

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ICB)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS-
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Estudo do estresse oxidativo e expressão da aromatase e receptor relacionado ao estrógeno gama na placenta humana

Trabalho de conclusão do Mestrado
apresentado ao Curso de Ciências
Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada
da Universidade Federal do Rio Grande,
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Mestranda: Alzira Xavier Garcês

Orientador: Prof^o Dr^o Pablo Elias Martínez

Co-Orientadora: Dr^a Ana Cristina Kalb

Rio Grande

2013

*Dedico esse trabalho primeiramente a Deus pela oportunidade que me
foi concedida de desfrutar a vida e todos os seus mistérios.*

*Aos meus pais Gertrudes e Humberto e a minha avó Flogina, por tudo que me
ensinaram durante toda a minha vida.*

AGRADECIMENTOS

Concluir este mestrado foi um grande desafio, mas esse período foi de grandes aprendizados, não só intelectualmente, mas pessoal. Neste período passaram muitas pessoas que de alguma forma contribuíram para esse aprendizado, por isso gostaria de agradecer.

A minha mãe querida, que apesar da distância esteve sempre presente me dando todo amor e carinho do mundo e, aos meus irmãos Leonilde e Humberto pela amizade e pelo amor. Enfim, muito obrigada por tudo, de todo o meu coração. Amo vocês.

Aos meus tios: Cremilda, Agostinho, Juliana e Oldegario gostaria de agradecer por me ajudarem nesta fase tão importante da minha vida.

Em especial ao meu amor Mamadú Djaló pelo apoio, incentivo, por ter tido muita paciência e por estar sempre presente ao meu lado nas alegrias e nas tristezas. Te amo muito.

Ao meu orientador Prof^o. Dr^o. Pablo Elias Martínez quero agradecer pela oportunidade e por todos os ensinamentos no período em que trabalhamos juntos.

A minha co-orientadora Dr^a Ana Cristina, gostaria de agradecer, pela amizade e pela grande ajuda que tornou possível a realização desta dissertação.

A Débora Dias, Laís Nascimento, Ronald Silva e Mirian Melo quero agradecer por terem me ajudado muito nos experimentos. Obrigada, também, pela amizade e pela força.

Agradeço a minhas amigas: Charleny, Roberta, Danusa, Jéssica e Daiane, pela ajuda, conselhos, incentivos e principalmente pela amizade. Muito obrigada gurias.

A técnica Carol do laboratório de Histologia, a todos os professores da Fisiologia e aos amigos da sala 3. Agradeço também aos Médicos e enfermeiros do

Centro Obstétrico do HU e a todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular da FAMED – FURG que ajudaram na dinâmica e na coleta das placentas.

RESUMO

Introdução: Durante a gravidez, devido ao aumento da exigência metabólica placentária há um aumento na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem causar, por exemplo, oxidação de ácidos graxos poli-insaturados na placenta, além disso, nesta fase ocorre um aumento na expressão da aromatase e do receptor relacionado ao estrógeno gama (ERRgama) na placenta humana. **Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar os parâmetros de estresse oxidativo e imunomarcação da aromatase e do ERRgama na placenta humana. **Métodologia:** A capacidade antioxidante total (ACAP), atividade da glutamato cisteína ligase (GCL), concentração glutatona (GSH), peroxidação lipídica e imunomarcação da aromatase e do ERRgama foram analisados em tecido placentário de 58 parturientes. Estas análises foram relacionadas com os dados socio-demográficos das participantes. **Resultados:** Os recém-nascidos de mães fumantes nasceram com menor peso ($p=0,001$). A concentração de GSH diminuiu a produção da peroxidação lipídica ($p<0,05$), por outro lado, a atividade de GCL teve efeito oposto ($p<0,001$). Encontramos uma diminuição na capacidade antioxidante total e aumento da peroxidação lipídica ($p<0,05$) na placenta. A placenta de mães fumantes tinham menos marcação da aromatase ($p=0,037$) já, as mães mais velhas tiveram menos marcação do ERRgama ($p=0,009$) na placenta. A GSH teve efeito positivo na imunomarcação de ERRgama ($p=0,001$). **Conclusões:** A expressão da aromatase e do ERRgamma na placenta são alterados tanto por fatores exógenos, tais como o fumo do cigarro, como por fatores endógenos, tais como a concentração de GSH e a idade da mãe. Os marcadores de estresse oxidativo na placenta são mais elevados em mães mais velhas e em placenta com menor capacidade antioxidante total.

Palavras-chave: placenta, estresse oxidativo, aromatase e receptor relacionada ao estrógeno gama.

ABSTRACT

Introduction: During pregnancy, due to increased metabolic demand placental there is an increased production of reactive oxygen species can cause, for example, oxidation of polyunsaturated fatty acids in the placenta, furthermore this phase there is an increase in the expression aromatase and estrogen receptor-related gamma (ERRgamma) in human placenta. The objective of the study was to evaluate the parameters of oxidative stress and immunolabeling of aromatase and ERRgamma in the human placenta.

Methods: The total antioxidant capacity (ACAP), glutamate cysteine ligase (GCL) activity, glutathione (GSH) concentration, lipid peroxidation and immunolabeling of aromatase and ERRgamma were measured in placental tissue of 58 parturient. These analyzes were related with socio-demographic data of the participants. **Results:** The fetus of smoking mothers were born with less weight ($p=0.001$). The concentration of GSH decreased lipid peroxidation ($p<0.05$). We found a reduction in total antioxidant capacity and increased lipid peroxidation ($p<0.05$) in the placenta. Smoking mothers had less aromatase ($p=0.037$) already older mothers had less labeling of the ERRgamma ($p=0.009$) in placenta. **Conclusions:** The expression of aromatase and ERRgamma in the placenta are altered both by exogenous factors such as cigarette smoke, as by endogenous factors such as the concentration of GSH and the age of the mother. Markers of oxidative stress in the placenta are higher in older mothers and placenta with lower total antioxidant capacity.

Keywords: placenta, oxidative stress, aromatase and estrogen-related receptor gamma

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE ABREVIATURAS	8
1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Placenta, uma glândula endócrina.....	9
1.2. Aromatase e suas funções na placenta	11
1.3. Receptores relacionados ao estrógeno-gama na placenta	13
1.4. Estresse oxidativo.....	14
1.5. Sistema de defesa antioxidante	16
1.6. Placenta e o estresse oxidativo.....	18
2. JUSTIFICATIVAS	19
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivos gerais	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
ARTIGO	
ABSTRAT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	24
2.1. Coleta e armazenamento das amostras.....	24
2.2. Medição da capacidade antioxidante total (ACAP).....	24
2.3. Determinação da atividade da glutamato cisteína ligase (GCL) e da concentração da glutathiona (GSH)	25
2.4. Medição da peroxidação lipídica	25
2.5. Imunohistoquímica da aromatase e do receptor relacionado ao estrógeno gama (ER γ).....	26
2.6. Análises estatísticas.....	26
3. RESULTADOS	26
4. DISCUSSÃO	28
5. REFERÊNCIAS	33
6. TABELAS E FIGURAS	38
CONCLUSÕES GERAIS	43
REFEÊNCIAS	43
ANNEX 1	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAP - Capacidade antioxidante total

CAT- Catalase

DHEA- Deidroepiandrosterona

ER- Receptor de estrógeno

ERRgama- Receptor relacionado ao estrógeno gama

GCL- Glutamato cisteína ligase

GR- Glutathiona redutase

GPx- Glutathiona peroxidase

GSH- Glutathiona reduzida

GSSG- Glutathiona oxidada

hCG- Gonadotropina coriônica humana

H₂O₂- Peróxido de hidrogênio

MDA- Malondialdeído

O₂⁻ - Radical ânion superóxido

·OH- Radical hidroxila

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SOD- Superóxido dismutase

TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

1. INTRODUÇÃO

1.1. Placenta, uma glândula endócrina

A placenta é um órgão temporário que serve como local de trocas fisiológicas entre a mãe e o feto (Moore *et al.*, 2012), que inclui transmissão de nutrientes, gases e água para o feto, excreção de resíduos de produtos do metabolismo fetal no sangue materno (Brolio *et al.*, 2010). Por esse motivo, a placenta desempenha papel fundamental no crescimento fetal. Além disso, a placenta fornece uma barreira que protege o feto de xenobióticos presentes no sangue materno (Yan *et al.*, 2005).

Segundo Gude *et al.*, 2004 a placenta não possui nervos por isso, qualquer comunicação entre a mãe e o feto ocorre através de substâncias por via sanguínea. Durante muitos anos, acreditava-se que a circulação materna é estabelecida dentro da placenta logo após implantação, porém, atualmente, sabe-se que o fluxo sanguíneo materno significativo ocorre pós 12^a semanas de gestação (Jauniaux *et al.*, 2005). A placenta é constituída por dois componentes: a porção fetal, originária do saco coriônico e a porção materna derivada do endométrio (Moore *et al.*, 2012) (Figura 1).

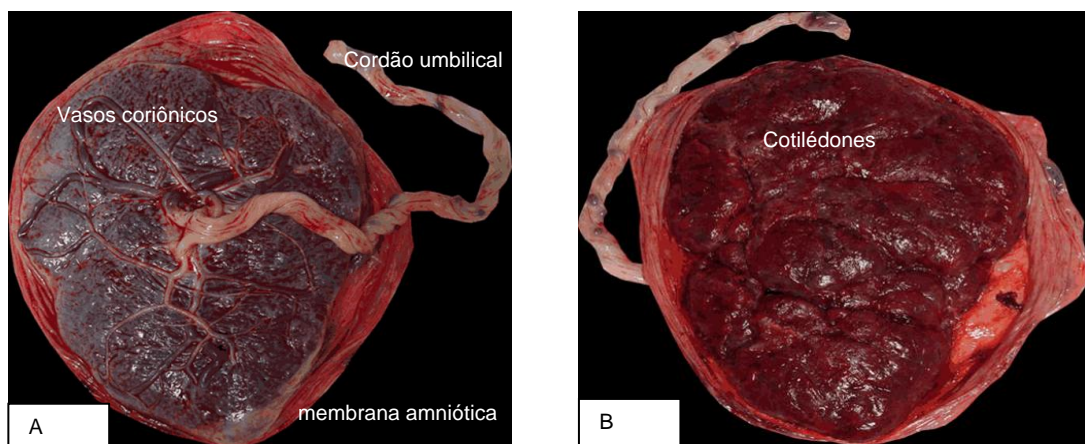


Figura 1. Placenta humana. A: porção fetal da placenta humana. B: porção materna da placenta humana. **Fonte:** Adaptado de: <http://fpebr.blogspot.com.br>.

O desenvolvimento da placenta depende da diferenciação dos trofoblastos em citotrofolasto e sinciotrofolasto (Genbacev *et al.*, 1996). O sinciotrofolasto é a camada sincicial que está em contato direto com o sangue materno e desempenha papel importante no transporte de nutrientes, resíduos e troca gasosa (Poidatz *et al.*, 2012) (Figura 2). Além disso, o sinciotrofolasto sintetiza uma série de hormônio tanto proteicos como esteroides (Genbacev *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2012).

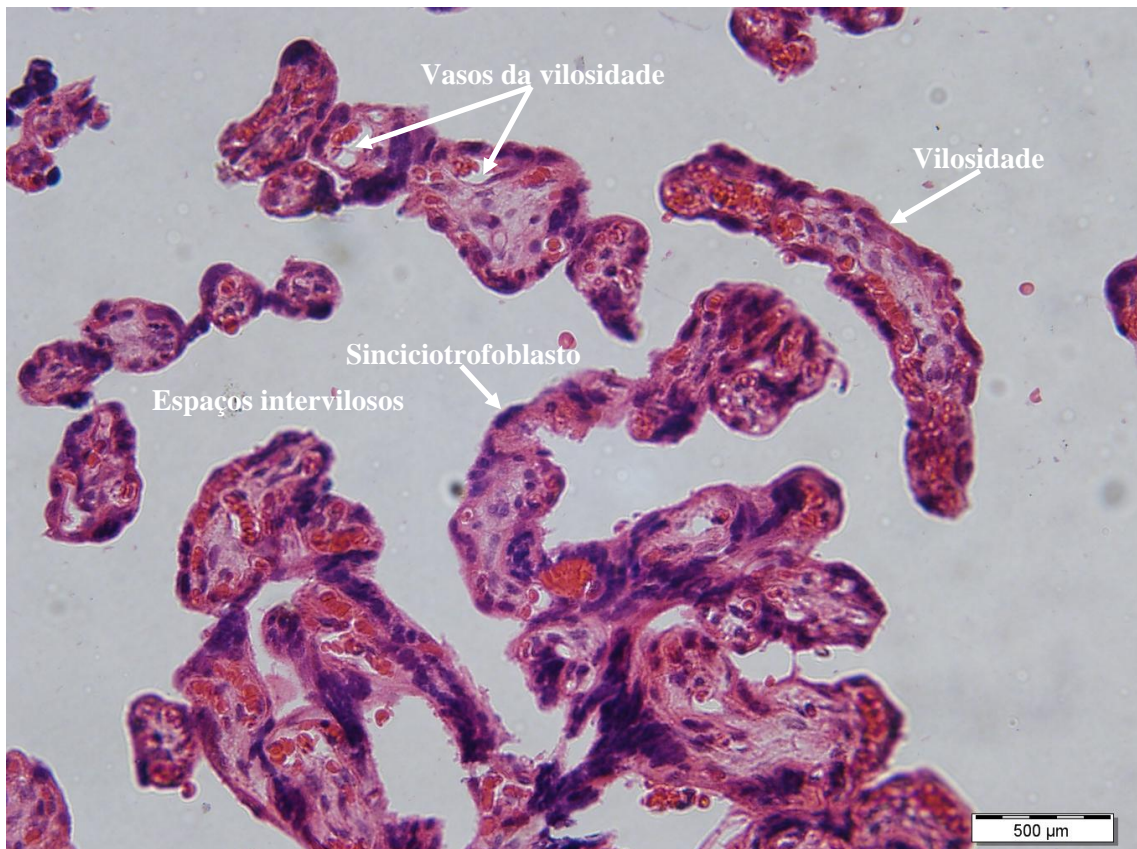


Figura 2: Micrografia da placenta humana. Corte transversal do lado materno da placenta humana, aumento 20 X. **Fonte:** Laboratório de histologia da FURG.

Os hormônios proteicos sintetizados pela placenta são: a) gonadotrofina coriônica humana (hCG) hormônio que ajuda a prolongar a vida útil do corpo lúteo no início da gravidez (Evain-Brion *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2012); b) somatomamotrofina coriônica humana age no feto modulando o desenvolvimento e estimula a produção de

insulina; c) corticotrofina coriônica humana, quando liberado na corrente sanguínea materna pode ajudar a modular o metabolismo materno (Gude *et al.*, 2004).

Já em relação à produção de hormônios esteroides pela placenta, um estudo relatou que uma das características da placenta é sua intensa atividade esteroidogênica (Evain-Brion *et al.*, 2003). As células precursoras da placenta não expressam aromatase por isso, à capacidade da placenta de sintetizar o estrógeno é vastamente aumentada após a nona semana de gestação em associação com a invasão do citotrofoblasto, alargamento das arteríolas uterinas, aumento do fluxo sanguíneo e a disponibilidade de oxigênio. Nesta fase a aromatase é altamente expressa na placenta e então esta se torna uma glândula endócrina altamente ativa (Kumar *et al.*, 2011).

1.2 Aromatase e suas funções na placenta

A enzima aromatase é um membro da família do citocromo P450 é produto do gene *CYP19A1* e fica localizada no retículo endoplasmático. A porção catalítica da aromatase contém um grupo heme, bem como um local de ligação de esteroides (Chumsri *et al.*, 2011). A expressão da aromatase em vários tecidos humanos é regulada pela utilização alternativa de múltiplos éxons (a aromatase é composta por múltiplos éxons1) e promotores de tecidos específicos (Harada *et al.*, 2011). O local de iniciação da transcrição na placenta reside ~100.000 pb do local de iniciação da tradução do éxon II (Figura 3) (Mendelson *et al.*, 2005).

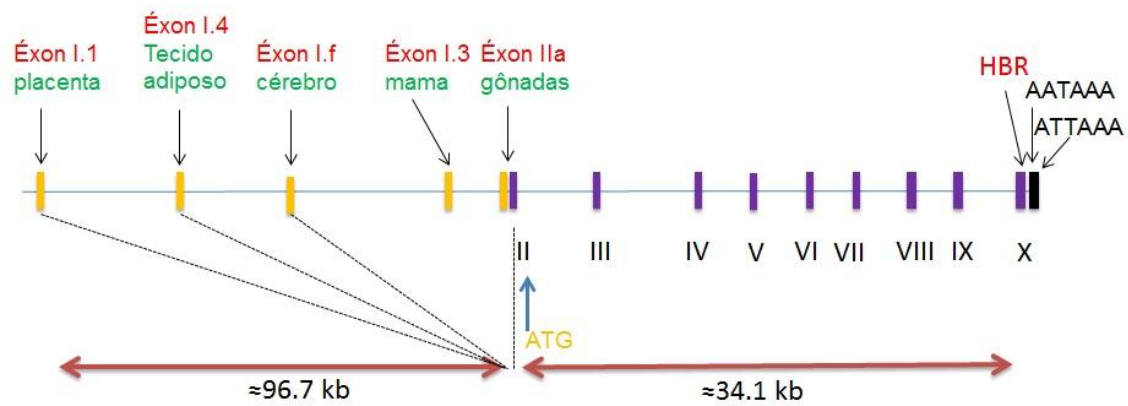


Figura 3: Representação esquemática do gene CYP19 humana (aromatase). Os éxons II-X (roxo) que codificam a proteína aromatase. A região de ligação do heme (HBR) e dois sinais de poliadenilação na região 3' não traduzida (UTR; preto) são codificados pelo éxon X. Os éxons I do tecido específico são inseridos num local comum (indicado pelas linhas verticais) imediatamente a montante do códon ATG no éxon II. **Fonte:** Adaptado de (Mendelson *et al.*, 2005).

A aromatase catalisa a etapa limitante da biossíntese dos estrógenos: a aromatização de andrógenos em estrógenos (Chumsri *et al.*, 2011; Harada *et al.*, 2011). Em contraste com outros órgãos esteroidogênicos, a placenta humana não expressa citocromo P450 17 α -hidroxilase e por isso não pode utilizar os esteroides de 21 carbonos, tais como pregnenolona ou a progesterona como substrato para a síntese de andrógenos para estrógenos. Assim, a síntese de estrógenos na placenta depende de uma fonte precursora de andrógenos o deidroepiandrosterona (DHEA) e deidroepiandrosterona-sulfato (DHEA-S) produzidos pela glândula adrenal materna e fetal respectivamente (Figura 4) (Gambino *et al.*, 2012; Rainey *et al.*, 2004; Stocco *et al.*, 2012).

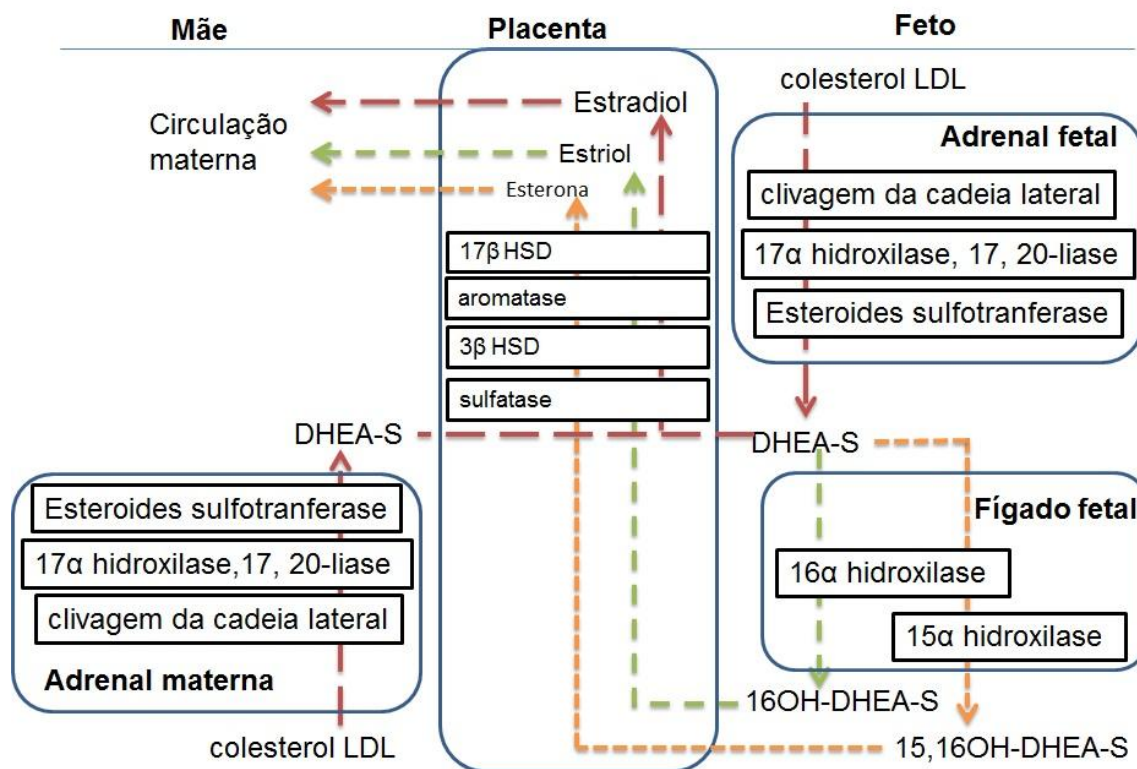


Figura 4. Biossíntese de estrógeno na placenta humana. **Fonte:** Adaptado de (Rainey *et al.*, 2004).

Os níveis elevados da aromatase na placenta humana servem para: a) metabolizar grandes quantidades de andrógenos produzidas pelas glândulas adrenais fetais, impedindo assim a conversão destes esteroides em andrógenos ativos, o que pode masculinizar o feto; b) gerar estrógenos biologicamente ativos, o que aumenta a angiogênese, fluxo sanguíneo útero-placentário e reduz a resistência vascular sistêmica (Kumar *et al.*, 2011; Stocco *et al.*, 2012). A aromatase da placenta também é crítica, para a diferenciação dos órgãos genitais externos femininos (Stocco *et al.*, 2012).

1.3 Receptores relacionados ao estrógeno-gama na placenta

Os receptores relacionados aos estrógenos (ERRs) são receptores nucleares órfãos que foram identificados por meio de sua homologia com os receptores de estrógeno (ERα e β). Os primeiros ERRs a serem identificados foram ERRα (NR3B1) e ERRβ (NR3B2), posteriormente foi identificado um terceiro membro da família dos

ERRs o ERR γ (NR3B3) (Duellman *et al.*, 2010; Eichner *et al.*, 2011; Poidatz *et al.*, 2012). Embora os ERRs, compartilham estreito parentesco estrutural com os ERs os ERRs não se ligam aos estrógenos (Duellman *et al.*, 2010; Eichner *et al.*, 2011; Poidatz *et al.*, 2012). No entanto, os ERRs apresentam diferentes níveis de atividade constitutiva (dependendo do tecido) e, podendo interagir com co-ativadores independente de qualquer ligante (Abad *et al.*, 2008). A atividade transicional dos ERRs são altamente dependente de proteínas co-ativadoras entre elas pode-se destacar a família de reguladores de transcrição o co-ativador alfa do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α) (Rangwala *et al.*, 2007).

Estudos têm mostrado que as isoformas dos ERRs são expressos em níveis muito elevados em tecidos com elevadas exigências metabólicas (Poidatz *et al.*, 2012; Rangwala *et al.*, 2007). Durante o desenvolvimento fetal o ERRgama é altamente expresso em tecidos metabolicamente ativos tais como; músculo esquelético, tecido adiposo e tecidos cardíacos. Já nos adultos os níveis mais elevados da expressão do ERRgama é observado no tecidos cardíacos, cérebro, rins e pâncreas (Abad *et al.*, 2008). Takeda *et al.*, 2009 mostrou que a placenta humana também expressa grandes quantidades de ERRgama. Entre as isoformas do ERRgama conhecidas, a isoforma-1 (ERRgama1) é expressa exclusivamente na placenta. Apesar dessas descobertas pouco se sabe das funções fisiológicas do ERRgama na placenta.

1.4 Estresse oxidativo

Grande parte da energia produzida no organismo é gerada por meio de fosforilação oxidativa, o que implica cinco complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial que estão envolvidos no transporte de elétrons através de uma série de proteínas via reações redox, tendo como destino final uma molécula de

oxigênio que é então convertida em água no complexo IV (Andrade *et al.*, 2010). No entanto, durante esse processo e em condições normais ~1-3% do oxigênio é reduzido univalentemente, ou seja, um processo em que a molécula recebe um elétron por vez, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, produzindo intermediários reativos, denominado ROS (Valko *et al.*, 2007).

ROS incluem as espécies radicalares como, radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($\cdot OH$), que possuem um elétron desemparelhado na última camada orbital e, não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O radical superóxido é a primeira espécie a ser formada a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron, é pouco reativo e impermeável a membranas lipídicas agindo apenas no local onde é produzido (Andrade *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2005).

Embora ROS tenham chamado atenção primeiramente como subproduto do metabolismo aeróbico potencialmente prejudicial, sabe-se agora que estas ROS desempenham papéis importantes na célula (Burton *et al.*, 2011). Em baixa concentração atuam como moléculas sinalizadoras intracelulares (Andrade *et al.*, 2010), por exemplo, na regulação da transcrição de genes (Mariani *et al.*, 2006). As ROS passam a ter efeito prejudicial ao organismo quando ocorre um aumento excessivo na sua produção ou uma diminuição na defesa antioxidante, levando ao estresse oxidativo (Andrade *et al.*, 2010).

As ROS podem atuar no organismo oxidando proteínas, DNA e ácidos graxos polinsaturados denominado (peroxidação lipídica) (Ribeiro *et al.*, 2005). A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação das ROS sobre os ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares levando à destruição dessas estruturas, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e em

condições extremas à morte celular (Galhardi *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2001). Os ácidos graxos polinsaturados são particularmente susceptíveis ao ataque de radical hidroxila (Burton *et al.*, 2011). Durante a oxidação de lipídeos há formação de substâncias denominadas aldeídos. Dentre os aldeídos o malondialdeído (MDA) é um dos mais abundantes e é utilizado como um marcador bioquímico da peroxidação de lipídeos *in vivo* e *in vitro* (Barbosa *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2005).

1.5 Sistema de defesa antioxidante

Para combater os efeitos danosos das ROS, os organismos aeróbicos possuem um sistema complexo de moléculas capazes de interceptar, degradar as ROS ou ainda reparar os danos causados por estas, denominado sistema de defesas antioxidantes, que podem ser de natureza enzimática ou não enzimática (Mota *et al.*, 2004). As enzimas antioxidantes presentes no sistema biológico mais comum são: a) superóxido dismutase (SOD) que converte o radical superóxido em peróxido de hidrogênio (Mariani *et al.*, 2006; Nassi *et al.*, 2009); b) catalase (CAT) que faz a conversão do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Mariani *et al.*, 2006) e c) glutathione peroxidase (GPx) (Erдем *et al.*, 2012) que constitui em uma classe principal de enzima envolvida na neutralização do peróxido de hidrogênio (Roland-Zejly *et al.*, 2011) (Figura 5).

Já entre as defesas antioxidantes não enzimáticas, pode-se destacar a glutathione reduzida (GSH), um dos mais importantes antioxidantes das células e, considerada a primeira linha de defesa contra as ROS (Dickinson *et al.*, 2002). O que determina a elevada concentração intracelular de GSH é o equilíbrio entre as reações que consomem a GSH as reações que produzem glutathione oxidada (GSSG), por exemplo, na degradação do peróxido de hidrogênio pela GPx (Mota *et al.*, 2004). A manutenção dos níveis normais de GSH acontece, em parte, através da redução da GSSG, catalisada pela

enzima glutatona redutase (GR) que requer poder redutor do NADPH gerado na via das pentoses fosfato (Dickinson *et al.*, 2002).

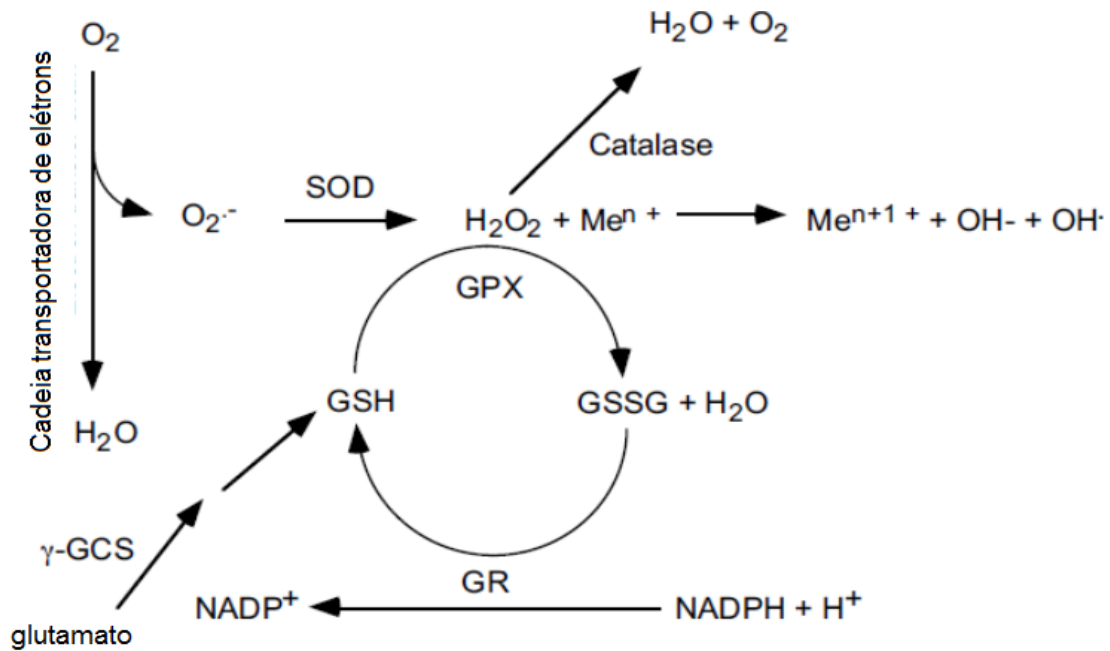
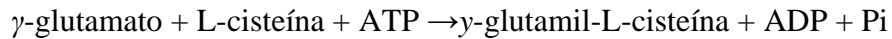
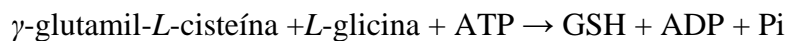


Figura 5. Cooperação entre antioxidantes. **Fonte:** Adaptado de (Cederberg 2001).

A GSH é um tripeptídeo composto por glutamato cisteína e glicina, a síntese de GSH ocorre em duas etapas: na primeira etapa que é considerada a etapa limitante na síntese da GSH, a γ -glutamil cisteína sintase (γ -GCS) atualmente chamada de glutamato cisteína ligase (GCL) catalisa a formação do dipeptídeo γ -glutamil-cisteína (γ -GluCis) na segunda etapa, a GSH sintetase faz a ligação do aminoácido glicina com o dipeptídeo com gasto de ATP gerando GSH (γ -glutamil-cisteína-glicina) (Lu *et al.*, 2009; White *et al.*, 2003) de acordo com as reações abaixo:



(catalisada pela GCL)



(catalisada pela GSH sintetase)

A GCL é um heterodímero constituído de duas subunidades uma é denominada subunidade catalítica (GCLc) que tem toda a atividade catalítica da enzima e a outra é a subunidade regulatória (GCLr). A atividade da GCLr modifica a atividade da holoenzima, diminuindo o valor do Km (constante de Michaelis que caracteriza a afinidade da enzima pelo substrato) para o glutamato e aumentando o valor do Ki (constante de inibição) para a GSH (White *et al.*, 2003). A síntese da GSH em células é normalmente regulada pela inibição do feedback da GCL pela GSH (Lu *et al.*, 2009).

1.6 A placenta e o estresse oxidativo

No primeiro trimestre da gestação existe um aumento fisiológico na produção de ROS devido à hipóxia-reoxigenação após o estabelecimento do fluxo sanguíneos nos espaços intervilosos (Potdar *et al.*, 2009; Dickinson *et al.*, 2002). Durante a gravidez devido ao aumento nos níveis da atividade metabólica na mitocôndria placentária (Myatt *et al.*, 2004; Potdar *et al.*, 2009) também há um aumento na produção de ROS (Potdar *et al.*, 2009; Roland-Zejly *et al.*, 2012). Por isso, a placenta é considerada uma fonte importante de estresse oxidativo durante a gravidez (Erdem *et al.*, 2012). Porém, trabalho tem relatado que peroxidação lipídica produzida durante a gravidez é controlada pelas enzimas antioxidantes sintetizadas pela placenta (Mueller *et al.*, 2005). No entanto, há evidências crescentes de que o estresse oxidativo desempenha papel importante em condições patológicas durante a gravidez como, pré-eclâmpsia, aborto espontâneo (Burton *et al.*, 2011), restrição de crescimento intra-uterino e até morte fetal (Al-Gubory *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVAS

Durante a gestação a placenta funciona como uma glândula endócrina e desempenha inúmeras funções que visam o crescimento e o desenvolvimento do feto. Por isso, qualquer alteração na sua função terá consequências diretas para o feto em desenvolvimento, neste sentido, é importante avaliar esses níveis no final da gestação, já que trabalhos têm relatado que o stress oxidativo desempenha papéis importante em várias patologias. Diante da importância da aromatase na síntese do estrógeno, qualquer insulto na sua síntese pela placenta pode ter consequências graves. Uma vez que foi relatado que o ERGama é altamente expresso na placenta durante a gestação é importante maior compreensão sobre o seu papel na placenta.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar os níveis de peroxidação lipídica, capacidade antioxidante total, atividade da GCL e contração da GSH e expressão da aromatase e do ERGama na placenta humana.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar a influência do tabagismo materno, sexo do recém-nascido e a imunoexpressão da aromatase no peso do recém-nascido.

Avaliar a influência do tabagismo materno e expressão do ERGama na imunoexpressão da aromatase na placenta.

Avaliar influência da idade da mãe e o papel da GSH na imunoexpressão do ERGama na placenta.

Avaliar a influência da idade da mãe e o papel da GCL e GSH nos níveis de peroxidação lipídica na placenta.

Avaliar a capacidade antioxidante total da placenta em relação aos níveis de peroxidação lipídica.

**Study of oxidative stress and expression of aromatase and estrogen-related
receptor gamma in human placenta**

Alzira Xavier Garcês¹, Ana Cristina Kalb¹, Laís Silva do Nascimento², Ronald Ladislau
Silva², Débora Cristine Chrisostomo Dias³, António Sergio Valera Junior³, Pablo Elías
Martínez³

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada
(FURG), Brasil.

²Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande (FAMED-FURG),
Brasil.

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Brasil.

Corresponding author: Pablo Elías Martínez

E-mail: pabloeliasm@gmail.com

ABSTRACT

Introduction: During pregnancy, due to increased metabolic demand placental there is an increased production of reactive oxygen species can cause, for example, oxidation of polyunsaturated fatty acids in the placenta, furthermore this phase there is an increase in the expression aromatase and estrogen receptor-related gamma (ERRgamma) in human placenta. The objective of the study was to evaluate the parameters of oxidative stress and immunolabeling of aromatase and ERRgamma in the human placenta.

Methods: The total antioxidant capacity (ACAP), glutamate cysteine ligase (GCL) activity, glutathione (GSH) concentration, lipid peroxidation and immunolabeling of aromatase and ERRgamma were measured in placental tissue of 58 parturient. These analyzes were related with socio-demographic data of the participants.

Results: The fetus of smoking mothers were born with less weight ($p=0.001$). The concentration of GSH decreased lipid peroxidation ($p<0.05$). We found a reduction in total antioxidant capacity and increased lipid peroxidation ($p<0.05$) in the placenta. Smoking mothers had less aromatase ($p=0.037$) already older mothers had less labeling of the ERRgamma ($p=0.009$) in placenta.

Conclusions: The expression of aromatase and ERRgamma in the placenta are altered both by exogenous factors such as cigarette smoke, as by endogenous factors such as the concentration of GSH and the age of the mother. Markers of oxidative stress in the placenta are higher in older mothers and placenta with lower total antioxidant capacity.

Keywords: placenta, oxidative stress, aromatase and estrogen-related receptor gamma

1. INTRODUCTION

The placenta is a complex organ that enables the mammalian embryo to survive in the intrauterine environment [1]. Among the various functions performed for the placenta is synthesizing and to secrete steroid and peptide hormones [2] including estrogen. Estrogens are synthesized from C₁₉-steroid precursors for the action of cytochrome P450 aromatase (CYP19A1). This enzyme is highly expressed in the human placenta [3]. In addition to the aromatase, estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) also was reported to be expressed at highest levels in the human placenta. This receptor was identified through their homology to the estrogen receptors but is not activated by estrogen, however, exhibit constitutive activity [4].

During pregnancy, due to high metabolic demand there is an increased production of reactive oxygen species (ROS) by placenta [5]. The ROS produced increases susceptibility to oxidative stress during pregnancy [6] and can have deleterious effects on cells as, oxidation of polyunsaturated fatty acids [7]. There is increasing evidence that oxidative stress plays a role in the pathological conditions during pregnancy such as, intra-uterine growth restriction (IUGR) and fetal death [8].

The ROS can be neutralized by an antioxidant defense system which is classified as enzymatic and non-enzymatic [9]. The glutathione (GSH), synthesized by the enzyme glutamate cysteine ligase (GCL) is the most important low molecular weight antioxidant synthesized in cells [10]. It is important to underscore that the antioxidant defense system also is present in human placenta [2].

The objective of this study was to evaluate the association between parameters of oxidative stress and immunolabeling of aromatase and estrogen receptor-related gamma in human placenta.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Collection and storage of samples

The study included 58 mothers attended at the Obstetric Center of the University Hospital of the Federal University of Rio Grande that agreed in signing a consent form free and clear. Mothers under 18 years old, their legal guardian were responsible for signing this form. The samples were collected between September 2011 to August 2012. We included only women with uncomplicated pregnancy and excluded multiple pregnancy. All participants answered a questionnaire (annex1) where we obtained information such as age and smoking habits. Data of the newborn such as weight and sex, were obtained through Medical record analysis. After normal delivery or cesarean, biopsies of placenta were performed on the disk of the central maternal side of the placenta. The portions of biopsies used in biochemical analysis were stored at -80°C and to immunohistochemistry were fixed in 4% paraformaldehyde. This study was approved by the Ethics Committee in Research in the Area of Health, n^o54/2011.

2.2 Measurement of total antioxidant capacity (ACAP)

The total antioxidant capacity against peroxy radicals (ROO^{\bullet}) was performed according to Amado et al. [11]. Aliquots of placenta homogenates were put in a medium containing 30mM HEPES (pH7.2), 200mM KCl, 1mM MgCl_2 and 40 μM of the fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$; Invitrogen) in presence or absence of 2,2'-azobis 2 methylpropionamide dihydrochloride (ABAP; 4 mM; Aldrich), which generates ROO^{\bullet} by thermal decomposition at 37°C . Fluorescence was considered as a measure of ROS production and was read in a spectrofluorimeter equipped with a microplate reader (Victor 2 Perkin Elmer) in wavelengths of 485 and 530nm for excitation and emission, respectively. Total fluorescence generation was

calculated by integrating the fluorescence units (FU) along the time of the measurement. The results were expressed as area difference of FU x min in the same sample with and without ABAP addition and standardized to the ROS area without ABAP. The relative difference between ROS area with and without ABAP was considered a measure of antioxidant competence of the placenta, where area difference is inversely proportional to the antioxidant capacity.

2.3 Determination of GCL activity and GSH concentration

GCL activity and GSH levels in the sample placenta were determined according White et al. [12]. This method employs the reaction of naphthalene dicarboxialdehyde (NDA) with GSH or γ -glutamylcysteine (γ -GC) to form fluorescent cyclic products. A reaction solution (25 μ l) with 400mM Tris-HCl, 40mM ATP, 20mM glutamate, 2.0mM EDTA, 20mM sodium borate, 2mM serine, 40mM MgCl was prepared just before the assay to prevent ATP degradation. After addition of placenta homogenates (25 μ l), the plate was incubated at room temperature for 60min and the reaction stopped by adding 50 μ l of 5-sulfosalicylic acid (SSA, 200mM). After protein precipitation, the plate was centrifuged for 5min at 2000 \times g and 20 μ l of supernatant from each well were transferred to a white plate, being added a 2,3-naphthalenedicarboxialdehyde (NDA) solution to all wells, and after 30min of incubation, the fluorescence intensity of the NDA-GSH complex was read at excitation and emission wavelengths of 485 and 530nm, respectively.

2.4 Measurement of lipid peroxidation

Determination of lipid peroxides was performed through estimation of the malondialdehyde content in placenta homogenates employing the thiobarbituric acid

reactive substances (TBARS) fluorimetric method, according to Oakes and Van der Kraak. [13]. Aliquots of sample extracts (10 μ l) were added to a reaction solution containing 150 μ l of 20% acetic acid, 150 μ l of thiobarbituric acid (0.8%), 50 μ l of MilliQ water and 20 μ l of sodium dodecyl sulfate (SDS, 8.1%). This mixture was heated at 95°C during 30min for derivatization. Following cooling for 10min, 100 μ l of MilliQ water and 500 μ l of n-butanol were added. After centrifugation (3,000x g during 10min at 15°C), 150 μ l of the organic phase were placed in a microplate reader and the fluorescence registered with wavelengths of 520 and 580nm for excitation and emission, respectively. Concentration of TBARS (nM/mg of wet tissue) was calculated employing a standard curve of tetramethoxypropane (TMP, Acros Organics) as Malondialdehyde (MDA) equivalent.

2.5 Immunomarcation of aromatase and ERRgamma

The slides of placenta (6 μ m) were deparaffinized with xylene, rehydrated in graded alcohols, and washed in with distilled water and finally in phosphate buffer (PBS, pH7.4). They were then treated with 3% hydrogen peroxide in PBS for 15min to inactivate endogenous peroxidase activity. After, slides were heat-treated for antigen retrieval using sodium citrate buffer (0.01%, pH6.0). To eliminate nonspecific binding, slides were incubated with 10% normal goat serum (NGS) in PBS + 3% bovine serum albumin (BSA) for 2 hours. After, slides were then incubated overnight at 4°C with the primary antibodies, Anti-Aromatase antibody (ab115271, abcam ®) or ERRgamma (Z-21: sc-133561, Santa cruz Biotechnology, INC) diluted 1:100 in PBS containing TritonX-100 0.5%. After, the slides were incubated with secondary antibody for 2 hours, Alexa Fluor 546 rabbit anti-goat IgG (Life Technologies) or Donkey Anti-Goat IgG H&L (DyLight® 488, ab96931, abcam®), diluted 1:200 in PBS containing Triton

X-100 0.5%. The slides were washed with PBS and incubated during 1min with 4,6-diamidino-2 phenylindole (DAPI) (D9542, Sigma-Aldrich). Finally, the slides were mounted with aqueous mount medium (Fluoromount, F4680, Sigma-Aldrich) and visualized in immunofluorescence microscope (Olympus BX51). The aromatase and ERRgamma were measured using the Image J program. The negative control was processed using identical protocols, except for the primary antibody.

2.6 Statistical Analysis

We used multiple regression analysis to examine the relation between parameters analyzed in placental tissue. Results were considered significant when the corresponding *P* value was less than 0.05.

3. RESULTS

In total 58 pregnant women participated in the study, age ranged from 15 to 40 years and the mean age was 23 years. Among the 58 newborns included in the study 30 (51%) were female. The lower and higher weights of the newborn were 1,950g and 4,000g Mean±SD weight was 3,051.09±515.62g. With regard to maternal smoking during the pregnancy we observed that 19 (32.75%) of the mothers were smokers, however, was not reported the number of cigarettes smoked per day. The variables that affected the birth weight were estimated by multiple regressions showed in Table 1. Birth weight was affected significantly [F(3, 52)=11.439 p<0.002] by sex (p<0.015), higher in males, by smoking (p=0.006), lower in newborn of mothers who smoked during pregnancy. Children of smoking mothers were born with less weight (2,945g) in relation to children of non-smoking mothers (3,161g) and aromatase had a negative effect (p=0.001) on birth weight.

The result of multiple regression [$F(2, 53)=7.0872$ $p<0.012$] (Table 2) showing the factors that influence the immunolabeling of aromatase in the placenta, wherein, the immunolabeling of ERRgamma had a positive effect ($p=0.005$). The Figure 1 shows the immunolabeling of aromatase in human placenta in which can see that smoking mothers had less immunolabeling of aromatase in the placenta (Figure 1.B1 and 1.B1) compared to non-smokers (Figure 1.C1 and 1.C3) ($p=0.037$).

The immunolabeling in the placenta ERRgamma is affected by mother's age and GSH, as shown in multiple regression [$F(2, 53)=13.690$, $p<0.01$] (Table 3). The placenta of older mothers had less ERRgamma ($p=0.009$) and GSH concentration had a positive effect on ERRgamma ($p=0.001$) in the placenta. The representative image of the immunolabeling of the ERRgamma in human placenta can be seen in (Figure 2B1 and 2.B3).

Multiple regression analysis of lipid peroxidation in placenta was affected by mother age, GCL activity and GSH concentration [$F(5, 50)=6.701$ $p<0.001$] (Table 4). Older mothers have higher lipid peroxidation in the placenta ($p<0.05$). GCL activity had a positive effect on the production of the lipid peroxidation ($p<0.001$) and, the increased concentration of GSH decreased lipid peroxidation ($p=0.05$) (Figure 3B). The Table 5 shows regression results of the ACAP [$F(3, 52)= 5.007$, $p <0.022$]. The ACAP was affected by the lipid peroxidation, in which the increase in lipid peroxidation decrease the total antioxidant capacity the placenta ($p<0.05$) (Figure 4) and, GCL activity had no significant effect ($p=0.085$).

4. DISCUSSION

Decreasing weight in newborn of smoking mothers was reported in studies done by Simpson [14] and, more recent studies by Sasaki et al. [15], Sbara et al. [16] and,

Wang et al. [17]. The cigarette smoke is composed of more than 4000 compounds [15], it is very difficult to correlate specific compounds with negative effects. However, nicotine one of the principal alkaloids of tobacco smoke, has been implicated in causing severe adverse effects in the developing fetus. It is well documented that nicotine activates the adrenergic system, how nicotine crosses the placenta there is a possibility of activating the adrenergic system fetus. Various laboratory shows that nicotine induces the release of catecholamines and having a direct vasoconstrictive effect on blood vessels of the placenta [18]. This decreases placental blood flow which consequently reduces the amount of nutrient/oxygen transport to fetus [19]. Another component of cigarette smoke that may have negative effect on fetal growth is the carbon monoxide, which crosses the placenta and binds to hemoglobin forming carboxyhemoglobin, further interfering with tissue oxygenation [20].

The weight of the newborn is a variable of great importance due, in large part, from the recognition of its strong association with mortality not only in the perinatal period as infant [21]. Higher birth weight found in boys in our study is consistent with studies by Souza et al. [21] and recently by Secreti et al. [22].

During pregnancy aromatase expressed in the placenta is important for many functions, such as to generate biologically active estrogen [23] however, at the end of pregnancy, the increase in the placental aromatase is related to the increase in the level of estrogen which plays a fundamental role in labor [24]. Several hormones are related to the onset of the contraction, the peristaltic contractions of the smooth muscle are caused by oxytocin liberated by posterior lobe of the pituitary [25]. Oxytocin also stimulates the release of prostaglandins of the decidua, which stimulate myometrial contractility sensitizing the cells of this oxytocin. However, estrogens also increases the

contractility of the myometrium and stimulate the release of oxytocin and prostaglandins [25]. The circulating corticotropin-releasing hormone (CRH) that is seen in pregnancy is identical to maternal and fetal hypothalamic CRH but is synthesized in the placenta in large amounts stimulated by cortisol [26]. The placental CRH stimulates human fetal adrenal cells to produce dehydroepiandrosterone-sulfate (DHEA-S) and, the ability of cortisol to stimulate placental CRH makes it possible to create a feed-forward endocrine cascade that does not end until separation of the fetus from the placenta at delivery. This positive feedback cascade was proposed to drive the increase in CRH as well as fetal adrenal steroidogenesis in late gestation [26].

Decreasing in the quantity of aromatase in placenta of smoking mothers was also reported by Kitawaki et al. [27]. Barbiere et al [28] examined the effects of constituents of tobacco such as nicotine, cotinine and anabasine on estrogen production in cells of the placenta and concluded that these compounds inhibit the estrogen formation, suggesting that nicotine directly inhibit the enzyme aromatase. Already, Kumar et al. [3] observed that induction of aromatase expression was prevented when the cells were cultured under hypoxic (2% O₂) conditions. If the aromatase expression depends on oxygen, it is expected a reduction in the expression of aromatase in placenta of women smokers, once, compounds present in cigarette smoke can diminish blood flow uteroplacental and leads to hypoxia due to the formation of carboxyhemoglobin [19], consequently decreases the supply of oxygen to placenta.

Influence of immunolabeling ERRgamma on immunolabeling aromatase was also reported by Kumar et al. [3], they showed that during the differentiation of trophoblast in the placenta, ERRgamma induced expression of aromatase. They also reported that sequences nuclear receptor element (NRE-like)-183pb may serve as

response element (ERRE) by which ERRgamma induces the basal activity of the promoter aromatase. These data show that ERRgamma is capable of promoting the endocrine function of the human placenta by the induction of expression of aromatase [29].

Although there is no evidence in the literature that explain the mechanisms by which maternal age affects the immunolabeling of ERRgamma in the placenta, and considering the role of ERRgamma induction on aromatase placental, this study provides more information that can lead to the production of new scientific research to elucidate the functions of the ERRgamma in placenta.

Poidatz et al. [29] showed in their study that ERRgamma induced mitochondrial biogenesis in the placenta, based on analysis of mitochondrial DNA content and expression of the key regulators of mitochondrial biogenesis (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α (PGC-1 α) and nuclear respiratory factor (NRF1). These data lead to the hypothesis that the ERRgamma to induce mitochondrial biogenesis may indirectly influence the production of ROS in the placenta. Therefore, the increase in ERRgamma labeling is accompanied with an increase in the concentration of GHS which is necessary to make antioxidant defense against ROS.

The increased risk of adverse pregnancy outcomes in adolescents can have various influences including gynecological immaturity [30]. Despite a decrease in lipid peroxidation observed in mothers aged 20 to 30 years, still observed a production of lipid peroxidation. Study has shown that during normal pregnancy due to the high metabolic activity of placental mitochondria there is an increase in generating ROS [31], therefore, normal pregnancy is considered a condition of oxidative stress and lipid peroxidation explains the observed at this age. Based on "Oxidative Stress Theory" for

aging proposed by Harman 1991 [32] explain the increase in lipid peroxidation in the placenta of older mothers found in our study. It is noteworthy that beyond the placental contribution in the production of lipid peroxidation in pregnancy; maternal blood which circulates placenta can also bring lipid peroxidation [33]. Takeara et al. [34] showed that lipid peroxide concentration in maternal blood was 70% higher than the umbilical cord, supporting our hypothesis.

The activity of GCL is a major determinant of the rate of GSH synthesis [35] however, under physiological conditions GSH is a competitive inhibitor of GCL, providing negative feedback control of GSH generation [36]. When there is excessive increase of oxidative stress depletes cellular GSH [35], so a decrease in GSH levels will cause a transient increase in the activity of GCL pre-existing decreasing feedback inhibition by GSH [37]. So, the GCL current would have no effect on the regulation of agents that cause oxidative stress. Although GSH decreased lipid peroxidation, total antioxidant capacity was not sufficient to eliminate and prevent damage caused by ROS in the placenta. This result leads to hypothesis that in late pregnancy there is an increased of oxidative stress. This data is supported by the study by Patil et al. [38] which show an increase in lipid peroxidation in late gestation compared with beginning of pregnancy.

We conclude that, maternal smoking during pregnancy has negative implications not only for the mother but also for the fetus, nevertheless, many mothers continue to smoke during pregnancy. The expression of aromatase and ERRgamma in the placenta are altered both by exogenous factors such as cigarette smoke, as by endogenous factors such as the concentration of GSH and the age of the mother. Markers of oxidative stress

in the placenta are higher in older mothers and placenta with lower total antioxidant capacity.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank the graduate program in Physiological Sciences: Animal Physiology compared the Federal University of Rio Grande the opportunity for the development of this research. The Brazilian agency CAPES and INCT thank the financial support.

5. REFERENCES

- [1] Gambino YP, Maymó JL, Pérez-Pérez A, Calvo JC, Sánchez-Margalet V et al. Varone Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells--focus on leptin expression. *Placenta* 2012; 26: 63-70.
- [2] Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 369-82.
- [3] Kumar P & Mendelson CR. Estrogen-Related Receptorgamma (ERR γ) Mediates Oxygen-Dependent Induction of Aromatase (CYP19) Gene Expression during Human Trophoblast Differentiation. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 1-14.
- [4] Kallen J, Schlaeppli JM, Bitsch F, Filipuzzi I, Schilb A, Riou V, et al. Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERR α): crystal structure of ERR α ligand binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J Biol Chem* 2004; 279: 49330-7.

- [5] Mueller A, Koebnick C, Binder H, Hoffmann I, Schild RL, Beckmann MW. Placental defence is considered suficiente to control lipid peroxidation in pregnancy. *Med Hypotheses* 2005; 64: 553-57.
- [6] Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol* 2002; 57: 609-13.
- [7] Ribeiro SMR, Queiroz JH, Peluzo MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Biosci J* 2005; 31: 133-49.
- [8] Al-Gubory KA, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell B* 2010; 42: 1634–50.
- [9] Mota MP, Figueiredo PA, Duarte JA. Teorias biológicas do envelhecimento. *Rev Port Cienc do Desporto* 2004; 4: 81-110.
- [10] Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 1-12.
- [11] Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 2009; 407: 2115-23.
- [12] White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D, Kavanagh TJ. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Anal Biochem* 2003; 318: 175-80.

- [13] Oakes KO & Van Der Kraak GJ. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 2003; 63: 447-63.
- [14] Simpson WJ. A Preliminary Report on Cigarette Smoking and the Incidence of Prematurity. *Am J Obstet Gynecol* 1957; 73: 807-15.
- [15] Sasaki S, Kondo T, Sata T, Saijo Y, Katoh S, Nakajima S, et al. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 77-83.
- [16] Sbrana E, Suter MA, Abramovici AR, Hawkins HK, Moss JE, Patterson L, et al. Maternal tobacco use is associated with increased markers of oxidative stress in the placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2011; 205: 246e1-7.
- [17] Wang X, Zuckerman B, Pearson C, Kaufman G, Chen C, Wang G. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism, and infant birth weight. *JAMA* 2002; 287: 195-202.
- [18] Quigley M E, Sheehan KL, Wilkes M.M, Yen SS. Effects of maternal smoking on circulating catecholamine levels and fetal heart rates. *Am J Obstet Gynecol* 1979; 133: 685-90.
- [19] Chelchowska M, Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Laskowska-Klita T, Leibschang J. The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2011; 155: 132-36.
- [20] Cowperthwaite B, Hains SMJ, Kisilevsky BS. Fetal behavior in smoking compared to non-smoking pregnant women. *Infant Behav Dev* 2007;30: 422-30.

- [21] Souza MLR, Tanaka ACA, Siqueira AAF, Santana RM. Estudo sobre nascidos vivos em maternidades 1. peso ao nascer, sexo, tipo de nascimento e filiação previdenciária das mães. *Rev Saúde públ., S.Paulo* 1988; 22: 489-93.
- [22] Secretti T, Pedroso FS, Jacobi LF. Estudo do peso em neonatos vivos no hospital universitário de Santa Maria (HUSM) 2007; 33: 11-4.
- [23] Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids* 2012; 77: 27-35.
- [24] Wang WS, Liu C, Li WJ, Zhu P, Li JN, Sun K. Involvement of CRH and hCG in the induction of aromatase by cortisol in human placental syncytiotrophoblasts. *Placenta* 2013; 30: 1-7.
- [25] Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG; *Embriologia básica*. 8.ed. [Rio de Janeiro]: Elsevier, 2012.
- [26] Rainey WE, Rehman KS, Carr BR. Fetal and maternal adrenals in human pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004; 31:817- 35.
- [27] Kitawaki J, Inoue S, Tamura T, Yamamoto T, Honjo H, Higashiyama T et al. Cigarette smoking during pregnancy lowers aromatase cytochrome p-450 in the human placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993; 45: 485-91.
- [28] Barbieri RL, Gochberg J, Ryan KJ. Nicotine, Cotinine, and Anabasine Inhibit Aromatase in Human Trophoblast In Vitro. *J Clin Invest* 1986; 77: 1727-33.
- [29] Poidatz D, Dos Santos E, Brulé A, De Mazancourt P, Dieudonné MN. Estrogen-related receptor gamma modulates energy metabolism target genes in human trophoblast. *Placenta* 2012; 33: 688-95.
- [30] Hayward CR, Greenwood SL, Sibley CP, Baker PN, Challis JRG, Jones RL. Effect of maternal age and growth on placental nutrient transport: potential mechanisms for teenagers' predisposition to small-for-gestational-age birth? *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302: 233-42.

- [31] Kaya S, Keskin HL, Kaya B, Ustuner I, Avsar AF. Reduced total antioxidant status in postterm pregnancies. *Hippokratia* 2013; 17: 55-9.
- [32] Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci EUA* 1981; 78:7124-28.
- [33] Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 347-52.
- [34] Takehara Y, Yoshioka T, Sasaki J. Changes in the levels of lipoperoxide and antioxidant factors in human placenta during gestation. *Acta Med Okayama* 1990; 44: 103-11.
- [35] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 42-59.
- [36] Zhang H, Forman HJ. Glutathione synthesis and its role in redox signaling. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23: 722-28.
- [37] Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64: 1019-26.
- [38] Patil SB, Kodliwadmth MV, Kodliwadmth SM. Lipid peroxidation and nonenzymatic antioxidants in normal pregnancy. *J Obstet Gynecol India* 2006; 5: 399 - 401.

6. TABLES AND FIGURES

Table 1. Results of multiple regression analysis with birth weight(g) as dependent variable.

Independent variable	Regression coefficient	Standard error of regression coefficient	<i>p</i> -value
Intercept	3981.024		0.001
Smoking (no=1; yes=2)	-0.643	0.178	0.001
Sex newborn (female=1; male=2)	0.47	0.157	0.015
Aromatase	-0.985	0.178	0.001

The level of significance was set at $p < 0.05$.

$F(3, 52) = 11.439$; $R^2 = 0.79$, adjusted $R^2 = 0.72$, $p < 0.002$.

F: Fisher Test; R^2 coefficient of determination; adjusted R^2 coefficient of determination.

Table 2. Results of multiple regression analysis with aromatase as dependent variable

Independent variable	Regression coefficient	Standard error of regression coefficient	<i>p</i> -value
Intercept	24.6		0.038
Smoking (no=1; yes=2)	-0.519	0.216	0.037
ERRgamma	0.771	0.216	0.005

The level of significance was set at $p < 0.05$.

$F(2, 53) = 7.0872$; $R^2 = 0.58$, adjusted $R^2 = 0.50$; $p < 0.012$.

F: Fisher Test; R^2 coefficient of determination; adjusted R^2 coefficient of determination.

Table 3. Results of multiple regression analysis with ERRgamma as dependent variable

Independent variable	Regression coefficient	Standard error of regression coefficient	<i>p</i> -value
Intercept	107.603		0.003
Mother age	-0.542	0.166	0.009
[GSH]	0.734	0.166	0.001

The level of significance was set at $p < 0.05$

$F(2, 53) = 13.690$; $R^2 = 0.752$ Adjusted $R^2 = 0.697$; $p < 0.01$.

F: Fisher Test; R^2 coefficient of determination; adjusted R^2 coefficient of determination.

Table 4. Results of multiple regression analysis with MDA as dependent variable

Independent variable	Regression coefficient	Standard error of regression coefficient	<i>p</i> -value
Intercept	0.595		0.017
Mother age	-1.755	0.804	0.034
Mother age**2	1.931	0.806	0.021
[GSH]	1.307	0.464	0.007
[GSH]**2	-1.154	0.467	0.017
GCL activity	0.479	0.128	0.001

The level of significance was set at $p < 0.05$

$F(5, 50) = 6.7019$; $R^2 = 0.426$; adjusted $R^2 = 0.363$, $p < 0.001$

F: Fisher Test; R^2 coefficient of determination; adjusted R^2 coefficient of determination.

Table 5. Results of multiple regression analysis with ACAP as dependent variable

Independent variable	Regression coefficient	Standard error of regression coefficient	<i>p</i> -value
Intercept	32.764		0.017
Atividade GCL	0.396	0.207	0.085
Tbars	-4.884	1.757	0.019
TBARS**2	5.151	1.749	0.014

The level of significance was set at $p < 0.05$;

$F(3, 52) = 5.007$; $R^2 = 0.60$ adjusted; $R^2 = 0.48$, $p < 0.022$

F: Fisher Test; R^2 coefficient of determination; adjusted R^2 coefficient of determination.

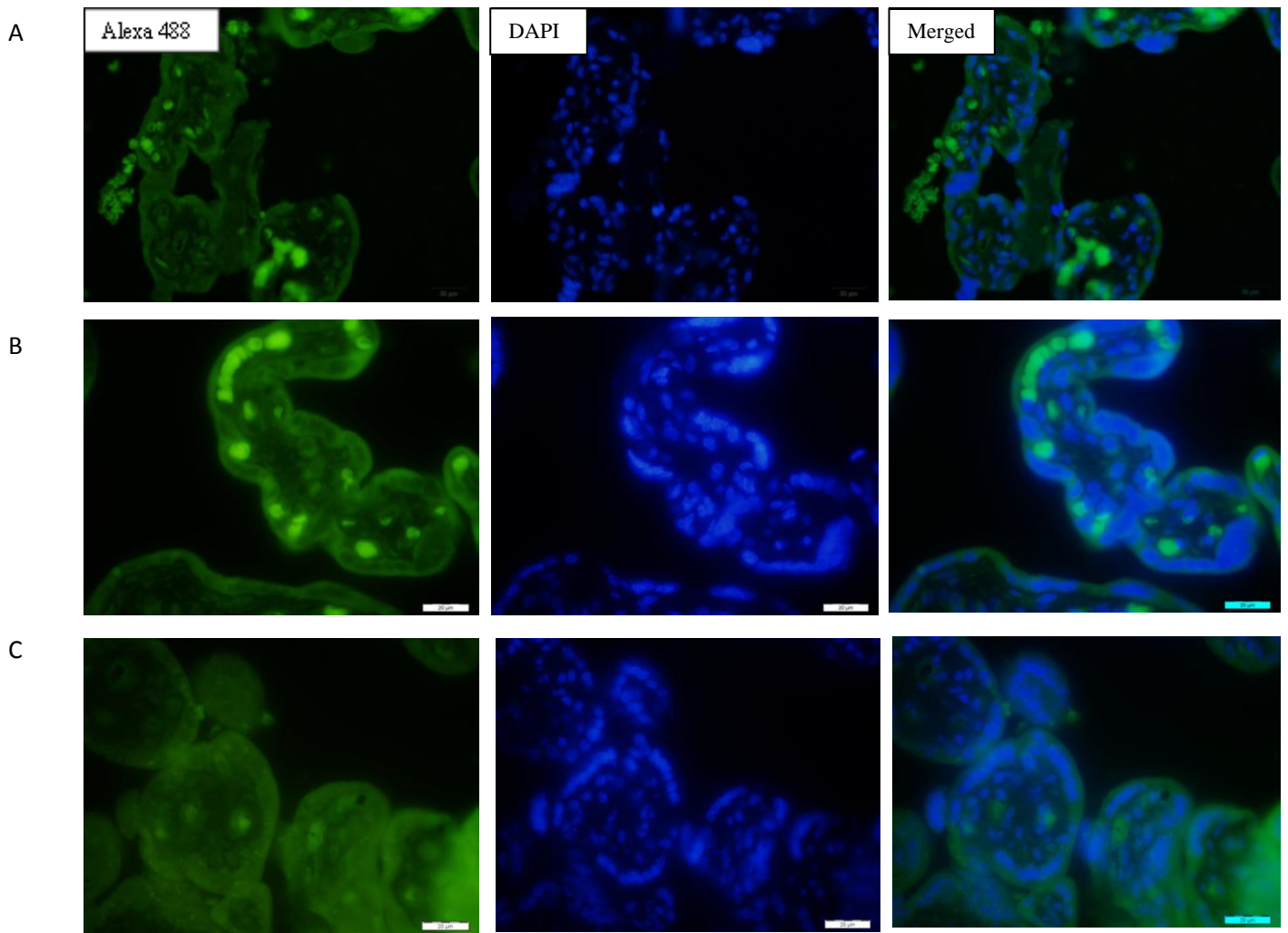


Figure 1: Immunolabeling of aromatase in the chorionic villi in human placenta during pregnancy. A: negative control, increase 100X. B: Placenta of Smoking mothers, increase 100X. C: Placenta of non-smoking mothers, increase 100X. The Immunolabeling of aromatase is located in the cytoplasm.

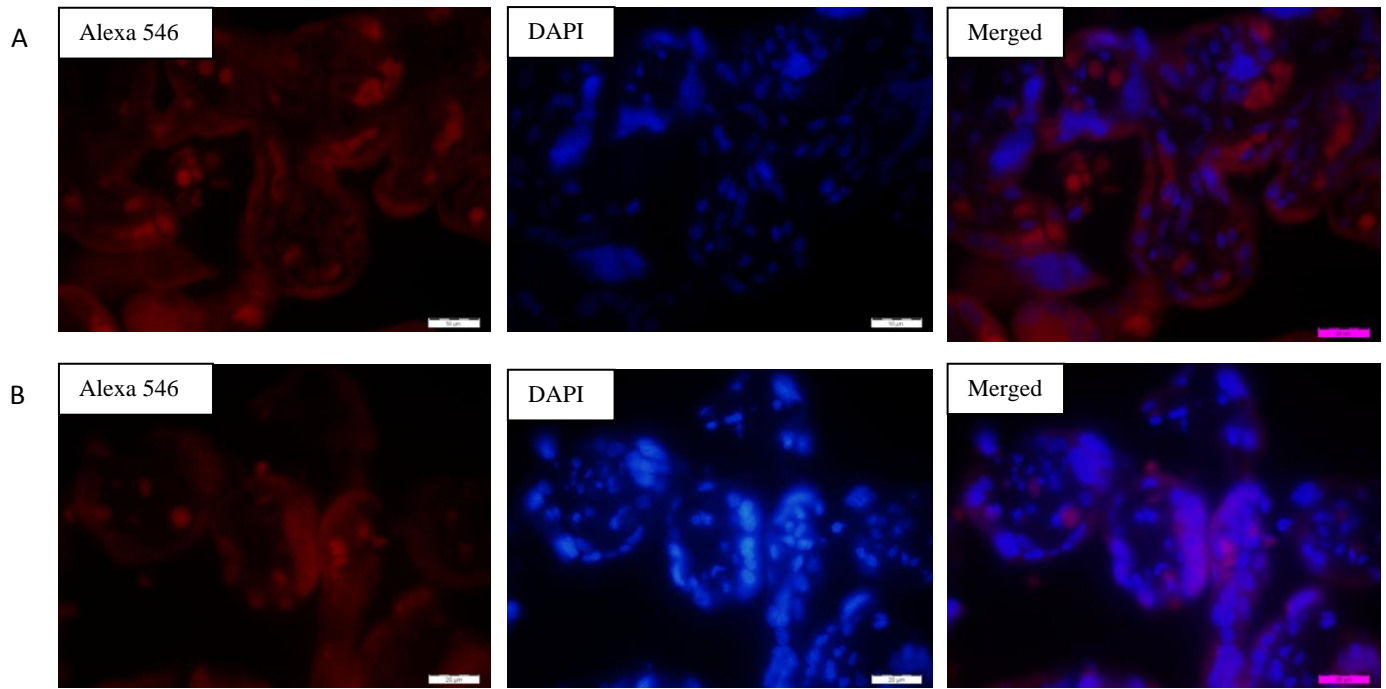


Figure 2: Immunolabeling of ERRgamma in the chorionic villi in human placenta during pregnancy. A: negative control, increase 100X. B: Immunolabeling of ERRgamma, increase 100X. The marking of ERRgamma is located in the nucleus.

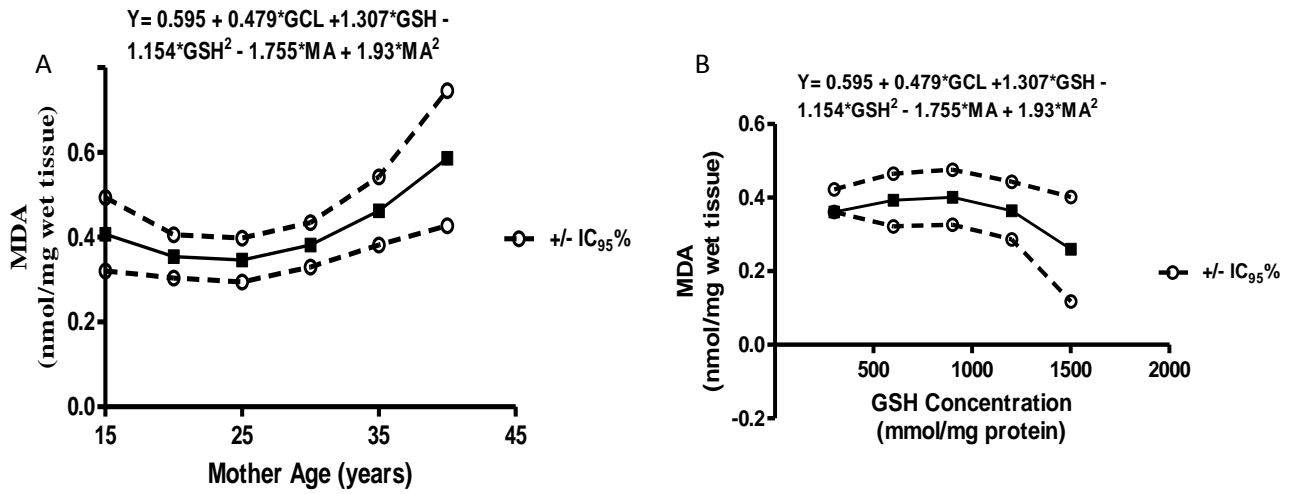


Figure 3: A. Relation between levels of malondialdehyde (MDA) in the human placenta and mother age. B. Relation between levels of malondialdehyde (MDA) in the human placenta and concentration of the tripeptide glutathione (GSH).

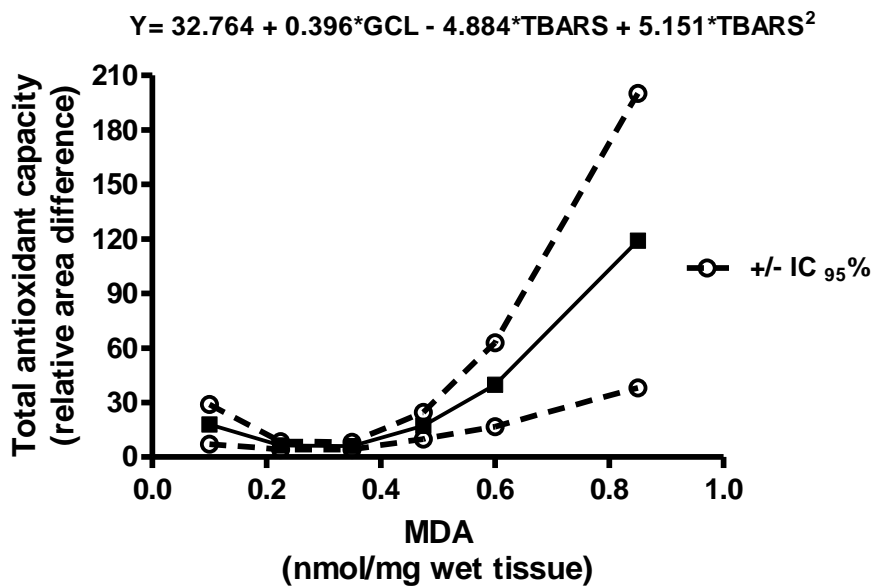


Figure 4: Relation between total antioxidant capacity against peroxy radicals (ROO^o) and levels of thio barbituric acid reative substances (TBARS) in the human placenta. Data are expressed as the difference in area with and without ABAP relative to the fluorescence area measured without ABAP.

CONCLÕES GERAIS

O tabagismo materno durante a gestação diminui o peso do recém-nascido e a imunexpressão da aromatase na placenta. Neste estudo se observou que filhos de mães fumantes nasciam com menos peso em relação aos filhos das mães não fumantes.

Os recém-nascidos do gênero masculino apresentam maior peso ao nascer.

A imunexpressão do ERRgama na placenta influencia a produção da aromatase, já a imunexpressão do ERRgama diminui com a idade.

Durante a gestação, o aumento na expressão do ERRgama na placenta influencia a síntese da GSH.

A produção de peroxidação lipídica na placenta varia de acordo com a idade da gestante, na qual gestantes mais velhas apresentam maior produção de peroxidação lipídica.

A GSH sintetizada pela placenta diminui a peroxidação lipídica, porém, quando foi analisada a capacidade antioxidante total, observou-se que houve uma queda na capacidade antioxidante total e um aumento na produção da peroxidação lipídica. Mostrando que no final da gestação a defesa antioxidante sintetizada pela placenta não é suficiente para diminuir danos causados por ROS. Então conclui-se que há um aumento do estresse oxidativo no final da gestação.

REFERÊNCIAS

Abad MC, Askari H, O'Neill J, Klinger AL, Milligan C, et al. Structural determination of estrogen-related receptor gamma in the presence of phenol derivative compounds. J Steroid Biochem Mol Biol 2008; 108:44-4.

Al-Gubory KA, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell B* 2010; 42: 1634–50.

Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev Bras Reprod Anim* 2010; 34 (2): 79-85.

Blogspot <http://fpebr.blogspot.com.br> <<ultimo acesso em 20/11/2013>>

Barbosa KBF, Brunoro NM C, Alfenas RCG, PAULA S O, Minin VPR et al. Oxidative stress: assessment of biomarkers. *J. Brazilian Soc. Food Nutr* 2008; 33: 111-28.

Brolio MP, Ambrósio CE, Francioli AR, Morini AC, Guerra R.R, Miglino MA. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. *Rev. Bras. Reprod. Anim* 2010; 34: 222-32.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2011; 25: 287–99.

Cederberg J. Oxidative Stress, Antioxidative Defence and Outcome of Gestation in Experimental Diabetic Pregnancy. Dissertação 2001.

Chumsri S, Howes T, Bao T, Sabnis S, Brodie A. Aromatase, Aromatase Inhibitors, and Breast Cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 125: 13-22.

Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:1019-26.

Duellman SJ, Calaoagan JM, Sato BG, Fine R, Klebansky B, Chao W et al. A novel steroidal inhibitor of estrogen-related receptor α (ERR α). *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 819-26.

Eichner LJ, Giguère V. Estrogen related receptors (ERRs): A new dawn in transcriptional control of mitochondrial gene networks. *Mitochondrion* 2011; 11: 544-52.

Erdem M, Harma M, HarmaIM, Arikan I, Barut A. Comparative study of oxidative stress in maternal blood with that of cord blood and maternal milk. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 285: 371-75.

Evain-Brion D, Malassine A. Human placenta as an endocrine organ. *Growth Horm IGF Res* 2003; 13: 34-7.

Gambino YP, Maymó JL, Pérez AP, Calvo JC, Sánchez-Margalet V, Varone CL. Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells--focus on leptin expression. *Placenta* 2012; 26: 63-70.

Galhardi F, Mesquita K, Monserrat JM, Barros DM. Effect of silymarin on biochemical parameters of oxidative stress in aged and young rat brain. *Food Chem Toxicol* 2009; 47: 2655-60.

Genbacev O, Joslin R, Damsky CH, Polliotti BM, Fisher SJ. Hypoxia Alters Early Gestation Human Cytotrophoblast Differentiation/Invasion In Vitro and Models the Placental Defects that Occur in Preeclampsia. *J. Clin. Invest* 1996; 97: 540-50.

Gude MN, Roberts CT, Kalionis B, King RG. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res* 2004; 114: 397-07.

Harada N, Yoshimura N, Honda S. Unique regulation of expression of human aromatase in the placenta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 86: 327-34.

Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao Y P, Skepper JN, Burton GJ. Onset of Maternal Arterial Blood Flow and Placental Oxidative Stress: A Possible Factor in Human Early Pregnancy Failure. *Am J Pathol* 2000; 157: 2111-22.

Kumar P & Mendelson CR. Estrogen-Related Receptorgamma (ERRy) Mediates Oxygen-Dependent Induction of Aromatase (CYP19) Gene Expression during Human Trophoblast Differentiation. *Mol Endocrinol* 2011; 25: 1-14.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm* 2001; 37 (3): 293-306.

Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30: 42-59.

Mariani E, Cornacchiola V, Polidori MC, Mangialasche F, Malavolta M, Cecchetti R, et al. Antioxidant enzyme activities in healthy old subjects: influence of age, gender and zinc status. *Biogerontology* 2006; 7: 391-98.

Mendelson CR, Jiang B, Shelton JMc, Richardson JA, Hinshelwood MM. Transcriptional regulation of aromatase in placenta and ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 95: 25-33.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG; *Embriologia básica*. 8. ed. [Rio de Janeiro]: Elsevier, 2012.

Mota MP, Figueiredo PA, Duarte JA. Teorias biológicas do envelhecimento. *Rev Port Cienc do Desporto* 2004; 4: 81-110.

Mueller A, Koebnick C, Binder H, Hoffmann I, Schild RL, Beckmann MW. Placental defence is considered suficiente to control lipid peroxidation in pregnancy. *Med Hypotheses* 2005; 64: 553-57.

Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 369-82.

Nassi N, Ponziani V, Becatti M, Galvan P, Donzelli G. Anti-oxidant enzymes and related elements in term and preterm newborns. *Pediatr Int* 2009; 51: 183-87.

Poidatz D, Dos Santos E, Brulé A, De Mazancourt P, Dieudonné MN. Estrogen-related receptor gamma modulates energy metabolism target genes in human trophoblast. *Placenta* 2012; 33: 688-95.

Potdar N, Singh R, Mistry V, Evans MD, Farmer PB, JC Konje, et al. First-trimester increase in oxidative stress and risk of small-for-gestational-age fetus. *BJOG* 2009; 116: 637-42.

Rainey WE, Rehman KS, Carr BR. Fetal and maternal adrenals in human pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am* 2004; 31:817- 35.

Rangwala SM, Li X, Lindsley L, Wang X, Shaughnessy S, Daniels TD, et al. Estrogen-related receptor is essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 357: 231–36.

Ribeiro SMR, Queiroz JH, Peluzo MCG, Costa NMB, Matta SLP, Queiroz MELR. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *J Biosci* 2005; 31: 133-49.

Roland-Zejly AL, Moisan V, St-Pierre I, Bilodeau JF. Altered placental glutathione peroxidase mRNA expression in preeclampsia according to the presence or absence of labor. *Placenta* 2011; 32: 161-67.

Stocco C. Tissue physiology and pathology of aromatase. *Steroids* 2012; 77: 27-35.

Takeda Yukimasa, Liu X, Sumiyoshi M, Matsushima A, Shimohigashi M, Shimohigashi Y. Placenta Expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERRy among the human reproductive tissues: predominant expression of Type-1 ERRy isoform. *J Biochem.* 2009; 146: 113–22.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39 44–84.

White CC, Viernes H, Krejsa CM, Botta D, Kavanagh TJ. Fluorescence-based microtiter plate assay for glutamate–cysteine ligase activity. *Anal Biochem* 2003; 318: 175-80.

Yan Y, Wang H, Feng H. Alterations of placental cytochrome P450 1A1 and P-glycoprotein in tobacco-induced intrauterine growth retardation in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26: 1387-94.

ANNEX 1

Study of oxidative stress and expression of aromatase and estrogen-related receptor gamma in human placenta.	Number questionnaire
---	---------------------------------

“THE QUESTIONS IN THIS QUESTIONNAIRE IS CONFIDENTIAL, THERE IS NO POSSIBILITY OF YOU BEING IDENTIFIED. THEREFORE WE RELY ON YOUR SINCERITY.”

“LET’S TALK ABOUT YOUR PERSONAL DATA”

1. What color of your skin? (1) White (2) Black

2. How old are you? ____ Year (complete)

3. Are you: (1) Single (2) Married or have a partner (3) Widow (4) Separate

4. Series until you study? ____th The ____th degree (already completed)

5. Do you smoke? (1) Yes How many cigarettes per day? _____ (2) No (3) Stopped smoking

6. Type of delivery: (1) vaginal (2) caesarean