

## ESTRESSE OXIDATIVO E MORFOLOGIA RENAL NA PROLE JOVEM DE RATAS TRATADAS COM ANTIOXIDANTES E SUBMETIDAS À DESNUTRIÇÃO DURANTE A GRAVIDEZ

Linaldo Francisco da Silva Filho<sup>1</sup>; Ana Durce Oliveira da Paixão<sup>2</sup>

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

**Sumário:** Desnutrição materna diminui o peso corpóreo no nascimento e pode induzir hipertensão e disfunção renal na idade adulta. Neste trabalho investigamos se a prole jovem, aos 30 dias de idade, já apresenta elevação da pressão arterial. Ratas Wistar foram mantidas, durante a prenhez, com dieta *ad libitum*, o grupo controle, ou com 50% de restrição dietética. Ambos grupos de mães receberam em paralelo, veiculo, ou  $\alpha$ -tocoferol, ou tempol, ou ambos,  $\alpha$ -tocoferol + tempol. Marcadores de estresse oxidativo no rim e a pressão arterial média (PAM) foram avaliados na prole, apenas nos filhotes machos, aos 30 dias de idade. A restrição dietética diminuiu o peso de nascimento e também o número de néfrons. Nos grupos tratados com os antioxidantes estes parâmetros se apresentaram similares aos de animais normonutridos. Os marcadores de estresse oxidativo indicam que a restrição dietética materna tornou a prole não responsiva aos efeitos antioxidantes do  $\alpha$ -tocoferol e tempol. A PAM apresentou-se semelhante entre os grupos estudados. Em resumo, apesar do número de néfrons diminuído, os animais submetidos à restrição dietética não apresentaram elevação da PAM na idade de 30 dias, o que indica que a elevação dos níveis pressóricos neste modelo pode ocorrer em faixa etária mais tardia.

**Palavras-chaves:** estresse oxidativo; hipertensão; restrição; tempol;  $\alpha$ -tocoferol.

### INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos e experimentais indicam que o ambiente materno influencia o peso de nascimento e pode programar doenças crônica-degenerativas. (Remacle *et al.*, 2004). Nossos resultados apontam que a administração de  $\alpha$ -tocoferol durante a gestação, em paralelo com a desnutrição, pode prevenir alterações renais estruturais que previnem a hipertensão induzida pela desnutrição materna (Vieira-Filho *et al.*, 2011). Neste trabalho investigamos se a restrição dietética materna altera o estresse oxidativo renal e os níveis pressóricos em ratos jovens, com 30 dias de idade. Adicionalmente, investigamos o efeito do  $\alpha$ -tocoferol, comparando-o com o tempol, um agente mimético da superóxido dismutase, sobre os mesmos parâmetros, associados ou não à desnutrição materna.

### MATERIAS E MÉTODOS

O procedimento com uso de animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal, sob o número 23076.009682/2011-07. Neste trabalho a desnutrição materna foi induzida através de 50% de restrição dietética, durante toda prenhez para investigar a prole aos 30 dias de idade, e em paralelo com a administração de dois agentes antioxidantes, o  $\alpha$ -tocoferol e o tempol. Ratas Wistar foram acasaladas, e após a detecção de espermatozoides no esfregaço vaginal, passaram a ser mantidas com dieta *ad libitum*, o grupo controle (C) ou com 50% de restrição dietética (R). Cada

grupo de mães foi tratado com veículo (V), ou com  $\alpha$ -tocoferol (Toc, 350 mg/kg/dia, por gavagem), ou com tempol (T, 30 mg/kg/dia, dissolvido na água), ou com ambos antioxidantes, o grupo Toc+T. Assim foram gerados os grupos: CV, RV, CToc, RToc, CT, RT, CToc+T e RToc+T. Após o desmame e até atingir 30 dias de idade a prole teve acesso *ad libitum* a ração e água.

#### **Pressão arterial média**

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (60mg/kg) para cateterização da artéria carótida, a qual foi conectada a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de pressão arterial (Power Lab, 8/30, ML866, AD Instruments, Australia) e a um computador onde pode ser visualizado as medidas obtidas. A pressão arterial média (PAM) foi continuamente mensurada durante 20 minutos.

#### **Estresse oxidativo renal**

O estresse oxidativo no rim foi avaliado através da expressão de gp91<sup>phox</sup>, uma subunidade da NADPH oxidase, por Western blotting, através dos níveis de malondialdeído (MDA) (Ohkawa *et al.*, 1979) e também pelos níveis de glutathiona reduzida (GSH) (Sedlak & Lindsay, 1968), um substrato antioxidante.

**Presença de angiotensina II:** Os rins foram coletados e parte do tecido foi fixado para detecção de células positivas para angiotensina II, através de imunohistoquímica. Estas células foram contadas em 30 glomérulos/corte. E na região túbulo-intersticial, o número de células positivas para angiotensina II foi contado em 30 campos/corte que mediam 0,245 mm<sup>2</sup>.

**Número de néfrons:** Os glomérulos foram contados em 30 campos na região cortical do rim, cada campo com medida de 0,15mm<sup>2</sup>, depois da imagem ter sido captada em um microscópio por uma câmera.

## **RESULTADOS**

#### **Pressão arterial e marcadores do estresse oxidativo**

Não foi detectada nenhuma alteração na pressão arterial média aos 30 dias de idade. A subunidade da NADPH oxidase, gp91<sup>phox</sup> também não foi alterada pela restrição dietética, nem pelos tratamentos com  $\alpha$ -tocoferol ou tempol (Tabela 1). O  $\alpha$ -tocoferol e o tempol diminuíram os níveis de MDA nos animais controle (comparar CToc, CT e CToc+T vs CV, Tabela 1), mas não o fizeram nos grupos submetidos à restrição dietética (compara RToc e RT vs RV, Tabela 1). Apenas a associação  $\alpha$ -tocoferol e tempol diminui os níveis de MDA nos animais submetidos à restrição dietética (comparar RToc+T vs RV). A restrição dietética apenas não afetou este parâmetro (RV vs CV, Tabela 1). A restrição dietética diminuiu os níveis de GSH no rim da prole (comparar RV vs CV, Tabela 1), o que indica diminuição da defesa antioxidante no órgão. O  $\alpha$ -tocoferol e o tempol também reduziram os níveis de GSH no grupo controle (comparar CToc e CT vs CV, Tabela1), provavelmente porque diante da ação antioxidante destas substâncias níveis menores de GSH são sintetizados.

#### **Número de néfrons e número de células positivas para angiotensina II na área túbulo intersticial**

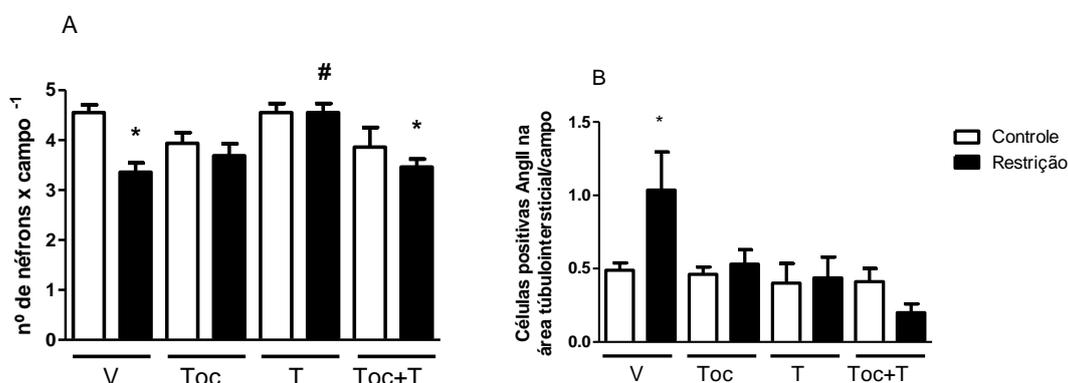
Na Figura 1 estão apresentados os dados da contagem de néfrons. Os animais cujas mães foram submetidas à restrição dietética, durante a gravidez, apresentaram uma redução significativa no número de néfrons, quando comparados aos animais normonutridos (RV vs. CV). O  $\alpha$ -tocoferol não foi capaz de recuperar o número de néfrons (RToc vs. RV). Por outro lado, o tempol teve este efeito (RT vs RV). Nenhum dos antioxidantes afetou a nefrogênese na prole normonutrida (CToc vs. CV, CT vs. CV

e CToc+T vs. CV). O número de células positivas para angiotensina II apresentou-se aumentado o grupo RV (Figura 2).

**Tabela 1: Pressão arterial média (PAM) e expressão de gp91<sup>phox</sup> (NOX-2) em ratos de 30 dias de idade.**

Grupos	PAM, mmHg	gp91 <sup>phox</sup> , % em relação ao CV	MDA	GSH
CV (n = 10)	105 ± 4	100	0,41 ± 0,02	22,53 ± 2,59
RV (n = 8)	99 ± 3	95,0 ± 13,1	0,41 ± 0,06	13,07 ± 0,55*
CToc (n = 8)	105 ± 5	104,5 ± 29,5	0,29 ± 0,01*	11,00 ± 0,55*
RToc (n = 4)	110 ± 3	97,3 ± 17,4	0,31 ± 0,02	16,56 ± 2,52
CT (n = 7)	99 ± 2	148,3 ± 47,3	0,36 ± 0,04*	12,81 ± 1,39*
RT (n = 12)	107 ± 3	103,0 ± 12,6	0,35 ± 0,02	15,86 ± 1,48
CToc+T (n = 7)	107 ± 4	115,0 ± 23,3	0,24 ± 0,02*	15,73 ± 0,95
RToc+T (n = 5)	103 ± 3	100,1 ± 16,7	0,36 ± 0,03†	20,92 ± 6,26

Dados são média ± EPM. P < 0.05: \* vs. CV, † vs. seu respectivo grupo controle.



**Figura 1.** A) Número de néfrons em rins de ratos com 30 dias de idade. B) Células positivas para angiotensina II na região do interstício tubular. Dados expressos como média ± E.P.M. p<0,05: vs CV; #vs RV.

## DISCUSSÃO

Nem a restrição dietética, nem os antioxidantes durante o período pré-natal foram capazes de alterar a expressão de gp91<sup>phox</sup>, também denominada NOX-2, no rim de ratos 30 dias. Embora os níveis de angiotensina II tenham se apresentado elevados na região túbulo-intersticial em animais submetidos à restrição dietética, a expressão da gp91<sup>phox</sup> não se apresentou elevada. O que indica que a angiotensina II pode apenas aumentar a atividade da NADPH oxidase sem afetar sua expressão (Touyz *et al.*, 2005).

É digno de nota o fato do número de néfrons estar reduzido e o número de células positivas para angiotensina estar elevado no grupo RV, sem no entanto se observar elevação da pressão arterial. A limitação do método de mensuração pela condição

anestésica pode ser a razão. No entanto, existem dados que mostram que a restrição dietética da ordem de 50% não induz elevação da pressão, mesmo em animais acompanhados por até um ano de idade, através de telemetria (Hoppe *et al.*, 2007). Aos 30 dias de idade a prole submetida à restrição dietética ainda não é hipertensa embora na vida adulta esses animais podem desenvolver hipertensão como é subsidiado por diversos autores que correlacionam baixo peso ao nascer e hipertensão na vida adulta (Remacle *et al.*, 2004; Vieira-Filho *et al.*, 2011).

### CONCLUSÕES

Os presentes dados mostram que a restrição dietética materna não afetou o estresse oxidativo renal, nem os níveis pressóricos aos 30 dias de idade, embora tenha reduzido o número de néfrons e aumentado o número de células positivas para angiotensina II. O  $\alpha$ -tocoferol e o tempol reduziram os níveis de malondialdeído em ratos normonutridos, mas não o fizeram em animais submetidos à restrição dietética durante a vida pré-natal, o que indica que estes animais estão vulneráveis a elevação do estresse oxidativo.

### REFERÊNCIAS

HOPPE C.C.; EVANS R.G.; MORITZ K.M.; *et al.* Combined prenatal and postnatal protein restriction influences adult kidney structure, function, and arterial pressure. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v.292, p.R462-9, 2007.

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.

REMACLE, C.; BIESWAL, F.; REUSENS, B. Programming of obesity and cardiovascular disease. **International Journal of Obesity** v.28, p.S46-S53, 2004.

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.

TOUYZ, R.M.; MERCURE, C.; HE Y.; JAVESHGHANI, D.; *et al.* Angiotensin II-dependent chronic hypertension and cardiac hypertrophy are unaffected by gp91phox-containing NADPH oxidase. **Hypertension** v.45, p.530–537, 2005.

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. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v.36, p.1157-1163, 2009.