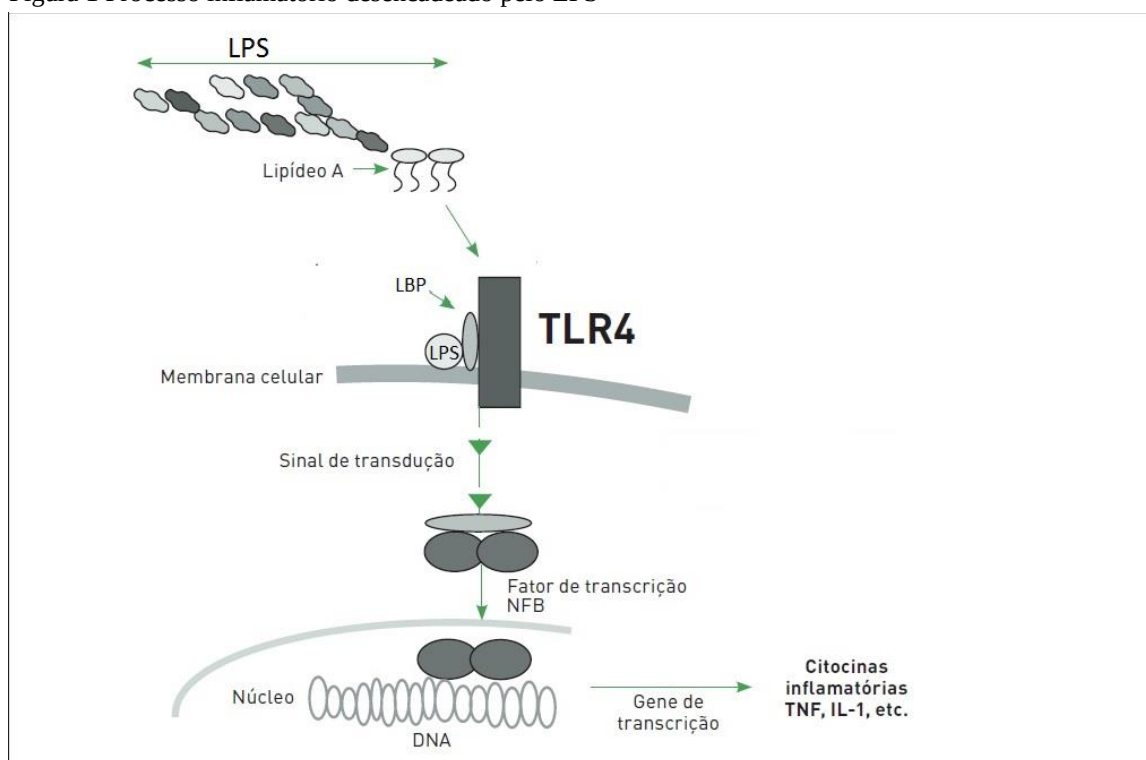
Serhan e Savil (2005) destacam que uma resposta inflamatória bem sucedida é aquela que resulta na eliminação do agente infeccioso seguida pela fase de resolução e reparo tecidual, o qual é mediado principalmente pelos macrófagos recrutados e residentes. Para tal Medzhitov (2010) reconhece a importância de haver um equilíbrio no processo de resolução da inflamação, pois o processo inflamatório exacerbado pode causar dano e injúria tecidual. A inflamação crônica está fortemente associada a patologias como artrite reumatoide, doenças inflamatórias intestinais, asma, diabetes, aterosclerose, como também está relacionada às doenças neurodegenerativas (GLASS et al., 2010; LI et al., 2011).

A inflamação pode ser induzida em animais experimentais através da exposição a produtos da parede celular de bactérias gram-negativas, principalmente o LPS que mimetiza várias das respostas inflamatórias de fase aguda, sem causar infecção ao hospedeiro (BURRELL, 1994). O LPS é formado por uma macromolécula glicolipídica composta de uma região lipídica bifosforilada denominada lipídio A associada a uma cadeia de carboidrato. A porção “lipídio A” é a responsável pela maior parte da atividade imunológica do LPS. Esta macromolécula é reconhecida pelo sistema imune inato em um mecanismo dependente da ativação do receptor do tipo Toll-4 (TLR4) (RIETSCHEL, KIRIKAE et al., 1994; MILLER, ERNST et al., 2005). O TLR4 pode ser expresso em uma variedade de células que participam da resposta imune inata, destacando-se neutrófilos, monócitos, macrófagos, células endoteliais

e células dendríticas (ANDONEGUI, ZHOU et al., 2009; GANLEY-LEAL, LIANG et al., 2010).

Em sua cascata de sinalização, o LPS solúvel ativa o TLR4, através de um mecanismo dependente da proteína ligante do LPS (LBP) e do CD14, uma proteína que pode estar solúvel na circulação ou ancorada na membrana celular de monócitos, neutrófilos e macrófagos. A sinalização intracelular mediada pela ativação do TLR4 via LPS envolve uma ativação sequencial de proteínas específicas, que por fim, conduzem à translocação do fator nuclear κ B (NF κ B) para o núcleo. O NF κ B regula transcricionalmente genes promotores de citocinas inflamatórias como interleucinas (IL) 1β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF), como apresentado na figura 1. A produção dessas moléculas promove uma sinalização para células do sistema imune que medeiam a resposta inflamatória sistêmica e generalizada, observada após a exposição ao LPS (NIJLAND et al., 2014).

Figura 1 Processo inflamatório desencadeado pelo LPS



Fonte: Modificado de Foschesatto Filho e Barros, 2013.

No período gestacional, a inflamação aguda ou processos inflamatórios promovem ativação do sistema imune e aumentam a liberação de glicocorticoides, a produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente de IL- 1β , IL-6, TNF- α , tanto na mãe quanto no feto. Essas citocinas têm a capacidade de atravessar a barreira placentária e hematoencefálica, modulando funções em desenvolvimento, como por exemplo, aquelas ligadas ao sistema nervoso central e

ao sistema imune do feto. Ademais, os patógenos podem ser reconhecidos por células do trofoblasto que por sua vez também produzem citocinas que vão agir no feto (MEYER et al., 2007).

3.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) ou de espécies reativas de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species*) e a defesa antioxidante do organismo (CINDROVA-DAVIES et al., 2007; RUDER et al., 2009; LIMÓN-PACHECO e GONSEBATT, 2009 BURTON et al., 2010;). As ROS são formadas por derivados do oxigênio (ECHTAY, 2007) e se caracterizam por serem moléculas instáveis e altamente reativas. Os principais tipos de ROS são ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH) (BURTON et al., 2011).

O sistema de defesa antioxidante é composto por dois tipos de antioxidantes: os enzimáticos e os não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são denominados de antioxidantes endógenos, estes neutralizam o excesso de ROS e impedem a danificação da estrutura celular. Dentre esses, destaca-se a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSHPx) e a glutathione redutase (GSH), (SILVA e NAVES, 2001). Já os não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes exógenos ou suplementos dietéticos, tais como vitaminas A, E e C, carotenóides e polifenóis como flavonóides e taninos, podendo estes ser associados a atividades antidiabéticas, antineoplásicas e antiinflamatórias (DESMARCHELIER et al., 1999; MCCUNE e JOHNS, 2002; 2007).

O estresse oxidativo aumentado causa danos aos ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios. Dentre estes, a peroxidação lipídica é particularmente prejudicial devido a fácil propagação de reações de radicais livres (ECHTAY, 2007). Ademais, a elevação do estresse oxidativo tem sido correlacionada com envelhecimento, doenças neurodegenerativas e doença renal crônica (PENNATHUR e HEINECKE, 2007).

3.3.1 Estresse Oxidativo na Gestação

A gravidez é caracterizada por aumento na geração das ROS, principalmente de O_2^- que ocorre em função da demanda metabólica aumentada, maior atividade mitocondrial e grande

necessidade de oxigenação da unidade útero-placentária. Portanto, ocorre elevação de peroxidação lipídica (SATTAR et al., 1996; LITTLE e GLADEN, 1999).

Em condições normais, a elevação do status oxidativo é acompanhada de um aumento paralelo da capacidade antioxidante (BUHIMSCHI e WEINER, 2002; SAGOL et al., 1999). Porém, em condições patológicas prevalece a produção de ROS acompanhada de níveis diminuídos da produção da SOD e GSHPx, enzimas antioxidantes presentes nos trofoblastos placentários (GITTO et al., 2002; GRUPTA et al., 2005). Nesta condição, pode ocorrer danos celulares, inclusive do DNA e das proteínas fetais (DOTAN et al., 2004; GRUPTA et al., 2005; GRUPTA et al., 2009).

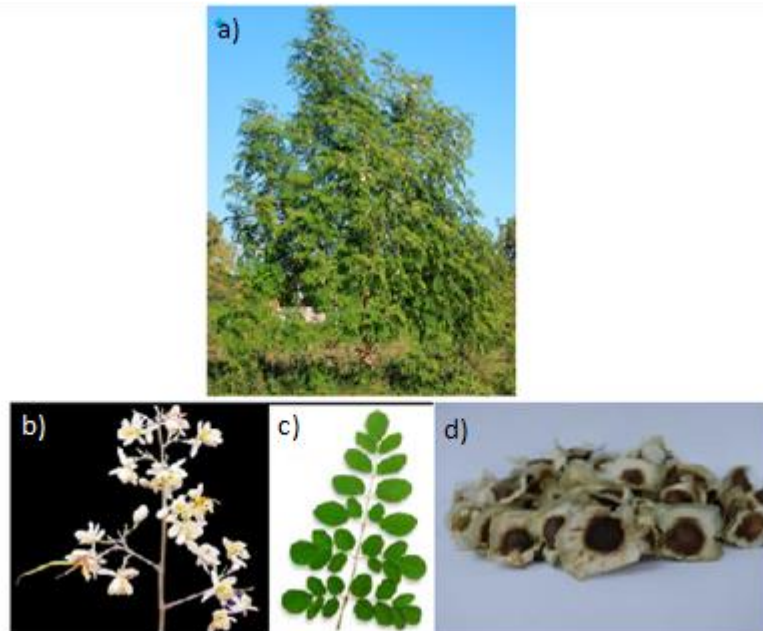
Devido ao intenso metabolismo peculiar ao tecido, a placenta é uma fonte importante de estresse oxidativo durante a gravidez. É um tecido rico em ácidos graxos polinsaturados, que podem sofrer peroxidação, os quais são normalmente lançados na circulação materna. Em condições patológicas, como na pré-eclampsia, as principais enzimas antioxidantes como SOD, catalase, GSHPx, glutathione redutase, glutathione S-transferase presentes na placenta, têm sua atividade diminuída (GITTO et al., 2002) o que acarreta um desequilíbrio entre produção e eliminação de ROS.

3.4 MORINGA OLEIFERA

3.4.1 Origem

Moringa é o único gênero de plantas da família Moringaceae. Esse gênero, por sua vez, é composto por 13 espécies, cuja mais conhecida e estudada é a *Moringa oleifera* Lamark, (PALIWAL e SHARMA, 2011). A *M. oleifera* é uma planta originária do norte da Índia, Afeganistão, Paquistão e Bangladesh, contudo, é cultivada na África e América Latina (OLIVEIRA, 1999). No Brasil, é encontrada em maior número na região Nordeste, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará, sendo conhecida popularmente como lírio-branco, quiabo-de-quina ou simplesmente moringa. A *M. oleifera* pode ser cultivada tanto em climas tropical, quente quanto seco-úmido e é capaz de sobreviver a diversas condições climáticas (MORTON, 1991; ANWAR et al., 2005). Caracteriza-se por ser bastante tolerante à seca, sendo cultivada em regiões áridas e semiáridas, as quais possuem precipitações anuais abaixo de 300 mm, sendo dessa forma uma cultura bastante viável economicamente. Esta planta (Figura 2) é uma árvore de madeira macia com crescimento rápido que chega a alcançar 12 metros de altura (SHARMA, 2011; ROLOFF, 2009).

Figura 2. *Moringa oleifera* Lamarck

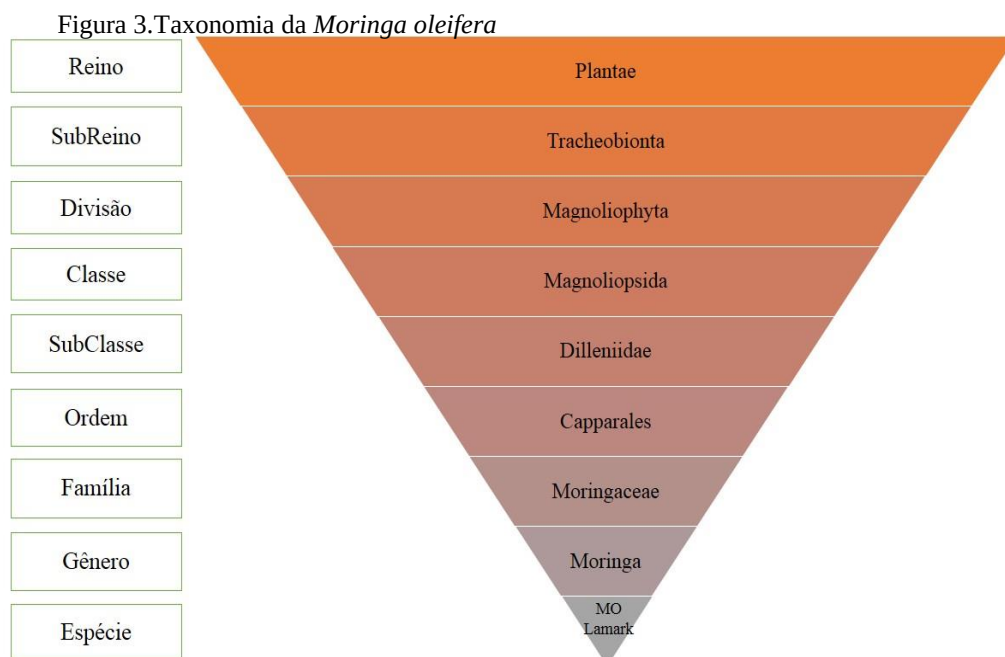


Partes da *M. oleifera*, a) árvore; b) flores; c) folhas; d) sementes.

A *Moringa oleifera* é mencionada como possuidora de inúmeras propriedades e está presente na dieta de grande parte da população do sul da Índia, pelo fato de conter vários aminoácidos e vitaminas (MAKKAR E BECKER, 1996).

3.4.2 Características

A MO é classificada taxonomicamente como apresentado na Figura 3, conforme a descrição do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (Figura 3).



Fonte: Criado a partir de dados obtidos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

A *M. oleifera* é conhecida como árvore milagrosa e árvore da vida. Todas as partes da árvore são tradicionalmente aproveitadas para diversos fins, sendo inclusive utilizadas na medicina tradicional para tratamento de várias doenças (ODEBIYI, 1999). As flores, raízes, frutas e sementes da *Moringa oleifera* são muito usadas no tratamento de inflamação, disfunção cardiovascular, doenças hepáticas e hematológicas e mau funcionamento renal (MAZU et al., 1999; RAO e MISHRA, 1998; MAHAJAN e MEHTA, 2008), doenças gastrointestinais e desordens hepatorenal (NADKARNI, 1976; PARROTTA, 2001) e normalização dos níveis de açúcar e colesterol no sangue (LIMAYE et al., 1995; RAO e MISRA, 1998).

Entre os componentes da *M. oleifera* estão substâncias com atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, destacando-se ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides e ácido ascórbico (DILLARD et al., 2000; SIDDHURAJU et al., 2003), além de isotocianato e derivados fenólicos (ANWAR et al., 2007). Ainda, destaca-se a presença de as vitaminas A, B, C e E, assim como riboflavina, ácido linolênico e ácido fólico nas folhas da MO (AMAGLO et al., 2009; ANWAR et al., 2007; SHIH et al., 2011). Além disso, foram encontrados alcaloides, taninos, saponinas e antraquinonas nas sementes (KASOLO et al., 2011; KAWO et al., 2009). No mais, a MO é rica em minerais como cálcio, potássio e magnésio.

Verma et al (2009) comprovaram que ácidos fenólicos e flavonoides, presentes na sementes da *M. oleifera*, inibem a toxicidade produzida por tetracloreto de carbono, pela diminuição dos níveis de peróxidos de lipídeos e elevação dos níveis de GSH e SOD. No mais, diversos estudos têm focado na composição química dessa planta, e tem sido identificado lectinas que podem conferir a *M. oleifera* propriedades farmacológicas (KAWO et al., 2010; HAMZA, 2010; MEHTA e AGRAWAL, 2008).

Os componentes da *M.oleifera* são também usados com fins nutricionais. Segundo Fashey (2005), as qualidades nutricionais da MO estão relatadas tanto na literatura científica quanto na popular. A Moringa é usada como produto alimentar em comunidades onde existem desnutrição proteica (KAFUKU et al., 2010; RASHID et al., 2011), na Índia, Paquistão, Filipinas e boa parte da África (D'SOUZA et al., 1993; ANWAR et al., 2003; 2005). Ainda, diversos benefícios para saúde são descritos como resultado da suplementação com folhas, sementes da *M.oleifera* ou seus respectivos extratos (MAHAJAN et al., 2007; HAMZA, 2010; YASSA e TOHAMY, 2014).

3.4.3 Extrato das sementes da *Moringa oleifera*

Quanto à composição química das sementes da *Moringa oleifera*, Gallão (2006) observou teor considerável de lipídios, aproximadamente 19%, sendo as proteínas a classe encontrada em maior quantidade, aproximadamente 40% (tabela 1).

Tabela 1. Composição química das sementes da *Moringa oleifera*

Composição	Semente
Umidade (%)	6,3
Açúcares solúveis (g/100g)	3,14
Oligossacarídeos (g/100g)	3,31
Amido (g/100g)	6,02
Proteínas (g/100g)	39,3
Lipídeos (g/100g)	18,8

Fonte: Gallão et al., 2006.

As sementes possuem atividade antifúngica, antibacteriana (RASHID et al., 2008), coagulante, antitumoral (GUEVARA e VARGAS, 1999), anti-inflamatória e antioxidante (KUMBHARE, 2012). Também tem sido relatado que o extrato de sementes pode ser usado para tratar doenças estomacais, da visão, dor nas articulações, diabetes, anemia e hipertensão arterial, dor de dente, hemorróidas e distúrbios uterinos (POPOOLA e OBEMBE, 2013; ABE e OHTANI, 2013). Além disso, o óleo extraído das sementes pode ser usado pelas indústrias alimentícias, farmacêutica e de cosméticos, bem como para cozinhar e confeccionar sabão (SILVA et al., 2013). As sementes da *Moringa* também são utilizadas para purificar água (LEA, 2010), com dose de 0.2 µg/µL (ROLIM et al., 2011).

Por outro lado, Villaseñor (1989) relatou algumas substâncias prejudiciais encontradas nas sementes da *M.oleifera* tais como 4-fenilacetoneitrila, 4-hidroxifenilacetoneitrila, e 4-hidroxifenilacetamida. O mesmo autor demonstrou que esses compostos isolados a partir de sementes torradas apresentaram efeitos mutagênicos em um ensaio de micronúcleos em camundongos.

Dentre as moléculas bioativas das sementes da *M.oleifera* estão as lectinas que são proteínas capazes de interagir com carboidratos (ARAUJO et al., 2013).

3.5 Lectinas

3.5.1 Conceito

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune, que apresentam atividade hemaglutinante e estrutura diversificada, contendo pelo menos um domínio de ligação a carboidratos, tais como monossacarídeo e oligossacarídeo. As lectinas se ligam aos carboidratos de forma reversível e seletiva através de ligações de hidrogênio e pontes de Van der Waals (CORREIA et al., 2008; PEUMANS et al., 2001, SHARON e LIS, 2004; SHARON, 2007).

Essas proteínas estão distribuídas amplamente na natureza (RATANAPO et al., 2001), e tem sido isoladas de vírus, bactérias e fungos (TRIGUEIROS et al., 2003, ZHAO et al., 2009, WANG et al., 2009), bem como em vertebrados, incluindo os mamíferos (KILPATRICK, 2002). Nas plantas, as lectinas podem ser encontradas e isoladas de sementes (SANTOS et al., 2009), folhas (NAPOLEÃO et al., 2011), flores (ITO, 1986), raízes (SOUZA et al., 2011), frutos (THAKUR et al., 2007) e rizomas (ALBUQUERQUE et al., 2012).

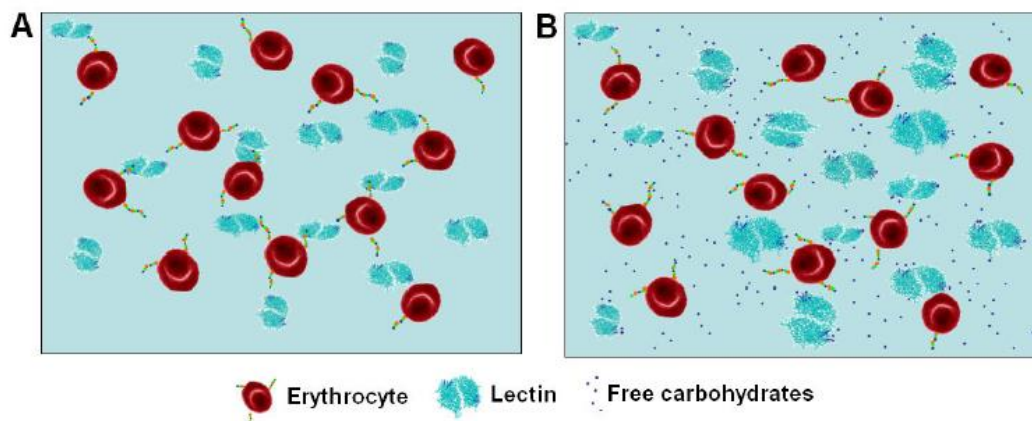
As lectinas de plantas são as mais estudadas atualmente devido à sua importância econômica e nutricional (LIS e SHARON, 1998).

3.5.2 Caracterização

As lectinas se diferenciam pela composição e pela sequência de aminoácidos na cadeia polipeptídica, além do número de subunidades na estrutura proteica. São também diferentes no que diz respeito à necessidade da presença de metais para atividade hemaglutinante, assim como na especificidade do sítio de ligação a carboidratos (KENNEDY et al., 1995; CORREIA et al., 2008)

Segundo Santos et al (2005), as lectinas podem ser detectadas em material biológico a partir de ensaios de aglutinação, onde há a interação dessas proteínas com os carboidratos da superfície celular do eritrócito por meio de seus sítios de ligação (figura 4). Estas moléculas também podem ser isoladas por diferentes técnicas de purificação, como cromatografias de afinidade, troca iônica, interação hidrofóbica e filtração em gel (LAM e NG, 2011).

Figura 4. Interação das lectinas com os carboidratos



Fonte: Trazido de Paiva et al (2010). Representação esquemática da rede de eritrócitos promovida pela ligação da lectina aos carboidratos de superfície (A) e Inibição da atividade de hemaglutinação por hidratos de carbono livres (B).

As propriedades biológicas das lectinas incluem aglutinação de células bacterianas, agregação plaquetária (RADI-BAPTISTA et al., 2006), atividade mitogênica (ZHENG et al., 2007), antimitogênica (LIU et al., 2006), inseticida (KAUR et al., 2015; PAIVA et al, 2012; COELHO et al., 2007), antifúngica (YAN et al., 2005), antibacteriana (TUNKIJJANUKIJ e OLAFSEN, 1998), antitumoral e atividade anti ou pró-inflamatória (PIRES et al, 2016; SANTIAGO et al, 2014; TEIXEIRA et al, 2014).

Experimentos *in vivo* demonstraram que lectinas de plantas podem exercer ações pró ou anti-inflamatórias dependendo da via em que são administradas. (ALENCAR et al., 2004). Estes efeitos geralmente são oriundos da ativação ou inibição de neutrófilos, via interação entre o domínio ligante a carboidrato da lectina e resíduos de carboidratos presentes na membrana das células, por um mecanismo indireto (FIGUEIREDO et al., 2009).

Segundo Peumans e Van Damme (1995) algumas lectinas podem estar envolvidas nos mecanismos de defesa relacionado à sua afinidade por carboidratos. Estudos apontam que as lectinas que possuem como açúcares ligantes N-acetil-D-glucosamina e glucose-manose inibem a infiltração neutrofílica em diferentes modelos de inflamação (ALENCAR et al., 1999).

3.5.3 Classificação

As lectinas podem ser classificadas de acordo com a especificidade da interação com carboidratos em: galactose, glicose/manose (WONG E NG, 2005), manose (GIBSON et al., 2008; MARZI et al., 2007; VAN DE GEJIN et al., 2007), glicose, galactose e galactosamina acetilada (CHUMKHUTHOD et al, 2006), ácido siálico (BHOWAL et al., 2005; GERLACH

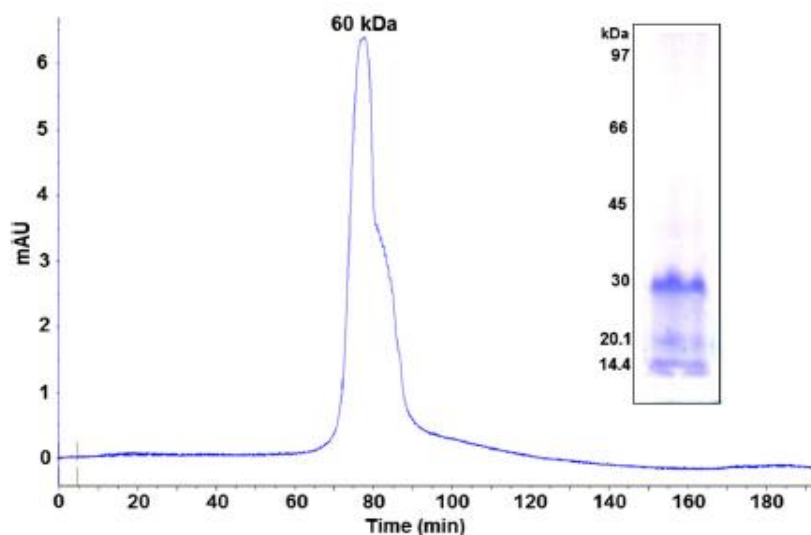
et al., 2002), xilose (LIU et al., 2006), lactose (HAN et al., 2005), arabinose (WANG e NG, 2005) e raminose (NITTA et al., 2007).

Quanto à estrutura, as lectinas podem ser classificadas como merolectinas, hololectinas, quimerolectinas (PEUMANS e VAN DAMME, 1998) e superlectinas (PEUMANS et al., 2001). As merolectinas são proteínas monovalentes que possuem apenas um sítio de ligação. Já as hololectinas possuem no mínimo dois sítios de ligação a carboidratos, sendo idênticos ou homólogos, e precipitam glicoconjugados e/ou aglutinam células. Por outro lado, as quimerolectinas possuem um ou mais sítios de ligações a carboidratos e também outros sítios independentes que não se ligam a carboidratos. Por fim, a superlectinas, são proteínas que apresentam pelo menos dois sítios de ligação para carboidratos diferentes.

3.5.4 WSMoL (Water soluble MO lectin)

Uma das lectinas presentes na *Moringa oleifera* é a WSMoL, que apresenta massa molecular de 60 kDa, sendo composta por três polipeptídeos com massas moleculares de aproximadamente 30, 20 e 15 kDa (figura 5).

Figura 5. Caracterização estrutural da WSMoL



Fonte: Retirado de Moura et al., 2016.

Esta lectina é isolada a partir do extrato aquoso das sementes de moringa através de extração de proteínas em água destilada, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia em coluna de quitina (COELHO et al., 2009).

A WSMoL apresenta atividades antibacteriana e coagulante (FERREIRA et al., 2011), não genotóxica (ROLIM et al., 2011) e promove efeitos deletérios em larvas e ovos de *Aedes aegypti* (COELHO et al., 2009; SANTOS et al., 2012).

Embora a atividade anti-inflamatória tenha sido demonstrada para lectinas (LEITE et al., 2012; SILVA et al., 2010), estudos acerca das ações farmacológicas da WSMoL ainda são inexistentes. Em conjunto, esses achados apontam para efeitos do extrato aquoso das sementes da *M. oleifera* e da WSMoL, que merecem investigações quando administrados *in vivo*, especialmente no que se refere ao desenvolvimento fetal, uma vez que a AEMOS foi preconizado para purificar a água em algumas populações em desenvolvimento (LEA, 2014) e a WSMoL é conhecida como parcialmente responsável pelo efeito de clarificação da água (FERREIRA et al., 2011; FREITAS et al., 2016).

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia Celular e Molecular**. 7. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ABE, R.; OHTANI, K. An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. **Journal Ethnopharmacology**, v.145, p. 554–565, 2013.

AKIRA, S. Innate immunity and adjuvants. **Philosophical Transactions of the Royal Society London Biological Sciences**, v. 366, p.2748 – 2755, 2011

ALBUQUERQUE, L.P. et al. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.75, p. 158–166, 2012.

ALENCAR, N.M.N. et al. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p.107-113, 1999.

ALENCAR, N.M.N. et al. Vatairea macrocarpa lectin induces wa edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v.11, p. 195-200, 2004.

ANWAR, F. et al. Analytical characterization of *Moringa oleifera* seed oil grown in temperate regions of Pakistan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6558–6563, 2003.

ANWAR, F. et al. Interprovenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, p. 45–5, 2005.

ANWAR, F. Et al. *Moringa oleifera* Lam.: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 17-25, 2007.

ARAÚJO, L. et al. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. **Plos One**, v. 8, 2013

AWAD, N. et al. R. N-acetyl-cysteine (NAC) attenuates LPS-induced maternal and amniotic fluid oxidative stress and inflammatory responses in the preterm gestation. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 204, n. 5, p. 450. 2011.

BHOWAL, J. et al. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1973-1982, 2005.

BHUPTAWAT, H.; FOLKARD, G.K.; CHAUDHARI, S. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. **Journal Hazardous Materials**. v. 142, p. 477-82, 2007.

BUCHANAN, M.M. et al. Toll-like receptor 4 in CNS pathologies. **Journal of Neurochemistry**, v. 114, n. 1, p. 13-27, 2010.

BUHIMSCHI, I.A.; WEINER, C.P. Oxygen free radicals and disorders of pregnancy. **Fetal Maternal Medicine Review**, v. 12, p.273-98, 2002.

BURRELL R: Human responses to bacterial endotoxin. **Circulatory Shock**, v. 3, p.137-53, 1994.

BURTON, G.; JAUNIAUX, E. Oxidative Stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, p.287–299, 2010.

CACERES, A. et al. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 2: screening for antispasmodic, anti-inflammatory and diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 3, p. 233-237, 1992.

CHAN, C.T.Y. et al. Reprogramming of tRNA modifications controls the oxidative stress response by codon-biased translation of proteins. **Nature Communication**, v. 3, n. 937, p. 1-21, 2012.

CHUMKHUNTHOD, P. et al. Purification and Characterization of an N-acetyl-d-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 326-332, 2006.

CINDROVA-DAVIES, T. et al. Oxidative stress, gene expression, and protein changes induced in the human placenta during labor. **American Journal of Pathology**, v. 171, p.1168–1179, 2007.

COELHO, J. et al. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, v. 77, p. 934–938, 2009.

COELHO, M.B. et al. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera:Pyralide): Comparative Biochemistry and Physiology Part C. **Toxicology and Pharmacology**, v. 146, p.406-414, 2007.

CORREIA, M.T.S. et al. Lectins carbohydrate recognition molecules: are they toxic? **Recent Trends in Toxicology**, 2008. p. 47-59, 2008.

COUTINO-RODRIGUEZ, E. et al. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinating property of *rschemia coli* 0157:h7. **Archives of Medical Research**, v. 32, p.251-257, 2001.

DESMARCHELIER, C. et al. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the ‘Caatinga’ region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69–77, 1999.

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS. Natural Resources Conservation Service. Plants Database. Disponível em: <https://plants.usda.gov/classification.html>. Acessado em: 16 de janeiro de 2017

D'SOUZA, J. Comparative studies on nutritive values of tender foliage of seedlings and mature plants of *Moringa oleifera* Lam. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, v. 17, p. 479–485, 1993.

DEVASKAR, S.U.; THAMOTHARAN, M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance. **Reviews in Endocrine e Metabolic Disorders**, v. 8, n. 2, p.105-13, 2007.

DILLARD, C. et al. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n.12, p.1744-1756, 2000.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 200-27, 2004.

ECHTAY, K. Mitochondrial uncoupling proteins-What is their physiological role? **Free Radical Biology & Medicine** v. 43, p. 1351-1371, 2007.

FAHEY, J. *Moringa oleifera*: A review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. **Tree Life Journal**, v. 1, p.1-15, 2005.

FAROOQ, F. et al. Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. **Journal of Medicine Plants Research**, v. 6, n. 27, p. 4368-4374, 2012.

FERREIRA, R. et al. Coagulant and antibacterial activities of the watersoluble of sees lectin from *Moringa oleifera*. **Letters in Applied Microbiology**. v. 53, n. 2, p. 186-92, 2011.

FIGUEIREDO, J.G. et al. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induce by *Diocela rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 736-744, 2009.

FISHER, R.E.; STEELE, M.; KARROW, N.A. Fetal programming of the neuroendocrine-immune system and metabolic disease. **Journal of Pregnancy**, 2012.

FOCHESATTO-FILHO, L.; BARROS, E. **Medicina Interna na Prática Clínica**. Artmed, 2013, Porto Alegre.

FREITAS, J.H. et al. Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. **Protein Peptide Letters**, v.23, p. 645-9, 2016.

GALLAO, M.I.; DAMASCENO, L.F.; BRITTO, E.S. Chemical and strucutural evaluation of moringa seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p.106-109, 2006.

GANATRA, T.H.; JOSHI, U.H.; DESAI, T.R.; TIRGAR, P.R. Investigation of cardi tonic activity of *Moringa oleifera* roots in doxorubicin induced congestive heart failure. **Journal of Pharmacy Research**, v. 5, n.7, p. 15-23, 2012.

GERLACH, D. et al. Chemical and physicochemical characterization of the sialic acid-specific lectin from *Cepaea hortensis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, p. 61-98, 2002.

GIBSON, C. et al. Mannose binding lectin haplotypes are associated with cerebral palsy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 197, n. 5, p.14, 2008.

GITTO, E. et al. Causes of Oxidative Stress in the Pre- and Perinatal Period. **Biology of the Neonate**, v. 81, n. 3, p.146– 157, 2002.

GOLDSTEIN, I. et al. What should be called a lectin? **Nature**, p.285-66, 1980.

GUEVARA, A.; VARGAS, C. An antitumor promoter from *Moringa oleifera* Lam. **Mutation Research**, v. 440, p. 181–188, 1999.

GUPTA, S. et al. Lipid peroxidation and antioxidant status in preeclampsia: a systematic review. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 6, n. 11, p.750-9, 2009.

GUPTA, S.; Agarwal, A.; Sharma, R.K. The role of placental oxidative stress and lipid peroxidation in preeclampsia. **Obstetrical Gynecological Survey**, v. 60, n. 12, p.807-16, 2005.

HAMZA, A. et al. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lamseed Extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 48, no. 1, pp. 345–355, 2010.

HAN, C.H et al. A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible Split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, p. 252-257, 2005.

HAWIGER, D. et al. Dendritic Cells Induce Peripheral T Cell Unresponsiveness Under Steady State Conditions In Vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 6, p. 769–779, 2001.

KAFUKU, G. Et al. Alkaline catalyzed biodiesel production from *Moringa oleifera* oil with optimized production parameters. **Applied Energy**, v. 87, 2010.

KAUR, M. et al. Assessment of *Sauromatum Guttatum* lectin toxicity against *Bractocera curcubita*. **Journal Environment Biology**, v. 26, n. 6, p.1263-1268, 2015.

KENNEDY, J.F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochemical and Biophysical Acta**. v. 1572, n. 2-3, p.187-197, 2002.

KUMBHARE, M. et al. Estimation of total phenolic content, cytotoxicity and in-vitro antioxidant activity of stem bark of *Moringa oleifera*. **Asian Pacific Journal**, v. 12, n. 2, p. 144-150, 2012.

LAM, S. K., NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n.1, p. 45–55, 2011.

LEA, M. Bioremediation of Turbid Surface Water Using Seed Extract from *Moringa oleifera* Lam. (Drumstick) Tree. **Current Protocols Microbiology**, 2010.

- LEITE, J. F. M. et al. Antinociceptive and Antiinflammatory Effects of a Lectin-Like Substance from *Clitoria fairchildiana* R. Howard Seeds. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 3277-3290, 2012.
- LIMAYE, D. et al. Cardiovascular effects of *Moringa pterygosperma*. **Phytotherapy Research**, v. 9, p. 37-40, 1995.
- LIMÓN-PACHECO, J; GONSEBATT, M. The role of antioxidants and antioxidant related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research**. v. 674, p. 137-147, 2009.
- LITTLE, R.E.; GLADEN, B.C. Level of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 347-52, 1993.
- LIU, Q.H. et al. First report of a xylose-specific lectin with potente hemagglutinating, antiproliferative and anti-mitogenic activities from a wild ascomycete mushroom. **Biochemical & Biophysical Acta**, v. 1760, n. 12. p. 1914-1919, 2006.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p.637-674, 1998.
- MAHAJAN, G.; MEHTA, A. Effect of *Moringa oleifera* Lam. seed extract on ovalbumin-induced airway inflammation in guinea pigs, **Inhalation Toxicology**, v. 20, n. 10, p. 897–909, 2008.
- MAHAJAN, S. et al. Protective effect of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. Against inflammation associated with development of arthritis in rats, **Journal of Immunotoxicology**, v. 4, n. 1, p. 39–47, 2007.
- MAKKAR, H.; BECKER, K. Nutritional value and antinutritional components of whole and ethanol extracted *Moringa oleifera* leaves. **Animal Feed Science and Technology**, v. 63, p. 211–228, 1996
- MARZI, A. et al. Modulation of HIV and SIV neutralization sensitivity by DC-sing and mannose-binding lectin. **Virology**, v. 368, p.322-330, 2007.
- MAZU, U. et al. Evaluation of hematological and hepatorenal functions of methanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. root treated mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, n. 6, p. 612–614, 1999.
- MCCUNE, L.M.; JOHNS, T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest. **Journal Ethnopharmacology**. v. 82, p. 197-205, 2002.
- MCCUNE, L.M.; JOHNS, T. Antioxidant activity relates to plants part, life form and condition in some diabetes remedies. **Journal Ethnopharmacology**. v. 112, p. 461-469. 2007.

- MCLEAN, M.; CHIPPS, D.; CHEUNG, N.W. Mother to child transmission of diabetes mellitus: does gestational diabetes program Type 2 diabetes in the next generation? **Diabetic Medicine: a journal of the British Diabetic Association**, v. 23, n. 11, p.1213-5, 2006.
- MEDZHITON, R. Origin and Physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: a new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771 -776, 2010.
- MEDZHITOV, R. Innate immunity: quo vadis? **Nature Immunology**, v. 11, n. 7, p. 551-553, 2010.
- MEHTA, A. et al. Investigation into the mechanism of action of *Moringa oleifera* for its anti-asthmatic activity. **Oriental Pharmacy and Experimental Medicine**. vol. 8, p. 24-31, 2008.
- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **The developing human: Clinically Oriented Embryology**. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders, 2003.
- MORTON, J. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae)—a boon to arid lands? **Economic Botany**, v. 45, n. 3, p. 318–333, 1991.
- MOURA, K.S., et al. Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 180, n.7, p.1361-1371, 2016.
- NADKARNI, A. **Indian Materia Medica**. Popular Prakashan, Bombay. p. 810–816,1976.
- NANDAVE, M. et al. *Moringa oleifera* leaf extract prevents isoproterenol-induced myocardial damage in rats: evidence for an antioxidant, antiperioxidative, and cardioprotective intervention. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 1, p.47–55, 2009.
- NAPOLÊÃO, T. H. et al. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 52-59, 2011.
- NIJLAND, R et al., Recognition of LPS by TLR4: Potential for Anti-Inflammatory Therapies. **Marine Drugs**, v. 12, p. 4260 – 4273, 2014.
- NITTA, K. et al. Rhamnose-binding lectin from catfish eggs comes to rest cell proliferation in Gb3-expressing Burkitt's lymphoma cells though down-regulation of c-myc. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 149, p. 35, 2007.
- ODEBIYI, A.; SOFOWORA, E. Pytochemical screenings of Nigerian medicinal plants part 11. **Lloydia**, v. 44, p. 234–246, 1999.
- OGBUNUGAFOR, H.A. et al. Physico-chemical and Antioxidant Properties of *Moringa oleifera* Seed Oil. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 10, p. 409-414, 2011.

OLIVEIRA, J. et al. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 815-820, 1999.

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. 144, 2013.

PAIVA, P.M.G. et al. Antimicrobial activity of secondary metabolites and lectins from plants. In Current Research, **Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. Edited by Mendez-Vilas A. Brazil: Formatex; p.396–406, 2010.

PAIVA, P.M.G. et al. Insecticidal activity of lectins and secondary metabolites. In: PERVEEN, F. (Ed.), **Insecticides – Advances in integrated pest management**. Rijeka: InTech, p. 579-598, 2012.

PALIWAL, R.; SHARMA, V. A review on horse radish tree (*Moringa oleifera*): multipurpose tree with high economic and commercial importance. **Asian Journal of Biotechnology**, v. 3, p. 317–328, 2011.

PALM, N.W.; MEDZHITOV R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. **Immunological review**, v. 227, p. 221-233, 2009.

PANDA, S.; Kar, A.; Sharma, P. Cardioprotective potential of N, α -L rhammopyranosylvincosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of *Moringa oleifera* in isoproterenol induced cardiotoxic rats: in vivo and in vitro studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n 4, p. 959–62, 2013.

PENNATHUR, S.; HEINECKE, J. Mechanisms for oxidative stress in diabetic cardiovascular disease. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.9, n. 7, p.955-969, 2007.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J. et al. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related protein. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. 491, p.27-54, 2001.

PIRES, A.F. et al. A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflammation Research**, v.65, p. 43-52, 2016.

POPOOLA, J.; OBEMBE, O. Local knowledge, use pattern and geographical distribution of *Moringa oleifera* Lam. (Moringaceae) in Nigeria. **Journal Ethnopharmacology**, v.150, p. 682–691, 2013.

RADIS-BAPTISTA, G. et al. Crotacetin, a novel snake venom C-type lectin homolog pf convulxin, exhibits an unpredictable antimicrobial activity. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 44, p.412-423, 2006.

- RAO, K.; MISHRA, S. Anti-inflammatory and antihepatotoxic activities of the rats of moringa pterygosperma geaertn. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, n. 1, p. 12–16, 1998.
- RASHID, U. et al. Application of response surface methodology for optimizing transesterification of *Moringa oleifera* oil: Biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 3034–3042, 2011.
- RASHID, U. et al. *Moringa oleifera* oil: A possible source of biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8175–8179, 2008.
- RATANAPO, S. et al. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv *mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739–744, 2001.
- REMACLE, C. et al. Intrauterine programming of the endocrine pancreas. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 9, n 2, p. 196-209, 2007.
- ROLIM, L. et al. Genotoxicity Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Extract and Lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. T53–T58, 2011.
- RUDER, E.; HARTMAN, T.; GOLDMAN, M. Impact of oxidative stress on female fertility. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.21, n. 3, p. 219–222, 2009.
- SAGOL, S.; OZKINAY, E.; OZSENER S. Impaired antioxidant activity in women with pre-eclampsia. **Internacional Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 64, p. 121-7, 1999.
- SANTIAGO, A.R. et al. Purification, characterization and partial sequence of a pro-inflammatory lectins from seeds of *Canavalia oxyphylla*. **Journal of Molecular Recognition**, v. 27, p. 117-123, 2014.
- SANTOS, A.F.S. et al. Detection of water soluble lectin and antioxidant component from *Moringa oleifera* seeds. **Water Research**, vol.39, p. 975–980, 2005.
- SANTOS, A.F.S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.
- SANTOS, N. et al. Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* lectin on *Aedes aegypti*. **Plos One**, v. 7, n. 9, 2012.
- SATTAR, N. et al. Potential pathogenic roles of aberrant lipoprotein and fatty acid metabolism in preeclampsia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 103, p. 614-20, 1996.
- SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p.1191-7, 2005.
- SHARMA, V. et al. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. pods. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, 554–557, 2011.

SHARON, N. Carbohydrate-specific reagentes and biological recognition molecules. **Journal Biological Chemistry**, v. 282, p. 2753 – 2764, 2007.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinin to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, n.11, p. 53-62, 2004.

SHEFFIELD, J. S. Sepsis and septic shock in pregnancy. **Critical Care Clinics**, v. 20, p. 651-660, 2004.

SIDDHURAJU, P. et al. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agro-climatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n.8, p. 2144-2155, 2003.

SILVA, C.; NAVES, M. Suplementação de vitaminas na prevenção do cancer. **Revista Nutrição**. v. 14, n. 2, p. 135-143.

SILVA, L. M. C. M. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.33, n. 5, p. 830-835, 2010.

SIMMONS, R.A. Role of metabolic programming in the pathogenesis of beta-cell failure in postnatal life. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v.8, n.2, p. 95-104, 2007.

SOUZA, J.D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, p. 696-702, 2011.

STROWING, T. et al. Inflammasomes in health and disease. **Nature**, v. 481, p. 278-286, 2012.

TEIXEIRA, C.S. et al. Manose-specific legume lectin from seeds of *Dolichos lablab* (FRIL) stimulates inflammatory and hypernociceptive process in mice. **Process Biochemistry**, v. 49, p 529-534, 2014.

THAKUR, A. et al. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 9 p. 1404–1412, 2007.

TRIGUEIROS, V. et al. Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, n. 3 p. 292-298, 2003.

TUNKIJANUKIJ, S.; OSAFSEN, J. A. Sialic acid-binding lectin with antibacterial activity from the horse mussel: further characterization and immunolocalization. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 22, p. 139-150, 1998.

VAN DAMME, E. et al. **Handbook of Plant Lectins: Properties and Biomedical Applications**. Ed. John Wiley and Sons, p.452, 1998.

VAN DE GEJIN, F.E. et al. Mannose-binding lectin genotypes and pre-eclampsia: A case study. **Human Immunology**, v. 68, p. 888-893, 2007.

VERMA, A. et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringaoleifera* leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p.2196–2201, 2009.

VIEIRA-FILHO, L.D. et al. Alpha-tocopherol prevents intrauterine undernutrition-induced oligonephronia in rats. **Pediatric Nephrology**. v.26, p. 2019-29, 2011.

VIEIRA-FILLHO, L. D. Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **British Journal of Nutrition**, v. 2, p.1-13, 2014.

VIEYRA, A. Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α -tocopherol during lactation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 505, n. 1, p. 91-7, 2011.

VILLASENOR, I. et al. Mutagens from roasted seeds of *Moringa oleifera* seeds. **Mutation Research** vol, 224, p. 209-212, 1989.

WANG, H.X.; NG, T.B. First report of an arabinose-specific fungal lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 337, n. 2, p.261-625, 2005.

WANG, X.W. et al. A novel C-type lectin (FeLec4) facilitates the clearance of *Vibrio anguillarum* in vivo in Chinese White shrimp. **Developmental e Comparative Immunology**. v. 33, p. 1039-1047, 2009.

WEI, Y.L.; Li, X.H.; Zhou, J.Z. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 28, n. 5, p.651-6, 2007.

YABESH, J. et al. An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India. **Journal Ethnopharmacology**, v. 154, p.774–789, 2014.

YAJNIK, C.S. Fetal programming of diabetes: still so much to learn! **Diabetes Care**, v. 33, n 5, p.1146-8, 2010.

YAN, J.; Yang, H. Gestational diabetes mellitus, programming and epigenetics. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v.27, n.12, p.1266-9, 2014.

YASSA, H.; TOHAMY, A. Extract of *Moringa oleifera* leaves ameliorates streptozotocin-induced Diabetes mellitus in adult rats, **Acta Histochemica**, v. 116, n. 5, p. 844–854, 2014.

ZHAO, J.K. et al. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrellae*. **Toxicon**, v. 53, n.3, p. 360-366, 2009.

ZHENG, S. et al. A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1620- 1624, 2007.

ARTIGO

Artigo para ser submetido ao Journal of Ethnopharmacology

Aqueous soluble extract from *Moringa oleifera* seeds and one of its lectin effects on placental and fetal oxidative stress

Alana Veras^a, Laryssa Nascimento^a, Juliane Farias^a, Regina Aires^a, Linaldo Silva-Filho^a, Natalia Santos^a, Wilka Farias^a, Thayna Constantino^a, Edjair Cabral^a, Thiago Napoleão^b, Leucio Vieira-Filho^a, Patricia Paiva^b, Ana Durce Paixão^a

^a Departament of Physiology and Pharmacology, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Departament of Biochemistry, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The authors report no conflict of interest

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

Financial supporters had no involvement in the design and analysis of the study or in the writing of this article. To whom correspondence should be addressed. E-mail: adpaixao@ufpe.br

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Aqueous soluble extract from *Moringa oleifera* (Lamarck) seeds (AEMOS) has been used to wastewater treatment and some evidence indicates it has antioxidant action. One of its lectin, the WSMoL, was pointed as responsible for the water clarifying effects. Together, these findings point positive and eventual negative effects from AEMOS and WSMoL, which deserve investigations when administered in vivo, especially regarding fetal development, since AEMOS has been preconized to clean tap water in some developing populations

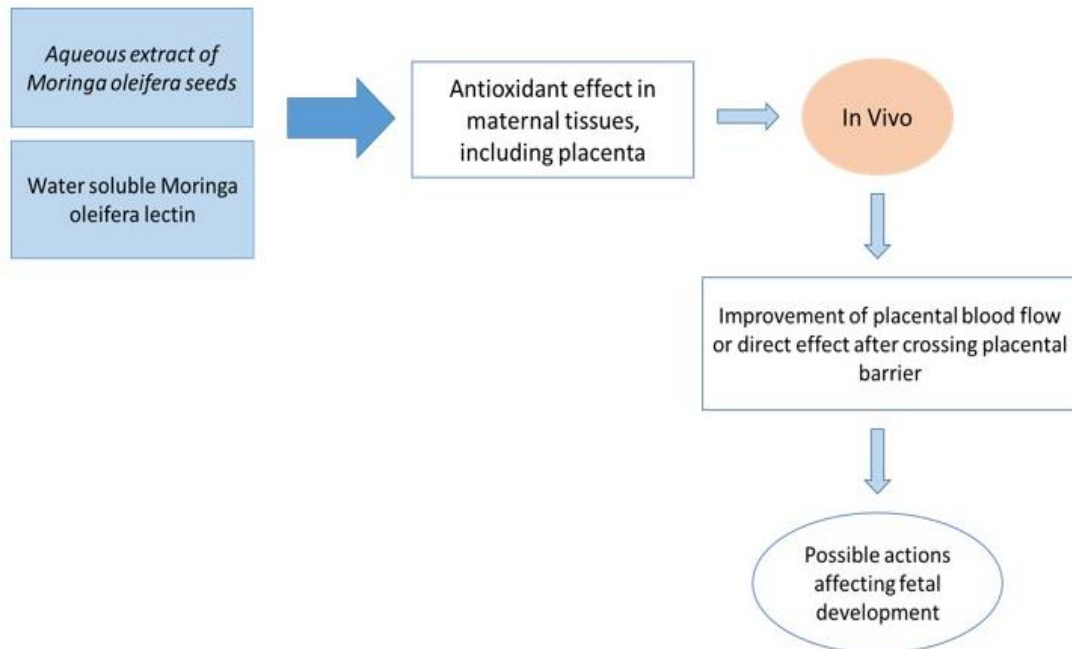
Aim: It was investigated whether AEMOS and WSMoL affect placental and fetal oxidative stress. For that, lipopolysaccharide (LPS) was used as a tool to increase maternal/fetal oxidative stress.

Materials and methods: Pregnant Wistar rats were treated with LPS or its vehicle on the 13th, 15th, 17th and 19th pregnancy day. AEMOS (200 mg/kg, by gavage), WSMoL (1.1 mg/kg, by gavage) or tempol (18 mg/kg, dissolved in drinking water) were daily administered from the 13th to 19th pregnancy day. Pregnancy was interrupted on the 20th day to withdraw maternal and fetal organs. Oxidative stress was evaluated by accessing malondialdehyde and lucigenin-produced luminescence from superoxide anion.

Results: LPS treatment increased malondialdehyde in maternal liver, maternal urine, placenta and fetal liver, as well as it elevated superoxide anion in placenta and fetal kidney. AEMOS and WSMoL reduced malondialdehyde and superoxide anion in these organs.

Conclusion: AEMOS and WSMoL have an antioxidant effect on maternal and fetal organs, therefore they can positively affect fetal development

GRAPHICAL ABSTRACT



1. Introduction

Several parts of *Moringa oleifera* (*M. oleifera*) Lamarck have multiple applications in folk medicine. Their seeds, besides exhibiting nutritional (Oliveira et al., 1999) and medicinal use (Ogbunugafor et al., 2011; Farooq et al., 2012), contain water soluble proteins useful to wastewater treatment (Bhuptawat et al., 2007; Ferreira et al., 2011; Lea, 2014). Some proteins in *M. oleifera* are lectins, which have the properties to agglutinate to carbohydrate molecules. An important nutritional feature of some plant lectins is their ability to survive digestion by the gastrointestinal tract (Vasconcelos and Oliveira, 2004). Thus, the aqueous soluble extract from *Moringa oleifera* seeds (AEMOS) can adhere to gastrointestinal wall to affect gut bacteria and intestinal permeability, becoming toxic to consumers (Ramadass et al., 2010; Yamamoto et al., 2013). One of the water soluble lectin from *Moringa oleifera*, the WSMoL, was characterized as a 60 kDa molecule (de Moura et al., 2016) and is known as partially accountable for AEMOS water clarifying effect (Ferreira et al., 2011; Freitas et al., 2016). From medicinal point of view, AEMOS and WSMoL present anti-inflammatory activity reducing lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory mediators (Araujo et al., 2013) and shows discrete *in vitro* antioxidant activity (Santos et al., 2012), while the AEMOS has antioxidant effect and leads to ameliorative effects on liver fibrosis in rats (Hamza, 2010). Together, these findings point positive and eventual negative effects from AEMOS and WSMoL, which deserve investigations when administered *in vivo*, especially regarding fetal development, since AEMOS has been preconized to clean tap water in some developing populations (Lea, 2014).

LPS is an endotoxin derived from the cell wall of Gram-negative bacteria that has proven to be particularly useful in the production of experimental maternal inflammation during pregnancy (Wei et al., 2007; Boles et al., 2012). It acts increasing inflammatory interleukins, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), which activates endothelial and placental NADPH oxidase to produce superoxide anion (Li et al., 2010). It increases lipid peroxidation in serum of pregnant rats that is paralleled by a similar profile in the kidneys from offspring (Awad et al., 2011). Increased oxidative stress in fetal offspring leads to impairment in renal development (Vieira-Filho et al., 2014), one cause of elevation in blood pressure at adulthood (Hao et al., 2010). Maternal environment, during pregnancy, as a cause of late hypertension is shared by several conditions, especially that one affecting maternal oxidative stress (Paixão and Alexander, 2013). Thus, in principle, even products from folk medicine may affect fetal development.

To shed light on *Moringa oleifera* folk medicine, pregnant rats untreated or treated with LPS were used as a tool to investigate the effect of AEMOS and WSMoL on markers of oxidative stress in maternal/fetal organs.

2. Material and Methods

2.1. Plant material

Moringa oleifera seeds were collected in Recife City, State of Pernambuco, northeastern Brazil, and stored at -20 °C. A voucher specimen (number 73,345) was archived at the herbarium, Dárdano de Andrade Lima, at the Instituto Agronômico de Pernambuco in Recife, Brazil. Plant collection was performed with authorization (38690-2) of the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade at the Brazilian Ministry of Environment.

2.2. Preparation of aqueous soluble extract from *Moringa oleifera* seeds

The seeds were dried at 28 °C and powdered using a blender. The powder (10 g) was homogenized with distilled water (100 mL) under constant agitation for 16 h at 25°C. After filtration with cotton gauze and centrifugation (3000 *g*, 15 min, 4°C), the supernatant corresponded to the aqueous extract.

2.3. Preparation of WSMoL

WSMoL was isolated according to the procedure established by Coelho et al. (2009). For this, the extract was treated with ammonium sulfate at 60% saturation (Green and Hughes 1955) during 4 h at 28°C and the precipitated fraction was collected by centrifugation (3000 *g*, 15 min, 4°C), resuspended and dialyzed against distilled water (4 h) and 0.15 M NaCl (4 h). The dialyzed fraction (50 mg of proteins) was then loaded onto a chitin column (7.5 × 1.5 cm) previously equilibrated (0.3 mL/min) with 0.15 M NaCl. WSMoL was eluted with 1.0 M acetic acid and then dialyzed against distilled water (6 h, 4°C) for eluent elimination, providing a yield of 3.4 mg per column.

2.4. Chemical and drugs

LPS from *Escherichia coli* 0111:B4, 4-Hydroxy-TEMPO (tempol), N,N'-Dimethyl-9,9'-biacridinium dinitrate (lucigenin), β -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (β -NADPH), 2-thiobarbituric acid (TBA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, trizma, bovine serum albumin, protease inhibitor cocktail, EDTA, N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide (BAPNA) was obtained from were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Thiopental was obtained from Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos (São Paulo, SP, Brazil).

2.5. Animals

All procedures using animals were carried out in accordance with the Brazilian Society of Laboratory Animal Sciences (SBCAL) and underwent ethical review by the Committee for Experimental and Animal Ethics at the Federal University of Pernambuco (No. 23076.009437/2015-15).

Adult female Wistar rats, aged 90 days, weighing 200 – 250 were randomly mated and the first pregnancy day was determined by the presence of spermatozoid in vaginal plug. Pregnant rats were maintained in individual cage, under 12 h cycle light/dark, at 21 °C, with free access to water and food. Physiological solution (0.5 mL/kg) or LPS (0.5 mg/kg) (Graciarena et al., 2010) were subcutaneously administered at days 13, 15, 17 and 19 of pregnancy to control dams (C, n=16) and LPS dams (L, n=32), respectively. From the 13th to 19th pregnancy day, AEMOS (200 mg/kg), WSMoL (1.1 mg/kg) or tempol (18 mg/kg) were daily administered. AEMOS and WSMoL were administered by gavage, while tempol was added in drinking water. Tempol concentration was determined in accordance to dam weights and daily water intake to warrant the preconized dosage. The final groups were designated as C (n = 9), L (n = 9), LAEMOS (n = 8) and LWSMoL (n = 9) LTempol (n = 6). At 18th pregnancy day, dams were placed in metabolic cage for measurement of diet and water intake, besides urine collection. The pregnancy was interrupted on the 20th day, under thiopental anesthesia (60 mg/kg, i.p.) to withdraw maternal livers, male fetuses and their corresponding placentas. Placental labyrinths corresponding to male fetuses were weighed and prepared to measure markers of oxidative stress. On average, 2 placentas and 2 fetuses were obtained from each mother. All excised tissues were immediately placed in appropriate cold solutions. The fetuses were weighed and their livers and kidneys were promptly removed and

transferred to appropriate solutions. To investigate the effect of gastrointestinal enzymes on WSMoL, duodenum was obtained from control rats treated only with physiological solution.

2.6. Investigation of integrity from WSMoL in rat gut

Duodenum was homogenized for 15 min with 2 mL of 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 containing 20 mM CaCl_2 and then submitted to ultrasonic bath for more 15 min. The suspension was centrifuged (9000 g, 5 min, 4°C) in order to yield the homogenate. Protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951) and trypsin-like activity was evaluated as described by Oliveira et al. (2016) using the substrate BApNA. One unit of trypsin activity is defined as the amount of enzyme that hydrolyses 1 μmol of BApNA per minute. WSMoL (1 mL; 300 μg) was incubated at 37°C with the homogenate (1 mL; 1 mg of protein) for 1 and 2 h at 37°C. After conclusion of each incubation, protein digestion was stopped by immersing the tubes in boiling water for 15 min. The mixtures were lyophilized and resuspended in 30 μL of sample buffer and submitted to SDS-PAGE (12.5%, w/v, gel) according to Laemmli (1970). A control containing the mixture lectin/homogenate submitted to the heating step without any previous incubation at 37°C was also performed. A sample containing only WSMoL was also submitted to electrophoresis in the same gel. The polypeptide bands were stained with 0.02% (v/v) Coomassie Brilliant Blue in 10% (v/v) acetic acid.

2.7. Investigation of tissular oxidative stress

Malondialdehyde (MDA), superoxide anion (O_2^-) and reduced glutathione (GSH) were accessed as markers of oxidative stress. The tissues were homogenized in 1.15% KCl (1g tissue:5 mL) using a grinder coupled to an IKA RW20 rotor at 1200 rpm for 2 min in an ice-bath. MDA levels were measured according to Ohkawa et al (1979), with some modifications. The homogenate was incubated with 0.3% TBA in 7.5% acetic acid and 0.4% SDS for 60 min at 100°C. After, n-Butanol was added after the tubes were chilled, to be centrifuged. The absorbance of supernatant was measured at 535 nm. For the standard curve, 1,1,3,3-tetraethoxy-propane was used.

Levels of reduced glutathione (GSH) were measured as non-protein sulphydryl groups (Sedlak and Lindsay, 1968). TCA (5%) was used to precipitated protein from the tissue homogenates (1g tissue:5mL 1.15% KCl). The protein-free supernatant reacted with 0.4 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) in 200mM/2mM Tris-EDTA buffer, pH 8.9, for 5 min at

room temperature. L-cysteine was used for the standard curve and absorbance was read at 412 nm. Both the MDA and GSH results were corrected for protein concentration, measured by Lowry's method (Lowry et al., 1951).

O_2^- was assessed by the lucigenin enhanced chemiluminescence. Tissue homogenates were centrifuged at 12000 *g* (Micro High Refrigerated Centrifuge VS-15000 CFNII, Vision Scientific, Daejeon, South Korea), 4°C, for 12 min. The supernatant was added to the phosphate buffer saline, pH of 7.4, in a proportion of 0.1 mL to 1 mL. The chemiluminescence was measured in a luminometer (Varioskan Flash, Thermo Scientific, Vantaa, Finland) each 30 s for 5 min, at 37°C, before and after adding 10 μ M lucigenin and 100 μ M NADPH. The assays were performed in triplicates.

2.8. Antioxidant activity by ABTS assay

The radical $ABTS^+$ was generated by oxidation of ABTS solution (7 mM) with 2.45 mM potassium persulfate solution. The mixture was allowed to react for 12 h in the dark at room temperature (25°C) before use. For the test, the $ABTS^+$ stock solution (1 mL) was diluted in 60 mL of methanol to obtain an absorbance of 0.70 ± 0.02 at 734 nm. Next, 2.7 mL of this diluted ABTS solution was added to a solution (0.3 mL) of AEMOS or WSMoL (both at 100, 125, 250, 500 and 1000 μ g/mL) or the standard Trolox (1.0, 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 μ g/mL in methanol). The absorbance at 734 nm was read 6 min after the addition of the radical. The test was performed in triplicate to determination of the percentage inhibition of ABTS radical as well as the concentration required to decrease the presence of $ABTS^+$ by 50% (IC_{50}).

2.9. Statistical analysis

Results are presented as mean $\pm$ SEM. To validate the treatment of LPS as a tool to increase tissular oxidative stress, C and L groups were compared by using Student *t* test. The effects of AEMOS, WSMoL and tempol were compared among them and with L group by using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student-Newman-Keuls. GraphPad Prism 5 was the software applied to all statistical analysis. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Effect of rat duodenum enzymes on WSMoL

Duodenum homogenate showed trypsin-like activity (11.3 ± 3.2 mU/mg), which assures that active proteases were present during the assays. Fig. 1 shows SDS-PAGE of the mixtures containing WSMoL and duodenum homogenates (lanes 1–3) incubated or not at 37°C. A sample containing only WSMoL was also submitted to electrophoresis in the same gel (lane 4), revealing two polypeptide bands, which is in agreement with the SDS-PAGE profile previously reported for this lectin (Moura et al., 2016; Oliveira et al., 2016). It can be observed that WSMoL polypeptide bands were detected in the samples incubated for 1 and 3 h, although the intensity was lower than that of observed in the non-incubated mixture. This result evidences that this lectin exhibit a good resistance level to digestion by proteases.

3.2. Effects of AEMOS and WSMoL on maternal weight gain and fetal weight

Table 1 shows that L dams presented lower body weight gain, during pregnancy, than C dams, likely due to lower diet intake presented by L dams. In line with this data, placental weight was also lower in L than in C dams. Conversely, LAEMOS group showed higher body weight gain, higher placental weight and higher diet intake than L group. LWSMoL did not show any difference, regarding these parameters, compared to L group. On the other hand, the LTempol dams showed lower body weight gain than L dams. Even LPS or AEMOS had affected maternal body weight; they did not affect fetal body weight. Differently, the LTempol group showed lower fetal body weight than the L group. It is remarkable that fetal kidney weight was lower in L than in C group and that in LAEMOS this parameter was higher than that in L group.

3.3. Effects of AEMOS and WSMoL on markers of *in vivo* oxidative stress

As shown in Fig. 2, L dams presented higher MDA levels in liver (Fig. 2A), urine (Fig. 2C) and placenta (Fig. 2E) than C dams. Conversely, LAEMOS group showed lower MDA levels in these three segments (Fig. 2B, D and F) than L group, while LWSMoL showed lower MDA levels than L group, only in urine and placenta (Fig. 2 D and F). LTempol group also showed lower levels of MDA in the segments than Lgroup. In placenta, comparing groups treated with antioxidant agents among them, LWSMoL and LTempol showed similar levels of MDA, but lower levels than LAEMOS ($P < 0.01$). When measured

as O_2^- , in placenta, oxidative stress was also higher in L than that in C group, before (Fig. 3A) and after NADPH (Fig. 3C), substrate for NADPH oxidase, was added in the reaction. Again, LAEMOS, LWSMoL and LTempol groups showed lower levels of O_2^- than L group (Fig. 3B), when evaluation was performed in basal condition (absence of NADPH). However, only LWSMoL and LTempol were lower than L group, when NADPH was added in reaction (Fig. 3D).

In fetal organs (Fig. 4), MDA was higher in liver of L than that in C group (Fig. 4A), as well as O_2^- was higher in L kidneys before (Fig. 4C) and after (Fig. 4E) NADPH addition in reaction. In the liver, LAEMOS and LWSMoL, but not LTempol, showed lower levels of MDA than L group (Fig. 4B). However, in the kidney, only LAEMOS showed lower levels of O_2^- , before NADPH addition (Fig. 4D) and LWSMoL, after NADPH addition (Fig. 4F), compared to L group. LTempol, paradoxically, showed higher levels of O_2^- than L group (Fig. 4D).

GSH levels in maternal and fetal organs, shown in Fig. 5, represent a marker of endogenous antioxidant. L group showed a lower level of GSH in fetal liver than C group (Fig. 5E). None of the antioxidant agents affected this parameter.

3.4. Effects of AEMOS and WSMoL on react to ABTS

Effects of AEMOS and WSMoL on react to ABTS was compared to that of trolox. The results are shown in Table 2. While IC_{50} to trolox was $1.71 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$, IC_{50} for AEMOS and WSMoL, were respectively, 750.2 ± 6.58 and $742.6 \pm 17.6 \mu\text{g/mL}$.

4. Discussion

Maternal environment during pregnancy might be a determinant of chronic diseases at adult life, in part due to inappropriate development of organs as the kidneys (Paixão and Alexander, 2013). Impairment of renal development has been associated to elevation of blood pressure (Barker et al., 1990; Langley-Evans et al., 1999), in part due to elevation or reduction in placental oxidative stress (Vieira-Filho et al., 2009; Paixão and Alexander, 2013). Thus, the present investigation sought to investigate whether AEMOS and WSMoL could reduce LPS-induced oxidative stress in maternal/fetal tissues.

Effects of AEMOS and WSMoL preventing LPS-induced oxidative stress was well characterized in pregnant rats (Figs. 2 and 3) in a pattern similar to that shown by tempol, a well-known mimetic of superoxide dismutase enzyme. Maternal liver and urine were included, besides placentas, in order to compare the effects among different maternal tissues. Antioxidant action of AEMOS was already reported in rats (Hamza, 2010), however with a higher dose than the presently used, 1 g/kg. It is not surprising this antioxidant action, since compounds as gallic acid, ellagic acid, kaempferol (Singh et al., 2009) and others phenolic compounds (Govardhan Singh et al., 2013) have been identified in the water soluble part of *Moringa. oleifera* seeds. However, antioxidant action in WSMoL, from our knowledge, was not previously reported. The dose of WSMoL was chosen on the basis of its estimated presence in AEMOS considering the dose presently used, 200 mg/kg. Thus, antioxidant action in AEMOS could be partially due to WSMoL, especially taking into account that they showed similar IC_{50} to react with ABTS. In fetal liver, AEMOS and WSMoL also exhibited a well characterized antioxidant action (Fig. 4), different from tempol ineffectiveness to change the LPS effect. However, in the fetal kidney their antioxidant effects were less characterized, AEMOS reduced NADPH oxidase-independent O_2^- and WSMoL reduced NADPH oxidase-dependent O_2^- . Whatever the effect of AEMOS and WSMoL in fetal kidney, it is clear that both of them affect the O_2^- production and therefore they can also affect fetal development.

It is not clear, if it is a direct effect, due to AEMOS and WSMoL crossing placental barrier or an indirect effect due to them reducing maternal and placental oxidative stress. Regarding this point, the following arguments are placed: i) even the IC_{50} for both are very high (Table 2), it is possible they reach IC_{50} concentration in maternal or fetal fluid/tissues, since approximately 60 mg of AEMOS and 0.33 mg of WSMoL was daily administered for 7 days; ii) the presence of intact WSMoL after incubation with the rat duodenum (Fig.1), indicates its absorption is viable in intestine; iii) lectins can cross epithelium in general by endocytosis or exocytosis (Vasconcelos and Oliveira, 2004); iv) lectins could reach high plasma levels, since they are slowly excreted (Vasconcelos and Oliveira, 2004); v) different from WSMoL, phenolic compounds present in AEMOS are submitted to several metabolic steps from their intestinal absorption until renal excretion (Velderrain-Rodríguez et al., 2014), but it is known they appear in amniotic fluid at very low concentration (Arola-Arnal et al., 2013); vi) when searched in fetal liver, by current methods, the WSMoL has not been found (data not showed), though it could be questioned if the method would reach very small concentration in the tissue. If in the fetuses, AEMOS and WSMoL effects were indirect, it

was likely due to placental blood flow improvement determined by vasodilation that led to fetal nutrition improvement. However, taking into account the above-mentioned arguments, it is possible that both of them cross placental barrier.

Antioxidant action of AEMOS and WSMoL were not due to elevation in GSH (Fig. 5), although there is evidence that phenolic compounds, likely present in AEMOS, can increase GSH levels (Serreli et al., 2017). It may be suggested that phenolic compounds did not reach enough concentration to increase this marker of endogenous antioxidant. Although in placenta, LAEMOS had shown higher oxidative stress than LWSMoL, maternal body weight gain during pregnancy and the fetal kidney weight were increased by AEMOS (Table 1). It is known that antioxidant action could result in amelioration of placental blood flow to improve fetal development (Costa et al., 2016); the fetal body weight was not increased in LAEMOS, but placental weight was increased in this group.

According to Lea (2014) in a review article, to clean water one shelled *Moringa oleifera* seed approximately 200 mg) is used to treat 1 liter of very turbid water. It is not possible to extrapolate dosage and effects of drugs, in general, from rats to humans (Freireich et al. 1966). However, the present results show that both the water soluble extract from *Moringa oleifera* seed and one of its water soluble lectin, the WSMoL, has antioxidant effect in maternal and fetal organs. Therefore, it is important to take in account that water treated with *Moringa oleifera* seeds could affect fetal development.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge CNPq, CAPES and FACEPE for financial support. Nielson Torres de Mello is acknowledged for his technical support.

References

- Araujo, L.C., Aguiar, J.S., Napoleão, T.H., Mota, F.V., Barros, A.L., Moura, M.C., Coriolano, M.C., Coelho, L.C., Silva, T.G., Paiva, P.M., 2013. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. PLoS One. 8(12):e81973. DOI:10.1371/journal.pone.0081973.
- Arola-Arnal, A., Oms-Oliu, G., Crescenti, A., del Bas, J.M., Ras, M.R., Arola, L., Caimari, A., 2013. Distribution of grape seed flavanols and their metabolites in pregnant rats and their fetuses. Mol. Nutr. Food Res. 57, 1741-52. DOI: 10.1002/mnfr.201300032
- Awad, N., Khatib, N., Ginsberg, Y., Weiner, Z., Maravi, N., Thaler, I., Ross, M.G., Itskovitz-Eldor, J., Beloosesky, R., 2011. N-acetyl-cysteine (NAC) attenuates LPS-induced maternal and amniotic fluid oxidative stress and inflammatory responses in the preterm gestation. Am. J. Obstet. Gynecol., 204:450.e15–20. DOI: 10.1016/j.ajog.2011.01.030
- Barker, D.J., Bull, A.R., Osmond, C., Simmonds, S.J., 1990. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. BMJ. 301, 259–262.
- Bhuptawat, H., Folkard, G.K., Chaudhari, S., 2007. Innovative physico-chemical treatment of wastewater incorporating *Moringa oleifera* seed coagulant. J. Hazard Mater. 142, 477-82. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.08.044.
- Boles, J.L., Ross, M.G., Beloosesky, R., Desai, M., Belkacemi, L., 2012. Placental-mediated increased cytokine response to lipopolysaccharides: a potential mechanism for enhanced inflammation susceptibility of the preterm fetus. J. Inflamm. Res., 5, 67–75. DOI: 10.2147/JIR.S32108.
- Coelho, J.S., Santos, N.D., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C., Leite, S.P., Navarro, D.M., Paiva, P.M., 2009. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. Chemosphere. 77, 934-8. DOI:10.1016/j.chemosphere.2009.08.022.
- Costa, M.R., Pires, K.M., Nalbones-Barbosa, M.N., Dos Santos, V. S, Resende, A.C., de Moura, R.S., 2016. Grape skin extract-derived polyphenols modify programming-induced renal endowment in prenatal protein-restricted male mouse offspring. Eur. J. Nutr. 55, 1455-64. DOI:10.1007/s00394-015-0963-5.
- de Moura, K.S., da Silva, H.R., Dornelles, L.P., Coelho, L.C., Napoleão, T.H., de Oliveira, M.D., Paiva, P.M., 2016. Coagulant Activity of Water-Soluble *Moringa oleifera* Lectin Is Linked to Lowering of Electrical Resistance and Inhibited by Monosaccharides and Magnesium Ions. Appl Biochem Biotechnol. 180, 1361-1371. DOI:10.1007/s12010-016-2172-y.
- Farooq, F., Rai, M., Tiwari, A., Arif-Khan, A., Farooq, S., 2012. Medicinal properties of *Moringa oleifera*: An overview of promising healer. J. of Med. Plants Res. 6 27, 4368-4374. DOI: 10.5897/JMPR12.279.
- Ferreira, R.S., Napoleão, T.H., Santos, A.F., Sá, R.A., Carneiro-da-Cunha, M.G., Morais, M.M., Silva-Lucca, R.A., Oliva, M.L., Coelho, L.C., Paiva, P.M., 2011. Coagulant and

antibacterial activities of the water-soluble seed lectin from *Moringa oleifera*. Lett. Appl. Microbiol. 53, 186-92. DOI:10.1111/j.1472-765X.2011.03089.x

Freitas, J.H., de Santana, K.V., da Silva, P.M., de Moura, M.C., Coelho, L.C., do Nascimento, A.E., Paiva, P.M., Napoleao, T.H., 2016. Evaluation of *Moringa oleifera* Seed Lectin as a Metal Remover in Aqueous Solutions. Protein Pept. Lett. 23, 645-9. DOI: 10.2174/0929866523666160517123558.

Freireich, E.J., Gehan, E.A., Rall, D.P., Schmidt, L.H., Skipper, H.E. 1996. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. Cancer Chemother Rep. 50, 219-44.

Govardhan, Singh. R. S., Negi, P. S., Radha, C., 2013. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour. J. of Functional Foods, 5. 1883 -1891. DOI: 10.1016/j.jff.2013.09.009.

Graciarena, M., Depino, A.M., Pitossi, F.J., 2010. Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGF β ₁ downregulation. Brain Behav. Immun. 24,1301–1309. DOI: 10.1016/j.bbi.2010.06.005.

Hamza, A.A. 2010. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. Food Chem. Toxicol. 48, 345-55. DOI: 10.1016/j.fct.2009.10.022.

Hao, X.Q., Zhang, H.G., Li, S.H., Jia, Y., Liu, Y., Zhou, J.Z., Wei, Y.L., Hao, L.Y., Tang, Y., Su, M., Li, X.H., 2010. Prenatal exposure to inflammation induced by zymosan results in activation of intrarenal renin-angiotensin system in adult offspring rats. Inflammation. 33, 408–414. DOI:10.1007/s10753-010-9199-y.

Langley-Evans, S.C., Welham, S.J., Jackson, A.A., 1999. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. Life Sci. 64, 965–974. DOI: 10.1016/S0024-3205(99)00022-3.

Lea, M. 2014. Bioremediation of Turbid Surface Water Using Seed Extract from the *Moringa oleifera* Lam. (Drumstick) Tree. Curr. Protoc. Microbiol. 33, 1-8. DOI: 10.1002/9780471729259.mc01g02s33.

Li, S.M., Zeng, L.W., Feng, L., Chen, D.B., 2010. Rac1-dependent intracellular superoxidformation mediates vascular endothelial growth factor-induced placental angiogenesis in vitro. 151, 5315–5325. DOI: 10.1210/en.2010-0178.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-75.

Ogbunugafor, H.A., Eneh, F.U., Ozumba, A.N., Igwo-Ezikpe, M.N., Okpuzor, J., Igwilo, I.O., Adenekan, S.O., Onyekwelu, O.A., 2011. Physico-chemical and Antioxidant Properties of *Moringa oleifera* Seed Oil. Pakistan J. of Nutrition 10, 409-414. DOI: 10.3923/pjn.2011.409.414.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 95, 351–8.

Oliveira, A.P., Silva, L.L., Lima, T.A., Pontual, E.V., Santos, N.D., Coelho, L.C., Navarro, D.M., Zingali, R.B., Napoleão, T.H., Paiva, P.M., 2016. Biotechnological value of *Moringa oleifera* seed cake as source of insecticidal lectin against *Aedes aegypti*. *Process Biochemistry*, 51, 1683-1690. DOI: 10.1016/j.procbio.2016.06.026.

Oliveira, J.T., Silveira, S.B., Vasconcelos, I.M., Cavada, B.S., Renato, A. M., 1999. Compositional and nutritional attributes of seeds from the multiple purpose tree *Moringa oleifera* Lamarck. *J. Sci. Food Agric.* 79, 815-820. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0010(19990501)79:6<815::AID-JSFA290>3.0.CO;2-P

Paixão, A.D., Alexander, B.T., 2013. How the kidney is impacted by the perinatal maternal environment to develop hypertension. *Biol Reprod*, 89, 144. DOI: 10.1095/biolreprod.113.111823.

Ramadass, B., Dokladny, K., Moseley, P.L., Patel, Y.R., Lin, H.C., 2010. Sucrose co-administration reduces the toxic effect of lectin on gut permeability and intestinal bacterial colonization. *Dig. Dis. Sci.* 55, 2778-84. DOI: 10.1007/s10620-010-1359-2.

Santos, A.F., Argolo, A.C., Paiva, P.M., Coelho, L.C., 2012. Antioxidant activity of *Moringa oleifera* tissue extracts. *Phytother Res.* 26, 1366-70. DOI:10.1002/ptr.4591.

Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25, 192–205.

Serrelli, G., Incani, A., Atzeri, A., Angioni, A., Campus, M., Cauli, E., Zurru, R., Deiana, M., 2017. Antioxidant Effect of Natural Table Olives Phenolic Extract Against Oxidative Stress and Membrane Damage in Enterocyte-Like Cells. *J. Food Sci.* 7 Jan 10. doi: 10.1111/1750-3841.13613.

Singh, B.N., Singh, B.R., Singh, R.L., Prakash, D., Dhakarey, R., Upadhyay, G., Singh, H.B., 2009. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food Chem Toxicol.* 47, 1109-16. DOI: 10.1016/j.fct.2009.01.034.

Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T., 2004. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon.* 44, 385-403. DOI:10.1016/j.toxicon.2004.05.005

Velderrain-Rodríguez, G.R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J.F., Chen, C.Y., Robles-Sánchez, M., Astiazaran-García, H., Alvarez-Parrilla. 2014. Phenolic compounds: their journey after intake. *Food Funct.* 5, 189-97. DOI: 10.1039/c3fo60361j.

Vieira-Filho, L.D., Lara, L.S., Silva, P.A., Luzardo, R., Einicker-Lamas, M., Cardoso, H.D., Paixão, A.D., Vieyra, A., 2009. Placental oxidative stress in malnourished rats and changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36, 1157-63. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2009.05212.x.

Vieira-Filho, L.D., Cabral, E.V., Farias, J.S, Silva, P.A., Muzi-Filho, H., Vieyra, A., Paixão, A.D. 2014. Renal molecular mechanisms underlying altered Na⁺ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br. J. Nutr.* 111, 1932–1944. DOI:10.1017/S0007114513004236.

Wei, Y.L., Li, X.H., Zhou, J.Z., 2007. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 28, 651–656. DOI:10.1111/j.1745-7254.2007.00593.x.

Yamamoto, S., Tomiyama, M., Nemoto, R., Naganuma, T., Ogawa, T., Muramoto, K., 2013. Effects of food lectins on the transport system of human intestinal Caco-2 cell monolayers. *Biosci. Biotech. Biochem.* 77, 1917-24. DOI:10.1271/bbb.130367.

Table 1

General Parameters

	C	L	LAEMOS	LWSMoL	LTempol
Maternal weight gain (g)	93.7 ± 4.5	68.5 ± 2.3***	79.2 ± 1.6 [#]	74.0 ± 4.1	55.1 ± 1.4 ^{##}
Placental weight (g)	0.53 ± 0.01	0.46 ± 0.01***	0.50 ± 0.01 [#]	0.48 ± 0.01	0.53 ± 0.01 ^{##}
Fetal body weight (g),	3.77 ± 0.02	3.74 ± 0.05	3.77 ± 0.04	3.47 ± 0.07	3.12 ± 0.24 ^{###}
Fetal liver weight (g)	0.28 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.24 ± 0.01
Fetal kidney weight (mg)	14 ± 0.1	12 ± 0.1 [*]	15 ± 0.1 ^{##}	12 ± 0.1	12 ± 0.1
Maternal food intake (g/day)	28 ± 1	22 ± 1 ^{**}	20 ± 1	21 ± 1	21 ± 1
Maternal water intake (mL/day)	59 ± 5	51 ± 3	55 ± 5	44 ± 3	52 ± 2

Results are mean ± SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. C; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs. L. C and L are mothers, respectively, untreated and treated with LPS during pregnancy, while LAEMOS, LWSMoL and LTempol are pregnant mothers treated with LPS and additionally treated with AEMOS, WSMoL and tempol, respectively.

Table 2

Effects of AEMOS and WSMoL on react to ABTS

	Trolox		AEMOS	WSMoL
Concentration (µg/mL)		Concentration (µg/mL)		
5.0	88.78 ± 0.17	1000	57.51 ± 0.70	60.16 ± 2.05*
4.0	86.35 ± 0.01	500	46.12 ± 0.23	45.42 ± 2.89
3.0	75.24 ± 0.44	250	33.25 ± 0.07	30.02 ± 0.23*
2.0	64.70 ± 0.62	125	16.27 ± 0.62	15.14 ± 0.54
1.0	38.91 ± 0.53	100	18.7 ± 0.08	9.86 ± 0.14*

* $P < 0.05$ WSMoL vs. AEMOS

Figure Captions

Fig. 1. Representative image of WSMoL in SDS-PAGE. Lanes 1, 2 and 3 represent the lectin incubated in homogenate of rat duodenum, at 37 °C for 0, 1, and 3 h, respectively. Lane 4 contains only the lectin. The arrows indicate the polypeptide bands corresponding to SDS-PAGE profile of WSMoL, showing that this lectin is not digested in rat gut.

Fig. 2. Effects of AEMOS and WSMoL on levels of malondialdehyde (MDA) in maternal liver (A and B), urine (C and D) and placenta (E and F). C and L are mothers, respectively, untreated and treated with LPS during pregnancy, while LAEMOS, LWSMoL and LTempol are pregnant mothers treated with LPS and additionally treated with AEMOS, WSMoL and tempol, respectively. Data are mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. C (Student t test). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, $P < 0.001$ vs. L (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls).

Fig. 3. Effects of AEMOS and WSMoL on levels of superoxide anion, accessed by lucigenin-produced luminescence, in placenta, before (A and B) and after NADPH (C and D) addition. Superoxide anion was accessed by lucigenin-produced luminescence. C and L are mothers, respectively, untreated and treated with LPS during pregnancy, while LAEMOS, LWSMoL and LTempol are pregnant mothers treated with LPS and additionally treated with AEMOS, WSMoL and tempol, respectively. Data are mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ vs. C (Student t test). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, $P < 0.001$ vs. L (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls).

Fig. 4. Effects of AEMOS and WSMoL on levels of malondialdehyde (MDA) in fetal liver (A and B) and superoxide anion in fetal kidney, before (C and D) and after NADPH (E and F) addition. Superoxide anion was accessed by lucigenin-produced luminescence. C and L are fetuses from mothers, respectively, untreated and treated with LPS during pregnancy, while LAEMOS, LWSMoL and LTempol are fetuses from mothers treated with LPS and additionally treated with AEMOS, WSMoL and tempol, respectively. Data are mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. C (Student t test). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, $P < 0.001$ vs. L (One-way ANOVA followed by Student-Newman-Keuls).

Fig. 5. Effects of AEMOS and WSMoL on levels of reduced glutathione (GSH) in maternal liver (A and B), placenta (C and D) and fetal liver (E and F). C and L are groups, respectively, untreated and treated with LPS, while LAEMOS, LWSMoL and LTempol are groups treated with LPS and additionally treated with AEMOS, WSMoL and tempol, respectively. * $P < 0.05$ vs. C (Student t test).

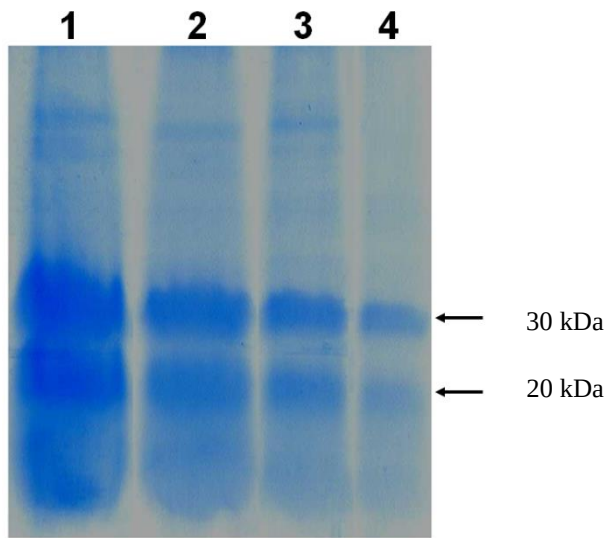


Figure 1

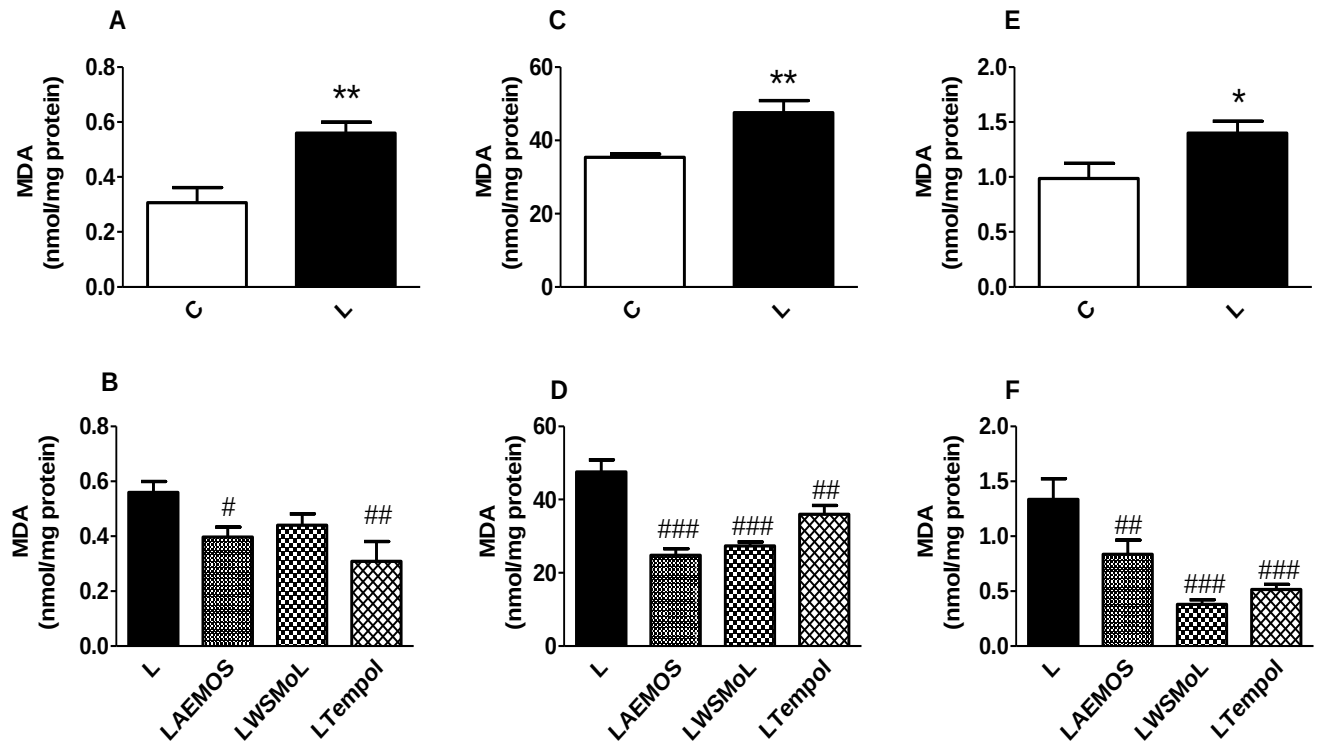


Figure 2

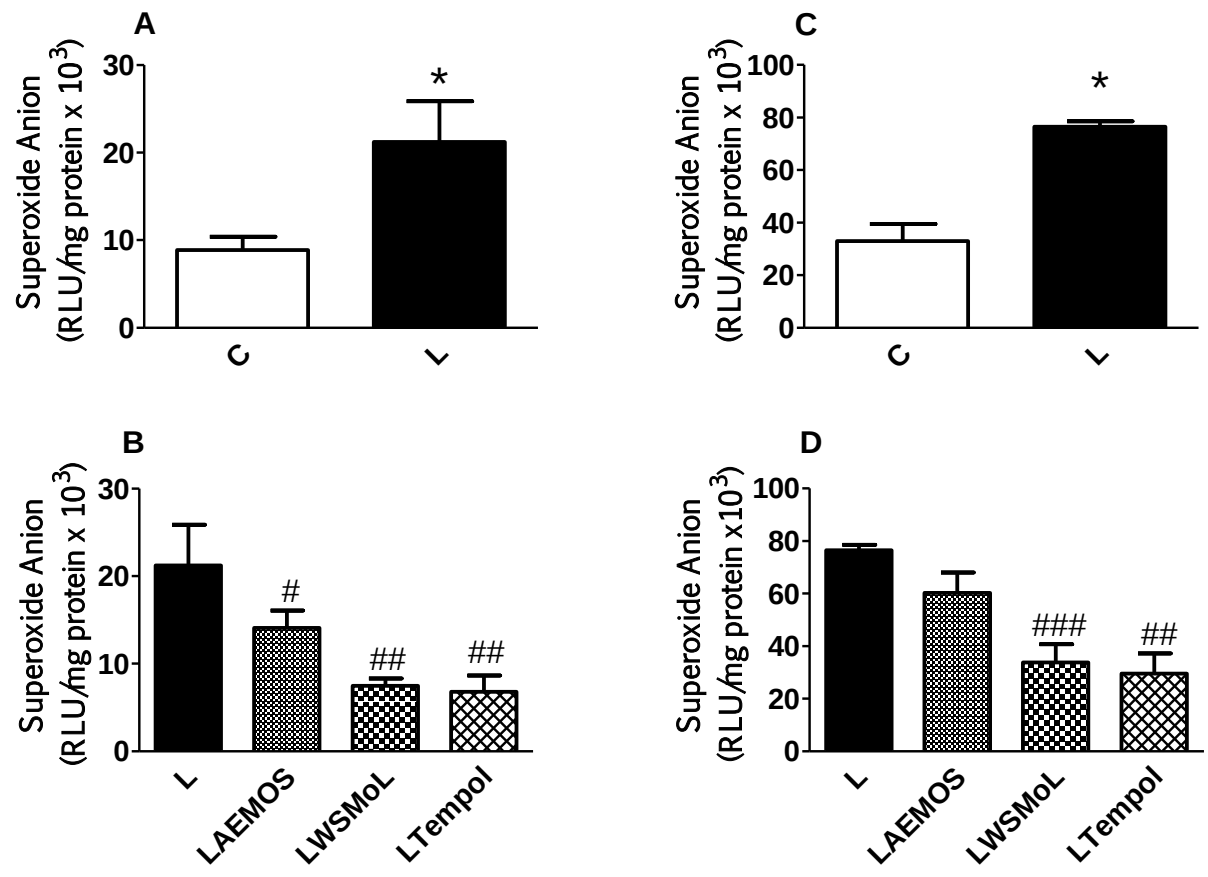


Figure 3

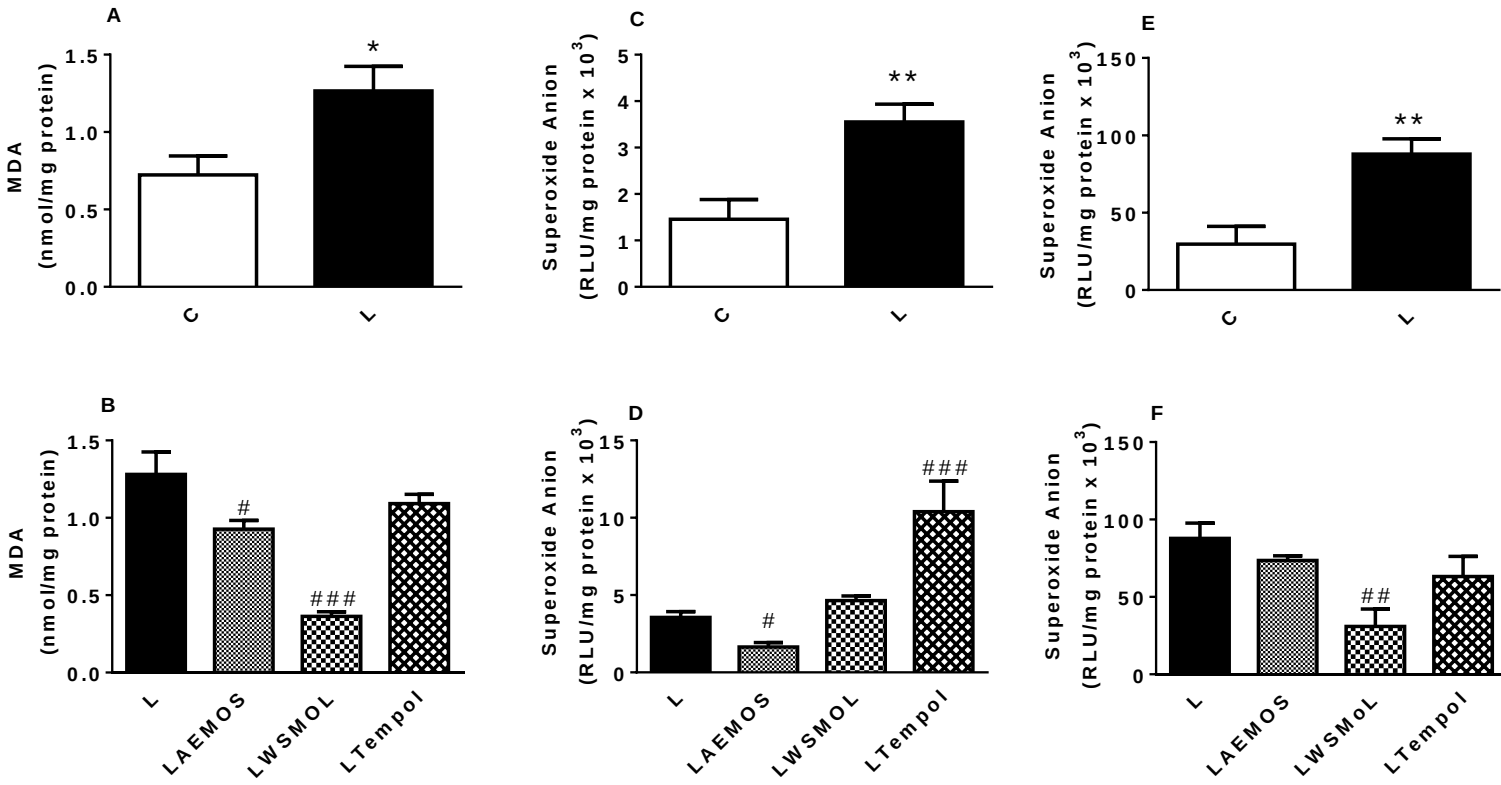


Figure 4

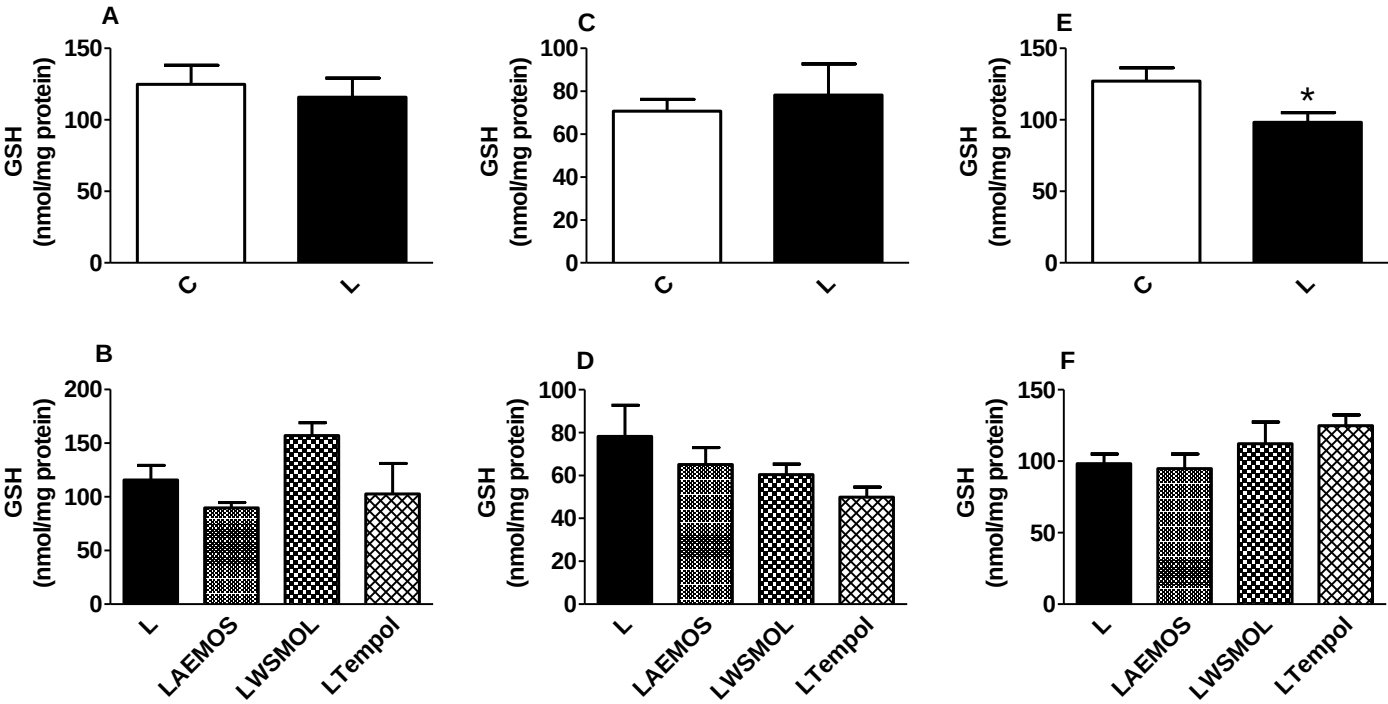


Figure 5

CONCLUSÃO

O extrato aquoso das sementes da *Moringa oleifera* e uma de suas lectinas, a WSMoL, têm efeito antioxidante nos órgãos materno, incluindo a placenta, quando administrados *in vivo*. Desta forma podem afetar o desenvolvimento fetal, de forma direta, através do cruzamento da barreira placentária; ou de forma indireta, através da redução do estresse oxidativo materno com consequente melhora do fluxo sanguíneo placentário.

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, 08 de abril de 2015.

Ofício nº 29/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.^a Ana Durce Oliveira da Paixão**
Universidade Federal de Pernambuco
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB
Processo nº 23076.009437/2015-15

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 e desenvolvimento renal fetal: anti-oxidantes bioativos para prevenir disfunção renal”**.

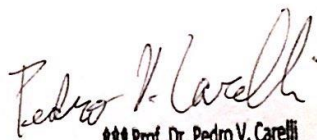
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals 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; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 90 dias; Peso: 250g; Sexo: fêmeas; Número total de animais: 48.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584