

# EFEITOS DA INFLAMAÇÃO MATERNA SOBRE NÍVEIS PRESSÓRICOS E VIAS REGULADORAS DA DEPOSIÇÃO DE MATRIZ EXTRACELULAR GLOMERULAR EM RATOS ADULTOS

Kelly Monteiro dos Santos<sup>1</sup>; Leucio Duarte Vieira Filho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Enfermagem – CAV – UFPE; E-mail: kellymonteiroufpe@gmail.com,

<sup>2</sup>Docente/pesquisador do Depto de Fisiologia e Farmacologia– CCB – UFPE. E-mail: leucio\_filho@hotmail.com

**Sumário:** A inflamação materna, através da elevação do estresse oxidativo placentário, pode programar hipertensão através de aumento do estresse oxidativo e deposição de tecido fibrótico no rim na vida adulta. Desse modo, investigamos a influência da inflamação materna induzida por lipopolissacarídeo (LPS) sobre a programação destas alterações, na presença e na ausência de tratamento com  $\alpha$ -tocoferol, um reconhecido antioxidante. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE (nº 23076.015422/2012-43). A inflamação materna durante a gestação prejudica o desenvolvimento fetal dos ratos e programa hipertensão na vida adulta. Em paralelo, ocorre elevação da proteinúria, da deposição de colágeno, da expressão da NADPH oxidase e da atividade da isoforma 2 da metaloproteinase de matriz no rim. O tratamento simultâneo com  $\alpha$ -tocoferol previne as alterações induzidas pelo LPS. Esses resultados reforçam a participação do estresse oxidativo placentário no mecanismo de programação da hipertensão na vida adulta. Ainda podemos sugerir que a presença de alterações nas vias de regulação da degradação de matriz extracelular na vida adulta favorecem ao desenvolvimento de disfunção renal e ao estabelecimento da hipertensão.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -tocoferol; desenvolvimento fetal; fibrose renal; inflamação; NADPH oxidase.

## INTRODUÇÃO

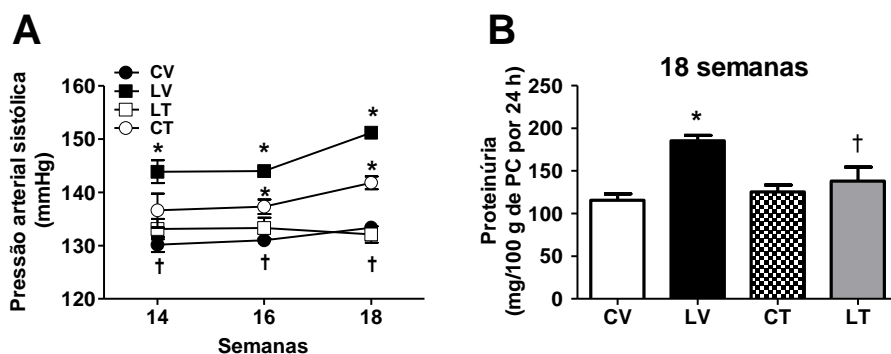
O desenvolvimento intrauterino representa uma janela na qual o organismo está suscetível a programação de hipertensão na vida adulta (Fowden et al., 2006). A elevação do estresse oxidativo no ambiente intrauterino tem sido apontada como um fator importante no mecanismo de programação (Luo et al., 2006). Na vida adulta, a hipertensão pode decorrer de alterações de alterações da função renal, dentre elas, a indução de fibrose glomerular e tubulointersticial (Griffin, 2006). A formação de tecido fibrótico no rim é influenciada em grande parte pela degradação de matriz extracelular dependente da atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs – *matrix metalloproteinases*) (Han et al., 2006). Por outro lado, indivíduos hipertensos apresentam uma importante correlação entre os níveis pressóricos e a produção de espécies reativas do oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) (Touyz et al., 2004). A NADPH oxidase é a principal fonte de produção de ROS em diversos tipos celulares não-fagocíticos e pode contribuir de forma importante para a fibrose renal (Zhao et al., 2008). Devido à importância da elevação do estresse oxidativo na programação intrauterina e no mecanismo de geração das patologias programadas, a vitamina E pode ser uma ferramenta promissora na reprogramação, pela sua capacidade antioxidante. Com base nessas evidências, a elevação do estresse oxidativo placentário pode programar elevação do estresse oxidativo renal, hipertensão e deposição de tecido fibrótico no glomérulo na vida adulta da prole. Desse modo, investigamos a influência do estresse oxidativo placentário sobre tais parâmetros, através da indução da inflamação materna durante a gestação, na presença e na ausência de tratamento com  $\alpha$ -tocoferol.

## MATERIAIS E MÉTODOS

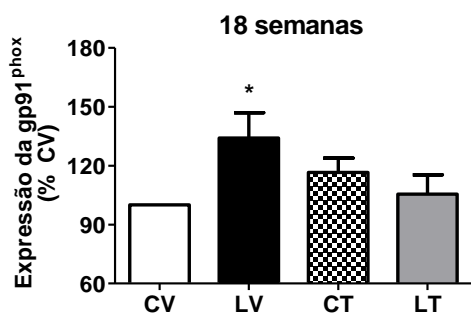
Foram utilizados ratos Wistar, mantidos sob condições ideais no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (processo nº 23076.015422/2012-43). O processo inflamatório foi induzido em ratas através da administração subcutânea de lipopolissacarídeo (LPS – grupo L, n=20; 0,5 mg/kg de peso corpóreo, s.c.) nos dias 13, 15, 17 e 19 de prenhez. O grupo de fêmeas Controle recebeu tratamento com NaCl 0,9% (grupo C, n=20; 1 mL/kg de peso corpóreo, s.c.) nos mesmos dias. A partir do 13º dia de gestação, fêmeas de ambos os grupos foram submetidas ao tratamento oral diário com  $\alpha$ -tocoferol (T, 350 mg/kg de peso corpóreo; CT, n=8; e LT, n=8) ou óleo de milho (veículo – V, 1 mL/kg de peso corpóreo; CV, n=12; e LV, n=12). Após o nascimento, a prole foi reduzida a número máximo de 8 animais por ninhada e foram formados os seguintes grupos (n=20–23/grupo): CV, LV, CT e LT. A partir de 12–13 semanas de vida, os animais foram submetidos durante 4-6 semanas à avaliação quinzenal da pressão arterial sistólica (PAS) e à coleta de urina em gaiola metabólica, para avaliação da excreção de proteína. Parte da prole (n=10–15/grupo) foi submetida à coleta do tecido renal para mensuração do estresse oxidativo renal, avaliação da expressão proteica da subunidade catalítica gp91<sup>phox</sup> da NADPH oxidase e avaliação da deposição de colágeno no córtex. A outra parte da prole (n=8–10/grupo) teve os rins coletados para isolamento dos glomérulos para avaliação da atividade das isoformas 2 e 9 das MMP (MMP-2 e MMP-9). A avaliação da PAS foi realizada através de pletismografia da cauda. O estresse oxidativo foi estimado pela avaliação da peroxidação lipídica, através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, e pela dosagem dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), através da dosagem de grupamentos sulfidrilas não-proteicos. A expressão da subunidade gp91<sup>phox</sup> foi imunodetectada em homogenato de tecido cortical através de *Western blotting*. A atividade das MMPs foi avaliada através da zimografia. A deposição de colágeno foi quantificada realizados cortes histológicos corados com *Picro Sirius red*. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  EPM. Após a verificação da normalidade das amostras, foi realizada a análise estatística e as diferenças consideradas significativas para  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

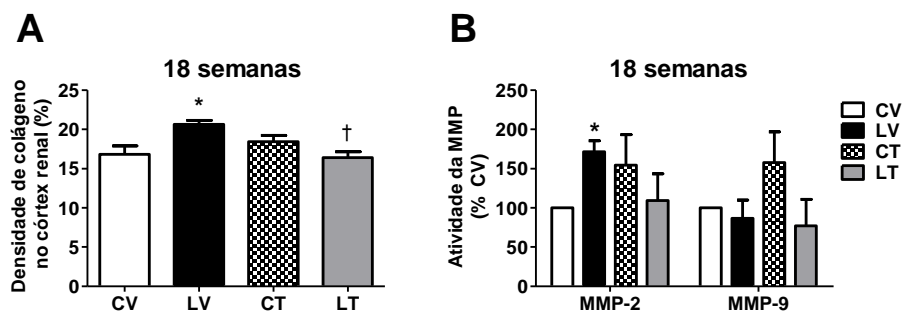
O peso corpóreo após o nascimento da prole submetida à inflamação intrauterina (LV) foi cerca de 7% menor ( $P < 0,05$ ) do que o grupo CV. O grupo CT apresentou peso corpóreo após o nascimento semelhante ao grupo CV, contudo o grupo LT apresentou valor 10% superior ( $P > 0,05$ ) aos animais LV e semelhante ao grupo CV. Não foram observadas diferenças no peso corpóreo, peso renal, consumo de água e ração e diurese da prole na 18ª semana de vida. Por outro lado, a prole LV apresentou níveis elevados de PAS (Figura 1A) e de excreção urinária de proteína (Figura 1B) em relação ao grupo CV na vida adulta. O tratamento materno com  $\alpha$ -tocoferol preveniu tanto a elevação da PAS quanto a elevação da proteinúria induzidas pela inflamação materna (Figura 1A e B). A expressão proteica no córtex renal da subunidade catalítica gp91<sup>phox</sup> da NADPH oxidase foi mais elevada ( $p < 0,05$ ) no grupo LV do que no grupo CV (Figura 2), assim como a densidade de colágeno no córtex renal (Figura 3A) e a atividade da MMP-2 no glomérulo (Figura 3B). Não foram observadas diferenças significantes na atividade da MMP-9 entre os grupos experimentais. Por outro lado, o tratamento materno com  $\alpha$ -tocoferol preveniu o aumento da expressão da gp91<sup>phox</sup>, da deposição de colágeno e da atividade da MMP-2 (Figuras 2 e 3).



**Figura 1.** Pressão arterial sistólica da prole acompanhada das 14 às 18 semanas de vida (A) e excreção urinária de proteína da prole com 18 semanas de vida (B). PC = peso corpóreo. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Diferenças estatísticas entre grupo avaliadas através do teste ANOVA de duas vias seguido pelo teste Bonferroni: \*  $P < 0,05$  vs. CV; †  $P < 0,05$  vs. LV.



**Figura 2.** Avaliação da expressão protéica da subunidade catalítica gp91<sup>phox</sup> da NADPH oxidase no córtex renal de animais com 18 semanas de vida. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. Diferenças estatísticas entre grupos avaliadas através do *one sample t test*: \*  $P < 0,05$  vs. CV.



**Figura 3.** Avaliação da densidade de colágeno no córtex renal (A) e da atividade das metaloproteinases de matriz 2 e 9 (MMP-2 e 9) em glomérulos isolados da prole (B) com 18 semanas de vida. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM. As diferenças estatísticas na densidade de colágenos entre grupos foram avaliada através do teste ANOVA de duas vias seguido pelo teste Bonferroni, enquanto que as diferenças estatísticas nas atividades das MMPs foram avaliadas pelo *one sample t test*: \*  $P < 0,05$  vs. CV; †  $P < 0,05$  vs. LV.

## DISCUSSÃO

Nossos dados reforçam o papel do estresse oxidativo no mecanismo de retardo do desenvolvimento fetal e programação de hipertensão na vida adulta, devido aos efeitos protetores do tratamento materno com  $\alpha$ -tocoferol sobre as alterações induzidas pelo LPS. A elevação do estresse oxidativo no ambiente intrauterino também parece estar envolvido

com a programação de hipertensão na vida adulta em outros modelos experimentais (Vieira-Filho et al., 2014). Na vida adulta, foram observadas alterações induzidas pela inflamação materna compatíveis com danos na integridade da barreira de filtração glomerular, como proteinúria elevada e deposição de matriz extracelular. Essas alterações podem ter decorrido de um aumento da fibrose renal estimulada por uma maior produção de superóxido mediada pela gp91<sup>phox</sup> e por alterações na via de degradação de matriz extracelular dependente da MMP-2. Achados semelhantes são observados em modelos de doença renal crônica (Han et al., 2006; Zhao et al., 2008). A prevenção da elevação dos níveis pressóricos e das disfunções renais observada nos animais tratados com o  $\alpha$ -tocoferol pode ter envolvido a recuperação das alterações na expressão da gp91<sup>phox</sup> e da atividade da MMP-2.

### CONCLUSÕES

A inflamação materna durante a gestação prejudica o desenvolvimento fetal dos ratos e programa hipertensão e disfunção renal na vida adulta. O mecanismo de programação parece envolver a elevação do estresse oxidativo no ambiente intrauterino e perda de integridade da barreira de filtração glomerular e fibrose renal. Esses eventos, por sua vez, podem ser decorrentes de aumento da produção de superóxido mediada pela NADPH oxidase, assim como, por alterações na regulação da degradação de matriz extracelular mediada pela MMP-2.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os membros do Laboratório de Fisiopatologia Renal e do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Renal/UFPE que sempre disponibilizaram ajuda no desenvolvimento do trabalho e também a UFPE, CAPES, CNPq e FACEPE pelo apoio estrutural e financeiro para toda realização do projeto.

### REFERÊNCIAS

- FOWDEN, A. L.. Intrauterine Programming of Physiological Systems: Causes and Consequences. **Physiology**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.29-37, 1 fev. 2006. American Physiological Society. DOI: 10.1152/physiol.00050.2005.
- GRIFFIN, Karen A.; BIDANI, Anil K.. Hypertension and Kidney Damage. **The Journal Of Clinical Hypertension**, [s.l.], v. 8, n. 3, p.209-214, mar. 2006. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1524-6175.2005.05111.x.
- HAN, S. Y.. An imbalance between matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 contributes to the development of early diabetic nephropathy. **Nephrology Dialysis Transplantation**, [s.l.], v. 21, n. 9, p.2406-2416, 1 set. 2006. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/ndt/gfl238.
- LUO, Z.c. et al. Tracing the origins of “fetal origins” of adult diseases: Programming by oxidative stress?. **Medical Hypotheses**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.38-44, jan. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.mehy.2005.08.020.
- VIEIRA-FILHO, Leucio D. et al. Renal molecular mechanisms underlying altered Na<sup>+</sup> handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **British Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 111, n. 11, p.1932-1944, 24 mar. 2014. Cambridge University Press (CUP). DOI: 10.1017/s0007114513004236.
- ZHAO, L. et al. Reactive Oxygen Species Contribute to Lipopolysaccharide-Induced Teratogenesis in Mice. **Toxicological Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 1, p.149-157, 7 dez. 2007. Oxford University Press (OUP). DOI: 10.1093/toxsci/kfn027.