

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Instituto de Ciências Básicas da Saúde

Departamento de Fisiologia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia

TESE DE DOUTORADO

**IMPACTO DO BLOQUEIO PRECOCE DO RECEPTOR AT1 NA  
CARDIOMIOPATIA INDUZIDA PELA HIPERÓXIA NEONATAL EM RATOS  
ADULTOS: UM MODELO DE CONDIÇÕES ADVERSAS ASSOCIADAS À  
PREMATURIDADE**

Jéssica Hellen Poletto Bonetto

Porto Alegre, 2019

**Jéssica Hellen Poletto Bonetto**

**IMPACTO DO BLOQUEIO PRECOCE DO RECEPTOR AT1 NA  
CARDIOMIOPATIA INDUZIDA PELA HIPERÓXIA NEONATAL EM RATOS  
ADULTOS: UM MODELO DE CONDIÇÕES ADVERSAS ASSOCIADAS À  
PREMATURIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Fisiologia.

Orientadora: Dra. Adriane Belló Klein  
Co-orientadora: Dra. Anne Monique Nuyt

Porto Alegre, 2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos que recebo e pessoas que conheço, me fazendo pensar todos os dias como sou afortunada.

Agradeço imensamente à minha mãe (Jane), minha vó (Selvina), meu vô (Pedro) e meu pai-drasto (Jorge) pelo infinito apoio e incentivo durante essa trajetória e todo o sempre. Vocês são aqueles que acreditam em mim quando eu mesma não o faço, e isso faz toda a diferença para eu alcançar meus objetivos. Amo vocês. Ao meu colega de laboratório, noivo e pai da minha filha, Rafael, obrigada por fazer a vida muito mais alegre e colorida, os dias muito mais leves, e os “problemas” algo simples e fáceis de resolver. Contigo aprendo todos os dias a ser mais humana, mais amável e altruísta. Te amo infinitamente e agradeço toda a tua ajuda dentro e fora do laboratório.

À minha filha Caetana, que ainda nem nasceu, mas já é o maior de todos os estímulos para a busca de novas conquistas e para eu me tornar um ser humano melhor, e ser um bom exemplo.

A família do Rafael, D. Liliane, S. Nelson, Sabrina, Mateus, Cristian e todos do Alegrete: obrigada pelo suporte físico e emocional, a qualquer hora e lugar.

Obrigada por me deixarem fazer parte dessa família tão linda e divertida.

À minha orientadora, Profa. Adriane Belló Klein, pela oportunidade de ser sua aluna e poder conviver e aprender com a senhora, uma excelente e dedicada professora e pesquisadora, mas acima de tudo, uma pessoa simples e afetuosa. A oportunidade que a senhora me deu em seu laboratório abriu portas para muitas outras grandes oportunidades (inclusive a de eu construir a minha família - risos). Obrigada por tudo isso, pela amizade e pela confiança.

*To my co-supervisor, Dr Anne Monique Nuyt, thank you so much for one of the most incredible opportunity I had, to learn lots of new things at your lab. You are an example of researcher and human being, a big fighter but at the same time sensitive and supportive. Thank you for all the words of support and strength on the most difficult times during the experiments. We miss bringing the sunshine for the lab, as you once said.*

*To the colleagues of the lab in Montreal, thank you so much for all the help, friendship and amazing moments we had together. Thank you specially to Daniela, Daniele, Aurélie, Thuy-An, Alyson, Ying and Anik: your help was fundamental for the development of this work.*

*For all our friends in Canada, specially Helena, Rafael and the kids, Mariane, Alex, Roger, Daniela, Alisson, Débora, Thuy-An and Valerie; you made that one year of sandwich Ph.D. lighter and happier.*

Aos amigos e amigas do Brasil, obrigada pelo apoio e incentivo para eu ir em busca dos meus sonhos.

Aos colegas do laboratório de Fisiologia Cardiovascular da UFRGS, obrigada por todos esses anos de parceria e amizade. Compartilhamos momentos maravilhosos de estudo, trocas de ideias, experimentos e diversão. Tenho muito orgulho do que cada um vem se tornando e conquistando!

À minha querida iniciação científica, Marina, obrigada pela ajuda na análise dos experimentos e por disseminar tão bem os nossos resultados. Muito obrigada também por todos os ensinamentos, trocas de conhecimento e pela amizade.

Aos professores do laboratório, Alex e Paulo, a técnica Tânia, e as pós-docs Cristina e Elvira, muito obrigada pela parceria, carinho, apoio e trocas de ideias.

Muito obrigada a Dra. Karina Rabello Casali, pela colaboração com o nosso trabalho, a qual enriqueceu tanto os nossos resultados.

Aos professores e time do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, obrigada por todas as oportunidades e conhecimento compartilhado em todos esses anos de pós-graduação.

Às agências de fomento brasileiras (CNPq, CAPES e FAPERGS) pelo financiamento para a realização deste trabalho, e às agências de fomento canadenses (*Global Affairs Canada e Fonds de Recherche du Québec*), as quais me oportunizaram a realização do doutorado sanduíche.

Finalmente, aos queridos ratinhos que doaram suas vidinhas para que, de alguma forma, pudéssemos contribuir com o conhecimento e com a ciência.

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

*O pequeno príncipe  
Antoine de Saint-Exupéry*

## RESUMO

Indivíduos prematuros apresentam maior risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular, com evidências apontando para um papel do sistema renina angiotensina na programação dessas doenças. Ainda, o bloqueio do receptor AT1 de angiotensina II previne as alterações cardíacas decorrentes da exposição neonatal à hiperóxia (modelo de condições adversas relacionadas à prematuridade) em ratos jovens. Ademais, o sistema nervoso autônomo tem sido proposto como outro mecanismo importante na programação da doença cardiovascular no adulto. Considerando o papel de ambos os sistemas supracitados, o presente estudo teve como objetivo investigar se o bloqueio neonatal do receptor AT1 previne as alterações morfo-funcionais cardíacas decorrentes da hiperóxia pós-natal na idade adulta. Ainda, se a hiperóxia neonatal leva ao prejuízo do controle autonômico cardíaco em associação ao estresse oxidativo, e qual o impacto do tratamento com losartan sobre essas alterações. Filhotes de ratos Sprague-Dawley foram mantidos com suas mães à 80% de O<sub>2</sub> ou ar ambiente do dia 3 ao dia 10 de vida. Do dia 8 ao dia 10 de vida, Losartan (20 mg/kg/dia) ou água foram administrados por gavagem, gerando assim 3 grupos experimentais: Controle+H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>-exposto+H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>-exposto+Los. A função ventricular esquerda, hipertrofia e fibrose, expressão dos componentes do sistema renina angiotensina, registros de pressão arterial e ECG de 24h, variabilidade da frequência cardíaca, balanço simpato-vagal, inervação simpática, sinalização adrenérgica e marcadores de estresse oxidativo foram examinados em ratos adultos. Os dados foram analisados por ANOVA de uma ou duas vias seguido por post-hoc de Dunnet ou Kruskal-Wallis e apresentados como média ± DP ou mediana e intervalos interquartis. Os animais expostos ao O<sub>2</sub> desenvolveram disfunção cardíaca leve associada à hipertrofia e fibrose, bem como diminuição da expressão do receptor Mas e aumento de AT2, sem diferenças significativas no AT1. O losartan preveniu o desenvolvimento de fibrose miocárdica, normalizou a espessura de parede ventricular, o diâmetro ventricular e o volume sistólico dos ratos expostos a hiperóxia. Todavia, o tratamento com losartan levou também à redução da fração de ejeção e fração de encurtamento e não preveniu as

mudanças na função diastólica. Nenhuma modulação sobre os componentes do SRA foi observada. Considerando o sistema nervoso autônomo, a exposição à hiperóxia diminuiu significativamente a variabilidade da frequência cardíaca e aumentou o balanço simpato-vagal. O tratamento com losartan preveniu essas alterações. Os grupos O<sub>2</sub>-expostos apresentaram aumento significativo do receptor  $\beta$ <sub>1</sub>-adrenérgico e diminuição da inervação simpática, sem modulação pelo tratamento com losartan. Os animais O<sub>2</sub>-expostos não apresentaram aumento nos marcadores de estresse oxidativo, apenas na expressão da catalase, também sem modulação pelo losartan. Não houve diferenças significativas entre os grupos para a pressão arterial de 24h. A exposição neonatal à hiperóxia leva a alterações cardíacas morfo-funcionais, associada a mudanças de expressão dos componentes do SRA e prejuízo do controle autonômico cardíaco, apontando um papel de ambos os sistemas na programação da doença por insultos perinatais. O bloqueio neonatal de AT1 apresentou algumas repercussões positivas em nível de sistema cardiovascular, atenuando o desenvolvimento de mudanças morfo-funcionais, tanto em nível tecidual quanto central sobre o sistema simpático. Considerando esses efeitos, outros estudos são necessários para investigar e compreender o papel dos sistemas renina angiotensina e autônomo em insultos perinatais adversos, assim como possíveis terapias possam ser elaboradas e testadas previamente a estudos clínicos.

Palavras-chave: prematuridade, hiperóxia, sistema renina angiotensina, cardiomiopatia, desenvolvimento programado, sistema nervoso autônomo.

## ABSTRACT

Preterm individuals have higher risk to develop cardiovascular disease and several clinical and experimental evidences indicate the role of the renin angiotensin system on the programming of the diseases. Recently, it has been shown that the angiotensin II AT1 receptor blockade prevents cardiac changes due to neonatal hyperoxia exposure (a recognized model of preterm birth related conditions) in young rats. Furthermore, autonomic nervous system has been suggested as another important mechanism on cardiovascular disease programming on adulthood due to perinatal insults. Considering the role of both systems above cited, the present study aimed to investigate if neonatal AT1 blockade prevents morpho-functional changes due to neonatal hyperoxia exposure in adulthood. Moreover, if neonatal hyperoxia leads to impairment of cardiac autonomic control in association with oxidative stress, and whether there is an impact of neonatal treatment with losartan on these changes. Sprague-Dawley pups were kept with their mothers under 80% of O<sub>2</sub> or room air from day 3 to 10 of life. Losartan (20 mg/kg/day) or water were administered by gavage from day 8 to 10 of life, generating 3 experimental groups: Control + H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O, and O<sub>2</sub>-exposed + Los. Left ventricular function (echocardiography and intraventricular catheterism), hypertrophy, and fibrosis, renin angiotensin system components expression, BP and ECG recordings by telemetry, heart rate variability, sympatho-vagal balance, sympathetic innervation, adrenergic signaling, antioxidants, and oxidative stress markers were examined in adult rats of approximately 16 weeks. Data were analyzed by one or two-way ANOVA followed by Dunnet's post-hoc or Kruskal-Wallis and were presented as mean  $\pm$  SD or median and interquartile intervals. O<sub>2</sub>-exposed rats developed mild cardiac dysfunction, associated with hypertrophy and fibrosis, as well as decreased Mas receptor and increased AT2 expression, without differences on AT1 expression. Neonatal AT1 blockade prevented the development of fibrosis, normalized ventricular wall thickness, the ventricular diameter and stroke volume of adult rats exposed to hyperoxia. However, losartan neonatal treatment led also to decreased ejection fraction and fractional shortening and did not prevent changes in diastolic function. No modulation over the



RAS components was observed. Considering the effects on the autonomic nervous system, hyperoxia exposure significantly decreased heart rate variability and increased sympatho-vagal balance. Losartan treatment prevented these changes. Moreover, O<sub>2</sub>-exposed groups presented a significant increase of  $\beta$ 1-adrenergic receptor and decreased sympathetic innervation, both without modulation by losartan treatment. O<sub>2</sub>-exposed group did not present increase of oxidative stress markers, only on catalase protein expression, also without modulation by losartan. Finally, there were no differences between groups for 24h blood pressure. Neonatal hyperoxia exposure leads to cardiac morpho-functional changes, associated to altered pattern of renin angiotensin system components expression and cardiac autonomic control impairment, showing a role of both systems on the programming of disease by perinatal insults. Neonatal AT1 blockade presented positive repercussion at the cardiovascular system level, attenuating the morpho-functional changes, both at the tissue level, as well as centrally on the autonomic nervous system. Considering these effects, other studies are necessary to investigate and compare the role of the renin angiotensin and autonomic systems in adverse perinatal conditions, as well as possible therapies to be elaborated and testes prior to clinical studies.

Keywords: preterm birth, hyperoxia, renin angiotensin system, cardiomyopathy, developmental programming, autonomic nervous system.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução mono e tetravalente do oxigênio molecular.....	22
Figura 2 - Sistema renina angiotensina: peptídeos, receptores, eixos e ações.....	28
Figura 3 - Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência.....	38
Figura 4 - Desenho experimental do estudo.....	46
Figura 5 – Desenho esquemático – principais resultados.....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tipos de receptores $\beta$ -adrenérgico, sua localização corporal e porcentagem no tecido cardíaco.....	34
---	----

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E FÓRMULAS

Ang (1–7) - angiotensina (1–7)

Ang I - angiotensina I

Ang II - angiotensina II

AT1 - receptor de angiotensina II do tipo 1

AT2 - receptor de angiotensina II do tipo II

BRA - bloqueadores seletivos do receptor AT1

CAT - catalase

DCV - doenças cardiovasculares

DMV - núcleo dorsal motor do vago

ECA 2 - enzima conversora de angiotensina do tipo 2

ECA - enzima conversora de angiotensina

ERO - espécies reativas de oxigênio

FC - frequência cardíaca

GPx - glutathione peroxidase

GSH - glutathione reduzida

GSSG - glutathione oxidada

H<sub>2</sub>O - água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio

HF - componente espectral de alta frequência

IC - insuficiência cardíaca

iECA - inibidores da ECA

LF/HF - balanço simpato-vagal ou balanço autonômico

LF - componente espectral de baixa frequência

Los - losartan

Mas - receptor Mas de angiotensina (1–7)

NA - núcleo ambíguo

NE - noradrenalina

NO - óxido nítrico

NOS - óxido nítrico sintase

NTS - núcleo do trato solitário

$O_2^{\bullet-}$  - ânion superóxido

$OH^-$  - íon hidroxil

$OH^{\bullet}$  - radical hidroxil

OMS - Organização Mundial da Saúde

PA - Pressão arterial

PKA - proteína quinase A

$PO_2$  - pressão parcial de  $O_2$

RL - radicais livres

SNA - sistema nervoso autônomo

SNP - sistema nervoso parassimpático

SNS - sistema nervoso simpático

SOD - superóxido dismutase

SRA - sistema renina angiotensina

TBARS - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

VD - ventrículo direito

VE - ventrículo esquerdo/ventricular esquerdo

VFC - variabilidade da frequência cardíaca

VPA - variabilidade da pressão arterial

$\beta$ 1 - receptor beta-adrenérgico 1

$\beta$ 2 - receptor beta adrenérgico 2

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	16
1.1 Doenças cardiovasculares .....	16
1.2 Prematuridade.....	17
1.3 Impacto da prematuridade na vida adulta: o desenvolvimento programado das doenças .....	19
1.4 Mecanismos do desenvolvimento programado das DCV .....	21
1.4.1 Estresse oxidativo.....	21
1.4.2 Sistema renina angiotensina.....	26
1.4.3 Sistema nervoso autônomo .....	32
1.4.4 Modelo experimental de exposição neonatal à hiperóxia .....	40
2 HIPÓTESE .....	42
3 OBJETIVOS .....	43
3.1 Objetivo geral .....	43
3.2 Objetivos específicos .....	43
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	44
4.1 Aspectos éticos .....	44
4.2 Animais .....	44
4.3 Cálculo amostral .....	44
4.4 Grupos experimentais .....	45
4.5 Protocolo experimental .....	45
4.5.1 Exposição neonatal a altas concentrações de O <sub>2</sub> .....	46
4.5.2 Tratamento neonatal com losartan .....	47
4.5.3 Análise ecocardiográfica.....	47

4.5.4 Cirurgia de implantação de transmissores de telemetria .....	48
4.5.5 Aquisição e registro dos sinais .....	49
4.5.6 Análise da pressão arterial e análise da VFC .....	49
4.5.7 Cateterismo cardíaco .....	50
4.5.8 Coleta e processamento dos tecidos .....	51
4.5.9 Análises morfométricas .....	51
4.5.10 Análises histológicas .....	52
4.5.11 Ensaio de imunofluorescência cardíaca .....	52
4.5.12 Western Blotting .....	53
4.5.13 Análises bioquímicas .....	55
4.5.14 Análise Estatística .....	56
4.5.15 Contribuição autoral .....	56
5 RESULTADOS .....	58
6 DISCUSSÃO .....	59
7 CONCLUSÃO .....	67
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
9 APÊNDICES .....	80
9.1 Artigo 1 .....	80
9.2 Artigo 2 .....	112



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doenças cardiovasculares

As doenças cardiovasculares (DCV) compreendem um grupo de doenças de diferentes etiologias que são responsáveis por altas taxas de internação hospitalar, morbidade e mortalidade. Os indicadores e dados básicos do Ministério da Saúde mais atuais (2011) apontam que, no Brasil, as DCV representam em torno de 30% da mortalidade total, atingindo mais de 5% das pessoas com 35 anos ou mais (MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SVS, [s.d.]; MOURA et al., 2012), justificando a necessidade de estudo e desenvolvimento de pesquisas científicas na área. Mais especificamente, segundo as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (2016), a distribuição da taxa de mortalidade por causas no Brasil no ano de 2013, se deu da seguinte maneira: 31,4% por doenças isquêmicas do coração, 29,5% por doenças cerebrovasculares, 13,8% por doenças hipertensivas, 8,0% por insuficiência cardíaca (IC) congestiva e 17,3% por outras DCV. Apesar da redução observada nas taxas de mortalidade por DCV ao longo dos últimos anos, as doenças hipertensivas apresentaram um aumento entre 2002 e 2009 e tendência à redução desde 2010. A hipertensão arterial é uma condição clínica multifatorial, caracterizada por elevação sustentada dos níveis pressóricos  $\geq 140$  e/ou 90 mmHg, a qual está frequentemente está associada a distúrbios metabólicos, alterações funcionais e/ou estruturais de órgãos-alvo, sendo agravada pela presença de outros fatores de risco. Dentre os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento de hipertensão arterial e DCV em geral estão idade, sexo, etnia, genética, excesso de peso e obesidade, sedentarismo, ingestão de sal, consumo de álcool e fumo, diabetes, pressão alta, colesterol alto e fatores socioeconômicos (FRYAR; CHEN; LI, 2012; KOENE et al., 2016; MALACHIAS et al., 2016).

Além dos fatores de risco clássicos, estudos epidemiológicos recentes têm mostrado uma associação entre fatores ambientais adversos ocorridos durante o período fetal/perinatal e o desenvolvimento de DCV e metabólicas na vida adulta (LEESON; LEWANDOWSKI, 2017; SARTORI et al., 2016). Esses dados vão ao

encontro da hipótese de Barker (1995) da programação fetal da doença no adulto, que observou que indivíduos com baixo peso ao nascer (<2.5 Kg) apresentavam maior mortalidade por DCV durante a vida adulta (BARKER, 1995). A partir de então, muitos estudos epidemiológicos têm confirmado essa associação e os termos “programação fetal” e “origem do desenvolvimento da saúde e doença do adulto” (*Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD*) têm sido utilizados para a sua descrição (SUZUKI, 2018). Carr e cols. (2017) demonstraram, recentemente, uma associação positiva entre a idade gestacional ao nascer e o desenvolvimento de DCV, na qual indivíduos com idade gestacional menor que 28 semanas apresentam 17 vezes mais chance de desenvolver IC na idade adulta, quando comparados a indivíduos nascidos a termo com 37 semanas ou mais. Assim, a prematuridade pode ser considerada como um possível fator de risco para o desenvolvimento de DCV na idade adulta (CARR et al., 2017).

## 1.2 Prematuridade

A prematuridade, por definição, é considerada quando um nascimento ocorre com menos de 37 semanas de gestação (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, [s.d.]), representando mais de 80% dos bebês com baixo peso ao nascer (<2,5 kg) (ABITBOL; RODRIGUEZ, 2012). O nascimento prematuro ou pré-termo é uma síndrome complexa multifatorial, considerada a principal causa de morte entre neonatos (75% da mortalidade perinatal) e crianças com menos de 5 anos no mundo (PHILLIPS; ABBOT; ROKAS, 2015). Cerca de 5% dos nascimentos pré-termo ocorrem com menos de 28 semanas de gestação (prematuridade extrema), 15% com 28–32 semanas (prematuridade severa), 20% com 32–33 semanas (prematuridade moderada) e 60–70% com 34–36 semanas (*near term*) (GOLDENBERG et al., 2008). O nascimento pré-termo pode ocorrer tanto de forma espontânea, após parto prematuro com membranas intactas ou por ruptura prematura de membranas do pré-termo (PPROM), ou também, como consequência de parto iatrogênico por indicações maternas e/ou fetais (TAN; TO, 2015). Diversos

fatores e características materno-fetais estão associados ao nascimento pré-termo, incluindo infecções ou inflamação, isquemia ou hemorragia útero-placentária, superdistensão uterina, restrição de crescimento intrauterino, características materno-demográficas (baixo *status* educacional e socioeconômico, baixa e alta idade materna), curto intervalo entre gestações, parto prematuro prévio, gestação múltipla, estado nutricional, características psicológicas, estresse, depressão, asma, diabetes e hipertensão (GOLDENBERG et al., 2008; NUYT, 2008).

Apesar de todo o avanço recente na prevenção e manejo do nascimento prematuro (TAN; TO, 2015; VENTO; SAUGSTAD, 2010), globalmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou recentemente que a taxa de nascimentos pré-termo alcança 9,6% (BECK et al., 2010). No Brasil, segundo o Sinasc (Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos), a prevalência de nascimentos pré-termo oscilou entre 6 e 7%, de 2000 a 2010, enquanto as estimativas corrigidas mostraram valores entre 11 e 12% para o mesmo período. No triênio 2009-2011 a prevalência de nascimentos pré-termo no Brasil foi aproximadamente de 11,7% (MATIJASEVICH et al., 2013). Esses números se tornam alarmantes ao se observar o *ranking* dos países com maior número de nascimentos prematuros, no qual o Brasil se encontra em 10º lugar segundo a OMS (WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, [s.d.]).

Ademais, um aumento considerável nas taxas de sobrevivência de bebês prematuros, tem sido observado (NUYT et al., 2017). Até a metade dos anos 60, quando as unidades neonatais foram criadas, as taxas de sobrevivência para bebês nascidos prematuros eram muito baixas. Nos últimos 30 anos, observou-se um grande avanço no cuidado intensivo neonatal, considerando-se tanto equipamentos/infraestrutura e pesquisas quanto o cuidado pelo corpo clínico, o que colaborou para o aumento das taxas de sobrevivência de bebês prematuros para 96% e extremamente prematuros para 76% nos EUA em 2013 (RAJU et al., 2017). Esse aumento reflete, hoje, no número de adultos vivos que nasceram prematuros, permitindo, portanto, o estudo do impacto da prematuridade na vida adulta.

### **1.3 Impacto da prematuridade na vida adulta: o desenvolvimento programado das doenças**

O nascimento prematuro é um reflexo de condições adversas no ambiente intra-uterino que estão diretamente associadas ao aumento no estresse oxidativo e inflamação como infecções, pré-eclampsia, diabetes e obesidade materna (NUYT et al., 2017). Ademais, complicações pós-natais relacionadas à prematuridade como sepse, desnutrição, e seus tratamentos, como a suplementação de O<sub>2</sub>, nutrição parenteral e uso de esteroides contribuem para uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e inflamação, colaborando para o prejuízo no desenvolvimento e amadurecimento dos órgãos e sistemas no bebê (NUYT et al., 2017).

A adaptação à vida extra-uterina implica principalmente em modificações cardiovasculares e respiratórias que ocorrem de maneira gradual durante os primeiros minutos após o nascimento. Em condições fisiológicas, o feto é relativamente hipóxico em relação ao adulto, uma vez que a pressão parcial de O<sub>2</sub> arterial (PaO<sub>2</sub>) aumenta de 40 - 50 mmHg do período fetal para 70 - 80 mmHg no recém-nascido nos primeiros 5 a 10 minutos após a cessação da circulação pelo cordão umbilical (TORRES-CUEVAS et al., 2017). Essa exposição do neonato a relativamente altas concentrações de O<sub>2</sub> comparadas à vida intrauterina favorece o aumento do conteúdo sanguíneo e biodisponibilidade de O<sub>2</sub>, levando à uma “explosão” da geração de radicais livres de O<sub>2</sub> (YZYDORCZYK et al., 2013). Bebês prematuros e com baixo peso ao nascer apresentam seu sistema respiratório e antioxidante imaturos, sendo, portanto, mais vulneráveis ao dano oxidativo, uma vez que é apenas no último trimestre de uma gestação normal que há aumento nos níveis de enzimas antioxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; SUTHERLAND et al., 2014). Ainda, o plasma neonatal e cordão umbilical de neonatos prematuros apresentam baixos níveis de antioxidantes não-enzimáticos como a vitaminas A, C e E, ceruloplasmina ferroxidase e transferrina (LINDEMAN et al., 2000; NEGI et al., 2012). Adicionalmente, a combinação de um sistema antioxidante imaturo para enfrentar este aumento na PO<sub>2</sub> somado à necessidade de terapia com suplementação de O<sub>2</sub> e outros fatores pró-oxidantes, pode levar a um aumento

significativo no estresse oxidativo no período pós-natal imediato (COMPORTI et al., 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; KATO et al., 2014; YZYDORCZYK et al., 2013). Esse aumento significativo nas espécies reativas de oxigênio (ERO) plasmáticas leva ao desenvolvimento de condições agudas frequentemente observadas em bebês prematuros, como a retinopatia da prematuridade, broncodisplasia pulmonar, enterocolite necrosante e hemorragia intraventricular (ASKIE; HENDERSON-SMART, 2001; KATO et al., 2014). Em longo prazo, considerando o sistema cardiovascular, este aumento de ERO leva ao desenvolvimento de hipertensão precoce, doenças metabólicas e mudanças na estrutura e função cardíaca, favorecendo o desenvolvimento de DCV (ABITBOL; RODRIGUEZ, 2012; BERTAGNOLLI et al., 2016; NUYT et al., 2017). Esse fenômeno de adaptação e de respostas permanentes a longo prazo, decorrentes de um estímulo que ocorreu durante um período crítico do desenvolvimento, é denominado de “desenvolvimento programado” (LANGLEY-EVANS, 2006; LANGLEY-EVANS; MCMULLEN, 2010).

As consequências mais tardias do nascimento prematuro e de condições perinatais adversas estão começando a ser reveladas. Estudos recentes têm demonstrado que indivíduos nascidos pré-termo, e principalmente, com baixo peso ao nascer, têm maior propensão para o desenvolvimento de doença cerebrovascular, renal e cardiovascular, incluindo maior risco de IC e morte, (ABITBOL; RODRIGUEZ, 2012; ROGGERO et al., 2013; SUTHERLAND et al., 2014). O desenvolvimento programado dessas doenças se baseia em múltiplos mecanismos, dentre os quais estão incluídas mudanças morfológicas e funcionais dos sistemas cardiovascular (KOWALSKI et al., 2016; LEWANDOWSKI et al., 2013) e renal, alterações hormonais e metabólicas, mudanças epigenéticas, alteração do padrão celular de apoptose e proliferação, indução de estresse oxidativo e processos inflamatórios (TOMAT; SALAZAR, 2014).

## 1.4 Mecanismos do desenvolvimento programado das DCV

### 1.4.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo parece ser um dos componentes centrais dentre os diversos fatores implicados nas condições perinatais adversas e no desenvolvimento programado da hipertensão e disfunção cardiovascular (NUYT, 2008; PERRONE et al., 2016; TORRES-CUEVAS et al., 2017). Conceitualmente, o estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e de defesas antioxidantes em favor dos primeiros, podendo levar à lesão tecidual e modificações na sinalização redox e vias de controle específicas (JONES, 2006; KAUL et al., 1993). Dentre os agentes oxidantes, os radicais livres (RL) são os principais atuantes, sendo que RL é qualquer espécie química (átomo ou molécula) capaz de existir independentemente, que possua um ou mais elétrons desemparelhados, em qualquer orbital, normalmente no mais externo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). São, portanto, reativos e capazes de iniciar reações em cadeia por extrair um elétron de moléculas próximas e completar seus próprios orbitais (GRIEVE et al., 2004). Sua interação com moléculas biológicas como aminoácidos, carboidratos, lipídios e DNA pode levar a danos irreversíveis a essas estruturas (JONES, 2008).

O oxigênio molecular apresenta dois elétrons de spins paralelos no seu orbital mais externo, que o torna um RL pouco reativo. Dessa forma, o oxigênio pode receber um elétron e se tornar um forte agente oxidante. Por outro lado, para sua completa redução, deve receber quatro elétrons todos de uma vez, o que ocorre com 95% do oxigênio consumido, envolvendo, portanto, a redução tetravalente do oxigênio. O oxigênio restante (menos que 5%) é reduzido de forma monovalente gerando intermediários altamente reativos conhecidos como ERO (KAUL et al., 1993).

A redução monovalente do oxigênio molecular leva à formação do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Este radical possui uma meia vida relativamente curta e limitada capacidade de difusão. Em pH ácido, este ânion é protonado na forma de  $HO_2^{\bullet}$  que

é mais tóxico às membranas devido a sua grande lipofilicidade. A enzima superóxido dismutase (SOD) atua dismutando o  $O_2^{\cdot-}$  em um não radical, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Em mamíferos, existem 3 isoformas da SOD: a mitocondrial que contém Mn (Mn-SOD), a citosólica que contém Cu-Zn (Cu/Zn-SOD) e a extracelular que também contém Cu-Zn (EC-SOD) (POLJSAK, 2011).

O  $H_2O_2$  tem meia vida relativamente longa e pode atravessar as membranas celulares e percorrer distâncias consideráveis, causando danos em alvos distantes de sua origem (KAUL et al., 1993). É reduzido pela catalase (CAT) ou por peroxidases, como a glutathiona peroxidase (GPx) (GRIEVE et al., 2004; MURPHY et al., 2011). O que determina qual das enzimas estará mais ativa é a concentração de  $H_2O_2$  e a localização. A CAT está presente principalmente nos peroxissomas e age em concentrações nanomolar (nmol/L) de  $H_2O_2$ . Já a GPx atua em concentrações micromolar ( $\mu\text{mol/L}$ ) de  $H_2O_2$  (ASCENSÃO et al., 2003). A GPx utiliza a glutathiona reduzida (GSH) como um agente redutor para transformar o  $H_2O_2$  em água, sendo a GSH transformada em sua forma oxidada (GSSG). Na presença de metais de transição como  $Fe^+$  e  $Cu^{++}$ , o  $H_2O_2$  é reduzido à radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) e íon hidroxil ( $OH^-$ ). O  $OH^{\cdot}$  é altamente reativo, com tempo de meia vida muito curto e apresenta limitada capacidade de difusão. Dessa forma, modifica estruturas próximas ao seu sítio de geração, principalmente por abstração de hidrogênios de ligações insaturadas. A adição de um quarto elétron juntamente com um próton leva à formação de  $H_2O$  (KAUL et al., 1993). A sequência de reações de redução do oxigênio pode ser melhor visualizada na figura 1.

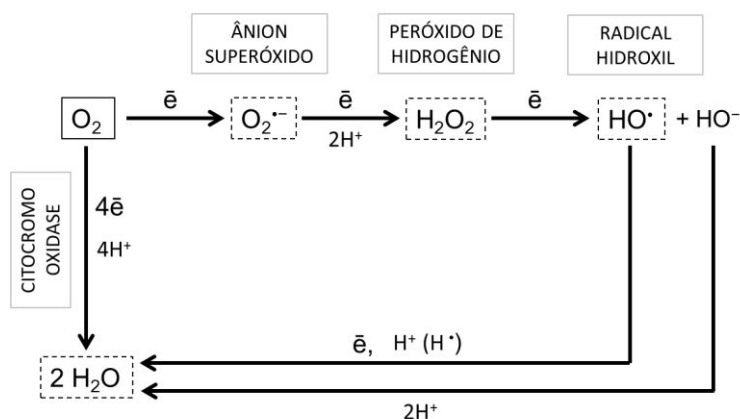


Figura 1: Redução mono e tetravalente do oxigênio molecular. Adaptado de (LUSHCHAK, 2016).

As principais fontes intracelulares geradoras de ERO são a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial *in vivo*, as NADPH oxidases (Nox), a xantina oxidase e a óxido nítrico sintase desacoplada (NOS-desacoplada) (AFANAS'EV, 2011; POLJSK, 2011). A produção de ERO pela mitocôndria se dá através do “vazamento” de elétrons pelos dois transportadores de elétrons da cadeia respiratória, os complexos I e III, o que contribui de maneira importante na superprodução de ERO, observada nas doenças cardíacas (AFANAS'EV, 2011). A família das NADPH oxidases (Nox) compreende diversas isoenzimas, sendo que além da NADPH oxidase fagocítica (Nox2), seis homólogas (Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 e Duox2) estão presentes em células não fagocíticas. As enzimas Nox2 e Nox4 exercem um papel importante na doença cardíaca. Estudos mostram uma forte associação entre a Nox2, também conhecida como gp91phox, com o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e IC. O aumento da atividade da Nox2 subunidade p47phox pós infarto do miocárdio também foi relatado (AFANAS'EV, 2011). A enzima xantina oxidase, principalmente ativada em situações de isquemia-reperfusão, é também uma importante fonte de ERO. A forma nativa dessa enzima é a xantina desidrogenase, que participa do metabolismo das purinas. Durante situações de isquemia, existe uma conversão da xantina desidrogenase em xantina oxidase, através da modificação de um grupo sulfidril ou por clivagem proteolítica. A xantina oxidase atua catalisando a reação da hipoxantina em ácido úrico, mas em acoplamento com a redução parcial do oxigênio molecular, o que leva à geração de ânion superóxido (MCCORD, 1988; RAEDSCHELDERS; ANSLEY; CHEN, 2012). Finalmente, as óxido nítrico sintases (NOS) catalisam a conversão da L-arginina à L-citrulina e óxido nítrico (NO). Em situações de desacoplamento, essas enzimas também produzem ânion superóxido. As isoformas neuronal (nNOS ou NOS1) e endotelial (eNOS ou NOS3) são constitutivamente expressas em cardiomiócitos, enquanto que a isoforma induzível (iNOS ou NOS2) é ausente no coração hígido, sendo sua expressão estimulada por agentes pró-oxidantes. As NOS são capazes de produzir tanto ERO, como espécies reativas de nitrogênio, e dessa forma podem



tanto potencializar (através da formação de peroxinitrito), como também atenuar (através do NO) o dano cardíaco (AFANAS'EV, 2011).

Em baixas concentrações, as ERO são moléculas de sinalização, porém sua produção excessiva ou anormal leva ao estresse oxidativo (LEE; GIORDANO; ZHANG, 2012). A interação das ERO com elementos biológicos como aminoácidos, carboidratos, DNA e lipídios de membrana, leva, na maioria dos casos, a lesões irreversíveis nestas biomoléculas. Os danos mais graves são os causados aos ácidos nucleicos, podendo levar a alterações na ordem de suas bases. Alterações em aminoácidos específicos de enzimas podem levar à perda ou alteração de função (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). As ERO são também capazes de romper ligações entre átomos de carbono e hidrogênio presentes em ácidos graxos poliinsaturados, componentes da membrana celular. A reação das ERO com essas moléculas leva ao desemparelhamento dos elétrons das mesmas, gerando o radical peróxil. Uma reação em cadeia pode ocorrer a partir desse ponto, uma vez que esse radical, bastante reativo, pode oxidar os lipídeos insaturados adjacentes, levando ao dano lipídico, também conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (FAM; MORROW, 2003). As consequências desse processo são a diminuição da fluidez da membrana plasmática, aumento da sua permeabilidade, danos a proteínas, receptores e canais iônicos de membrana, perda da integridade da membrana plasmática bem como de organelas, como lisossomos e mitocôndrias (FAM; MORROW, 2003; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984).

Os antioxidantes endógenos enzimáticos, como a SOD, CAT e GPx, e não enzimáticos como a vitamina E, glutathiona, entre outros, atuam por meio de diversos mecanismos na tentativa de minimizar ou inibir os efeitos deletérios causados pelas ERO, seja impedindo sua produção, removendo essas moléculas do meio ou atuando como antioxidantes de reparo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

#### **1.4.1.1 Estresse oxidativo e desenvolvimento programado das DCV**

Evidências clínicas e experimentais apontam o papel do estresse oxidativo como um dos agentes centrais do desenvolvimento programado das doenças. Em humanos, marcadores de estresse oxidativo como isoprostanos urinários e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em nível sistêmico (eritrócitos) se mostraram elevados em crianças com baixo peso ao nascer, demonstrando forte associação positiva entre os níveis de TBARS e a pressão arterial (PA) sistólica (FRANCO et al., 2007). Estudos experimentais, mimetizando inúmeras condições adversas no período ante/pós-natal reforçam a forte associação entre aumento da produção de ERO e diminuição de antioxidantes com o aparecimento de alterações como o aumento de conteúdo de colágeno vascular e disfunção endotelial, prejuízo na neovascularização, necrose e apoptose endotelial aumentadas e alterações epigenéticas, que impactam na vida adulta e contribuem para um maior risco de desenvolvimento de DCV (ÁVILA et al., 2015; BLACKMORE; OZANNE, 2015; MATHIEU et al., 2017; MENDES GARRIDO ABREGÚ et al., 2018; NUYT, 2008). Estudos de intervenção utilizando antioxidantes exógenos confirmam o papel mecanístico do estresse oxidativo na programação das DCV, uma vez que se observa a prevenção do desenvolvimento ou a atenuação das condições adversas na saúde cardiovascular da prole em diferentes modelos experimentais (CAMBONIE et al., 2006; KANE et al., 2013; LIANG; OEST; PRATER, 2009; XIAO et al., 2015).

O papel do estresse oxidativo também é evidenciado em outros modelos de insultos fetais em decorrência da ativação de sistemas envolvidos na programação das DCV, como o sistema renina angiotensina (SRA) (NUYT, 2008), principalmente por ativação da NADPH oxidase, e o sistema nervoso autônomo (SNA), uma vez que o tratamento com antioxidantes previne o prejuízo neste sistema na idade adulta em modelo de hipóxia fetal (KANE et al., 2013).

### 1.4.2 Sistema renina angiotensina

O SRA exerce um papel importante no controle fisiológico do sistema cardiovascular e equilíbrio hidroeletrolítico (AIRES, 2008). A angiotensina II (Ang II), principal efetor do SRA, é gerada através de um processo proteolítico de dois passos. No primeiro passo, a renina, uma enzima glicoprotéica secretada pelas células justaglomerulares das artérias renais aferentes, medeia a proteólise do precursor angiotensinogênio circulante, proveniente do fígado, gerando o decapeptídeo angiotensina I (Ang I). No segundo passo, a Ang I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) em Ang II (FARAG et al., 2015). A atividade da enzima de conversão de angiotensina, embora predominantemente encontrada no endotélio dos vasos pulmonares, ocorre também no endotélio de outros leitos vasculares e em outros tecidos, incluindo o coração e as artérias coronárias (RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000). A Ang II exerce suas ações fisiológicas através da ligação a receptores de membrana acoplados a proteínas G. Existem dois tipos de receptores para Ang II, o AT1 e o AT2, ambos com ampla distribuição tecido-específica (BILLET et al., 2008; LAVOIE; SIGMUND, 2003). A ação da Ang II sobre o receptor AT1 produz vasoconstrição arteriolar, aumentando a resistência vascular sistêmica e a pressão sanguínea arterial (FARAG et al., 2015). Também gera vasoconstrição de forma indireta, aumentando o tônus simpático e a liberação de arginina vasopressina e promove retenção renal de sódio e água, expandindo o volume plasmático. Este último efeito é gerado através de sua ação direta sobre os túbulos renais, como também, indiretamente pela estimulação da liberação de aldosterona pelo córtex da adrenal. Ainda, a Ang II é capaz de estimular a sede, atuando sobre o sistema nervoso central, contribuindo para o aumento do volume plasmático (LAVOIE; SIGMUND, 2003).

Além dessas ações clássicas, a ação da Ang II sobre o AT1 promove efeitos fibróticos, mitogênicos e proliferativos em cardiomiócitos e outros tecidos (VARAGIC; FROHLICH, 2002). Também estimula a produção de ERO que por sua vez estimulam a resposta inflamatória através do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B), promovendo a transcrição de citocinas. A Ang II também pode induzir a

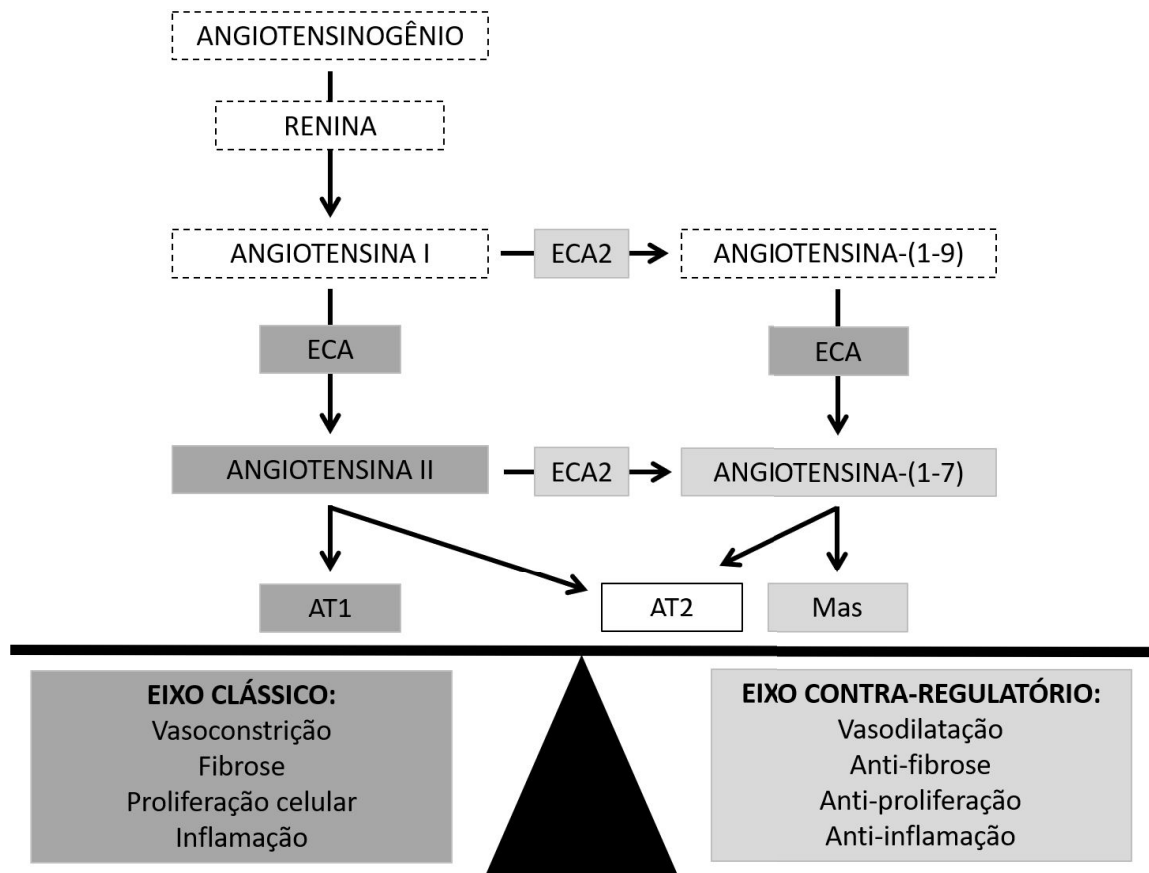
apoptose através da inibição da proteína antiapoptótica Bcl-2 mediada por ERO (FARAG et al., 2015).

Estudos prévios têm apontado para a existência de componentes do SRA em diferentes tecidos periféricos, evidenciando a presença de SRA locais (LAVOIE; SIGMUND, 2003). Evidências indicam que os principais efeitos do SRA local cardíaco são a hipertrofia e a hiperplasia de células cardíacas através da ação da Ang II sobre o receptor AT1 (VARAGIC; FROHLICH, 2002).

A Ang II pode também se ligar ao receptor AT2, porém, com menos afinidade. O receptor AT2 é principalmente estimulado pela angiotensina (1–7), que pode ser gerada tanto a partir da Ang I quanto da Ang II, através de conversão enzimática. A Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ECA 2) exerce papel central na produção de Ang (1–7), apresentando maior afinidade pela Ang II. Dessa forma, a ECA 2 previne o acúmulo de Ang II favorecendo a formação de Ang-(1-7), contra-regulando as ações deletérias da Ang II. Esta enzima também atua formando a Ang (1–9), a qual é clivada para gerar Ang (1–7) (DONOGHUE et al., 2000; FARAG et al., 2015). A ligação de uma dessas substâncias ao receptor AT2 produz efeitos que equilibram os efeitos da estimulação do AT1. A ativação do AT2 tanto pela Ang II quanto pela Ang 1-7 resulta em vasodilatação, liberação de óxido nítrico (NO) e inibição de proliferação e crescimento (FARAG et al., 2015; PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015).

Ainda, o receptor Mas é um proto-oncogene identificado como o receptor específico para Ang (1–7), primeiramente descrito por Santos (SANTOS et al., 2003). A interação da Ang (1–7) com o receptor Mas promove efeitos antiproliferativos, antiarrítmicos, vasodilatadores e estimula a natriurese, contra-regulando assim, de forma intrínseca, as ações tróficas e pressóricas da Ang II (FARAG et al., 2015; PASSOS-SILVA; BRANDAN; SANTOS, 2015). O receptor Mas pode também oligomerizar com o AT1, inibindo assim as ações da Ang II.

Os passos destas reações e suas ações podem ser observados na figura 2.



**Figura 2: Sistema renina angiotensina: peptídeos, receptores, eixos e ações.** Adaptado de Farag et al., 2015.

Desta forma, é possível a separação didática dos componentes em dois eixos: o primeiro eixo, clássico, é representado predominantemente pela tríade ECA/Ang II/AT1 e promove respostas de vasoconstrição, proliferação, inflamação, estresse oxidativo, trombogênese e fibrose. O segundo eixo, contra-regulatório, é representado pela ECA2/Ang-(1-7)/Mas que em geral promove vasodilatação, inibição da proliferação e da trombogênese, atenuação do efeito vasoconstritor da Ang II e inibição da ECA (FERRARLO, 2011).

A homeostasia do sistema cardiovascular depende, dentre diversos fatores, do equilíbrio entre ambos os eixos do SRA, mediados pela Ang II via receptor AT1 e pela Ang (1-7) e seus receptores AT2 e Mas (FARAG et al., 2015; ZUCKER; XIAO; HAACK, 2014). A ativação permanente e excessiva do receptor AT1 pode ocasionar alterações na PA, no volume sanguíneo e nas estruturas cardíaca e vascular, desempenhando papel fundamental na fisiopatologia das DCV (WRIGHT; MIZUTANI;

HARDING, 2008). Quando há hiperativação desse sistema, ocorre, inicialmente, uma regulação para baixo de receptores adrenérgicos resultante da presença de aminas circulantes em excesso, o que inibe a resposta contrátil adequada ao estímulo adrenérgico. Em seguida, ocorre o aumento da restrição sal/água e intensa vasoconstrição periférica, levando ao aumento desproporcional da pré e pós-carga. Esses eventos levam a uma diminuição do desempenho cardíaco com progressão para a disfunção miocárdica, ou cardiomiopatia. Ocorrem ainda, alterações na ultra-estrutura miocárdica induzidas por aminas adrenérgicas, Ang II e aldosterona, tanto ao nível celular quanto extracelular, que podem contribuir para o prejuízo de função (DISTEFANO; SCIACCA, 2012). Observa-se, portanto, uma resposta inicial adaptativa à função cardíaca diminuída; porém, a estimulação prolongada do SRA se torna mal adaptativa levando à vasoconstrição excessiva, fibrose e remodelamento cardíaco (AINSCOUGH et al., 2009; GUO et al., 2005; WRIGHT; MIZUTANI; HARDING, 2008).

O prejuízo no SRA tem sido reportado constantemente nas DCV, justificando o uso de medicamentos relacionados ao SRA como primeira linha de tratamento para tais doenças (BERTAGNOLLI, 2017). Estratégias farmacológicas de bloqueio dos componentes do SRA têm sido empregadas principalmente para o tratamento de DCV, destacando a hipertensão como principal alvo terapêutico. As duas maiores classes de bloqueadores do SRA, disponíveis no mercado, são os inibidores da ECA (iECA) e os bloqueadores seletivos do receptor AT1 (BRA), ambas relacionadas à inibição da ação da Ang II, porém através de mecanismos de ação diferentes. Uma terceira classe, disponível clinicamente desde 2007, o inibidor direto da renina, tem se mostrado eficaz no tratamento contra hipertensão, IC congestiva e proteinúria, tanto isolado ou combinado às terapias clássicas (RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000; ROBLES; CEREZO; HERNANDEZ-GALLEGO, 2014).

Os iECA bloqueiam a conversão de Ang I em Ang II, levando a menor ativação de ambos os receptores AT1 e AT2. Somado a esse efeito clássico, os iECA bloqueiam a degradação enzimática da bradicinina, contribuindo para os efeitos vasodilatadores e tecido-protetores através da liberação de NO. Apesar de alguns efeitos adversos bem conhecidos dos iECA como a tosse e reações

alérgicas, esta classe mostra alta eficácia para redução de eventos cardiovasculares e mortalidade em pacientes com DCV inicial ou avançada (RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000; ROBLES; CERESO; HERNANDEZ-GALLEGO, 2014).

Os BRA bloqueiam o SRA atuando como antagonistas seletivos do receptor AT1, impedindo a ligação da Ang II. Ainda, sua baixíssima afinidade com o receptor AT2, permite a ativação do mesmo pela Ang II, teoricamente possibilitando a geração de efeitos anti-proliferativos e anti-inflamatórios (ROBLES; CERESO; HERNANDEZ-GALLEGO, 2014). Fazem parte dessa classe o losartan (Los), o valsartan, o irbesartan, o candesartan e o telmisartan. O efeito anti-hipertensivo dos BRA é comparável a outros medicamentos como os iECA, os antagonistas do cálcio e os betabloqueadores. O irbesartan (300 mg/dia) e o candesartan (16 mg/dia) parecem ter efeito anti-hipertensivo mais acentuado que o Los (100 mg/dia e 50 mg/dia, respectivamente) em pacientes com hipertensão arterial primária. Essa maior eficácia anti-hipertensiva parece estar relacionada à ação mais prolongada desses compostos (RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000; ROBLES; CERESO; HERNANDEZ-GALLEGO, 2014). Diversos estudos demonstram o potente efeito anti-hipertensivo do Los, antagonista específico do receptor AT1, em diferentes modelos animais e estudos clínicos, com decréscimo de até 45% na PA em humanos após 13 horas da administração da medicação. Seu efeito anti-hipertensivo persiste até 24 horas após uma dose única de 40 mg. Além do efeito anti-hipertensivo do Los, efeitos como atenuação da hipertrofia cardíaca, principalmente por redução da Ang II local, e redução da área de infarto, entre outros efeitos benéficos sobre os rins e sistema nervoso central são observados em animais e humanos (KANG et al. 1994; MA et al., 2010).

#### **1.4.2.1 Sistema renina angiotensina e desenvolvimento programado das DCV**

Evidências clínicas e experimentais têm demonstrado o papel do SRA no desenvolvimento programado das DCV, especialmente associando o SRA com o impacto de condições adversas na nefrogênese durante o período perinatal

(LANGLEY-EVANS et al., 1999; PLADYS et al., 2004; VINTURACHE; SMITH, 2014; YAN et al., 2014).

Estudos em modelos animais como exposição maternal a glicocorticoides, restrição calórica ou proteica gestacional e insuficiência uteroplacentária têm evidenciado alterações no desenvolvimento renal como um ponto em comum, isto é, um insulto ocorrido no período perinatal resulta em mudanças permanentes na estrutura e função renal, impactando também no SRA local (RASCH; SKRIVER; WOODS, 2004; WATANABE et al., 2018). Estudos experimentais com dieta materna pobre em proteínas ou rica em sal e com uso de BRA mostram o SRA diminuído no tecido renal durante a nefrogênese e confirmam essa hipótese. O impacto no SRA local e o baixo número de néfrons formados pode contribuir para o desenvolvimento de hipertensão primária mais tardiamente (MORITZ et al., 2010; RASCH; SKRIVER; WOODS, 2004).

O SRA local de outros tecidos corporais também pode ser afetado por insultos perinatais, podendo impactar na função cardiovascular adulta. Em uma coorte de adolescentes nascidos prematuros, a exposição antenatal a corticosteroides foi associada com alterações nos componentes do SRA, especificamente pelo aumento urinário de Ang II/Ang-(1-7), aumento plasmático de Ang-(1-7) e diminuição da razão Ang II/Ang-(1-7) plasmática (SOUTH et al., 2017). Estudos experimentais como o de Marshall e cols. (2013) observaram aumento da PA e diminuição da sensibilidade barorreflexa associados a alterações no SRA circulante, renal e cerebral na prole jovem de ovelhas expostas à betametasona antenatal (MARSHALL et al., 2013). Resultados similares foram observados no tecido vascular em modelo murino de dieta gestacional rica em sacarose (WU et al., 2016) e, no tecido cardíaco da prole adulta em modelo murino de hipertireoidismo materno (LINO et al., 2015). Reforçando ainda mais o papel do SRA no desenvolvimento programado da hipertensão, o uso de bloqueadores do SRA na prole jovem (2 a 4 semanas de idade) de mães com dieta pobre em proteínas preveniu o desenvolvimento de hipertensão, efeito este não observado, porém, quando a prole adulta é tratada. Essas evidências sugerem a presença de níveis aumentados de Ang II e/ou de AT1 nas primeiras semanas de vida neste modelo experimental (NUYT, 2008), como



observado por Bertagnolli e cols. (2016) em ratos neonatos (5 e 10 dias de vida) expostos à hiperóxia do dia 3 ao dia 10 de vida (BERTAGNOLLI et al., 2016). Outro estudo do mesmo grupo, com este modelo experimental demonstrou que estes ratos desenvolvem na idade adulta mudanças na estrutura cardíaca, evidenciado por hipertrofia e fibrose, além de disfunção cardíaca, associadas ao desequilíbrio na expressão dos receptores AT1 e AT2 cardíacos (BERTAGNOLLI et al., 2014). Finalmente, o bloqueio de AT1 no período neonatal, neste modelo animal, foi capaz de prevenir o desequilíbrio dos receptores de Ang II, além de diminuir fibrose e hipertrofia cardíaca em animais jovens com 4 semanas de idade (BERTAGNOLLI et al., 2016). Entretanto, se estes efeitos cardioprotetores do bloqueio de AT1 permanecem até idades mais avançadas não está completamente elucidado.

#### **1.4.3 Sistema nervoso autônomo**

O SNA ou sistema neurovegetativo, dividido em sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP), compõe uma importante interface entre o sistema nervoso central e a musculatura lisa, cardíaca, glândulas e tecido adiposo, e dessa forma controla a maior parte das funções viscerais. O controle neural da função cardiovascular é determinado pela interação de mecanismos de ambos os componentes simpático e parassimpático que, em situações fisiológicas, usualmente levam à ativação de um componente e inibição do outro (AIRES, 2008).

O controle parassimpático do coração ocorre através dos componentes vagais. Os corpos dos neurônios pré-ganglionares vagais estão localizados no bulbo, no núcleo dorsal motor do vago (DMV) e no núcleo ambíguo (NA). As fibras colinérgicas originadas nesses locais se direcionam ao coração fazendo sinapses intramurais com as fibras pós-ganglionares também colinérgicas, que por sua vez, inervam essencialmente o nodo sinoatrial, o nodo atrioventricular e os átrios. Os efeitos, portanto, decorrentes da estimulação parassimpática sobre o coração através da ação da acetilcolina sobre receptores muscarínicos são a redução da

frequência cardíaca (FC), retardo da condução atrioventricular com consequente diminuição do débito cardíaco, e posteriormente da PA (AIRES, 2008).

Por outro lado, a inervação simpática ao sistema cardiovascular é extensa e atinge, além das câmaras cardíacas, os vasos sanguíneos sistêmicos. Um grupamento neuronal específico situado no bulbo ventro-lateral rostral (BVLr) se projeta diretamente aos neurônios pré-ganglionares simpáticos e é considerado a mais importante fonte de estimulação simpática ao sistema cardiovascular. Cabe destacar que um grupamento neuronal importante, no bulbo ventro-lateral caudal (BVLc), exerce ação depressora sobre o BVLr, reduzindo acentuadamente a PA. Os corpos celulares dos neurônios pré-ganglionares colinérgicos simpáticos estão localizados na coluna intermédio-lateral e na substância branca do funículo lateral adjacente, nas porções torácica e lombar da medula espinhal. As fibras pré-ganglionares simpáticas se projetam nos gânglios simpáticos, onde encontram corpos celulares dos neurônios pós-ganglionares noradrenérgicos e medula da adrenal. As fibras simpáticas pós-ganglionares se distribuem amplamente por todo o coração (nodos, átrios ventrículos, coronárias) e artérias, arteríolas, vênulas e veias. A noradrenalina (NE) liberada por essas fibras se liga aos receptores adrenérgicos, determinando seus efeitos cronotrópicos, dromotrópicos, inotrópicos e lusitropicos positivos. Essas alterações associadas à intensa vasoconstrição periférica promovida pela estimulação simpática levam ao aumento da PA (AIRES, 2008; WANG; SETO; GOLLEDGE, 2014).

Aferências periféricas com informações sobre a circulação e atividade cardíaca se projetam para o Núcleo do Trato Solitário (NTS), uma estrutura alongada, localizada central e dorsalmente no bulbo, que desempenha papel essencial na fisiologia do controle cardiovascular por ser a primeira estação sináptica das aferências periféricas (barorreceptores) e por distribuir essas informações aos núcleos bulbares de integração primária, o DMV, o NA e o BVLc e áreas suprabulbares. O DMV e NA, por sua vez, geram o tônus vagal e o BVLc modula o tônus simpático de acordo com a situação corporal no momento, informado pelo NTS (AIRES, 2008). Na hipertensão arterial, o NTS desempenha papel fundamental na função barorreflexa prejudicada e na simpato-excitação. Receptores de Ang II como AT1 são altamente ex-

pressos no NTS e contribuem significativamente para a hipertensão, uma vez que sua ativação pela Ang II nesse local leva à diminuição da sensibilidade barorreflexa. Receptores AT2 também são significativamente expressos no NTS e o aumento de sua atividade/expressão contribui para o reestabelecimento da função barorreflexa e decréscimo da PA em modelos animais de hipertensão neurogênica (SPERETTA et al., 2018).

Os grandes efetores da sinalização adrenérgica cardíaca são os receptores adrenérgicos, que são divididos em duas categorias principais:  $\alpha$  e  $\beta$ . Estes, por sua vez, ainda se subdividem, em  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos (tabela 1) compõem, em geral, 90% dos receptores adrenérgicos cardíacos, sendo os 10% restantes do subtipo  $\alpha_1$  (BAKER, 2014). Estes últimos são encontrados nos cardiomiócitos e nos vasos coronarianos; os  $\alpha_2$  nos microvasos coronarianos e nos terminais pré-sinápticos simpáticos (BAKER, 2014; WALLUKAT, 2002).

**Tabela 1. Tipos de receptores  $\beta$ -adrenérgico, sua localização corporal e porcentagem no tecido cardíaco**

TIPO	TECIDOS ONDE É ENCONTRADO	PORCENTAGEM NO CORAÇÃO
$\beta_1$	Principalmente no coração	75–80% dos receptores $\beta$ -adrenérgicos cardíacos
$\beta_2$	Pulmões, rins, vasos sanguíneos e coração	20–25% dos receptores $\beta$ -adrenérgicos cardíacos
$\beta_3$	Tecido adiposo e pouco no coração	

**Fonte:** (BAKER, 2014; HAMDANI; A. LINKE, 2012; WALLUKAT, 2002).

A proporção de receptores  $\beta$ -adrenérgicos no coração gera uma razão  $\beta_1:\beta_2$  de 80:20 no miocárdio saudável. Existe ainda um quarto subtipo de receptor ( $\beta_4$ ) que é considerado um receptor  $\beta_1$  com baixa afinidade, mas necessita ainda

caracterização genética e farmacológica. Os receptores  $\beta$ -adrenérgicos são acoplados a proteínas G, que possuem subunidades tanto estimulatórias (Gs) quanto inibitórias (Gi). A proteína G, quando estimulada, ativa a enzima adenilato ciclase que catalisa a conversão de ATP à AMPc e, esse último, por sua vez, ativa a proteína quinase A (PKA). A PKA promove, então, a fosforilação de diversas proteínas: proteínas relacionadas ao manuseio do cálcio e miofilamentos contráteis, a saber: canais de cálcio do tipo lentos (ICa<sup>++L</sup>) e rianodina (RyR), aumentando seu tempo de abertura e, assim, a quantidade de cálcio que entra na fibra muscular, aumentando a contratilidade; fosfolambam que atua sobre a bomba SERCA aumentando a recaptção de cálcio para o retículo sarcoplasmático e sobre a troponina I, diminuindo a afinidade da troponina C pelo cálcio, ambos acelerando e favorecendo o relaxamento; sobre a cadeia pesada da miosina, melhorando a interação cinética das pontes cruzadas; sobre a titina, diminuindo a rigidez do sarcômero, favorecendo o enchimento ventricular (BAKER, 2014; HAMDANI; A. LINKE, 2012; WALLUKAT, 2002).

Quando o coração sofre um dano, ocorre um prejuízo na sua função de bomba levando a uma diminuição do débito cardíaco e, assim, um prejuízo na perfusão tecidual periférica. Como um mecanismo compensatório, sistemas neuroendócrinos como o sistema SRA e o SNS são ativados. A ativação aguda do SNS, rápida e eficaz, leva à melhora do desempenho cardíaco através do aumento de força contrátil, da FC e do relaxamento ventricular. Apesar de agudamente ser benéfica, a ativação crônica do SNS é tóxica ao coração, levando a aumento de apoptose e hipertrofia, favorecendo a progressão para IC (BAKER, 2014; HAMDANI; A. LINKE, 2012; WALLUKAT, 2002). A função autonômica cardíaca anormal está associada a um pior prognóstico e tem sido considerada como um fator de risco para doença cardiovascular (HARALDSDOTTIR et al., 2018).

Em geral, na IC se observa uma diminuição na expressão dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos como uma resposta adaptativa na tentativa de diminuir ou atenuar os efeitos tóxicos promovidos pela estimulação adrenérgica crônica. Diversas evidências mostram o papel tóxico do receptor  $\beta$ 1 na IC, incluindo ensaios experimentais com modelos *knockout* e de superexpressão, como também ensaios com linhagem

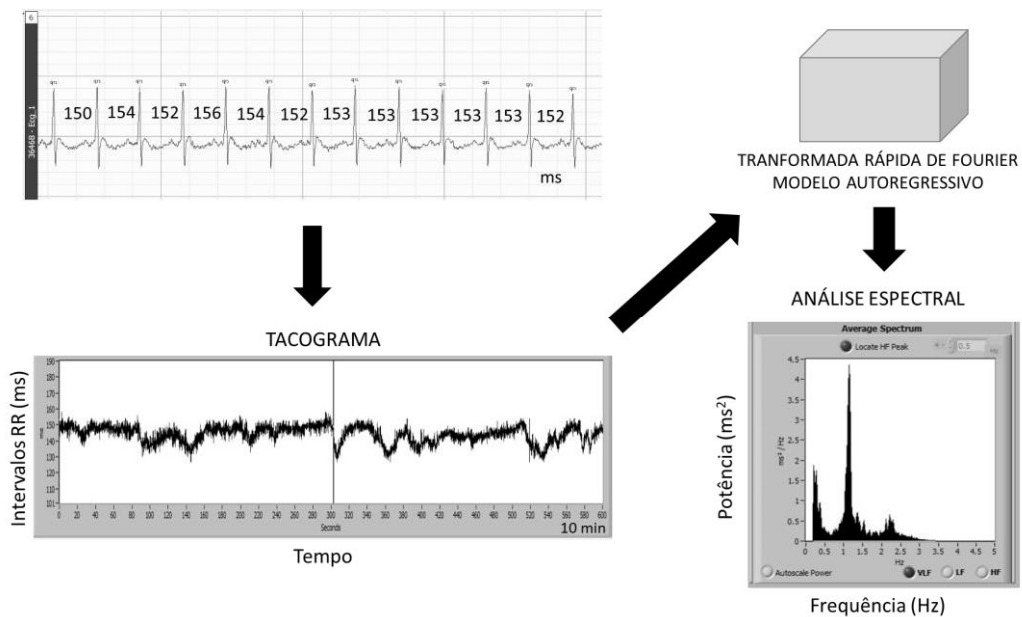
celular, evidenciando vias de sinalização mal-adaptativas e protetoras. Outros estudos evidenciando o papel das vias de sinalização ativadas por  $\beta_1$ , apontam que os efeitos tóxicos, como sinais pró-apoptóticos, são exercidos pela ativação da PKA e CamKII e que outra via protetora Epac (exchange protein directly activated by cAMP) + ERK (extracellular signal-related kinases) promove sinalização de sobrevivência, podendo contribuir para os efeitos benéficos observados em modelos animais (BAKER, 2014; HAMDANI; A. LINKE, 2012; WALLUKAT, 2002).

Cabe destacar que o balanço adrenérgico do coração insuficiente é difícil de determinar, pois geralmente ambos componentes, hiper e hipoadrenérgicos, coexistem simultaneamente. Em estudos clínicos e experimentais é possível observar que dados como aumento da atividade simpática, aumento do *spillover* de NE no plasma e aumento de NE plasmática são acompanhados por uma diminuição de NE cardíaca e nos terminais simpáticos, diminuição na densidade de terminais nervosos simpáticos cardíacos, diminuição na recaptação de NE e *downregulation* dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos (BAKER, 2014).

Para o estudo da modulação autonômica cardiovascular, diversos parâmetros podem ser avaliados. A análise da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), no domínio do tempo, leva em consideração os intervalos de tempo entre sucessivos ciclos cardíacos normais (intervalo RR) de um registro eletrocardiográfico, e juntamente com a análise da variabilidade da pressão arterial sistólica (VPA), expressa quantitativamente o resultado da ação do SNA sobre o sistema cardiovascular. Para essa análise, os índices obtidos utilizam o tempo em ms (milissegundos) como variável e são aplicados procedimentos estatísticos ou geométricos sobre os sucessivos intervalos RR normais, evidenciando a VFC (DE SÁ et al., 2013; MALLIANI et al., 1991; PERINI; VEICSTEINAS, 2003). Alterações na FC são normais e esperadas e indicam a habilidade do coração em responder aos múltiplos estímulos fisiológicos e ambientais como respiração, exercício físico, estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas, sono e ortostatismo, bem como compensar desordens induzidas por doenças. Uma alta VFC é sinal de boa adaptação e mecanismos autonômicos eficientes, enquanto que, uma baixa VFC é, frequentemente, um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA

(VANDERLEI et al., 2009) . Ainda, a diminuição na VFC constitui um importante fator prognóstico para o surgimento de eventos cardíacos em indivíduos aparentemente saudáveis, cardiopatas, hipertensos, diabéticos e obesos, com evidências de que essa redução possa estar relacionada ao aumento da modulação simpática e/ou diminuição do tônus vagal (DE SÁ et al., 2013).

A análise espectral, ou análise no domínio da frequência, consiste em decompor a VFC em seus componentes oscilatórios fundamentais, definindo-os pela sua frequência e amplitude. Uma vez que a FC apresenta flutuações, dando origem a uma representação gráfica dos intervalos RR normais, em relação ao tempo (tacograma), este fenômeno ondulatório complexo pode ser decomposto em ondas mais simples, por meio de algoritmos matemáticos, como a Transformada Rápida de Fourier (FFT) ou pelo modelo autorregressivo (DE SÁ et al., 2013; MALLIANI et al., 1991). Através da FFT, é possível se obter uma estimativa de potência espectral da VFC. Já com o modelo autoregressivo, a potência contida nos picos pode ser calculada sem a necessidade de bandas espectrais pré-definidas (VANDERLEI et al., 2009). As oscilações rítmicas da PA e FC apresentam três faixas de frequência distintas: HF (*High Frequency*- alta frequência), que indica a atuação do nervo vago sobre o coração; LF (*Low Frequency* – baixa frequência), decorrente da ação conjunta da modulação vagal e simpática, com predomínio do simpático e VLF (*Very Low Frequency* – muito baixa frequência), cuja explicação fisiológica não está bem esclarecida (CERUTTI et al., 1991). A razão LF/HF reflete as alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração. A medida dos componentes espectrais normalmente é representada em valores absolutos de potência ( $\text{ms}^2$ ). Entretanto, os valores de HF e LF podem ser expressos também em unidades normalizadas (nu), sendo o valor de cada um desses componentes divididos pela potência total menos o componente de VLF ( $\text{HF (nu)} = \text{HF}/(\text{TP} - \text{VLF}) \times 100$  e  $\text{LF (nu)} = \text{LF}/(\text{TP} - \text{VLF}) \times 100$ ) minimizando os efeitos das alterações na faixa de VLF sobre as outras frequências mais rápidas (LF e HF) (DE SÁ et al., 2013; MALLIANI et al., 1991; MONTANO et al., 2009).



**Figura 3: Análise da variabilidade da frequência cardíaca no domínio da frequência.** O sinal é representado graficamente em um “tacograma” e em seguida é decomposto em seus diferentes componentes de frequência através de algoritmos matemáticos. Imagens obtidas a partir dos softwares AcqKnowledge 4.4 (BIOPAC Systems, Inc., EUA) e CardioSeries 2.4 (São Paulo, Brasil).

#### 1.4.3.1 Sistema nervoso autônomo e desenvolvimento programado das DCV

O SNS também parece exercer um papel no desenvolvimento programado da hipertensão e DCV (TOMAT; SALAZAR, 2014). Diversas evidências apontam para mudanças na função autonômica, verificadas através da análise VFC, de crianças e adultos nascidos pré-termo. Em recém-nascidos prematuros, um estudo observou uma superativação do SNS, enquanto o tônus vagal está diminuído (SMITH; DOIG; DUDLEY, 2005). Outro estudo, com recém-nascidos com prematuridade severa, demonstrou uma diminuição significativa na VFC, VLF, LFabs e HFabs no grupo pré-termo, quando comparado ao grupo controle, enquanto LFnu, HFnu e a razão LF/HF não apresentaram diferenças significativas. Nenhuma mudança foi observada quando os bebês atingiram a idade a termo (PATURAL et al., 2008). Em crianças de 9-10 anos com baixo peso ao nascer (<2,5 kg), independentemente da idade gestacional,

se observa uma diminuição da VFC (RAKOW et al., 2013). O mesmo foi observado por Zamecznik e cols. (2017) em crianças de 5 a 10 anos, pequenas para idade gestacional. Uma análise mais completa feita por Haraldsdottir e cols. (2018) mostraram que adolescentes nascidos prematuros apresentam menor VFC e maior LF que adolescentes nascidos a termo (HARALDSDOTTIR et al., 2018). Em adultos nascidos prematuros, com menos de 34 semanas, observa-se um aumento da PA sistólica acompanhada de um aumento na VPA (SIPOLA-LEPPÄNEN et al., 2015).

Diferentes modelos animais de condições perinatais adversas também evidenciam função autonômica prejudicada. Um estudo desenvolvido com modelo murino de obesidade maternal investigou a função autonômica da prole jovem e adulta, em ambos os sexos. Os autores concluíram que a prole de mães obesas, apresentou hiperresponsividade simpato-excitatória persistente, associada ao aumento da PA basal diurna e noturna, à resposta pressórica ao estresse de contenção e à leptina, ao conteúdo renal de NE, além de aumento na razão LF/HF nos animais jovens. Os animais adultos mostraram manutenção da PA elevada, que foi abolida pelo bloqueio  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgico, além da diminuição da sensibilidade dos barorreceptores (SAMUELSSON et al., 2010). Um estudo experimental do mesmo grupo com ratos neonatos tratados com leptina analisou a função cardiovascular e autonômica aos 30 dias, 2 meses e 12 meses de idade. Aos 30 dias, tanto ratos machos quanto fêmeas tratados com leptina apresentaram maior PA sistólica noturna e aumento na razão LF/HF, indicando um aumento no tônus simpático. Estas alterações permaneceram até a idade adulta, influenciando permanentemente a PA, função e estrutura cardíaca (SAMUELSSON et al., 2013).

Diversos mecanismos têm sido associados ao aumento da atividade simpática em resposta a insultos perinatais. Entre eles, disfunção renal, aumento de adiposidade, níveis elevados de leptina e o SRA já foram explorados. Ações centrais da Ang II podem levar ao aumento da atividade do nervo simpático renal, mediante ativação de regiões de controle cardiovascular, aumentando dessa forma, a secreção de renina, a reabsorção de sódio e, como consequência, a PA. O SRA também pode atuar diretamente sobre o controle barorreflexo da PA e FC, em regiões de controle cardiovascular como o NTS (NUYT, 2008; TOMAT; SALAZAR, 2014). Mudanças



epigenéticas no SRA cerebral também foram associadas à disfunção autonômica na prole de camundongos com dieta rica em açúcar e gordura (MUKERJEE et al., 2018).

Neste cenário, ainda que o sistema SNS pareça exercer um papel no desenvolvimento programado da hipertensão, o efeito de condições deletérias neonatais pró-oxidantes sobre a modulação autonômica cardiovascular na idade adulta e sua associação com o SRA ainda não foi evidenciado.

#### **1.4.4 Modelo experimental de exposição neonatal à hiperóxia**

O modelo animal de exposição neonatal à hiperóxia mimetiza as condições perinatais adversas pró-oxidantes decorrentes da prematuridade e suas implicações e comorbidades em longo prazo (BERTAGNOLLI et al., 2014). Apesar de os filhotes de ratos expostos a alta pressão parcial de O<sub>2</sub> nascerem a termo, diversos órgãos e tecidos ainda se encontram em estágio de desenvolvimento, o que permite o estudo dos danos relacionados ao estresse hiperóxico típico de bebês prematuros (YZYDORCZYK et al., 2008). Desta forma, este modelo é particularmente relevante para examinar as consequências agudas e em longo prazo do dano oxidativo neonatal de prematuros. Em estudos com ratos e camundongos, a exposição neonatal à hiperóxia tem sido utilizada para mimetizar a retinopatia da prematuridade, condição adversa comumente observada no período pós-natal em prematuros (DORFMAN et al., 2008; NANDGAONKAR et al., 1999). Experimentos utilizando este modelo murino têm demonstrado que o estresse oxidativo perinatal pode ser o “gatilho” iniciador na programação da (dis)função cardiovascular em longo prazo, uma vez que ratos adultos apresentam aumento da PA, diminuição no desenvolvimento vascular e no número de néfrons (YZYDORCZYK et al., 2008), e alterações morfológicas e funcionais cardíacas (BERTAGNOLLI et al., 2014; VELTEN et al., 2011) e pulmonares (RAMANI et al., 2015). Esses achados estão baseados em modificações estruturais, como remodelamento de matriz extracelular (aumento colágeno, diminuição de elastina), levando ao aumento da rigidez nos

vasos sanguíneos, vascular, assim como mecanismos envolvendo aumento da produção de ERO e ativação precoce do SRA (BERTAGNOLLI et al., 2014; HUYARD et al., 2014; MIVELAZ et al., 2011). Ainda, Yzydorczyk e cols. (2008) observaram um aumento significativo na FC em animais de ambos os sexos submetidos à hiperóxia neonatal, após o aumento da PA, sugerindo que o aumento da FC, secundário à hipertensão, poderia estar associado à dessensibilização do barorreceptor aferente ou ao aumento da ativação central simpática eferente mediada por Ang II (YZYDORCZYK et al., 2008).

Ainda que diversas evidências, neste modelo experimental, apontem o estresse oxidativo e o SRA como importantes agentes na programação da disfunção cardíaca, ainda não é evidente se existe um prejuízo na modulação autonômica cardíaca, e se através do bloqueio do SRA no período neonatal observa-se cardioproteção até a idade adulta associada a esses sistemas.

## **2 HIPÓTESE**

A exposição neonatal à hiperóxia leva a alterações de estrutura e função cardíacas na idade adulta (4 meses) e ao prejuízo da modulação autonômica cardíaca em associação ao estresse oxidativo em ratos e o bloqueio do receptor AT1 no período neonatal (8 a 10 dias de idade) previne essas alterações exercendo efeito cardioprotetor.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo investigar se as alterações morfo-funcionais cardíacas e o possível prejuízo na modulação autonômica em associação ao estresse oxidativo decorrentes da exposição neonatal à hiperóxia em ratos adultos podem ser prevenidos pelo bloqueio do receptor AT1 no período neonatal.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar o efeito da hiperóxia neonatal e do bloqueio neonatal de AT1 sobre:

- Parâmetros morfométricos, desenvolvimento de hipertrofia e fibrose cardíaca em ratos adultos;
- A função cardiovascular por meio de parâmetros ecocardiográficos e hemodinâmicos em ratos adultos;
- A expressão de componentes do eixo clássico e do eixo contra-regulatório do sistema renina angiotensina em ratos adultos expostos à hiperóxia neonatal;
- A modulação autonômica cardíaca por meio da análise da VFC e balanço simpato-vagal em ratos adultos;
- A expressão de receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos, bem como componentes da sinalização adrenérgica em ratos adultos;
- A densidade de inervação simpática cardíaca em ratos adultos;
- A expressão de pró e antioxidantes, bem como sobre marcadores de estresse oxidativo em ratos adultos;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro de Pesquisa do Hospital Universitário Sainte-Justine/ Universidade de Montreal (protocolo 513-C) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocolo 31499), e realizados seguindo as diretrizes do “Canadian Council on Animal Care” e do “National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” e de acordo com a Lei 11.794 de 2008 e Resoluções Normativas e Orientações Técnicas vigentes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2015).

### 4.2 Animais

Foram utilizados ratos neonatos Sprague-Dawley machos, provenientes da empresa *Charles River Laboratories* (Saint-Constant, QC, Ca), mantidos em caixas ventiladas (394 x 346 x 213 mm), 2 – 4 animais/caixa, à temperatura constante (22°C) com um ciclo claro-escuro 12:12-h e com acesso à ração (Envigo 2918 Teklad Global 18% *Protein Rodent Diet*; Lachine, QC, Ca) e água *ad libitum*.

### 4.3 Cálculo amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado por meio do *software Sigma Plot 11.0*. Para o cálculo, foram considerados probabilidade de erro  $\alpha = 0.05$  e poder do teste estatístico ( $1 - \beta$  probabilidade de erro) = 0.90. Baseado no estudo de Bertagnolli e cols (2014), o  $n$  calculado para a realização dos experimentos foi 8 animais por grupo. Considerando o número de grupos, os diferentes períodos

experimentais e a mortalidade em procedimentos cirúrgicos experimentais (aproximadamente 25% por procedimento), o  $n$  amostral total calculado foi de 56 animais. Apenas os ratos machos foram estudados, e não mais que 3 animais por tratamento de cada ninhada foram utilizados (4 ninhadas, estabelecendo um  $n$  total de 12 ratos/grupo).

#### 4.4 Grupos experimentais

Ninhadas de ratos Sprague-Dawley foram recebidas no biotério do Centro de Pesquisa do Hospital Universitário Sainte-Justine com os filhotes no seu primeiro dia de vida. Após ambientação de 48h ao biotério, os animais foram pesados e divididos randomicamente nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo controle+água (CTL+H<sub>2</sub>O):** filhotes mantidos em ar ambiente que receberam água (veículo) por via intragástrica;
- **Grupo O<sub>2</sub>-exposto+água (O<sub>2</sub>-exposto+H<sub>2</sub>O):** filhotes expostos a 80% de O<sub>2</sub> do dia 3 ao dia 10 de vida e que receberam água por via intragástrica;
- **Grupo O<sub>2</sub>-exposto+losartan (O<sub>2</sub>-exposto+Los):** filhotes expostos a 80% de O<sub>2</sub> do dia 3 ao dia 10 de vida e que receberam losartan (20 mg/kg/dia) por via intragástrica do dia 8 ao dia 10 de vida;

#### 4.5 Protocolo experimental

Os procedimentos descritos a seguir podem ser didaticamente observados na figura 4:

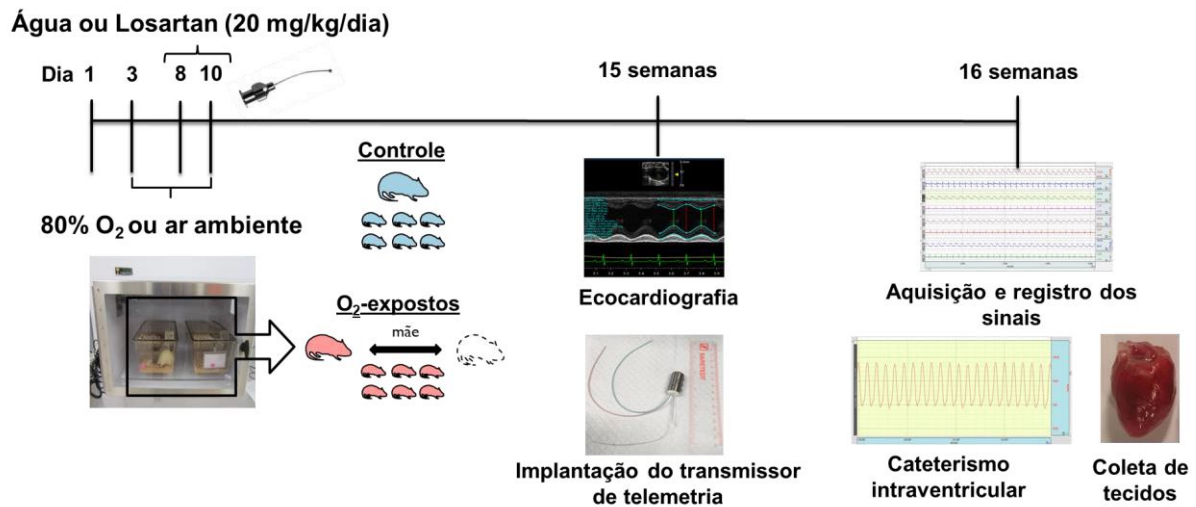


Figura 4: Desenho experimental do estudo.

#### 4.5.1 Exposição neonatal a altas concentrações de O<sub>2</sub>

Filhotes dos grupos O<sub>2</sub>-expostos foram mantidos a 80% de O<sub>2</sub> (ProOx P110, Biosherix, Lacona, NY) dos 3 aos 10 dias de vida com suas mães. As mães do grupo O<sub>2</sub>-expostos foram trocadas por uma mãe substituta mantida em ar ambiente com outra ninhada (filhotes não utilizados no estudo) a cada 12 horas para evitar possível morbidade materna. A troca das mães não exerce nenhum impacto sobre o crescimento corporal dos filhotes, bem como sobre a PA, como previamente demonstrado (YZYDORCZYK et al., 2008). Os filhotes dos grupos Controle foram mantidos em ar ambiente com suas mães (sem trocas). Os filhotes foram desmamados com 3 semanas de idade com ração padrão (BERTAGNOLLI et al., 2014) e foram pesados semanalmente até completarem 16 semanas de vida.

#### 4.5.2 Tratamento neonatal com losartan

O bloqueador do receptor AT1 de Ang II, Los (losartan potassium, Sigma Aldrich, 61188), foi administrado em ratos neonatos (8 a 10 dias de idade) na dose de 20mg/kg/dia (BERTAGNOLLI et al., 2016), via oral por gavagem (no grupo experimental O<sub>2</sub>-exposto+Los). A janela terapêutica foi escolhida com base na nefrogênese do rato, que ocorre até o 7º dia pós-natal (SCHREUDER et al., 2006). Os filhotes dos grupos CTL+H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>-exposto+H<sub>2</sub>O receberam veículo (água mineral). Os filhotes eram pesados e numerados e a dose diária de Los para cada filhote era calculada e o mesmo era diluído em água mineral considerando-se o número total de filhotes a serem tratados no mesmo dia do preparo. O volume diário administrado em cada animal foi de 50uL.

#### 4.5.3 Análise ecocardiográfica

Ao completarem 15 semanas de vida, uma semana antes da implantação do sistema de telemetria, ratos machos foram submetidos à análise ecocardiográfica para obtenção de parâmetros morfológicos e funcionais do ventrículo esquerdo (VE), como previamente descrito (BERTAGNOLLI et al., 2016). Todos os parâmetros foram obtidos por um único operador cegado para os grupos experimentais. Os ratos foram pesados, anestesiados com isoflurano inalado na proporção de 2.5% de isoflurano para 1 de O<sub>2</sub> (L/min) e tiveram seu tórax tricotomizado. Todas as medidas foram realizadas com os animais anestesiados alocados em posição supina em uma plataforma aquecida à 37º com monitoramento contínuo da temperatura corporal por termômetro anal e, da FC e frequência respiratória, através de ECG obtido por meio de eletrodos posicionados nas patas dianteiras e traseiras do animal. Imagens bi-dimensionais do VE foram obtidas no modo-M em posição perpendicular ao septo interventricular e a parede posterior do VE ao nível dos músculos papilares, utilizando um sistema de alta resolução de microimagens *in vivo* Vevo 3100 (Fujifilm Visualsonics®, Toronto, ON, Canadá) equipado com transdutor de arranjo linear de



13–24 MHz (Vevo MX transducer 250). Parâmetros de morfologia do VE como diâmetro diastólico ventricular esquerdo (DdVE), diâmetro sistólico ventricular esquerdo (DsVE), espessura da parede anterior na diástole e sístole, espessura da parede posterior na diástole e sístole bem como a FC foram obtidos. O volume sistólico (VS), débito cardíaco (DC), fração de ejeção (FE) e fração de encurtamento (FS) foram calculados a partir dos diâmetros e volumes ventriculares obtidos a partir de imagens no modo-M, de acordo com as recomendações da *American Society of Echocardiography* (SAHN et al., 1978), como a seguir:  $SV (\mu\text{L}) = \text{VDF} - \text{VSF}$ ;  $\text{CO} (\mu\text{L}/\text{min}) = \text{VS} \times \text{FC}$ ;  $\text{FE} (\%) = (\text{VDF} - \text{VSF})/\text{VDF} \times 100$ .  $\text{FS} (\%) = [\text{DdVE} + \text{DsVE}]/\text{DdVE} \times 100$ .

Após a realização da ecocardiografia, os animais foram monitorados até acordarem da anestesia quando, então, foram colocados de volta em suas caixas-moradia.

#### 4.5.4 Cirurgia de implantação de transmissores de telemetria

A monitorização da PA e FC dos animais dos diferentes grupos experimentais foi realizada através de um sistema de telemetria (TSE Stellar Telemetry, TSE Systems, Chesterfield, MO, USA), utilizando aparelhos implantáveis com transmissor de rádio-telemetria (PBTA-M pressure, bipotential, TSE Systems, Chesterfield, MO, USA). Para tanto, ratos adultos (15 semanas de idade) foram pesados e profundamente anestesiados com 4% e mantidos à 3% de isoflurano inalado em uma mistura com O<sub>2</sub> a 1 L/min. Em seguida, o tórax e a região inguinal esquerda foram tricotomizados e injeções profiláticas pré-operatórias de analgésico (1 mg/kg, S.C., Metacam, Meloxicam; Boehringer Ingelheim) e antibiótico (10 mg/kg, S.C., Enrofloxacin, Baytril; Bayer, Auckland, New Zealand) foram administradas. Uma plataforma aquecida à 37° foi colocada sob o campo cirúrgico e utilizada durante todo o procedimento de implantação. Uma incisão abdominal de aproximadamente 4 cm foi realizada na linha média e o *probe* do transmissor de telemetria foi suturado na cavidade peritoneal, na parede interna do músculo abdominal. Para a aquisição

de registros de ECG, 2 eletrodos bio-potenciais originados no *probe* guiados subcutaneamente foram implantados: o eletrodo negativo no músculo peitoral direito e o positivo na musculatura inferior às costelas esquerdas. Ainda, o transdutor de pressão foi inserido e implantado na artéria femoral esquerda (PARK et al., 2017). Todas as incisões foram suturadas e os ratos retornaram à sua caixa-moradia, 1 por caixa. Injeções de analgésico (1 mg/kg, S.C., Metacam, Meloxicam; Boehringer Ingelheim) foram administradas até o terceiro dia pós-cirúrgico (FLECKNELL, 2000; GAERTNER et al., 2008). O período de recuperação dos animais, para o início da aquisição dos sinais, foi de 6 a 9 dias (FAIRCHILD et al., 2011).

#### **4.5.5 Aquisição e registro dos sinais**

Sinais de PA e ECG foram adquiridos e registrados 10 min/hora/24h, com uma frequência de amostragem de 200 Hz, através de sistema de telemetria (TSE systems, USA), em animais acordados em sua caixa-moradia em um ambiente silencioso. Ainda, para a avaliação da modulação autonômica cardíaca, sinais de PA e ECG foram gravados com uma frequência de amostragem de 1 kHz por 10 minutos em um dos períodos do dia (11:00, 12:00 ou 13:00) e um dos períodos da noite (23:00, 00:00 ou 01:00). Todos estes registros foram feitos aproximadamente na mesma hora do dia e em um ambiente constante com o intuito de reduzir efeitos circadianos nas flutuações da FC.

#### **4.5.6 Análise da pressão arterial e análise da VFC**

Para a análise da PA sistólica, diastólica, média e FC de 24h, os registros de PA foram extraídos e analisados através do software AcqKnowledge 4.4 (BIOPAC Systems, Inc., USA) e os resultados expressos em mmHg e bpm. Para a análise da VFC os registros de ECG foram extraídos através do software AcqKnowledge 4.4 (BIOPAC Systems, Inc., USA). Após a detecção dos picos R dos registros de ECG,

um tacograma foi gerado com o intuito de se obter as flutuações da FC. Artefatos foram inspecionados e trechos estacionários de 200 – 300 batimentos foram selecionados. Para a extração dos parâmetros de VFC no domínio da frequência, a análise espectral baseada no modelo autorregressivo foi aplicada, considerando as bandas LF e HF como 0,2–0,75 Hz e 0,75–3,0 Hz, respectivamente, de acordo com a faixa sugerida para ratos (DA SILVA GONÇALVES BOS et al., 2017; MALLIANI et al., 1991; MONTANO et al., 2009). O poder total em cada frequência foi mensurado e utilizado para calcular os valores absolutos (abs,  $s^2$ ), normalizados (nu) e percentuais, além da razão LF/HF a partir dos intervalos RR.

#### **4.5.7 Cateterismo cardíaco**

Após a aquisição de 24h de registros de PA e ECG, ratos com 16 semanas de idade foram submetidos ao cateterismo do VE para monitorização das pressões sistólica e diastólica final do VE, além dos índices de contratilidade (+dP/dt) e relaxamento (-dP/dt). O procedimento foi realizado em todos os animais por um único operador cegado para os grupos. Os animais foram pesados e anestesiados com 2,5% de isoflurano inalado misturado com O<sub>2</sub> a 1 L/min. A região cervical anterior direita foi tricotomizada, uma incisão foi realizada e os músculos afastados até a localização da artéria carótida. O VE foi acessado via artéria carótida utilizando um cateter de polietileno (PE50) acoplado a um transdutor de pressão (TSD104A, Biopac Systems, Inc.) e um sistema de aquisição de registros. Todos os procedimentos foram realizados com os animais anestesiados (3% isoflurano + O<sub>2</sub> a 1 L/min). Os dados de pressão analógica (mmHg) foram adquiridos e digitalizados utilizando o software AcqKnowledge 4.2 (Biopac Systems, Inc.) com uma frequência de amostragem de 1 kHz.

#### **4.5.8 Coleta e processamento dos tecidos**

Imediatamente após o cateterismo intraventricular, os animais foram mortos por decapitação, ainda sob o efeito de anestesia (4:1 O<sub>2</sub>). O tórax foi aberto, o coração rapidamente removido e lavado em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15% para indução de parada diastólica, e em seguida pesado. Os átrios foram removidos e os corações foram cortados transversalmente (axiais); a parte basal do coração – compreendendo o VE e o VD - foi fixada por 24-48 horas em 4% de paraformaldeído e em seguida foi armazenada em solução salina à 4° até a inclusão em parafina. O tecido remanescente foi separado em VE e VD e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80° para posteriores análises moleculares.

#### **4.5.9 Análises morfométricas**

Além do coração, órgãos como fígado, pulmões, rins e tibia foram coletados e pesados para avaliação de parâmetros morfométricos. O índice de hipertrofia cardíaca foi determinado através da razão do peso do coração/peso corporal e peso do coração/comprimento da tibia (SCHENKEL et al., 2010). Pulmões e fígado foram pesados e alocados em estufa aquecida à 60°C e pesados diariamente até a estabilização de seu peso. Os índices de congestão pulmonar e hepática foram determinados pela relação peso úmido/peso seco do órgão e peso úmido/peso corporal. O índice de hipertrofia renal foi determinado a partir da razão peso do órgão/peso corporal (SINGAL et al., 1999).

#### **4.5.10 Análises histológicas**

Secções transversais da base do coração com ambos VE e VD foram incluídas em parafina. Cortes de 5 µm foram realizados em um micrótomo rotatório Leica RM2145 (Leica Biosystems, Concord, ON, Canadá) e foram corados com hematoxilina e eosina para avaliação da área de secção transversal do cardiomiócito e com o corante Tricromo de Masson, para a avaliação de fibrose cardíaca. Para todas as análises histológicas, duas imagens do sub-endocárdio, sub-epicárdio e miocárdio foram randomicamente obtidas utilizando um scanner de lâminas Axio Scan.Z1 (Zeiss, Jena, Germany). A área do cardiomiócito foi analisada no sub-endocárdio e sub-epicárdio através da medida da área de células com núcleo visível. A fibrose cardíaca foi analisada através da quantificação da porcentagem da intensidade de pixels comparada à intensidade máxima de pixels obtida através da coloração de Tricromo de Masson. O software Zen 2.3 (Zeiss, Jena, Germany) foi utilizado para a aquisição das imagens e o software Image J 1.51K para análise estereológica e quantificação de pixels como previamente descrito (BERTAGNOLLI et al., 2014).

#### **4.5.11 Ensaio de imunofluorescência cardíaca**

Segmentos transversos da base do coração compreendendo VE e VD foram incluídos em parafina. Segmentos de 5 µm foram cortados com um micrótomo rotatório Leica RM2145 (Leica Biosystems, Concord, ON, Canadá) para avaliação da inervação simpática cardíaca. As amostras de tecido cardíaco foram desparafinizadas em xileno, hidratadas em diluições seriadas de álcool, tampão fosfato (PBS) e água destilada. A exposição do antígeno foi realizada em 0,01 M de solução tampão citrato (pH 6) durante 20 minutos (em banho maria à 90°C). Soluções com Triton X-100 2% e glicina 0,1M foram utilizadas para permeabilizar e atenuar a fluorescência espontânea do sinal paraformaldeído (PFA). Em seguida, os

segmentos foram tratados com soro caprino (NGS, diluído em PBS 10%) por 30 minutos. O anticorpo primário (anti-tirosina hidroxilase, AB152, Millipore/Merck, 1/1000) foi diluído em PBS com soro caprino e incubado *overnight* à 4°C. Os tecidos foram lavados em PBS e, depois, incubados com anticorpo secundário (Alexa anti rabbit 546 nm, Invitrogen) por 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, os tecidos foram incubados com DAPI e fixados com fluorescência Dako. Para todas as análises histológicas, duas imagens de miocárdio de VE foram obtidas utilizando microscópio de fluorescência Leica DMI8 (Leica Microsystems, Concord, ON, Canadá). A análise da densidade de inervação simpática cardíaca foi realizada através do software Image J 1.51K. A porcentagem da área limiar foi medida através da divisão da superfície da fibra marcada na imagem pela área total da imagem (%) (BAKOVIC et al., 2018). O controle positivo do anticorpo primário foi testado antes do desenvolvimento do método se utilizando cortes de corpo estriado.

#### 4.5.12 Western Blotting

Amostras de VE foram homogeneizadas em homogeneizador Precellys 24 (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, França) utilizando tampão RIPA (Radioimmuno-precipitation assay) com inibidores de proteases (Sódio deoxicolato 10%, EDTA 100 mmol/L, SDS 10%, *Complete mini* (Roche) 0,05X, fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 100mmol/L, Igepal 10%). A suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 20 min a 4°C em uma centrífuga modelo Sorvall Legend Micro 21R (ThermoFisher, Germany). O sobrenadante foi utilizado para quantificação das proteínas para normalização. Cinquenta microgramas de proteína foram incubados com tampão de Laemmli (Tris 0,5 mol/L; SDS 10%; Glicerol 20%; Azul de bromofenol 0,05%; 2- betamercaptoetanol 6%) à 95°C por 2 minutos e, em seguida, foram expostos à eletroforese de gel monodimensional de poliacrilamida (Invitrogen Bolt 4-12% Bis-Tris Plus, Thermo Fisher) em tampão de corrida (Novex – MES SDS). As proteínas separadas foram transferidas através de eletroforese para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) usando tampão contendo Tris

base 48 mmol/L, glicina 39 mmol/L, metanol 10%, pH 8,3. As membranas foram então bloqueadas por uma hora em leite desnatado 1% em tampão TBS-tween (Tris 20 mM, NaCl 140 mM, Tween 20 0,05%). As membranas foram processadas por imunodeteccção, usando-se os seguintes anti-anticorpos primários: receptor de Ang II tipo 1 (AT1) (ab9391, 1/1,000, Abcam, Cambridge, MA), receptor de Ang II tipo 2 (AT2) (sc-9040, 1/1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), receptor Mas (Mas) (AAR-013, 1/1,000, Alomone, Jerusalem, Israel), enzima conversora de angiotensina (ECA) (sc-12187, 1/500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2) (ab108252, 1/1,000, Abcam, Cambridge, MA), CuZn superóxido dismutase (SOD) (SOD-1; SOD101, 1/2,000, Stressgen Bioreagents, Victoria, BC), Mn SOD (SOD-2; SOD111, 1/1,000, Stressgen Bioreagents, Victoria, BC), catalase (CAT) (ab52477, 1/1,000, Abcam, Cambridge, MA), glutationa peroxidase 1 (GPx-1) (S-072-100, 1/10,000, Novus Biologicals, Oakville, ON), gp91phox (NADPH oxidase 2) (ab43801, 1/1,000, Abcam, Cambridge, MA), xantina oxidase (sc-398548, 1/1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), cadeia pesada da miosina - myosin heavy chain (MHC) (ab15, 1/2,000, Abcam, Cambridge, MA), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ 1) (ab64715, 1/1,000, Abcam, Cambridge, MA), receptor beta adrenérgico tipo 1 (ADRB1) (NB600-978, 1/1,000, Novus Biologicals, Littleton CO), receptor beta adrenérgico tipo 2 (ADRB2) (NBP2-15564, 1/1,000, Novus Biologicals, Littleton CO), cálcio/calmodulina kinase II (CaMKII) (GTX61641, 1/1,000, Gene Tex, Irvine, CA), CaMKII oxidada (GTX36254, 1/1,000, Gene Tex, Irvine, CA). Anticorpos anti  $\beta$ -tubulina (T0198, 1/1,000, Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, ON) e GAPDH (sc-20357, 1/1,000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) foram utilizados como controle conforme o peso molecular da proteína de interesse. As bandas de proteínas foram reveladas com substrato de quimiluminescência (ECL) (Perkin Elmer Inc, Waltham, MA) em um sistema de documentação de géis (Syngene, G:BOX, Cambridge, UK) e quantificadas através do software Image J 1.51K.

### 4.5.13 Análises bioquímicas

#### 4.5.13.1 Preparo dos homogeneizados

As amostras de VE foram homogeneizadas com KCl 1,15% e PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 20 mmol/L utilizando um homogeneizador modelo Precellys 24 (Bertin instruments, Montigny-le-Bretonneux, França). A suspensão foi centrifugada a 3000 rpm por 20 min a 0–4 °C (LLESUY et al., 1985). O sobrenadante foi utilizado para mensuração dos níveis totais de ERO e peroxidação lipídica através de TBARS. As proteínas foram mensuradas através do método de Bradford (1976) (BRADFORD, 1976) com albumina de soro bovino como padrão.

#### 4.5.13.2 Determinação dos níveis totais de espécies reativas de O<sub>2</sub>

Para a detecção da concentração de espécies reativas totais no homogeneizado cardíaco, utilizou-se o método da oxidação do diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA). O DCFH-DA permeia a célula e é clivado por esterases intracelulares à 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH). O DCFH é então oxidado à molécula fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) por uma variedade de espécies reativas. O DCFH-DA é considerado um indicador geral de espécies reativas, reagindo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), hidroperóxidos lipídicos e com O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Uma vez que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um produto secundário do O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, a fluorescência a partir do DCF tem sido utilizada para estimar a produção de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. O ensaio foi realizado através da incubação do homogeneizado cardíaco com um meio de reação (tampão fosfato 20 mmol/L, KCl 140 mmol/L, pH 7,4) contendo DCFH-DA 100 µmol/L (*Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA*). Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente e na ausência de luz, a fluorescência foi medida usando comprimentos de onda de excitação (480 nm) e emissão de (535 nm). Os dados foram expressos como



pmol/mg proteína, baseados em uma curva padrão utilizando o composto DCF (LEBEL; ISCHIROPOULOS; BONDY, 1992).

#### **4.5.13.3 Peroxidação lipídica**

Para avaliação da lipoperoxidação, o kit de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (*Cayman Chemical, Michigan, USA*) foi utilizado e realizado conforme as instruções do fabricante. O produto formado pela reação do malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) a altas temperaturas foi mensurado colorimetricamente à 530 nm. Os resultados foram expressos como nmol/mg de proteína (JOSHI et al., 2018).

#### **4.5.14 Análise Estatística**

Os dados foram apresentados com média  $\pm$  DP ou mediana e intervalos interquartis. Os resultados foram analisados por meio de ANOVA de uma ou duas vias seguido pelo pós-teste de Dunnett, para comparações com o grupo O<sub>2</sub>-exposto+H<sub>2</sub>O, ou pós-teste de tendência linear. O *software* GraphPad Prism versões 6.0 e 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), Sigma Plot 12.0 e IBM SPSS 24.0 foram utilizados. O nível de significância foi estabelecido como  $P < 0.05$ .

#### **4.5.15 Contribuição autoral**

Idealização e desenho do estudo: JHPB, AC, ABK e AMN; Obtenção de financiamentos para realização dos experimentos: ABK e AMN; Manejo e tratamento dos animais: JHPB, AC e YH; Realização das análises ecocardiográficas: JHPB e ROF; Cateterismo intraventricular: ROF; Implantação dos transmissores de

telemetria: JHPB e DRD; Coleta e processamento dos tecidos: JHPB, ROF, DRD, DW, YH, AC; Análise dos registros de telemetria: JHPB, AS, MSF e KRC; Análises histológicas: JHPB e AS; Imunofluorescência cardíaca: AD; Western blotting: JHPB e AS; Análises bioquímicas: JHPB e ROF; Análise estatística: JHPB e AF; Análise, interpretação e discussão de resultados: JHPB, ABK e AMN; Escrita e revisão dos artigos: JHPB, ABK e AMN; Revisão e aprovação da versão final dos artigos: ABK e AMN.

## 5 RESULTADOS

Apêndices:

- Artigo 1, intitulado “Impact of early life AT<sub>1</sub> blockade on adult cardiac morpho-functional changes and the renin-angiotensin system in a model of neonatal high oxygen-induced cardiomyopathy”, publicado no periódico *European Journal of Pharmacology*;
- Artigo 2, intitulado “Losartan treatment prevents heart rate variability impairment in adult rats transiently exposed to neonatal hyperoxia: a model of prematurity-related deleterious conditions”, submetido ao periódico *Cardiovascular Research*.

## 6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que o tratamento neonatal com Los apresenta efeitos benéficos sobre aspectos morfofuncionais cardíacos na idade adulta, como previamente observado em animais jovens expostos à hiperóxia neonatal, principalmente no âmbito estrutural. Ainda, foi observado que a exposição neonatal à hiperóxia leva ao prejuízo da modulação autonômica e sinalização adrenérgica cardíaca e o bloqueio neonatal do receptor AT1 parece modular o prejuízo da modulação autonômica em nível especificamente central.

A exposição neonatal à hiperóxia leva a alterações estruturais e disfunção cardíaca em animais jovens e adultos (BERTAGNOLLI et al., 2014, 2016). Evidências prévias do nosso laboratório, com animais de mesma idade, evidenciou um aumento leve, porém significativo, no índice de hipertrofia cardíaca, sem diferenças no peso corporal, dos animais expostos à hiperóxia (BERTAGNOLLI et al., 2014). Os índices morfométricos de hipertrofia cardíaca e renal juntamente aos índices de congestão pulmonar e hepática, avaliados no presente estudo, sugerem ausência de insuficiência cardíaca severa ou congestiva nos animais O<sub>2</sub>-expostos. Possivelmente diferenças tão sutis em parâmetros estruturais sejam mais facilmente detectadas através de métodos mais sensíveis e específicos como por avaliação histológica e molecular, como evidenciado no presente estudo. O tratamento com o antagonista de AT1, Los, também não impactou nos parâmetros morfométricos na idade estudada.

Clinicamente, diversas evidências mostram que o nascimento prematuro está associado a alterações no desenvolvimento miocárdico pós-natal. Em recém-nascidos prematuros, se observa um aumento das dimensões VE no primeiro mês de vida com discreta disfunção sistólica e diastólica (AYE et al., 2017; KOZÁK-BÁRÁNY et al., 2001). Crianças de 5 anos nascidas prematuras, apresentam maior espessura septal interventricular e menores diâmetros ventriculares comparadas a crianças nascidas a termo (MIKKOLA et al., 2007). Em adultos jovens nascidos muito prematuros, estudos mostram formato cardíaco alterado com aumento de

massa VE, e menor comprimento e diâmetro VE, além de disfunção sistólica e diastólica VE (LEWANDOWSKI et al., 2013).

Mimetizando os relatos de estudos clínicos, os achados do presente estudo evidenciam o desenvolvimento de hipertrofia e fibrose associados ao aumento de espessura de parede e diminuição do diâmetro ventricular diastólicos nos animais expostos ao O<sub>2</sub>. Ainda, funcionalmente, observou-se diminuição do volume diastólico final, do volume sistólico e do índice de relaxamento ventricular. Apesar da diminuição no volume sistólico, não se observou impacto na fração de ejeção ventricular esquerda desses animais. Esse conjunto de resultados demonstra um prejuízo de função exclusivamente diastólica, com diminuição do volume sistólico.

Três componentes podem levar à modificação do volume sistólico: a pré-carga, a pós-carga e a contratilidade miocárdica intrínseca (AIRES, 2008). A pré-carga, estimada através do volume diastólico final, se mostrou, neste estudo, significativamente reduzida nos animais expostos à hiperóxia; a pós-carga, estimada através da medida da PA diastólica, que reflete a resistência periférica total, não diferiu significativamente entre os grupos neste estudo (PA de 24h); o índice de contratilidade miocárdica intrínseca (+dP/dt) não mostrou diferenças estatisticamente significativas nos animais expostos à hiperóxia. Dessa forma, considerando o conjunto de achados deste estudo, sugere-se que o componente determinante para a modificação do volume sistólico nos animais O<sub>2</sub>-expostos+H<sub>2</sub>O foi a pré-carga. Sugere-se ainda que o prejuízo no relaxamento ventricular observado nesses animais (-dP/dt) contribuiu significativamente para a diminuição do volume diastólico final e, como consequência, no volume sistólico.

Quanto à pós-carga, o aumento da PA esperado em decorrência da exposição ao O<sub>2</sub>, observado previamente neste mesmo modelo (YZYDORCZYK et al., 2008), não foi evidenciado no presente estudo. É importante ressaltar que, neste estudo, utilizou-se um sistema de telemetria, considerado padrão-ouro para a verificação da PA em animais, dada a possibilidade de se obter registros de animais acordados, livres de estresse em condições normais de vida. O estudo desenvolvido por Yzydorczyk e cols. (2008), por outro lado, utilizou o método de pletismografia de cauda, no qual, independentemente do período de habituação, existe uma potencial

contribuição do estresse de contenção no aumento da PA. Cabe enfatizar ainda, que, o presente modelo experimental leva ao desenvolvimento de alterações morfo-funcionais leves, e que quando os animais são expostos a um desafio hemodinâmico, como, por exemplo, a administração prolongada de Ang II, as modificações observadas se demonstram mais pronunciadas (BERTAGNOLLI et al., 2014). Numa abordagem translacional, essas evidências apontam para a necessidade de estratégias preventivas como a educação em saúde sobre os possíveis riscos associados à prematuridade.

Considerando um dos objetivos do presente estudo, o tratamento precoce com Los preveniu o desenvolvimento de fibrose ventricular esquerda, levou à diminuição na espessura de parede em diástole e normalização do diâmetro ventricular. Corroborando o diâmetro interno ventricular, observou-se um aumento do volume diastólico final (aumento da pré-carga), o que contribuiu diretamente para o aumento do volume sistólico. Apesar disso, não se observou aumento significativo da fração de ejeção. O prejuízo observado no relaxamento ventricular nos animais expostos ao O<sub>2</sub>, bem como as PA sistólica e diastólica de 24h, não foram modulados pelo Los. Dessa forma, o tratamento neonatal com Los demonstra impacto positivo sobre alguns aspectos estruturais cardíacos, efeito esse, que não refletiu diretamente sobre a função cardíaca, como previamente observado em animais mais jovens (BERTAGNOLLI et al., 2016).

Estudos prévios demonstram o SRA como um componente dentre os mecanismos para a programação da disfunção cardiovascular neste modelo animal (BERTAGNOLLI et al., 2014, 2016). Nestes estudos, o aumento da razão AT1/AT2 foi fortemente associado com as alterações morfo-funcionais observadas nos animais expostos à hiperóxia neonatal, principalmente em decorrência do aumento da expressão de AT1. No presente estudo, o receptor AT1 não apresentou aumento significativo nos animais O<sub>2</sub>-expostos+H<sub>2</sub>O. Ao mesmo tempo, há um aumento da expressão de AT2 e diminuição do receptor Mas, evidenciando uma modificação prolongada (até a idade adulta) deste sistema e um possível papel do eixo contra-regulatório do SRA na programação das doenças.

Insultos fetais como a restrição proteica na dieta materna e insuficiência placentária também reforçam o papel do SRA no desenvolvimento de DCV, uma vez que o bloqueio do SRA previne o desenvolvimento de hipertensão na prole (BERTAGNOLLI, 2017; DASINGER et al., 2016). Em humanos, níveis aumentados de aldosterona foram evidenciados em adolescentes de 14 anos de idade do sexo masculino, prematuros, com muito baixo peso ao nascer e de mães pré-eclâmpticas (WASHBURN et al., 2015). Apesar das evidências de uma forte associação do SRA com a programação da doença no adulto, no presente estudo, o bloqueio do receptor AT1 não levou a mudanças na expressão dos componentes deste importante sistema, incluindo a diminuição do receptor Mas de Ang-(1-7) observada nos animais expostos ao O<sub>2</sub>, evidenciada pela primeira vez no modelo experimental em questão.

Outro mecanismo que parece exercer um papel na programação das doenças é o SNA (DASINGER et al., 2016). Os resultados das análises no domínio do tempo e frequência da VFC do presente estudo demonstram que insultos ocorridos no período perinatal levam ao prejuízo da modulação autonômica cardíaca e sugerem o papel do SNA, em adição ao SRA, no desenvolvimento programado da disfunção cardiovascular. O mesmo já foi demonstrado em estudos clínicos com recém nascidos, crianças, adolescentes e adultos nascidos prematuros (PATURAL et al., 2008; RAKOW et al., 2013; SMITH; DOIG; DUDLEY, 2005). Um estudo recente com adultos jovens nascidos muito a extremamente prematuros mostrou aumento da VPA associado ao aumento da PA nesses indivíduos, quando comparados a controle nascidos a termo (SIPOLA-LEPPÄNEN et al., 2015). O aumento da VPA está associado com o desenvolvimento, progressão e severidade do dano cardiovascular e renal (lesão de órgão alvo), além de risco elevado de mortalidade (IRIGOYEN et al., 2016).

O aumento da modulação simpática e diminuição do tônus vagal, combinado ao aumento da expressão dos receptores  $\beta$ 1 adrenérgicos e diminuição da inervação simpática VE, também evidenciados pela primeira vez neste modelo animal, mostram um prejuízo na modulação autonômica/adrenérgica que podem estar contribuindo para as alterações estruturais e funcionais mal-adaptativas

cardíacas, independente de alterações na PA basal. Sabe-se que há aumento da atividade simpática na IC, sendo inicialmente benéfico para a manutenção da PA em resposta à diminuição do débito cardíaco devido à disfunção ventricular. Em longo prazo, a atividade sustentada do sistema simpático pode ser prejudicial ao coração pois contribui com a piora da disfunção ventricular e eventualmente à morte (WANG; SETO; GOLLEDGE, 2014). Uma vez que não se observou aumento significativo do receptor AT1 neste estudo, sugere-se que a diminuição do receptor Mas, associada ao aumento da modulação simpática cardíaca, podem ser os grandes contribuintes para a hipertrofia, fibrose e prejuízos funcionais observados nos animais O<sub>2</sub>-expostos. Cabe destacar que a interação da Ang-(1-7) com o receptor Mas medeia seus feitos anti-proliferativos e anti-fibróticos (FARAG et al., 2015).

O tratamento neonatal com Los preveniu as alterações nos parâmetros de VFC, principalmente no âmbito do sistema parassimpático. No tecido cardíaco, o tratamento com Los não modulou a diminuição da inervação simpática no VE, tampouco o aumento na expressão do receptor  $\beta$ 1 adrenérgico, ambos possivelmente compensatórios ao aumento do tônus simpático observado nos animais O<sub>2</sub>-expostos+H<sub>2</sub>O. Esses resultados sugerem que o tratamento neonatal com Los exerce uma modulação especificamente central sobre o SNA, atenuando o efeito simpato-excitatório da Ang II.

Em ambos estudos com humanos e animais, já se demonstrou o efeito depressor do sistema simpático com bloqueadores de AT1. Hikosaka e cols. (2002) observaram que o uso oral de candesartan por 4 semanas diminuiu a atividade simpática, além de aumentar a sensibilidade barorreflexa, em pacientes com IC leve (HIKOSAKA et al., 2002). Semelhante resultado foi observado em modelo animal de IC crônica, com o uso de Los na água de beber dos animais por 3 semanas, levando à diminuição da atividade do nervo simpático renal (SHARMA et al., 2011). Em um estudo desenvolvido por DiBona e cols. (1995), a injeção de Los, tanto por via intravenosa quanto intracerebroventricular, diminuiu a atividade do nervo renal simpático em ratos com IC congestiva, quando comparados a ratos controle, demonstrando o forte papel do SRA central na estimulação da modulação simpática (DIBONA; JONES; BROOKS, 1995). Estudos com diferentes modelos experimentais



de insultos fetais também demonstram que o SRA contribui para o aumento da responsividade simpática e da PA (DASINGER et al., 2016).

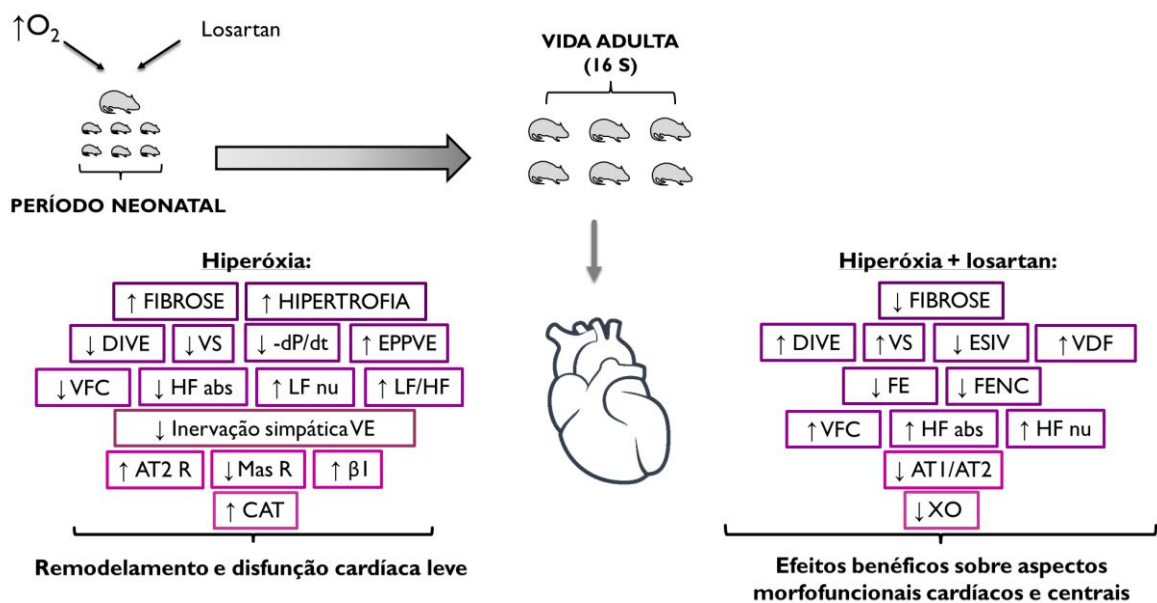
É bem estabelecido que a ativação de ambos os receptores AT1 (RAJTIK et al., 2016) e  $\beta$ -adrenérgicos (CORBI et al., 2013; XU et al., 2011) levam ao aumento na produção de ERO e, conseqüentemente, estresse oxidativo, que por sua vez, regulam vias intracelulares específicas e contribuem para a patogênese da IC, estimulando hipertrofia, remodelamento da matriz extracelular e disfunção cardíaca (HAFSTAD; NABEEBACCUS; SHAH, 2013). Apesar da ausência de diferenças significativas na expressão da CamKII oxidada/total, verificou-se a possibilidade de aumento na concentração de ERO, dado o aumento de atividade simpática e expressão de  $\beta$ 1 observados. Não se observou aumento significativo na concentração de ERO e na peroxidação lipídica no tecido cardíaco desses animais na idade estudada. Entretanto, um aumento significativo na expressão da enzima catalase foi evidenciado nos grupos O<sub>2</sub>-expostos, o que poderia estar contribuindo para o *scavenging* das ERO, prevenindo a detecção de estresse oxidativo no tecido cardíaco. De qualquer forma, é possível que o estresse hiperóxico, e como consequência, as ERO formadas durante o período neonatal tenham favorecido o desenvolvimento das alterações cardíacas observadas posteriormente na idade adulta, como a hipertrofia e fibrose.

Apesar de o tratamento com Los não ter modulado o aumento da catalase, se observa uma diminuição significativa na expressão da enzima xantina oxidase no grupo O<sub>2</sub>-exposto+Los. O mesmo padrão de diminuição se observou para a gp91phox NADPH oxidase, importante alvo tanto dos receptores de Ang II quanto dos adrenérgicos, porém não significativo. A diminuição da expressão de pró-oxidantes poderia estar contribuindo para atenuar as alterações morfo-funcionais observadas neste modelo animal, uma vez que seu papel na patogênese das doenças já é bem evidenciado. Em humanos adultos, a superprodução de ânion superóxido decorrente do aumento da ativação da NADPH oxidase por Ang II foi associada à disfunção e remodelamento vascular e, portanto, ao desenvolvimento de hipertensão (LI; SHAH, 2004). Ainda, Sabuhi e cols. (2011), demonstraram uma diminuição na expressão da NADPH oxidase, componente gp91phox em ratos

obesos tratados com um agonista de AT<sub>2</sub>, demonstrando um papel deste receptor no controle da PA (SABUHI et al., 2011). No presente estudo, um aumento significativo na expressão de AT<sub>2</sub> pelo tratamento com Los foi observado. Outras evidências também corroboram o potente efeito do receptor AT<sub>2</sub> em atenuar a ativação da NADPH oxidase induzida por Ang II (ADAMS et al., 2005; LU et al., 2015).

O conjunto de resultados de ERO, pró e antioxidantes sugerem que, em longo prazo, não se observa estresse oxidativo agudo ou sustentado neste modelo experimental. Dessa forma, sugere-se que durante a exposição aguda ao O<sub>2</sub> existe um aumento na produção de ERO que pode influenciar na programação destes sistemas (pró e antioxidantes) na vida adulta. O tratamento neonatal com Los exerce um papel extra na preparação da célula a um potencial novo insulto, através da diminuição das fontes de ERO. A investigação do padrão de expressão enzimático tanto de antioxidantes quanto pró-oxidantes se torna essencial considerando a possibilidade de programação destes pela hiperóxia, como também sua susceptibilidade à modulação por ambos sistemas-chave investigados neste estudo.

A figura abaixo sumariza esquematicamente os principais achados deste estudo.



**Figura 5: Desenho esquemático: principais resultados.** DIVE diâmetro interno do ventrículo esquerdo; VS volume sistólico;  $-dP/dt$  índice de relaxamento; EPPVE espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; ESIV: espessura do septo interventricular; VDF: volume diastólico final; FE: fração de ejeção; FENC: fração de encurtamento; VFC variabilidade da frequência cardíaca; HF: *high frequency* - componente parassimpático; LF: *low frequency* – componente simpático; LF/HF: balanço simpátovagal; AT1: receptor de angiotensina II do tipo 1; AT2: receptor de angiotensina II do tipo 2;  $\beta$ 1: receptor adrenérgico do tipo 1; CAT: catalase; XO: xantina oxidase.

Algumas limitações deste estudo podem ser, entretanto, evidenciadas. Considerando a gama de resultados numérica e biologicamente diferentes, porém com diferença quase significativa ou muito próxima à significância estatística, o  $n$  amostral se mostra um importante fator para a detecção e confirmação de diversos achados, como alguns dados ecocardiográficos, contratilidade miocárdica, expressão de algumas proteínas e análise da VFC. Cabe destacar que, muitas das metodologias apresentadas, foram desenvolvidas no período de um ano no laboratório da Dra. Anne Monique Nuyt em Montreal no Canadá, dificultando, dessa forma, a realização de experimentos extras para confirmação de algumas evidências. Ainda, como citado previamente, o modelo experimental utilizado leva ao desenvolvimento de alterações morfo-funcionais leves, semelhante às mudanças evidenciadas em humanos, e um desafio hemodinâmico ou estresse agudo, possivelmente levariam a diferenças mais pronunciadas. O estresse de contenção planejado previamente à realização dos experimentos com o equipamento de telemetria, que possivelmente evidenciaria diferenças significativas na PA, não pôde ser realizado devido a problemas técnicos com o equipamento recém padronizado, levando ao remodelamento do desenho experimental, ficando como perspectiva para próximos estudos do grupo. Ademais, apesar de não significativo, o aumento de peso corporal dos animais tratados com Los sugere a investigação e comparação da gordura corporal desses animais com os animais controle, infelizmente não avaliado neste estudo, bem como sobre o controle da dieta e ingestão de água, considerando a importância do SRA no controle hídrico corporal. Além disso, um estudo prévio do laboratório mostra ausência de danos ou prejuízos ao sistema renal decorrentes do tratamento neonatal com Los. De qualquer forma, se torna

interessante verificar se o mesmo é observado em animais adultos, não verificado neste estudo.

## **7 CONCLUSÃO**

Os achados da presente tese demonstram e sugerem um importante papel do SNA no desenvolvimento programado da doença cardiovascular no adulto, somado ao papel, já evidenciado do SRA no modelo animal estudado e em indivíduos prematuros. Mais ainda, o bloqueio precoce do SRA no período pós-natal se mostrou uma estratégia terapêutica eficaz e benéfica sobre alguns aspectos estudados, tanto em nível tecidual quanto central, em indivíduos já na idade adulta. Considerando que aproximadamente 15 milhões de bebês nascem prematuros anualmente em nível global, o conhecimento dos mecanismos celulares e sistêmicos envolvidos na programação e possível adaptação dos sistemas é de fundamental importância para determinar clinicamente quais indivíduos apresentam maior risco para o desenvolvimento das DCV e para contribuir na elaboração e testagem de novas estratégias preventivas e terapêuticas mais eficazes, elucidando ainda a possibilidade de terapias combinadas.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABITBOL, C. L.; RODRIGUEZ, M. M. The long-term renal and cardiovascular consequences of prematurity. **Nature Reviews Nephrology**, v. 8, n. 5, p. 265–274, 2012.

ADAMS, V. et al. Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease. **Circulation**, v. 111, n. 5, p. 555–562, 2005.

AFANAS'EV, I. ROS and RNS signaling in heart disorders: Could antioxidant treatment be successful? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 293769, 2011.

AINSCOUGH, J. F. X. et al. Angiotensin II type-1 receptor activation in the adult heart causes blood pressure-independent hypertrophy and cardiac dysfunction. **Cardiovascular Research**, v. 81, n. 3, p. 592–600, 2009.

AIRES, M. DE M. **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ASCENSÃO, A. et al. Exercício e stress oxidativo cardíaco. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 22, n. 5, p. 651–678, 2003.

ASKIE, L. M.; HENDERSON-SMART, D. J. Early versus late discontinuation of oxygen in preterm or low birth weight infants. **Cochrane database of systematic reviews**, n. 4, p. CD001076., 2001.

ÁVILA, J. G. O. et al. Impact of oxidative stress during pregnancy on fetal epigenetic patterns and early origin of vascular diseases. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 1, p. 12–21, 2015.

AYE, C. Y. L. et al. Disproportionate cardiac hypertrophy during early postnatal development in infants born preterm. **Pediatric Research**, v. 82, n. 1, p. 36–46, 2017.

BAKER, A. J. Adrenergic signaling in heart failure: A balance of toxic and protective effects. **Pflugers archives: european journal of physiology**, v. 466, n. 6, p. 1139–50, 2014.

BAKOVIC, M. et al. Changes in neurofilament 200 and tyrosine hydroxylase expression in the cardiac innervation of diabetic rats during aging. **Cardiovascular Pathology**, v. 32, p. 38–43, 2018.

BARKER, D. J. P. The fetal and infant origins of disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 25, n. 7, p. 457–463, 1995.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação

entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BECK, S. et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 88, n. 1, p. 31–8, 2010.

BERTAGNOLLI, M. et al. Transient neonatal high oxygen exposure leads to early adult cardiac dysfunction, remodeling, and activation of the Renin-Angiotensin system. **Hypertension**, v. 63, n. 1, p. 143–150, 2014.

BERTAGNOLLI, M. et al. Activation of the cardiac renin-angiotensin system in high oxygen-exposed newborn rats: Angiotensin receptor blockade prevents the developmental programming of cardiac dysfunction. **Hypertension**, v. 67, n. 4, p. 774–82, 2016.

BERTAGNOLLI, M. Preterm Birth and Renin-Angiotensin-Aldosterone System: Evidences of Activation and Impact on Chronic Cardiovascular Disease Risks. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 9, p. 1–6, 2017.

BILLET, S. et al. Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. **Kidney International**, v. 74, n. 11, p. 1379–84, 2008.

BLACKMORE, H. L.; OZANNE, S. E. Programming of cardiovascular disease across the life-course. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 83, p. 122–30, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248–254, 1976.

CAMBONIE, G. et al. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 3, p. R1236-45, 2006.

CARR, H. et al. Preterm Birth and Risk of Heart Failure Up to Early Adulthood. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 21, p. 2634–2642, 2017.

CERUTTI, C. et al. Autonomic nervous system and cardiovascular variability in rats: a spectral analysis approach. **The American journal of physiology**, v. 261, n. 4, p. H1292-9, 1991.

COMPORTI, M. et al. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 5, p. 724–32, 2004.

CONCEA. Conselho Nacional De Controle De Experimentação Animal. **Ministério da Ciência**, n. 25, p. 386, 2015.

CORBI, G. et al. Adrenergic signaling and oxidative stress: A role for sirtuins? **Frontiers in Physiology**, p. 4:324, 2013.

DA SILVA GONÇALVES BOS, D. et al. Contribution of Impaired Parasympathetic Activity to Right Ventricular Dysfunction and Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. **Circulation**, v. 137, n. 9, p. 910–924, 2017.

DASINGER, J. H. et al. Recent Advances in Hypertension Physiological Mechanisms. **Hypertension**, p. 826–831, 2016.

DE SÁ, J. C. F. et al. Variabilidade da frequência cardíaca como método de avaliação do sistema nervosa autônomo na síndrome dos ovários policísticos. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 35, n. 9, p. 421–426, 2013.

DIBONA, G. F.; JONES, S. Y.; BROOKS, V. L. ANG II receptor blockade and arterial baroreflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 269, n. 5, p. R1189–R1196, 1995.

DISTEFANO, G.; SCIACCA, P. Molecular pathogenesis of myocardial remodeling and new potential therapeutic targets in chronic heart failure. **Italian Journal of Pediatrics**, v. 38, 2012.

DONOGHUE, M. et al. A Novel Angiotensin-Converting Enzyme-Related Carboxypeptidase (ACE2) Converts Angiotensin I to Angiotensin 1-9. **Circulation Research**, v. 87, n. 5, p. E1-9, 2000.

DORFMAN, A. et al. Early manifestations of postnatal hyperoxia on the retinal structure and function of the neonatal rat. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, 2008.

FAIRCHILD, K. D. et al. Pathogen-induced heart rate changes associated with cholinergic nervous system activation. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 2, p. R330–R339, 2011.

FAM, S. S.; MORROW, J. D. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation—a review. **Current medicinal chemistry**, v. 10, n. 17, p. 1723–40, 2003.

FARAG, E. et al. An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis. **Anesthesia and Analgesia**, v. 120, n. 2, p. 275–92, 2015.

FERRARLO, C. M. ACE2: More of Ang-(1-7) or less Ang II? **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 20, n. 1, p. 1–6, 2011.

FLECKNELL, P. A. **Pain Management in Animals**. 1. ed. United Kingdom: Saunders Ltd., 2000.

FRANCO, M. C. P. et al. Biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in children born small for gestational age: Evidence of lipid peroxidation. **Pediatric**

**Research**, v. 62, n. 2, p. 204–208, 2007.

FRYAR, C. D.; CHEN, T. C.; LI, X. **Prevalence of uncontrolled risk factors for cardiovascular disease: United States, 1999-2010**. [s.l: s.n.].

GAERTNER, D. J. et al. Anesthesia and Analgesia for Laboratory Rodents. In: **Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals**. [s.l: s.n.]. p. 239–297.

GOLDENBERG, R. L. et al. Epidemiology and causes of preterm birth. **The Lancet**, v. 371, n. 9606, p. 75–84, 2008.

GRIEVE, D. J. et al. Role of oxidative stress in cardiac remodelling after myocardial infarction. **Heart Lung and Circulation**, v. 13, n. 2, p. 132–138, 2004.

GUO, X. et al. Prevention of remodeling in congestive heart failure due to myocardial infarction by blockade of the renin-angiotensin system. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 3, n. 4, p. 717–732, 2005.

HAFSTAD, A. D.; NABEEBACCUS, A. A.; SHAH, A. M. Novel aspects of ROS signalling in heart failure. **Basic Research in Cardiology**, v. 108, n. 4, p. 359, 2013.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v. 219, n. 1, p. 1–14, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 3. ed. [s.l.] Oxford University Press, 1999.

HAMDANI, N.; A. LINKE, W. Alteration of the Beta-Adrenergic Signaling Pathway in Human Heart Failure. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 13, p. 2522–2531, 2012.

HARALDSDOTTIR, K. et al. Impaired autonomic function in adolescents born preterm. **Physiological Reports**, v. 6, n. 6, p. e13620, 2018.

HIKOSAKA, M. et al. Candesartan and arterial baroreflex sensitivity and sympathetic nerve activity in patients with mild heart failure. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 875–880, 2002.

HUYARD, F. et al. Remodeling of Aorta Extracellular Matrix as a Result of Transient High Oxygen Exposure in Newborn Rats : Implication for Arterial Rigidity and Hypertension Risk. **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. 1–9, 2014.

IRIGOYEN, M. C. et al. Hypertension, Blood Pressure Variability, and Target Organ Lesion. **Current Hypertension Reports**, v. 18, n. 4, 2016.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1865–1879, 2006.

JONES, D. P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 295, n. 4, 2008.



- JOSHI, U. et al. Oleoylethanolamide treatment reduces neurobehavioral deficits and brain pathology in a mouse model of Gulf War Illness. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12921, 2018.
- KANE, A. D. et al. Vitamin C Prevents Intrauterine Programming of in vivo Cardiovascular Dysfunction in the Rat. **Circulation Journal**, v. 77, n. 10, p. 2604–11, 2013.
- KANG, P. M. et al. Angiotensin II receptor antagonists: A new approach to blockade of the renin-angiotensin system. **American Heart Journal**, v. 127, n. 5, p. 1388–1401, 1994.
- KATO, E. et al. Effects of supplemental oxygen on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels in extremely low birth weight infants. **Free Radical Research**, v. 48, n. 11, p. 1285–1290, 2014.
- KAUL, N. et al. Free radicals and the heart. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 30, n. 2, p. 55–67, 1993.
- KOENE, R. J. et al. Shared Risk Factors in Cardiovascular Disease and Cancer. **Circulation**, v. 133, n. 11, p. 1104–1114, 2016.
- KOWALSKI, R. R. et al. Elevated Blood Pressure with Reduced Left Ventricular and Aortic Dimensions in Adolescents Born Extremely Preterm. **The Journal of Pediatrics**, v. 172, p. 75- 80.e2, 2016.
- KOZÁK-BÁRÁNY, A. et al. Development of left ventricular systolic and diastolic function in preterm infants during the first month of life: A prospective follow-up study. **Journal of Pediatrics**, v. 139, n. 4, p. 539–545, 2001.
- LANGLEY-EVANS, S. C. et al. Intrauterine programming of hypertension: The role of the renin-angiotensin system. **Biochemical Society Transactions**, v. 27, n. 2, p. 88–93, 1999.
- LANGLEY-EVANS, S. C. Developmental programming of health and disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 1, p. 97–105, 2006.
- LANGLEY-EVANS, S. C.; MCMULLEN, S. Developmental origins of adult disease. **Medical Principles and Practice**, v. 19, n. 2, p. 87–98, 2010.
- LAVOIE, J. L.; SIGMUND, C. D. Minireview: Overview of the renin-angiotensin system - An endocrine and paracrine system. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2179–2183, 2003.
- LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the Probe 2',7'-Dichlorofluorescein as an Indicator of Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 227–231, 1992.
- LEE, J.; GIORDANO, S.; ZHANG, J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: Cross-talk and redox signalling. **Biochemical Journal**, v. 441, n. 2, p. 523–540,

2012.

LEESON, P.; LEWANDOWSKI, A. J. A New Risk Factor for Early Heart Failure: Preterm Birth. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 21, p. 2643–2645, 2017.

LEWANDOWSKI, A. J. et al. Preterm heart in adult life: Cardiovascular magnetic resonance reveals distinct differences in left ventricular mass, geometry, and function. **Circulation**, v. 127, n. 2, p. 197–206, 2013.

LI, J. M.; SHAH, A. M. Endothelial cell superoxide generation: Regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 5 56-5, 2004.

LIANG, C.; OEST, M. E.; PRATER, M. R. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. **Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 86, n. 5, p. 377–384, 2009.

LINDEMAN, J. H. N. et al. Postnatal changes in plasma ceruloplasmin and transferrin antioxidant activities in preterm babies. **Biology of the Neonate**, v. 78, n. 2, p. 73–76, 2000.

LINO, C. A. et al. Maternal hyperthyroidism increases the susceptibility of rat adult offspring to cardiovascular disorders. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 416, p. 1–8, 2015.

LLESUY, S. F. et al. Comparison of lipid peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin in mice. **Tumori**, v. 71, n. 3, p. 241–249, 1985.

LU, J. et al. Angiotensin AT2 receptor stimulation inhibits activation of NADPH oxidase and ameliorates oxidative stress in rotenone model of Parkinson's disease in CATH.a cells. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 47, p. 16–24, 2015.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals , reactive oxygen species , oxidative stresses and their classifications Chemico-Biological Interactions Free radicals , reactive oxygen species , oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, n. April, p. 164–175, 2016.

MA, T. K. W. et al. Renin-angiotensin-aldosterone system blockade for cardiovascular diseases: Current status. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 6, p. 1273–1292, 2010.

MALACHIAS, M. V. B. et al. Concept, epidemiology and primary prevention. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 107, n. 3, p. 1–6, 2016.

MALLIANI, A. et al. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v. 84, n. 2, p. 482–492, 1 ago. 1991.

- MARSHALL, A. C. et al. Antenatal betamethasone exposure is associated with lower ANG-(1-7) and increased ACE in the CSF of adult sheep. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 7, 2013.
- MATHIEU, R. et al. Neonatal exposure to high oxygen levels leads to impaired ischemia-induced neovascularization in adulthood. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- MATIJASEVICH, A. et al. Estimativas corrigidas da prevalência de nascimentos pré-termo no Brasil, 2000 a 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 22, n. 4, p. 557–564, 2013.
- MCCORD, J. M. Free radicals and myocardial ischemia: Overview and outlook. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 4, n. 1, p. 9–14, 1988.
- MENDES GARRIDO ABREGÚ, F. et al. Developmental programming of vascular dysfunction by prenatal and postnatal zinc deficiency in male and female rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 56, p. 89–98, 2018.
- MIKKOLA, K. et al. Fetal growth restriction in preterm infants and cardiovascular function at five years of age. **The Journal of pediatrics**, v. 151, n. 5, p. 494–9, 499.e1–2, 2007.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE/ SVS. **Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM)**. Disponível em: <[www.datasus.gov.br](http://www.datasus.gov.br)>. Acesso em: 27 jul. 2018.
- MIVELAZ, Y. et al. Neonatal oxygen exposure leads to increased aortic wall stiffness in adult rats: A Doppler ultrasound study. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 2, n. 3, p. 184–189, 2011.
- MONTANO, N. et al. Heart rate variability explored in the frequency domain: A tool to investigate the link between heart and behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, n. 2, p. 71–80, 2009.
- MORITZ, K. M. et al. Review: Sex specific programming: A critical role for the renal renin-angiotensin system. **Placenta**, v. 31, n. SUPPL., 2010.
- MOURA, E. C. et al. Research on chronic noncommunicable diseases in Brazil: Meeting the challenges of epidemiologic transition. **Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health**, v. 31, n. 3, p. 240–245, 2012.
- MUKERJEE, S. et al. Perinatal Exposure to Western Diet Programs Autonomic Dysfunction in the Male Offspring. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 38, n. 1, p. 233–242, 2018.
- MURPHY, M. P. et al. Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 361–366, 2011.
- NANDGAONKAR, B. N. et al. Indomethacin improves oxygen-induced retinopathy in

the mouse. **Pediatric Research**, 1999.

NEGI, R. et al. Evaluation of biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity in the cord blood of preterm low birth weight neonates. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 25, n. 8, p. 1338–1341, 2012.

NUYT, A. M. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: Evidence from human studies and experimental animal models. **Clinical Science**, v. 114, n. 1–2, p. 1–17, 2008.

NUYT, A. M. et al. Adult Consequences of Extremely Preterm Birth: Cardiovascular and Metabolic Diseases Risk Factors, Mechanisms, and Prevention Avenues. **Clinics in Perinatology**, v. 44, n. 2, p. 315–332, 2017.

PARK, S. E. et al. Differential heart rate variability and physiological responses associated with accumulated short- and long-term stress in rodents. **Physiology and Behavior**, v. 171, p. 21–31, 2017.

PASSOS-SILVA, D. G.; BRANDAN, E.; SANTOS, R. A. S. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 5, p. 310–20, 2015.

PATURAL, H. et al. Autonomic cardiac control of very preterm newborns : A prolonged dysfunction. **Early Human Development**, v. 84, n. 10, p. 681–687, 2008.

PERINI, R.; VEICSTEINAS, A. Heart rate variability and autonomic activity at rest and during exercise in various physiological conditions. **European Journal of Applied Physiology**, v. 90, n. 3–4, p. 317–325, 2003.

PERRONE, S. et al. Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. **World Journal of Clinical Pediatrics**, v. 5, n. 2, p. 172, 2016.

PHILLIPS, J. B.; ABBOT, P.; ROKAS, A. Is preterm birth a human-specific syndrome? **Evolution, Medicine and Public Health**, v. 2015, n. 1, p. 136–148, 2015.

PLADYS, P. et al. Role of brain and peripheral angiotensin II in hypertension and altered arterial baroreflex programmed during fetal life in rat. **Pediatric Research**, v. 55, n. 6, p. 1042–1049, 2004.

POLJSAK, B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2011.

RAEDSCHELDERS, K.; ANSLEY, D. M.; CHEN, D. D. Y. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 230–255, 2012.

RAJTIK, T. et al. Oxidative activation of CaMKII $\delta$  in acute myocardial ischemia/reperfusion injury: A role of angiotensin AT 1 receptor-NOX2 signaling axis.

**European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 114–122, 2016.

RAJU, T. N. K. et al. Adults born preterm: a review of general health and system-specific outcomes. **Acta Paediatrica**, v. 106, n. 9, p. 1409–1437, 2017.

RAKOW, A. et al. Decreased heart rate variability in children born with low birth weight. **Pediatric Research**, v. 74, n. 3, p. 339–43, 2013.

RAMANI, M. et al. Early exposure to hyperoxia or hypoxia adversely impacts cardiopulmonary development. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 52, n. 5, p. 594–602, 2015.

RASCH, R.; SKRIVER, E.; WOODS, L. L. The role of the RAS in programming of adult hypertension. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 181, n. 4, p. 537–542, 2004.

RIBEIRO, J. M.; FLORÊNCIO, L. P. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT 1. **Rev Bras Hipertens**, v. 7(3); n. 3, p. 293–302, 2000.

ROBLES, N. R.; CEREZO, I.; HERNANDEZ-GALLEGO, R. Renin-angiotensin system blocking drugs. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n. 1, p. 14–33, 2014.

ROGGERO, P. et al. Consequences of prematurity on adult morbidities. **European Journal of Internal Medicine**, v. 24, n. 7, p. 624–626, 2013.

SABUHI, R. et al. Role of the angiotensin II AT2 receptor in inflammation and oxidative stress: Opposing effects in lean and obese Zucker rats. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 300, n. 3, p. F700-6, 2011.

SAHN, D. J. et al. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**, v. 58, n. 6, p. 1072–1083, 1978.

SAMUELSSON, A. M. et al. Evidence for sympathetic origins of hypertension in juvenile offspring of obese rats. **Hypertension**, v. 55, n. 1, p. 176–82, 2010.

SAMUELSSON, A. M. et al. Experimental hyperleptinemia in neonatal rats leads to selective leptin responsiveness, hypertension, and altered myocardial function. **Hypertension**, v. 62, n. 3, p. 627–33, 2013.

SANTOS, R. A. S. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003.

SARTORI, C. et al. Epigenetics in cardiovascular regulation. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 903, p. 55–62, 2016.

SCHENKEL, P. C. et al. Redox-sensitive prosurvival and proapoptotic protein

expression in the myocardial remodeling post-infarction in rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2010.

SCHREUDER, M. F. et al. Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 291, n. 5, p. F1104-7, 2006.

SHARMA, N. M. et al. Decreased nNOS in the PVN leads to increased sympathoexcitation in chronic heart failure: Role for CAPON and Ang II. **Cardiovascular Research**, v. 92, n. 2, p. 348–357, 2011.

SINGAL, P. K. et al. **Oxidative stress status in the transition of hypertrophy to heart failure** *Heart Failure Reviews*, 1999.

SIPOLA-LEPPÄNEN, M. et al. Ambulatory blood pressure and its variability in adults born preterm. **Hypertension**, v. 65, n. 3, p. 615–621, 2015.

SMITH, S. L.; DOIG, A. K.; DUDLEY, W. N. Impaired parasympathetic response to feeding in ventilated preterm babies. **Archives of Disease in Childhood: Fetal and Neonatal Edition**, v. 90, n. 6, p. F505-8, 2005.

SOUTH, A. M. et al. Antenatal corticosteroids and the renin-angiotensin-aldosterone system in adolescents born preterm. **Pediatric Research**, v. 81, n. 1, p. 88–93, 2017.

SPERETTA, G. F. et al. Importance of AT1 and AT2 receptors in the nucleus of the solitary tract in cardiovascular responses induced by a high-fat diet. **Hypertension Research**, v. 42, n. 4, p. 439–449, 2018.

SUTHERLAND, M. R. et al. Preterm birth and hypertension risk: The oxidative stress paradigm. **Hypertension**, v. 63, n. 1, p. 12–18, 2014.

SUZUKI, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 3, p. 266–269, 2018.

TAN, M. Y.; TO, M. Recent advances in the prevention and management of preterm birth. **F1000Prime Reports**, v. 7, 2015.

TOMAT, A. L.; SALAZAR, F. J. Mechanisms involved in developmental programming of hypertension and renal diseases. Gender differences. **Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation**, v. 18, n. 2, p. 63–77, 2014.

TORRES-CUEVAS, I. et al. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. **Redox Biology**, v. 12, p. 674–681, 2017.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Revista brasileira de cirurgia cardiovascular : orgao oficial da Sociedade Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 24, n. 2, p. 205–17, 2009.

VARAGIC, J.; FROHLICH, E. D. Local Cardiac Renin–Angiotensin System:

Hypertension and Cardiac Failure. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 2002.

VELTEN, M. et al. Systemic maternal inflammation and neonatal hyperoxia induces remodeling and left ventricular dysfunction in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24544, 2011.

VENTO, M.; SAUGSTAD, O. D. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine Resuscitation of the term and preterm infant. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 216–222, 2010.

VINTURACHE, A. E.; SMITH, F. G. Angiotensin type 1 and type 2 receptors during ontogeny: Cardiovascular and renal effects. **Vascular Pharmacology**, v. 63, n. 3, p. 145–154, 2014.

WALLUKAT, G. The  $\beta$ -adrenergic receptors. **Herz**, v. 27, n. 7, p. 683–690, 2002.

WANG, Y.; SETO, S. W.; GOLLEDGE, J. Angiotensin II, Sympathetic nerve activity and chronic heart failure. **Heart Failure Reviews**, v. 19, n. 2, p. 187–198, 2014.

WASHBURN, L. K. et al. The renin–angiotensin–aldosterone system in adolescent offspring born prematurely to mothers with preeclampsia. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 3, p. 529–38, 2015.

WATANABE, I. K. M. et al. Up-regulation of renal renin-angiotensin system and inflammatory mechanisms in the prenatal programming by low-protein diet: Beneficial effect of the post-weaning losartan treatment. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 5, p. 530–535, 2018.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preterm birth**. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/preterm\\_birth/en/](http://www.who.int/topics/preterm_birth/en/)>. Acesso em: 27 jul. 2018.

WRIGHT, J. W.; MIZUTANI, S.; HARDING, J. W. Pathways involved in the transition from hypertension to hypertrophy to heart failure. Treatment strategies. **Heart Failure Reviews**, v. 13, n. 3, p. 367–375, 2008.

WU, L. et al. High sucrose intake during gestation increases angiotensin II type 1 receptor-mediated vascular contractility associated with epigenetic alterations in aged offspring rats. **Peptides**, v. 86, p. 133–144, 2016.

XIAO, D. et al. Antenatal Antioxidant Prevents Nicotine-Mediated Hypertensive Response in Rat Adult Offspring1. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 3, 2015.

XU, Q. et al. Myocardial oxidative stress contributes to transgenic  $\beta$  2 - adrenoceptor activation-induced cardiomyopathy and heart failure. **British Journal of Pharmacology**, v. 162, n. 5, p. 1012–28, 2011.

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

YZYDORCZYK, C. et al. Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood. **Hypertension**, v. 52, n. 5, p. 889–95, 2008.

YZYDORCZYK, C. et al. Developmental programming of eNOS uncoupling and enhanced vascular oxidative stress in adult rats after transient neonatal oxygen exposure. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 8–16, 2013.

ZUCKER, I. H.; XIAO, L.; HAACK, K. K. V. The central renin-angiotensin system and sympathetic nerve activity in chronic heart failure. **Clinical Science**, v. 126, n. 10, p. 695–706, 2014.



## 9 APÊNDICES

### 9.1 Artigo 1

European Journal of Pharmacology xxx (xxxx) xxx-xxx



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

journal homepage: <http://ees.elsevier.com>



Full length article

#### Impact of early life AT<sub>1</sub> blockade on adult cardiac morpho-functional changes and the renin-angiotensin system in a model of neonatal high oxygen-induced cardiomyopathy

Jéssica Hellen Poletto Bonetto<sup>a,b</sup>, Rafael Oliveira Fernandes<sup>a</sup>, Daniela Ravizzoni Dartora<sup>a</sup>, Adrien Flahault<sup>a</sup>, Aurélie Sonea<sup>a</sup>, Ying He<sup>a</sup>, Anik Cloutier<sup>a</sup>, Adriane Belló-Klein<sup>b</sup>, Anne Monique Nuyt<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Sainte-Justine University Hospital and Research Center, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada

<sup>b</sup> Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Keywords

Preterm birth  
Hyperoxia  
Cardiac  
Renin angiotensin system  
Cardiomyopathy  
Developmental programming

#### ABSTRACT

We previously reported that neonatal blockade of angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor prevents cardiac changes in 4 weeks rats with neonatal hyperoxia-induced cardiomyopathy, a recognized model of prematurity-related deleterious conditions. Considering the importance of AT<sub>1</sub> receptor and the renin angiotensin system (RAS) in normal development, the present study aimed to investigate the adult effects of neonatal AT<sub>1</sub> blockade on left ventricle (LV) in rats exposed to neonatal hyperoxia. Sprague-Dawley pups were exposed to 80% O<sub>2</sub> or room air from days 3–10. AT<sub>1</sub> blocker (losartan) or H<sub>2</sub>O were given by gavage from day 8–10. LV function (echo and intraventricular pressure), histology and expression of RAS components were examined in 15–16 weeks old adult males. Losartan treatment prevented myocardial fibrosis, LV wall thickening and stroke volume reduction in rats exposed to high O<sub>2</sub> in the neonatal period. However, Losartan treatment of O<sub>2</sub>-exposed pups led to reduced ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS), and did not prevent changes in diastolic function. Losartan also did not prevent increased LV AT<sub>2</sub> and decreased angiotensin-(1–7) Mas receptors expression observed in high O<sub>2</sub>-exposed rats. Neonatal Losartan attenuated long-term impact of neonatal hyperoxia but also led to decreased EF and FS. Increased AT<sub>2</sub> and decreased Mas receptor expression observed in O<sub>2</sub>-exposed group were unaffected by Losartan treatment. Our results show that early life Losartan treatment aimed at preventing cardiac consequences of neonatal deleterious conditions may also comprise detrimental effects that require further investigation prior to clinical translation in developing children.

#### 1. Introduction

Preterm birth (before 37 completed weeks of gestation) affects nearly 10% of live births worldwide (Beck et al., 2010). Survival rates of preterm infants have markedly improved over the past three decades due to the advances in obstetrical and neonatal clinical intensive care (Raju et al., 2017), leading to an increasing number of adults who were born preterm and very preterm (<32 weeks of gestation). Several evidence show that these individuals are more likely to develop cerebrovascular, renal, and cardiovascular disease in adulthood, including hypertension and higher risk of heart failure and cardiovascular mortality (Carr et al., 2017; Raju et al., 2017; Roggero et al., 2013; Sutherland et al., 2014). There is, accordingly, an increased awareness at providing this newly identified at-risk population with early preventive therapies.

Adolescents and young adults born very preterm display changes in cardiac shape and mass, and impaired diastolic function (Kowalski et

al., 2016; Lewandowski et al., 2013). Mimicking the findings from clinical studies, experimental models of preterm birth-related conditions, including our rodent studies of neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>)-exposure, show cardiomyocytes hypertrophy, fibrosis, and impaired left ventricle (LV) function (Bensley et al., 2018; Bertagnonli et al., 2016, 2014). Expression of AT<sub>1</sub> in cardiac LV is increased in newborn exposed to high O<sub>2</sub> (80% FiO<sub>2</sub> from day 3–10 of life), and persists elevated at juvenile (4 weeks) and adult (16 weeks) rats (Bertagnonli et al., 2016, 2014). We previously reported that AT<sub>1</sub> blockade during the neonatal period prevents the increased cardiac AT<sub>1</sub> expression, hypertrophy and fibrosis, and improves systolic function of 4 weeks old animals exposed to neonatal hyperoxia (Bertagnonli et al., 2016); whether the cardio-protective effects of neonatal AT<sub>1</sub> blockade observed in juvenile rats remains in adulthood has not been studied. Considering the RAS participates in normal cardiac development, it is important to determine the adult cardiac effect of transient early life AT<sub>1</sub>

\* Corresponding author. Sainte-Justine University Hospital Research Center, 3175 Chemin de la Côte-Sainte Catherine, Office 5.17.026, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada.  
Email address: [anne-monique.nuyt@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:anne-monique.nuyt@recherche-ste-justine.qc.ca) (A.M. Nuyt)

**Impact of early life AT<sub>1</sub> blockade on adult cardiac morpho-functional changes and the renin-angiotensin system in a model of neonatal high oxygen-induced cardiomyopathy**

Jéssica Hellen POLETTO BONETTO<sup>a,b</sup>, Rafael O FERNANDES<sup>a</sup>, Daniela R DARTORA<sup>a</sup>,  
Adrien FLAHAULT<sup>a</sup>, Aurélie SONEA<sup>a</sup>, Ying HE<sup>a</sup>, Anik CLOUTIER<sup>a</sup>, Adriane BELLÓ-  
KLEIN<sup>b</sup>, Anne Monique NUYT<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Sainte-Justine University Hospital and Research Center, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada

<sup>b</sup> Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, Brazil.

**Corresponding Author:** Dr. Anne Monique Nuyt  
Sainte-Justine University Hospital Research Center  
3175 Chemin de la Côte-Sainte Catherine, Office 5.17.026  
Montréal, Québec, Canada H3T 1C5  
Phone: +1 514 345 4931, ext 6146  
e-mail: [anne-monique.nuyt@recherche-ste-justine.qc.ca](mailto:anne-monique.nuyt@recherche-ste-justine.qc.ca)

**Word count:** 5219

**Tables:** 1

**Figures:** 5

**Supplemental File:** 1

## Abstract

We previously reported that neonatal blockade of angiotensin II AT<sub>1</sub> receptor prevents cardiac changes in 4 weeks rats with neonatal hyperoxia-induced cardiomyopathy, a recognized model of prematurity-related deleterious conditions. Considering the importance of AT<sub>1</sub> receptor and the renin angiotensin system (RAS) in normal development, the present study aimed to investigate the adult effects of neonatal AT<sub>1</sub> blockade on left ventricle (LV) in rats exposed to neonatal hyperoxia.

Sprague-Dawley pups were exposed to 80% O<sub>2</sub> or room air from days 3-10. AT<sub>1</sub> blocker (losartan) or H<sub>2</sub>O were given by gavage from day 8 to 10. LV function (echo and intraventricular pressure), histology and expression of RAS components were examined in 15-16 weeks old adult males.

Losartan treatment prevented myocardial fibrosis, LV wall thickening and stroke volume reduction in rats exposed to high O<sub>2</sub> in the neonatal period. However, Losartan treatment of O<sub>2</sub>-exposed pups led to reduced ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS), and did not prevent changes in diastolic function. Losartan also did not prevent increased LV AT<sub>2</sub> and decreased angiotensin-(1-7) Mas receptors expression observed in high O<sub>2</sub>-exposed rats.

Neonatal Losartan attenuated long-term impact of neonatal hyperoxia but also led to decreased EF and FS. Increased AT<sub>2</sub> and decreased Mas receptor expression observed in O<sub>2</sub>-exposed group were unaffected by Losartan treatment. Our results show that early life Losartan treatment aimed at preventing cardiac consequences of neonatal deleterious conditions may also comprise detrimental effects that require further investigation prior to clinical translation in developing children.

**Keywords:** preterm birth, hyperoxia, cardiac, renin angiotensin system, cardiomyopathy, developmental programming.

## 1. Introduction

Preterm birth (before 37 completed weeks of gestation) affects nearly 10% of live births worldwide (Beck et al., 2010). Survival rates of preterm infants have markedly improved over the past three decades due to the advances in obstetrical and neonatal clinical intensive care (Raju et al., 2017), leading to an increasing number of adults who were born preterm and very preterm (<32 weeks of gestation). Several evidence show that these individuals are more likely to develop cerebrovascular, renal, and cardiovascular disease in adulthood, including hypertension and higher risk of heart failure and cardiovascular mortality (Carr et al., 2017; Raju et al., 2017; Roggero et al., 2013; Sutherland et al., 2014). There is, accordingly, an increased awareness at providing this newly identified at-risk population with early preventive therapies.

Adolescents and young adults born very preterm display changes in cardiac shape and mass, and impaired diastolic function (Kowalski et al., 2016; Lewandowski et al., 2013). Mimicking the findings from clinical studies, experimental models of preterm birth-related conditions, including our rodent studies of neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>)-exposure, show cardiomyocytes hypertrophy, fibrosis, and impaired left ventricle (LV) function (Bensley et al., 2018; Bertagnolli et al., 2016, 2014). Expression of AT<sub>1</sub> in cardiac LV is increased in newborn exposed to high O<sub>2</sub> (80% FiO<sub>2</sub> from day 3-10 of life), and persists elevated at juvenile (4 weeks) and adult (16 weeks) rats (Bertagnolli et al., 2016, 2014). We previously reported that AT<sub>1</sub> blockade during the neonatal period prevents the increased cardiac AT<sub>1</sub>

expression, hypertrophy and fibrosis, and improves systolic function of 4 weeks old animals exposed to neonatal hyperoxia (Bertagnolli et al., 2016); whether the cardio-protective effects of neonatal AT<sub>1</sub> blockade observed in juvenile rats remains in adulthood has not been studied. Considering the RAS participates in normal cardiac development, it is important to determine the adult cardiac effect of transient early life AT<sub>1</sub> blockade before designing clinical trials that could be considered for preterm born subjects.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animal Model**

Litters with Sprague–Dawley pups obtained from Charles River laboratories (Saint-Constant, QC, Ca) were kept with their mother in 80% O<sub>2</sub> using an oxycycler (ProOx P110, Biosherix, Lacona, NY) from postnatal day (P) 3 to 10 of life (group O<sub>2</sub>-exposed) or room air (Control group) as previously described (Bertagnolli et al., 2016, 2014; Yzydorczyk et al., 2008). To avoid possible maternal morbidity associated with O<sub>2</sub> toxicity, the O<sub>2</sub>-exposed mothers were interchanged every 12 h with a surrogate mother from another litter kept at room air. This procedure was previously demonstrated by our group not to affect pup growth or survival (Yzydorczyk et al., 2008). For last 3 days of O<sub>2</sub> exposure (from P8 to P10), pups were treated by gavage with tap water or the AT<sub>1</sub> blocker, losartan potassium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (20 mg/kg/day) (Bertagnolli et al., 2016), dissolved in water to a final administration volume of 50 µl. We previously showed that this therapeutic time frame did not impact on nephrogenesis which proceeds up to 7 days postnatal in rats (Schreuder et al., 2006). Following the same protocol, room-air pups were gavaged with water (sham controls). Pups were weaned at 3 weeks to regular chow. The animals were then housed in individually

ventilated cages (394 x 346 x 213 mm), 2 – 4 animals/cage, in a room of constant temperature (22°C) with a 12:12-h light-dark cycle and provided with rat chow (Envigo 2918 Teklad Global 18% Protein Rodent Diet; Lachine, QC, Ca) and water *ad libitum*. Only male offspring were studied and no more than 3 rats were used per treatment in each litter (4 litters/group, establishing a total n=12 rats/group/age). Animals were weighed weekly until 16 weeks of age. All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of the Sainte-Justine University Hospital (CHU Sainte Justine) Research Center (protocol number 513-C) and followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and the National Institutes of Health (NIH) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

## **2.2 Echocardiographic analysis**

At 15 weeks, LV morphology and function were assessed under anesthesia using echocardiography, as previously described (Bertagnolli et al., 2016), with a high-resolution microimaging Vevo 3100 system (Fujifilm Visualsonics<sup>®</sup>, Toronto, ON, Canada). All echocardiographic assessments were done by a single operator, blinded to the treatment groups. See also Supplemental Methods.

## **2.3 Intraventricular pressures measurement**

Left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), heart rate (HR), and the contractility (+dP/dt) and relaxation (-dP/dt) indexes were measured in anesthetized 16-week-old animals using intraventricular polyethylene catheter (P50) inserted through the right carotid artery and coupled to a pressure transducer (TSD104A, Biopac Systems, Inc.). The analogic pressure data (mmHg) was acquired and digitalized using the AcqKnowledge 4.2 software (Biopac Systems, Inc.).

## 2.4 Tissue Processing

Immediately after intraventricular assessment, hearts were rapidly removed under isoflurane anesthesia (4:1 O<sub>2</sub>), washed in potassium chloride (100 mM KCl in saline) to induce diastolic arrest, and weighed. Atria were removed and the heart was transversely (short axis) cut; the basal LV was fixed for 24-48 h in 4% paraformaldehyde. The remaining LV tissue was immediately frozen in liquid nitrogen.

## 2.5 Western Blotting

LV proteins were subjected to one-dimensional polyacrylamide gel (Invitrogen Bolt 4-12% Bis-Tris Plus, Thermo Fisher) electrophoresis using the following polyclonal IgG primary antibodies: antibodies against AT<sub>1</sub> (ab9391, 1/1,000 dilution, Abcam, Cambridge, MA), AT<sub>2</sub> (sc-9040, 1/1,000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), angiotensin-(1-7) Mas receptor (Mas) (AAR-013, 1/1,000 dilution, Alomone, Jerusalem, Israel), angiotensin converting enzyme (ACE) (sc-12187, 1/500 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), angiotensin converting enzyme type 2 (ACE2) (ab108252, 1/1,000 dilution, Abcam, Cambridge, MA), myosin heavy chain (MHC) (ab15, 1/2,000 dilution, Abcam, Cambridge, MA) and transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ 1) (ab64715, 1/1,000 dilution, Abcam, Cambridge, MA). Antibodies against  $\beta$ -tubulin (T0198, 1/1,000 dilution, Sigma-Aldrich Canada Co., Oakville, ON) and GAPDH (sc-20357, 1/1,000 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) were chosen as control based on the molecular weight of the protein of interest. See also Supplemental Methods.

## 2.6 Histological Analysis

Five  $\mu\text{m}$  sections were stained with hematoxylin and eosin, and Masson's Trichrome for the evaluation of cardiomyocyte surface area and cardiac fibrosis, respectively, as previously described (Bertagnolli et al., 2014).

## 2.7 Statistical Analysis

Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.) in the table and figures. Comparisons between groups were performed using analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O using Dunnett's method. *P* for trend was obtained using a test for linear trend. The software GraphPad Prism version 6.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA), Sigma Plot 12.0 and IBM SPSS Statistics 24.0 were used for the tests performed. The significance level was established at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Morphometric parameters

Table 1 shows the morphometric parameters of 16 weeks-old adult male rats exposed to room air (Control) or neonatal high O<sub>2</sub> treated with Losartan (O<sub>2</sub>-exposed + Los) or water (O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O). Adult body weight and tibia length (marker of growth) were similar between groups, as well as lung, liver and kidney weights, and each of these organ weight to body weight ratio (Supplemental Table S1).



### 3.2 Markers of hypertrophy and fibrosis

Neonatal Losartan treatment prevented the increased LV tissue fibrosis assessed at histology in O<sub>2</sub>-exposed rats (Figure 1D and E). A similar trend was observed with the expression of TGF-β1, a marker of fibrosis (Figure 1 F). Heart weight and hypertrophy indexes (heart weight to body weight, and heart weight to tibia length) were similar between groups (Table 1). Histologically, LV cardiomyocyte cross-sectional surface area was increased in O<sub>2</sub>-exposed compared to controls and was unaffected by neonatal Losartan (Figure 1A and B). MHC expression, a marker of cardiomyocyte hypertrophy, presented a similar pattern of response to the neonatal interventions (Figure 1C). Echocardiographically (Figure 2), parameters showed that, compared to controls, O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O animals had a significantly higher LV posterior wall thickness and a marginally higher ( $P = 0.06$ ) interventricular septum thickness, another marker of hypertrophy. Neonatal treatment with Losartan was associated with lower interventricular septum thickness, but similar LV posterior wall thickness, as compared to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O animals (Fig. 2).

### 3.3 Systolic cardiac function

Sixteen-weeks old rats exposed to high O<sub>2</sub> in the neonatal period did not show a significant impairment in measures of LV systolic function cardiac output and contractility index. However, LVID and stroke volume were lower in O<sub>2</sub>-exposed vs. control rats and were significantly increased in O<sub>2</sub>-exposed Losartan-treated animals compared to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O animals. Losartan-treated animals had the lowest EF and FS values of all three groups ( $P$  for trend, 0.03) (Fig. 3).

### 3.4 Diastolic function

Neonatal O<sub>2</sub> exposure was associated with mild alterations in diastolic function (non-significant increase) ( $P = 0.06$ ) in LVEDP and significant ( $P = 0.04$ ) decrease in the relaxation index ( $-dP/dT$ ) in O<sub>2</sub>-exposed rats versus controls). We observed no difference between the O<sub>2</sub>-exposed rats receiving water and Losartan for these parameters, showing that neonatal Losartan treatment did not significantly improve diastolic function in 16-weeks old O<sub>2</sub>-exposed rats (Fig. 4).

### 3.5 Left ventricular renin-angiotensin components expression (Fig. 5)

In the current study, AT<sub>1</sub> expression did not significantly differ between groups. LV AT<sub>2</sub> expression was significantly increased in O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O animals and the highest in O<sub>2</sub>-exposed + Losartan. Mas receptor expression was significantly reduced in O<sub>2</sub>-exposed and remained reduced in O<sub>2</sub>-exposed + Losartan. ACE and ACE2 protein were similarly expressed in all groups.

## 4. Discussion

The current study examined the impact of early life AT<sub>1</sub> blockade on adult 16-week-old rats cardiac morpho-functional parameters and RAS components expression after neonatal high-O<sub>2</sub> exposure.

In brief, early-life Losartan treatment in rats exposed to high O<sub>2</sub> in the neonatal period prevented myocardial fibrosis, LV wall thickening and stroke volume reduction. However, Losartan treatment of O<sub>2</sub>-exposed pups led to reduced EF and FS, and did not prevent changes in diastolic function. Losartan also did not prevent increased LV AT<sub>2</sub> and decreased Mas receptors expression observed in high O<sub>2</sub>-exposed rats.

Overall, echocardiographic and intraventricular pressures data along with morphometric parameters can be compared with previous studies from our as well as other groups and indicate that neonatal high O<sub>2</sub> exposure leads to adult cardiac dysfunction and structural changes (Bertagnolli et al., 2016, 2014; Ramani et al., 2015; Velten et al., 2011). The aim of this study was to determine if the favorable LV changes observed at age 28 days in O<sub>2</sub>-exposed animals receiving a transient AT<sub>1</sub> blockade in the neonatal period would perpetuate later in life. Interestingly, compared to our previous study reporting adult LV impact of neonatal O<sub>2</sub>-exposure (Bertagnolli et al., 2014), current results differ on certain aspects: we do not observe differences in cardiac hypertrophy index heart to body weight ratio that were observed earlier in life in O<sub>2</sub>-exposed rats. We observed a reduction in LVID, which was not observed in our previous study. It is possible that the older age of the rats in the current study (16 vs. 12 weeks) could explain the attenuated cardiac changes observed in this model. We are not aware of other studies examining longer-term LV impact of transient neonatal high O<sub>2</sub> exposure. At the level of RAS expression, contrary to our observation at 4 and 12 weeks, AT<sub>1</sub> expression was not significantly increased in 16 weeks O<sub>2</sub>-exposed rats so that the reduced AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> ratio results from significantly increased AT<sub>2</sub>.

We had previously reported that transient blockade of AT<sub>1</sub> receptors during neonatal exposure to high O<sub>2</sub> could prevent LV hypertrophy, fibrosis and dysfunction in juvenile 4 weeks old rats. The current study shows that some of the beneficial effects of AT<sub>1</sub> blockade remain present in adult rats, with prevention of fibrosis, LV wall thickening and systolic dysfunction (stroke volume). However, neonatal Losartan treatment was also associated with possibly deleterious effects, including reduction in EF and FS in the O<sub>2</sub>-exposed + Losartan groups. The latter was observed despite normalization of stroke volume, and was associated with an increase in LV internal diameter and EDV compared to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O. We

postulate that the prevention of fibrosis and adverse remodeling by Losartan lead to relatively larger LV (LVID and EDV) with resulting lower EF and FS; alternatively, whether this also reflects alteration in mechanisms enabling the heart to mount a hypertrophic response to (patho)physiological stimuli remains to be studied. Overall, the pattern of the response to O<sub>2</sub> exposure and Losartan was similar for LVPW and IVS although response to Losartan reached statistical significance only for IVS. Interestingly, these observations can be paralleled to the reports in subjects with cardiac hypertrophic disease showing a more pronounced LV diastolic impairment and hypertrophy at the basal septum compared to the other LV walls (Galderisi et al., 1999; Yalçin et al., 2015).

As per current knowledge, the RAS consists of two antagonistic branches: the angiotensin converting enzyme (ACE)/AngII/AT<sub>1</sub> receptor pro-hypertrophy and fibrosis pathway, and the ACE2/Ang(1-7)/Mas receptor antifibrotic cardioprotective counter-regulatory pathway (Lautner et al., 2013; Passos-Silva et al., 2013). In adults, the pharmacological blockade of AngII/ AT<sub>1</sub> is a well-established clinical treatment of cardiac hypertrophy and heart failure (Stojiljkovic and Behnia, 2007; Yancy et al., 2013). Cardioprotective effects of AT<sub>1</sub> blockage are mediated by direct prevention of hypertrophic and fibrotic signaling pathways, as well as by reciprocal activation of the ACE2/Mas arm and, in some reports, increased in AT<sub>2</sub> expression and activity (Passos-Silva et al., 2015). In O<sub>2</sub>-exposed 4-weeks old rats, we previously reported that neonatal Losartan treatment was associated with a decrease in cardiac AT<sub>1</sub> expression and an increase in AT<sub>2</sub> expression leading to a decrease in the AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> ratio. The results we obtained in adult rats were consistent with the findings obtained at 4 weeks, showing that transient early-life Losartan treatment induces a prolonged modification of the RAS pathway. However, Losartan did not significantly impact AT<sub>1</sub> expression at 16 weeks. Other studies also report increased AT<sub>2</sub> expression in response to cardiac anti-hypertrophy

and anti-fibrotic treatments (Namsolleck et al., 2014; Pang et al., 2015). A specific role for AT<sub>2</sub> in decreasing/preventing organ fibrosis has been increasingly studied and demonstrated in pre-clinical models (Y. Wang et al., 2017). Additional studies are required to determine the definite role of AT<sub>2</sub> in programming cardiac changes after deleterious, prematurity-related, neonatal conditions.

Our results showed that transient neonatal O<sub>2</sub>-exposure led to a significant decrease in cardiac Mas protein expression, which is, to our knowledge, a first study examining impact of perinatal conditions (or programming) on adult cardiac Mas expression. The interaction of angiotensin-(1–7) with Mas mediates its cardiac anti-proliferative and anti-fibrotic effects (Farag et al., 2015; J. Wang et al., 2017). In the current study, neonatal Losartan did not prevent the decreased Mas expression of O<sub>2</sub>-exposed rats. ACE2 protein expression was not modulated by neonatal high O<sub>2</sub> exposure or Losartan treatment. Our data corroborates the study of Klimas et al., which showed that the continuous Losartan administration (prenatally to 9 weeks of age) in spontaneously hypertensive rats prevented LV hypertrophy but did not influence the reduced Mas mRNA expression (Klimas et al., 2015). Similarly, Zong et al. demonstrated that Losartan treatment of male rats with adriamycin-induced heart failure, improved cardiac function, reversed the increased AT<sub>1</sub> expression, but did not modify the reduced Mas expression (Zong et al., 2011).

Clinically, a growing body of evidence shows that preterm birth is linked to altered myocardial shape and function. At age 5, preterm children exhibit increased interventricular septum thickness and smaller LV diameters compared to term, indicative of premature hypertrophy (Mikkola et al., 2007). Young adults born very preterm, detailed imaging studies showed altered cardiac shape and LV mass with shorter ventricle and smaller internal diameter, and impaired systolic and diastolic function (Kowalski et al., 2016; Lewandowski et

al., 2013). In both clinical and experimental studies, cardiac changes prevail independently from blood pressure which nevertheless is significantly increased in preterm born individuals (Kowalski et al., 2016; Lewandowski et al., 2013). Effective treatment strategies for cardiac remodeling and dysfunction need to be determined to prevent premature cardiac disease in this population. Considering prevention and early intervention is preferable to therapies initiated when the disease is established, and considering the importance of RAS in developmental programming of cardiovascular dysfunction but also in normal development, it is of utmost importance to examine carefully in preclinical studies the long-term consequences of early life RAS modulation.

## **5. Conclusion**

In summary, our data provide evidence that brief neonatal AT<sub>1</sub> receptor blockade attenuated long-term structural and functional impact of neonatal high O<sub>2</sub>-exposure but also led to reduced EF and FS. Increased LV AT<sub>2</sub> and decreased Mas receptor expression observed in high O<sub>2</sub>-exposed group were unaffected by Losartan treatment. Our results show that early life Losartan treatment aimed at preventing cardiac consequences of neonatal deleterious conditions may also comprise detrimental effects that require further investigation prior to clinical translation in developing children. Indeed, as a number of preclinical studies have demonstrated the role of RAS -and the benefit of RAS blockade- in fetal and neonatal origins of cardiovascular diseases (Dasinger et al., 2016), preventive and therapeutic strategies are being considered (Tain et al., 2018). Current and other studies examining adult impact of early life RAS blockade indicate that optimal time window to initiate treatment, and which arm of the RAS to target, warrants further studies before clinical trials in very young children are considered (Walton et al., 2018).

**Acknowledgements:**

We acknowledge the technical assistance from Marie-Ève Brien, Thuy-An Mai Vo, Camille Girard-Bock, and Amy Al Simaani, and intellectual contribution from Prof. Dr. Alex Sander da Rosa Araujo.

**Funding:** This work was supported by research grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR 220771), the Heart and Stroke Foundation, and the Canada Foundation for Innovation (all to AMN), and by scholarship awards from the Brazilian Research Agency, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FQRNT) and Global Affairs Canada to JHPB, the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) to DRD and AF, the FRQNT and FRQS to ROF, and a Mach-Gaensslen Foundation of Canada to AS.

**Conflicts of Interest:** The authors have no conflicts of interest to disclose.

**References**

- Beck, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A.P., Merialdi, M., Requejo, J.H., Rubens, C., Menon, R., Van Look, P.F., 2010. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bull World Heal. Organ* 88, 31–8.  
<https://doi.org/10.2471/BLT.08.062554>
- Bensley, J.G., Moore, L., De Matteo, R., Harding, R., Black, M.J., 2018. Impact of preterm birth on the developing myocardium of the neonate. *Pediatr Res* 83, 880–888.  
<https://doi.org/10.1038/pr.2017.324>
- Bertagnolli, M., Dios, A., Béland-Bonenfant, S., Gascon, G., Sutherland, M., Lukaszewski,

- M.A., Cloutier, A., Paradis, P., Schiffrin, E.L., Nuyt, A.M., 2016. Activation of the cardiac renin-angiotensin system in high oxygen-exposed newborn rats: Angiotensin receptor blockade prevents the developmental programming of cardiac dysfunction. *Hypertension* 67, 774–82. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.06745>
- Bertagnolli, M., Huyard, F., Cloutier, A., Anstey, Z., Huot-Marchand, J.É., Fallaha, C., Paradis, P., Schiffrin, E.L., Deblois, D., Nuyt, A.M., 2014. Transient neonatal high oxygen exposure leads to early adult cardiac dysfunction, remodeling, and activation of the Renin-Angiotensin system. *Hypertension* 63, 143–150. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01760>
- Carr, H., Cnattingius, S., Granath, F., Ludvigsson, J.F., Edstedt Bonamy, A.K., 2017. Preterm Birth and Risk of Heart Failure Up to Early Adulthood. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 2634–2642. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.03.572>
- Dasinger, J.H., Davis, G.K., Newsome, A.D., Alexander, B.T., 2016. Recent Advances in Hypertension Physiological Mechanisms. *Hypertension* 826–831. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06603>
- Farag, E., Maheshwari, K., Morgan, J., Sakr Esa, W.A., Doyle, D.J., 2015. An update of the role of renin angiotensin in cardiovascular homeostasis. *Anesth. Analg.* <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000000528>
- Galderisi, M., Caso, P., Severino, S., Petrocelli, A., De Simone, L., Izzo, A., Mininni, N., De Divitiis, O., 1999. Myocardial diastolic impairment caused by left ventricular hypertrophy involves basal septum more than other walls: Analysis by pulsed Doppler tissue imaging. *J. Hypertens.* 17, 685–693. <https://doi.org/10.1097/00004872->



199917050-00013

- Klimas, J., Olvedy, M., Ochodnicka-Mackovicova, K., Kruzliak, P., Cacanyiova, S., Kristek, F., Krenek, P., Ochodnický, P., 2015. Perinatally administered losartan augments renal ACE2 expression but not cardiac or renal Mas receptor in spontaneously hypertensive rats. *J Cell Mol Med* 19, 1965–1974. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12573>
- Kowalski, R.R., Beare, R., Doyle, L.W., Smolich, J.J., Cheung, M.M.H., Callanan, C., Davis, N., De Luca, C.R., Duff, J., Hutchinson, E., Kelly, E., McDonald, M., Molloy, C., Wilson-Ching, M., Anderson, P., Burnett, A., Carse, E., Charlton, M.P., Hayes, M., Kelly, E., Opie, G., Watkins, A., Williamson, A., Woods, H., Roberts, G., Robertson, C., Wood, S., 2016. Elevated Blood Pressure with Reduced Left Ventricular and Aortic Dimensions in Adolescents Born Extremely Preterm. *J. Pediatr.* 172, 75-80.e2. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2016.01.020>
- Lautner, R.Q., Villela, D.C., Fraga-Silva, R.A., Silva, N., Verano-Braga, T., Costa-Fraga, F., Jankowski, J., Jankowski, V., Sousa, F., Alzamora, A., Soares, E., Barbosa, C., Kjeldsen, F., Oliveira, A., Braga, J., Savergnini, S., Maia, G., Peluso, A.B., Passos-Silva, D., Ferreira, A., Alves, F., Martins, A., Raizada, M., Paula, R., Motta-Santos, D., Kemplin, F., Pimenta, A., Alenina, N., Sinisterra, R., Bader, M., Campagnole-Santos, M.J., Santos, R.A.S., 2013. Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. *Circ. Res.* 112, 1104–11. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301077>
- Lewandowski, A.J., Augustine, D., Lamata, P., Davis, E.F., Lazdam, M., Francis, J., McCormick, K., Wilkinson, A.R., Singhal, A., Lucas, A., Smith, N.P., Neubauer, S.,

- Leeson, P., 2013. Preterm heart in adult life: Cardiovascular magnetic resonance reveals distinct differences in left ventricular mass, geometry, and function. *Circulation* 127, 197–206. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.126920>
- Mikkola, K., Leipälä, J., Boldt, T., Fellman, V., 2007. Fetal growth restriction in preterm infants and cardiovascular function at five years of age. *J Pediatr* 151, 494–9, 499.e1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2007.04.030>
- Namsolleck, P., Recarti, C., Foulquier, S., Steckelings, U.M., Unger, T., 2014. AT(2) receptor and tissue injury: therapeutic implications. *Curr Hypertens Rep* 16, 416. <https://doi.org/10.1007/s11906-013-0416-6>
- Pang, X.F., Zhang, L.H., Bai, F., Wang, N.P., Garner, R.E., McKallip, R.J., Zhao, Z.Q., 2015. Attenuation of myocardial fibrosis with curcumin is mediated by modulating expression of angiotensin II AT1/AT2 receptors and ACE2 in rats. *Drug Des Devel Ther* 9, 6043–6054. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S95333>
- Passos-Silva, D.G., Brandan, E., Santos, R.A.S., 2015. Angiotensins as therapeutic targets beyond heart disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 36, 310–20. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.03.001>
- Passos-Silva, D.G., Verano-Braga, T., Santos, R.A.S., 2013. Angiotensin-(1–7): beyond the cardio-renal actions. *Clin. Sci.* 124, 443–56. <https://doi.org/10.1042/CS20120461>
- Raju, T.N.K., Buist, A.S., Blaisdell, C.J., Moxey-Mims, M., Saigal, S., 2017. Adults born preterm: a review of general health and system-specific outcomes. *Acta Paediatr.* 106, 1409–1437. <https://doi.org/10.1111/apa.13880>

- Ramani, M., Bradley, W.E., Dell'Italia, L.J., Ambalavanan, N., 2015. Early exposure to hyperoxia or hypoxia adversely impacts cardiopulmonary development. *Am J Respir Cell Mol Biol* 52, 594–602. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0491OC>
- Roggero, P., Gianni, M.L., Garbarino, F., Mosca, F., 2013. Consequences of prematurity on adult morbidities. *Eur. J. Intern. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2013.01.011>
- Schreuder, M.F., Nyengaard, J.R., Remmers, F., van Wijk, J.A., de Waal, H.A., 2006. Postnatal food restriction in the rat as a model for a low nephron endowment. *Am J Physiol Ren. Physiol* 291, F1104-7. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00158.2006>
- Stojiljkovic, L., Behnia, R., 2007. Role of renin angiotensin system inhibitors in cardiovascular and renal protection: A lesson from clinical trials. *Curr. Pharm. Des.* 13, 1335–45. <https://doi.org/10.2174/138161207780618768>
- Sutherland, M., Ryan, D., Black, M.J., Kent, A.L., 2014. Long-Term Renal Consequences of Preterm Birth. *Clin. Perinatol.* <https://doi.org/10.1016/j.clp.2014.05.006>
- Tain, Y.L., Chan, S.H.H., Chan, J.Y.H., 2018. Biochemical basis for pharmacological intervention as a reprogramming strategy against hypertension and kidney disease of developmental origin. *Biochem. Pharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.01.014>
- Velten, M., Hutchinson, K.R., Gorr, M.W., Wold, L.E., Lucchesi, P.A., Rogers, L.K., 2011. Systemic maternal inflammation and neonatal hyperoxia induces remodeling and left ventricular dysfunction in mice. *PLoS One* 6, e24544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024544>
- Walton, S.L., Mazzuca, M.Q., Tare, M., Parkington, H.C., Wlodek, M.E., Moritz, K.M.,

- Gallo, L.A., 2018. Angiotensin receptor blockade in juvenile male rat offspring: Implications for long-term cardio-renal health. *Pharmacol. Res.* 134, 320–331. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.001>
- Wang, J., He, W., Guo, L., Zhang, Y., Li, H., Han, S., Shen, D., 2017. The ACE2-Ang (1-7)-Mas receptor axis attenuates cardiac remodeling and fibrosis in post-myocardial infarction. *Mol Med Rep* 16, 1973–1981. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6848>
- Wang, Y., Del Borgo, M., Lee, H.W., Baraldi, D., Hirmiz, B., Gaspari, T.A., Denton, K.M., Aguilar, M.I., Samuel, C.S., Widdop, R.E., 2017. Anti-fibrotic Potential of AT2 Receptor Agonists. *Front Pharmacol* 8, 564. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00564>
- Yalçın, F., Topaloglu, C., Kuçukler, N., Ofgeli, M., Abraham, T.P., 2015. Could early septal involvement in the remodeling process be related to the advance hypertensive heart disease? *IJC Hear. Vasc.* 7, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.ijcha.2015.04.003>
- Yancy, C.W., Jessup, M., Bozkurt, B., Butler, J., Casey, D.E., Drazner, M.H., Fonarow, G.C., Geraci, S.A., Horwich, T., Januzzi, J.L., Johnson, M.R., Kasper, E.K., Levy, W.C., Masoudi, F.A., McBride, P.E., McMurray, J.J.V., Mitchell, J.E., Peterson, P.N., Riegel, B., Sam, F., Stevenson, L.W., Tang, W.H.W., Tsai, E.J., Wilkoff, B.L., 2013. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: A report of the american college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31829e8776>
- Yzydorczyk, C., Comte, B., Cambonie, G., Lavoie, J.C., Germain, N., Shun, Y.T., Wolff, J., Deschepper, C., Touyz, R.M., Lelièvre-Pegorier, M., Nuyt, A.M., 2008. Neonatal oxygen exposure in rats leads to cardiovascular and renal alterations in adulthood.

Hypertension 52, 889–95. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.116251>

Zong, W.N., Yang, X.H., Chen, X.M., Huang, H.J., Zheng, H.J., Qin, X.Y., Yong, Y.H., Cao, K., Huang, J., Lu, X.Z., 2011. Regulation of angiotensin-(1-7) and angiotensin II type 1 receptor by telmisartan and losartan in adriamycin-induced rat heart failure. *Acta Pharmacol Sin* 32, 1345–1350. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.96>

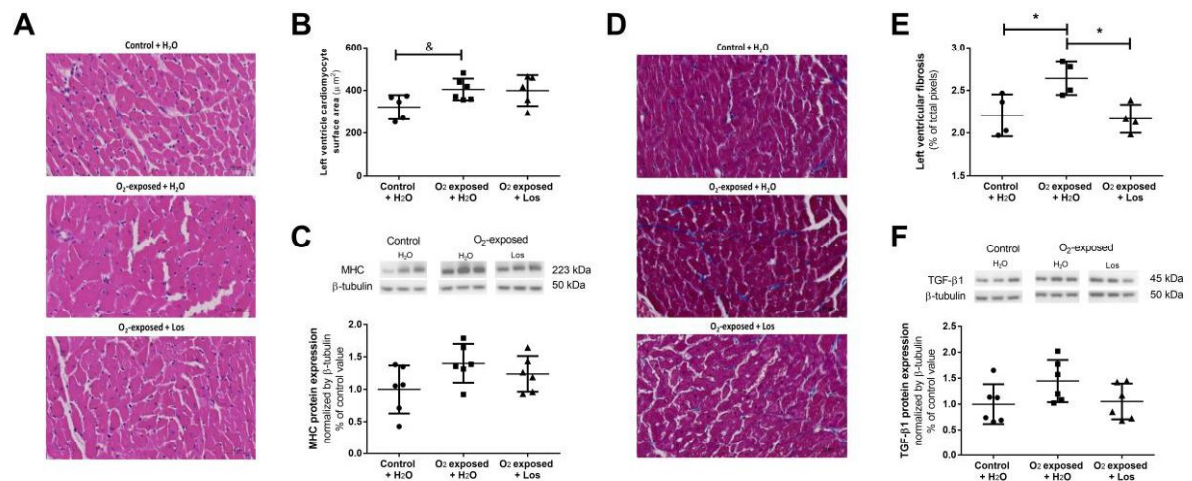
## Tables

**Table 1.** Morphometric parameters

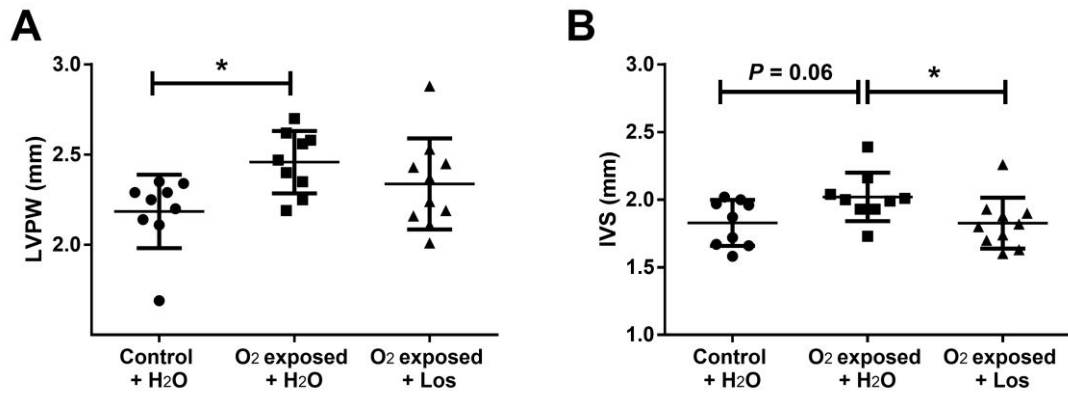
Morphometric Parameter	Control + H <sub>2</sub> O	O <sub>2</sub> -exposed + H <sub>2</sub> O	O <sub>2</sub> -exposed + Los
BW (g)	661 ± 28	677 ± 39	722 ± 78
Tibia length (mm)	52 ± 2	51 ± 1	51 ± 2
HW (g)	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.3
HW/BW (mg/g)	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.1	2.1 ± 0.2
HW/Tibia length (mg/mm)	28 ± 3	29 ± 2	30 ± 5

Morphometric parameters of 16-week-old male rats room air control (Control) or exposed to neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>-exposed) and treated with water (H<sub>2</sub>O) or Losartan (Los) from days 8 to 10 of life. Data presented are mean ± S.D. (n = 6 – 8 rats per group). *P*-values calculated using ANOVA followed by post-hoc comparisons to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O using Dunnett's method. No significant difference was found. BW: body weight; HW: heart weight.

## Figure legends

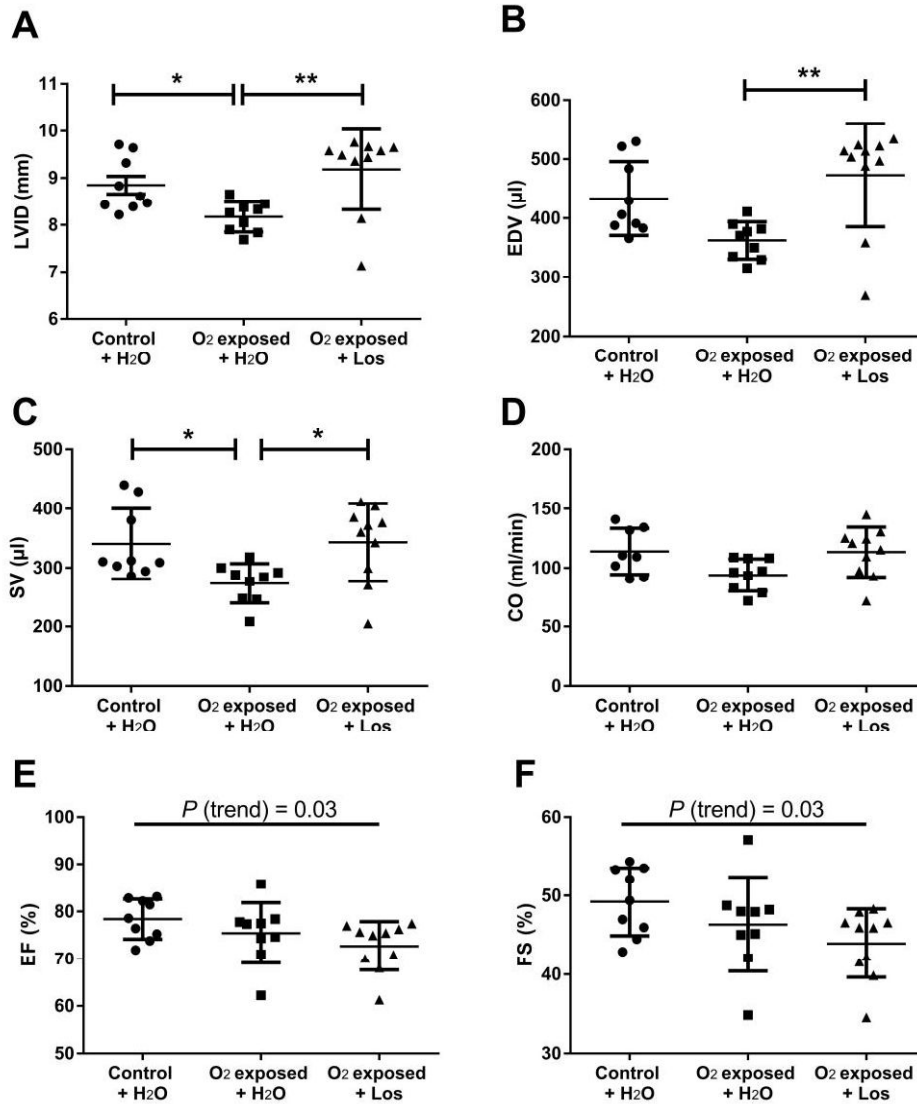


**Fig. 1. Histomorphometric parameters - hypertrophy and fibrosis - of 16-week-old male rats room air control (Control) or exposed to neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>-exposed) and treated with water (H<sub>2</sub>O) or Losartan (Los) from days 8 to 10 of life. A:** Representative photographs of sections (5  $\mu\text{m}$ ) of left ventricle (subendocardium) stained with hematoxylin/eosin (scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ); **B:** Quantification of cardiomyocyte cross-sectional surface area; **C:** MHC: myosin heavy chain; **D:** Representative photographs of sections (5  $\mu\text{m}$ ) of left ventricle (subendocardium) stained with Masson trichrome (scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ); **E:** Quantification of interstitial myocardium fibrosis; **F:** TGF- $\beta$ 1: transforming growth factor beta. Data presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 4 - 6 rats per group). &  $P < 0.05$  O<sub>2</sub>-exposed+H<sub>2</sub>O vs. Control+ H<sub>2</sub>O; \*  $P < 0.05$ . One-way analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc comparisons using Dunnett's method.



**Fig. 2.** Echocardiographic parameters of 15-week-old male rats room air control (Control) or exposed to neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>-exposed) and treated with water (H<sub>2</sub>O) or Losartan (Los) from days 8 to 10 of life. **A:** LVPW: left ventricular posterior wall thickness in diastole; **B:** IVS: interventricular septum thickness in diastole. Data presented are mean  $\pm$  S.D. (n = 9-10 rats per group). *P*-values calculated using ANOVA followed by post-hoc comparisons to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O using Dunnett's method. \* *P* < 0.05.





**Fig. 3. Echocardiographic parameters of 15-week-old male rats room air control**

**(Control) or exposed to neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>-exposed) and treated with water**

**(H<sub>2</sub>O) or Losartan (Los) from days 8 to 10 of life. A: LVID: left ventricular internal**

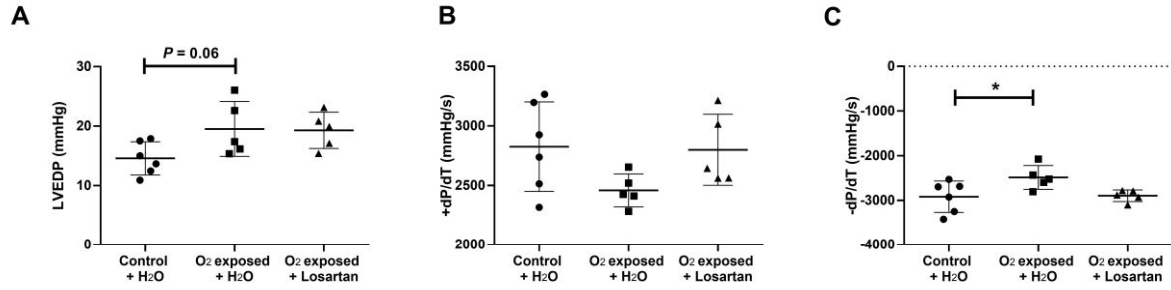
**diameter in diastole; B: EDV: end diastolic volume; C: SV: stroke volume; D: CO: cardiac**

**output; E: EF: ejection fraction; F: FS: fractional shortening. Data presented are mean ±**

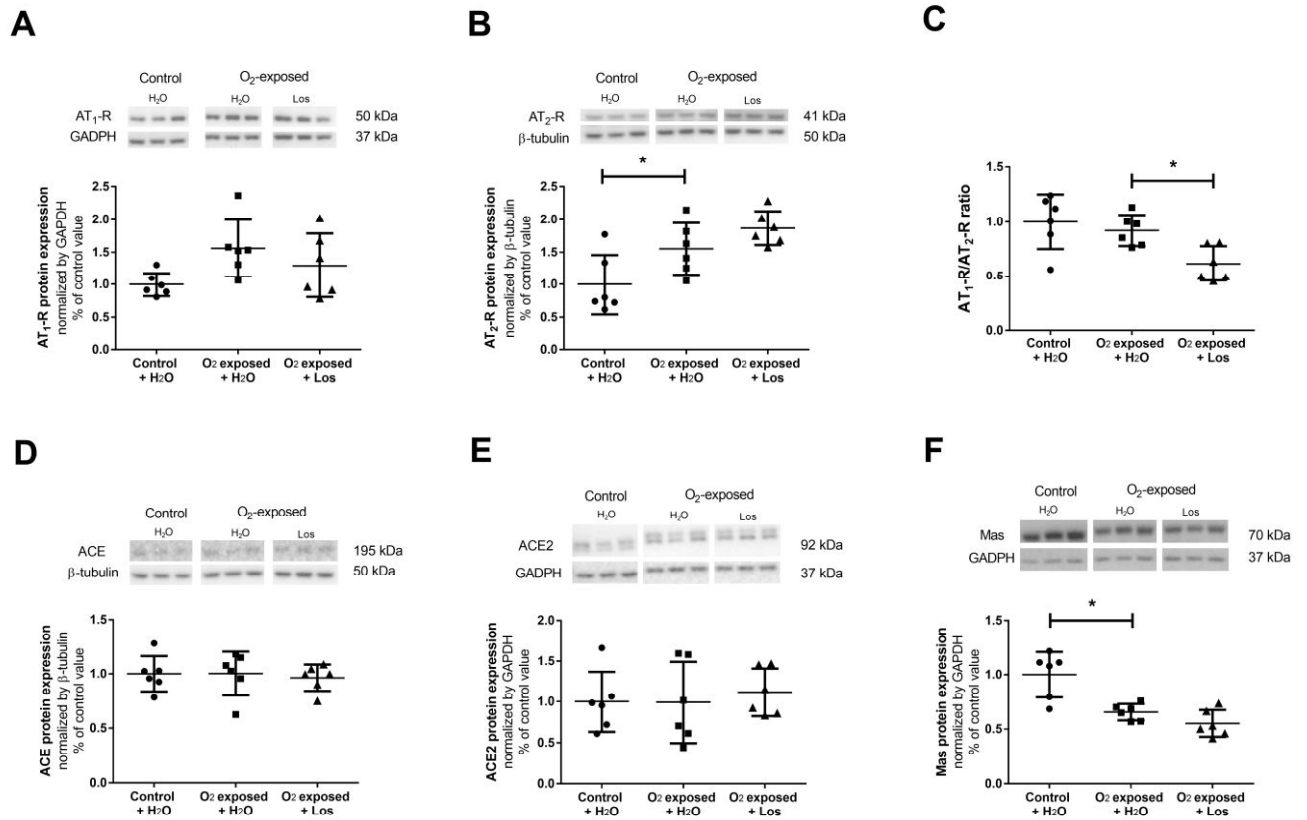
**S.D. (n = 9-10 rats per group). P-values calculated using ANOVA followed by post-hoc**

**comparisons to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O using Dunnett's method, or trend test when specified. \* P**

< 0.05, \*\*  $P < 0.01$ .



**Fig. 4. Left ventricular pressures of 16-week-old male rats room air control (Control) or exposed to neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>-exposed) and treated with water (H<sub>2</sub>O) or Losartan (Los) from days 8 to 10 of life. A: LVEDP: left ventricular end diastolic pressure; B: +dP/dt: contractility index; C: -dP/dt: relaxation index. Data presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 5 - 6 rats per group).  $P$ -values calculated using ANOVA followed by post-hoc comparisons to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O using Dunnett's method. \*  $P < 0.05$ .**



**Fig. 5.** Cardiac RAS components protein expression of 16-week-old male rats room air control (Control) or exposed to neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>-exposed) and treated with water (H<sub>2</sub>O) or Losartan (Los) from days 8 to 10 of life. **A:** AT<sub>1</sub>-R: angiotensin II receptor type 1; **B:** AT<sub>2</sub>-R: angiotensin II receptor type 2; **C:** AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub> ratio; **D:** ACE: angiotensin converting enzyme; **E:** ACE2: angiotensin converting enzyme 2; **F:** Mas: Mas receptor. Data presented as mean ± S.D. (n = 6 rats per group). *P*-values calculated using ANOVA followed by post-hoc comparisons to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O using Dunnett's method. \* *P* < 0.05.

**Impact of early life AT<sub>1</sub> blockade on adult cardiac morpho-functional changes and the renin-angiotensin system in a model of neonatal high oxygen-induced cardiomyopathy**

**Supplemental Methods and Results**

Jéssica Hellen POLETTO BONETTO<sup>a,b</sup>, Rafael O FERNANDES<sup>a</sup>, Daniela R DARTORA<sup>a</sup>,  
Adrien FLAHAULT<sup>a</sup>, Aurélie SONEA<sup>a</sup>, Ying HE<sup>a</sup>, Anik CLOUTIER<sup>a</sup>, Adriane BELLÓ-  
KLEIN<sup>b</sup>, Anne Monique NUYT<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Sainte-Justine University Hospital and Research Center, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, Canada

<sup>b</sup> Laboratory of Cardiovascular Physiology and Reactive Oxygen Species, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Rio Grande do Sul, Brazil.

**SUPPLEMENTAL MATERIAL**

**Supplemental Table S1**

**Supplemental Materials and methods**

**Supplemental References**

**Supplemental Table S1.** Morphometric parameters of 16-week-old male rats room air control (Control) or exposed to neonatal high oxygen (O<sub>2</sub>-exposed) and treated with water (H<sub>2</sub>O) or Losartan (Los) from days 8 to 10 of life.

Morphometric Parameters	Control+H <sub>2</sub> O	O <sub>2</sub> -exposed+H <sub>2</sub> O	O <sub>2</sub> -exposed+Los
Total Kidney/BW (mg/g)	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.1 ± 0.4
Wet lung/Dry lung (mg/mg)	5.0 ± 0.4	5.2 ± 0.3	4.9 ± 0.7
Wet lung/BW (mg/g)	3.0 ± 0.6	2.8 ± 0.3	2.8 ± 0.3
Wet liver/Dry liver (mg/mg)	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.2
Wet liver/BW (mg/g)	29 ± 3	30 ± 2	29 ± 3

Data presented are mean ± S.D. (n = 6 – 8 rats per group). *P*-values calculated using ANOVA followed by post-hoc comparisons to O<sub>2</sub>-exposed + H<sub>2</sub>O using Dunnett's method. BW: body weight.

## **Supplemental Materials and methods**

### **Echocardiography**

Rats were anesthetized with 2.5% inhaled isoflurane mixed with O<sub>2</sub> at 1 L/min, placed on a warming pad with body temperature and heart rate (electrocardiogram limb electrodes) continuous monitored. Two-dimensional guided M-mode images were obtained from a short axis left ventricular (LV) view positioned perpendicular to the interventricular septum and posterior wall of the LV at the level of the papillary muscles using a high-resolution in vivo microimaging system Vevo 3100 (Fujifilm Visualsonics<sup>®</sup>, Toronto, ON, Canada) equipped with a 13–24 MHz linear array transducer (Vevo MX transducer 250). Parameters of LV morphology, including LV internal diameter during diastole (LVIDd) and systole (LVIDs), diastolic interventricular septum thickness (IVS), diastolic LV posterior wall thickness (LVPW), and heart rate (HR) were obtained. Stroke volume (SV), cardiac output (CO), ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) were calculated using ventricular internal diameter, volume, and thickness obtained from M-mode images according to the American Society of Echocardiography recommendations (Sahn et al., 1978), as follows:  $SV (\mu\text{l}) = \text{FDV} - \text{FSV}$ ;  $\text{CO} (\mu\text{l}/\text{min}) = \text{SV} \times \text{HR}$ ;  $\text{EF} (\%) = (\text{FDV} - \text{FSV})/\text{FDV} \times 100$ ;  $\text{FS} (\%) = [(\text{LVIDd} + \text{LVIDs})/\text{LVIDd}] \times 100$ .

### **Western Blotting**

Left ventricles were homogenized using a Precellys 24 homogenizer (Bertin instruments, Montigny-le-Bretonneux, France) using a RIPA (Radioimmuno-precipitation assay) buffer containing protease inhibitors (Na-deoxycholate 10%, EDTA 100 mM, SDS 10%, complete mini (Roche) 0.05X, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) 100mM, Igepal 10%) and the suspension was centrifuged using a Sorvall Legend Micro 21R centrifuge (ThermoFisher,

Germany) at 12000 rpm by 20 min at 4°C to remove nuclei and cell debris. The supernatant was separated, and the protein concentration was quantified and used for normalization. The immunodetection steps were processed on polyvinylidene difluoride membranes using specific antibodies. Protein bands were developed with an enhanced chemiluminescence substrate (PerkinElmer Inc, Waltham, MA) using a gel documentation system (Syngene, G:BOX, Cambridge, UK) and quantified using Image J.

### **Histological Analysis**

Transverse cross-sections of the base of the heart with both LV were paraffin-embedded. Five µm microtome (Leica RM2145, Leica Biosystems, Concord, ON, Canada) sections were stained with hematoxylin and eosin, and Masson's Trichrome for the evaluation of cardiomyocyte surface area and cardiac fibrosis, respectively. For all histological analysis, two microphotographs of the LV sub-endocardium, sub-epicardium and mid-myocardium were randomly obtained by using a slide scanner Axio Scan.Z1 (Zeiss, Jena, Germany). Cardiomyocyte size was evaluated in the sub-endocardium and sub-epicardium by measuring the surface area of cells with a visible nucleus. Cardiac fibrosis was assessed by quantifying the % of pixel intensity compared to the maximum pixel intensity obtained from the Masson's trichrome staining. The software Zen 2.3 (Zeiss, Jena, Germany) was used to acquire the pictures and Image J 1.51K was used for stereological analysis and pixel quantification as previously described (Bertagnolli et al., 2014).

Bertagnolli, M., Huyard, F., Cloutier, A., Anstey, Z., Huot-Marchand, J.É., Fallaha, C., Paradis, P., Schiffrin, E.L., Deblois, D., Nuyt, A.M., 2014. Transient neonatal high oxygen exposure leads to early adult cardiac dysfunction, remodeling, and activation of the Renin-Angiotensin system. *Hypertension* 63, 143–150.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01760>

Sahn, D.J., DeMaria, A., Kisslo, J., Weyman, A., 1978. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58, 1072–1083.