

## DESENVOLVIMENTO RENAL FETAL DA PROLE DE RATAS TRATADAS COM ANTIOXIDANTES E SUBMETIDAS À DESNUTRIÇÃO

Beatriz Paz do Nascimento Soares<sup>1</sup>; Ana Durce Oliveira da Paixão<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Biomedicina – CCB – UFPE; E-mail: beatrizsoares1996@hotmail.com, <sup>2</sup>Docente do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB – UFPE. E-mail: adpaixao@ufpe.br.

**Sumário:** Investigamos se o perfil de estresse oxidativo hepático materno repercute sobre o estresse oxidativo placentário e também sobre o estresse oxidativo hepático e renal fetal. Ratas Wistar foram mantidas, durante a prenhez, com dieta *ad libitum*, o grupo controle, ou com 50% de restrição dietética, após a detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal. Em paralelo, veículo, ou  $\alpha$ -tocoferol, ou tempol, ou ambos,  $\alpha$ -tocoferol + tempol foram administrados para cada grupo de mães. Marcadores de estresse oxidativo foram avaliados no fígado materno, placenta, fígado de fetos machos e rim de fetos machos. O número de células positivas para angiotensina II, um marcador positivo de desenvolvimento fetal, foi avaliado no rim fetal. Nem a restrição dietética, nem os antioxidantes afetaram os marcadores de estresse oxidativo no fígado materno. Paradoxalmente, o tempol elevou os níveis de malondialdeído na placenta de mães submetidas à restrição dietética e no fígado de seus respectivos fetos. Nenhum tratamento alterou o número de células positivas para angiotensina II. Em resumo, a restrição dietética materna comprometeu a ação antioxidante do tempol. A elevação de estresse oxidativo placentário parece ser transferida para o fígado fetal, porém não se observou alteração do número de células positivas para angiotensina II no rim.

**Palavras-chave:** alfa-tocoferol; desenvolvimento renal; estresse oxidativo; restrição dietética; tempol.

### INTRODUÇÃO

A desnutrição pré-natal programa disfunção renal (Merlet-Bénichou *et al.*, 1994) e em algumas condições induz hipertensão na idade adulta (Paixão *et al.*, 2001). A elevação das espécies reativas de oxigênio na placenta pode reduzir a distribuição do fluxo sanguíneo útero-placentário, uma vez que na desnutrição o fluxo sanguíneo placentário já se apresenta reduzido (Rosso *et al.*, 1980). Antioxidantes como o  $\alpha$ -tocoferol e o tempol podem melhorar o crescimento fetal (Hoffmann *et al.*, 2008). Neste trabalho, investigamos se o perfil de estresse oxidativo hepático materno repercute sobre o estresse oxidativo placentário e também sobre o estresse oxidativo hepático e renal fetal. Também foi investigado se o perfil de estresse oxidativo materno afeta a presença de células positivas para angiotensina II, um marcador de desenvolvimento renal. Para tal, as mães foram tratadas com  $\alpha$ -tocoferol, tempol ou com restrição dietética.

### MATERIAIS E MÉTODOS

**Obtenção de animais:** O procedimento com uso de animais neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, sob o número 23076.056943/2011-70. Ratas Wistar nulíparas foram acasaladas aos seus 90 dias. A partir da observação de espermatozoide no esfregaço vaginal, manteve-se parte das ratas com dieta padrão, o grupo controle (C, n=20), enquanto a outra parte foi submetida a 50% de restrição dietética (R, n=20). Dentre as mães controle, 5 foram tratadas como veículo (óleo de milho, 100

$\mu$ /100g mais DMSO 100mM), 5 foram tratadas com  $\alpha$ -tocoferol (350 mg/kg/dia, p.o.), 5 foram tratadas com tempol (30 mg/kg/dia, p.o, dissolvido na água de beber) e as outras 5 foram tratadas com tempol mais  $\alpha$ -tocoferol. Subdividiu-se as ratas do grupo R de forma similar, obtendo-se 8 grupos: CV, CToc, CT, CToc+T, RV, RToc, RT e RToc+T. No 20º dia de gravidez, as ratas foram anestesiadas com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p) para coleta dos fetos machos e de suas respectivas placentas. O fígado e um rim fetais foram imediatamente coletados para mensuração de marcadores de estresse oxidativo. O rim contralateral foi destinado a estudos de imunohistoquímica.

**Marcadores de estresse oxidativo:** O estresse oxidativo nos tecidos foi avaliado pela mensuração de malondialdeído (MDA) (Ohkawa *et al.*, 1979), bem como através da mensuração dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), que foi determinada através de grupamentos sulfidrilas não proteicos (Sedlak *et al.*, 1968). Adicionalmente, ânions superóxidos ( $O_2^-$ ) foram avaliados através de reação com lucigenina (10  $\mu$ M) e detecção da quimioluminescência produzida em luminômetro, na presença de NADPH (100  $\mu$ M, Sigma-Aldrich). Para normatização destes três parâmetros a concentração de proteína foi mensurada nos homogenatos de tecidos pelo método do reagente de Folin.

**Avaliação da presença de angiotensina II no rim por imunohistoquímica:** Os rins foram fixados, lavados, desidratados e embebidos em parafina, formando blocos que foram cortados. Os cortes foram dispostos em lâminas e a parafina dos tecidos foi removida. Logo depois, foi feito o bloqueio da peroxidase endógena, seguido da recuperação da expressão antigênica e do bloqueio das suas ligações não-específicas. A reação foi realizada durante um pernoite, com anticorpo para angiotensina II. Feito isso, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado, anti-coelho. A reação foi detectada utilizando-se complexo avidina-biotina-peroxidase. Para a coloração, as lâminas foram mergulhadas em uma solução com o cromógeno diaminobenzidina. O material foi contracorado com verde de metil, desidratado através de uma bateria de solvente e montado em lâminas. Foram avaliados 30 glomérulos e 30 campos (0,245 mm<sup>2</sup>) na área túbulo-intersticial. A avaliação foi realizada por dois observadores sem conhecimento da identificação do material avaliado.

**Análise estatística:** A análise estatística foi realizada através de one-way ANOVA seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações. A diferença foi considerada significante quando  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

**Peso corpóreo:** O ganho de peso, durante a gravidez, do grupo RV foi menor do que o apresentado pelas mães CV. Nem o  $\alpha$ -tocoferol, nem o tempol foram capazes de melhorar o ganho de peso em mães submetidas à restrição dietética (Tabela 1). O peso placentário não foi afetado pela restrição dietética, nem pelos antioxidantes. A restrição dietética diminuiu o peso fetal (comparar grupo RV vs. CV). O tratamento com tempol e o tratamento  $\alpha$ -tocoferol + tempol foram capazes de aumentar o ganho de peso fetal (comparar RT vs. RV e RToc+T vs. RV, Tabela 1).

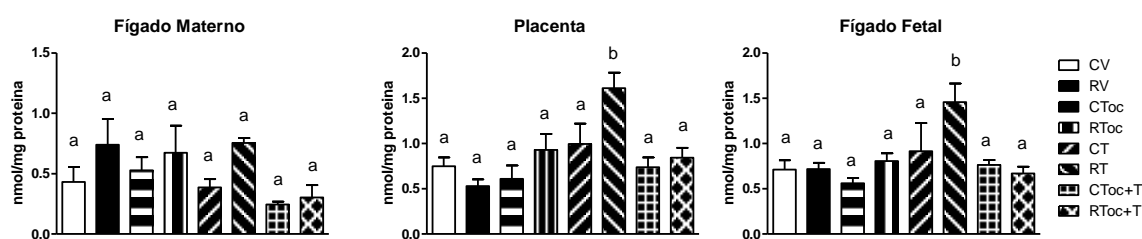
**Marcadores de Estresse Oxidativo Tecidual:** Os níveis de malondialdeído (MDA), os quais refletem a peroxidação lipídica, não se apresentaram alterados no fígado materno (Figura 1). No entanto, o grupo RT apresentou elevação dos níveis de MDA na placenta, o mesmo ocorrendo com o fígado fetal (Figura 1). Os níveis de glutathiona reduzida (GSH), que se trata de um substrato antioxidante, apresentaram-se 83% ( $P < 0,05$ ) mais elevados no fígado materno de mães normonutridas tratadas com ambos antioxidantes, grupo CToc+T do que no grupo CV (Dados não mostrados). Na placenta, este mesmo grupo e também o grupo RToc+T apresentaram níveis de GSH mais elevados do que os demais grupos. Já no

fígado fetal não houve diferença nos níveis de GSH entre os grupos (Dados não mostrados).

**Tabela 1. Dados de peso materno e fetal**

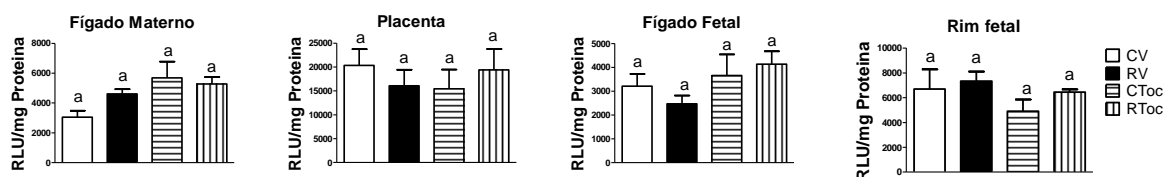
	Ganho de peso materno durante prenhez, g	Peso placentário, g	Peso corporal fetal, g
CV	83,70 ± 11,50	0,54 ± 0,01	4,19 ± 0,17
RV	34,70 ± 6,30*	0,49 ± 0,14	3,05 ± 0,07*
CToc	105,10 ± 4,50	0,50 ± 0,01	3,89 ± 0,17
RToc	17,20 ± 6,80*	0,47 ± 0,02	3,31 ± 0,12
CT	135,00 ± 13,00	0,52 ± 0,02	3,80 ± 0,06
RT	32,00 ± 4,20*	0,54 ± 0,02	3,65 ± 0,07†
CToc+T	87,80 ± 10,50	0,55 ± 0,01	4,17 ± 0,09
RToc+T	26,80 ± 1,00*	0,60 ± 0,02	3,41 ± 0,13†

Resultados são média ± EPM. P<0,05: \* vs. CV, †vs. RV.



**Figura 1:** Níveis de malondialdeído (MDA) no fígado materno, placenta e fígado fetal. Resultados são média ±EPM. Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes, P < 0,05.

Corroborando com os níveis de MDA, a produção de ânions superóxidos ( $O_2^-$ ) também não se apresentou alterada no fígado materno, placenta, fígado fetal ou rim fetal nos grupos CToc, RV e RToc (Figura 2).



**Figura 2:** Níveis de ânions superóxidos expressos com unidades relativas de luminescência (RLU, relative luminescence unit). Letras iguais sobre as diferentes barras indicam que não há diferença estatística entre elas.

**Células Positivas para Angiotensina II no rim fetal:** Não houve diferença no número de células positivas para angiotensina II, nem nos glomérulos, nem na região túbulo-intersticial, entre os grupos estudados (dados não mostrados).

## DISCUSSÃO

O tratamento materno com  $\alpha$ -tocoferol ou restrição dietética não resultou em alteração do estresse oxidativo no fígado materno, placenta ou fígado fetal. Já o tempol aumentou o estresse oxidativo na placenta e fígado fetal, embora tenha aumentado o peso fetal nas mães submetidas à restrição dietética. Nenhum dos tratamentos alterou o número de células positivas para angiotensina II que é um marcador de desenvolvimento renal.

Embora o tempol tenha aumentado os níveis de MDA na placenta e fígado fetal de animais submetidos à restrição dietética, o peso fetal do grupo RT indica que ocorreu uma melhora da nutrição fetal que não foi acompanhada de ganho de peso materno. O tempol é um anfólito hidrossolúvel que é transferido através da placenta e pode melhorar a função vascular neste órgão (Rexhaj *et al.*, 2011). Diferentemente, o  $\alpha$ -tocoferol, sem estar associado ao tempol, não recuperou o peso corpóreo fetal nem alterou os níveis de malondialdeído no fígado fetal, provavelmente porque seus níveis de transferência através da placenta são baixos (Debier *et al.*, 2005).

A restrição dietética materna não resultou em alteração dos níveis de MDA no fígado materno, nem na placenta. Diferente do que foi observado em nosso Laboratório com o uso de uma dieta multideficiente com alto teor de carboidratos (Vieira-Filho *et al.*, 2009). No entanto, as placentas de mães com restrição dietética tornaram-se vulneráveis a uma ação pró-oxidativa do tempol que também foi observada no fígado fetal, o que indica deficiência de substratos antioxidantes produzida pela desnutrição. A elevação de GSH, um substrato necessário para a defesa antioxidante, no fígado materno e placenta de mães tratadas com ambos,  $\alpha$ -tocopherol e tempol, mostra que associados estes agentes se somam na defesa antioxidante. Isto pode ser observado também com o aumento de peso fetal no grupo submetido à restrição dietética e tratamento com ambos antioxidantes.

### CONCLUSÕES

Através do monitoramento da peroxidação lipídica, mensurada pelos níveis de MDA e também pela quimioluminescência produzida pela lucigenina, estes dados mostram que o  $\alpha$ -tocopherol e a restrição dietética materna não influenciaram os níveis de estresse oxidativo, nem no fígado materno, nem na placenta, nem também no fígado fetal. O tempol, paradoxalmente, aumentou os níveis de MDA na placenta e no fígado fetal de animais submetidos à restrição dietética. No entanto, a presença de angiotensina II, um marcador positivo do desenvolvimento renal não se mostrou alterado.

### REFERÊNCIAS

- DEBIER, C.; LARONDELLE, Y. Vitamins A and E: metabolism, roles and transfer to offspring. **The British Journal of Nutrition**. v. 93, p. 153-174, 2005.
- HOFFMANN, D. S. WEYDERT, C. J., LAZARTIGUES, E., *et al.* Chronic tempol prevents hypertension, proteinuria, and poor feto-placental outcomes in BPH/5 mouse model of preeclampsia. **Hypertension**. v. 51, p. 1058-1065, 2008.
- MERLET-BÉNICHOU, C., GILBERT, T., MUFFAT-JOLY, M., *et al.* Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. **Pediatric Nephrology**. v. 8, p. 175-180, 1994.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry** v.95, p.351-358. 1979.
- PAIXÃO, A. D., MACIEL, C. R., TELES, M. B., *et al.* Regional Brazilian diet-induced low birth weight is correlated with changes in renal hemodynamics and glomerular morphometry in adult age. **Biology of the Neonate**. v. 80, p. 239-246, 2001.
- REXHAIJ, E. BLOCH, J., JAYET, P. Y., *et al.* Fetal programming of pulmonary vascular dysfunction in mice: role of epigenetic mechanisms. **The American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology** 301, H 247-252. 2011.
- ROSSO, P., KAVA, R. Effects of food restriction on cardiac output and blood flow to the uterus and placenta in the pregnant rat. **The Journal of Nutrition**. v. 110, p. 2350-2354, 1980.

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

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