

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

Linaldo Francisco da Silva Filho¹; Ana Durce Oliveira da Paixão²

¹Estudante do Curso de Farmácia – CCS – UFPE ; E-mail: linaldochico@gmail.com, ²Docente 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 α -tocoferol, ou tempol, ou ambos, α -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 α -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; α -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 α -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 α -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 α -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 α -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^{phox}, 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 mm².

Número de néfrons: Os glomérulos foram contados em 30 campos na região cortical do rim, cada campo com medida de 0,15mm², 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^{phox} também não foi alterada pela restrição dietética, nem pelos tratamentos com α -tocoferol ou tempol (Tabela 1). O α -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 α -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 α -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 α -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^{phox} (NOX-2) em ratos de 30 dias de idade.

Grupos	PAM, mmHg	gp91 ^{phox} , % 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.

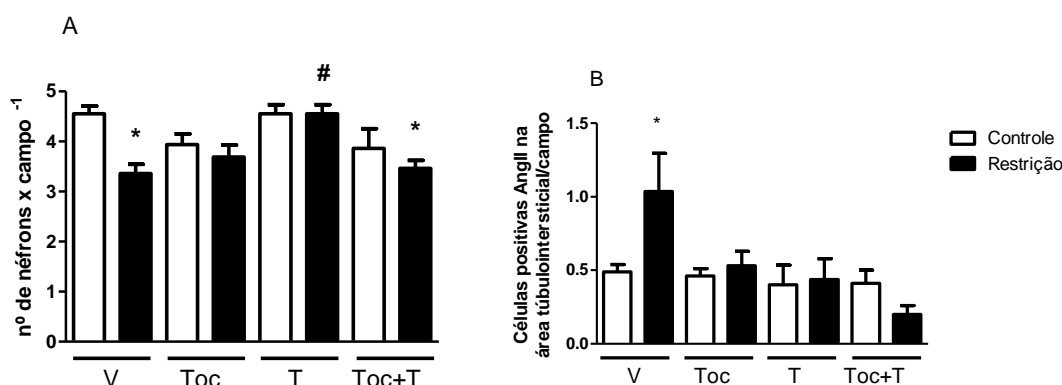


Figura 1. A) Número de néfrons em rins de ratos com 30 dias de idade. B) Células positivas para angiotensina II na região do interstício tubular. Dados expressos como média ± E.P.M. p<0,05: vs CV; #vs RV.

DISCUSSÃO

Nem a restrição dietética, nem os antioxidantes durante o período pré-natal foram capazes de alterar a expressão de gp91^{phox}, 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^{phox} 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 α -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.