



UNICAMP

DISFUNÇÃO DE MITOCÔNDRIAS CEREBRAIS EM RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTÉICA GESTACIONAL: PROVÁVEL RELAÇÃO COM O DESENVOLVIMENTO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL

Este projeto contou com o apoio da FAPESP e do CPNq.

Madeira, E.S.C.^{1,*}, Boer, P.A.², Gontijo, J.A.², Castilho, R.F.¹ e Maciel, E.N.¹

Departamentos de Patologia Clínica¹ e Clínica Médica², FCM, Unicamp, Campinas, SP. *E-mail: edusulinski@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A restrição protéica no período gestacional é fator determinante no desenvolvimento de diversas disfunções, bem como no retardo do desenvolvimento intra-uterino com reflexos na formação do sistema nervoso e no estabelecimento da hipertensão arterial. Neste trabalho avaliamos alterações na função mitocondrial e a sua relação com o desenvolvimento da hipertensão em animais submetidos à restrição protéica gestacional.

MÉTODOS

Animais de experimentação: Os estudos foram realizados em proles de ratas Wistar, fornecidas pelo Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. Estas foram submetidas a acasalamento e, após constatação da presença de espermatozoides no lavado vaginal, passaram a ser alimentadas com ração padrão para ratos (RN, 19% de proteína, dieta basal) ou com ração hipoprotéica (RHP, 6% de proteína) durante todo o período gestacional (WOODS *et al.*, 2004). As dietas foram isocalóricas e normossódicas (0,20%), e durante a amamentação as ratas foram alimentadas com ração padrão. Nestes estudos, utilizamos proles com 15, 30, 60, 120 e 180 dias de idade, cujas mães receberam ração hipoprotéica e, como controle, utilizamos proles com a mesma idade cujas mães receberam ração padrão durante a gestação.

Medida da Pressão Arterial Caudal (PAC): Alguns exemplares das proles foram mantidos até a idade de 60 e 120 dias e a pressão arterial sistêmica destes foi medida pela pletismografia de cauda.

Isolamento de Mitocôndrias de Cérebro: Mitocôndrias de cérebro das proles foram isoladas por centrifugação diferencial de acordo com o método descrito por Rosenthal *et al.*, 1987.

Dosagem de Proteína: A concentração de proteína das suspensões mitocondriais de cérebro foi determinada pelo método de biureto (Gornall *et al.*, 1949), modificado pela adição de colato 1% (Kaplan e Pedersen, 1983).

Consumo de Oxigênio: O consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas foi monitorado com um eletrodo de Clark (Yellow Springs Instrument Co.).

Medida de absorção de Ca²⁺: A captação de Ca²⁺ por mitocôndrias isoladas foi determinada utilizando o Calcium Green 5N, com comprimentos de onda de emissão e excitação de 506nm e 532nm, respectivamente (Murphy *et al.*, 1996).

RESULTADOS

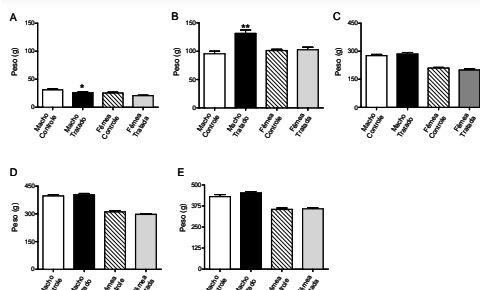


Figura 1 – Peso dos animais controles e tratados em diferentes idades – 15, 30, 60, 120 e 180 dias (Painéis A, B, C, D e E, respectivamente). * p < 0,05, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos controles com a mesma idade. ** p < 0,001, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos controles com a mesma idade.

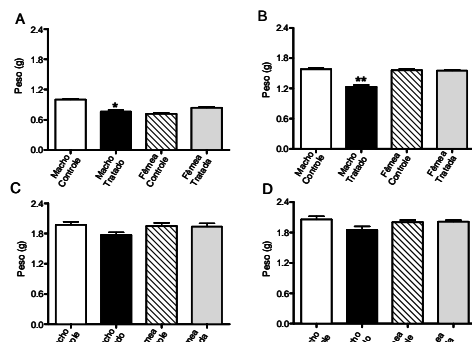


Figura 2 – Peso do cérebro dos animais controles e tratados em diferentes idades – 15, 30, 60 e 120 dias (Painéis A, B, C e D, respectivamente). * p < 0,05, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos controles com a mesma idade. ** p < 0,001, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos controles com a mesma idade.

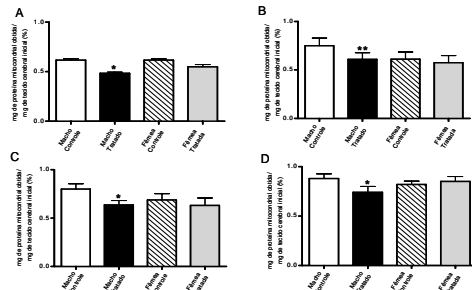


Figura 3 – Rendimento do isolamento mitocondrial, em proteína, a partir de cérebros obtidos animais controles e tratados com idades de 15, 30, 60 e 120 dias. (Painéis A, B, C e D, respectivamente). * p < 0,01, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos controles com a mesma idade. ** p < 0,05, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos controles com a mesma idade.

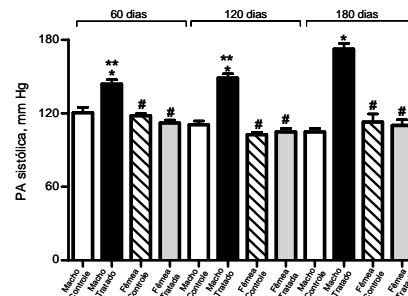


Figura 4 – Medida de pressão arterial sistêmica dos animais controles e tratados em idade de 60, 120 e 180 dias. * p < 0,001, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos controles com a mesma idade. ** p < 0,001, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos tratados com idade de 180 dias. # p < 0,001, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos machos tratados com a mesma idade.

Idade		V3 (n átomos O ₂ /mg/min)		V4 (n átomos O ₂ /mg/min)		CR (V3/V4)	
		"NADH"	"SUCC"	"NADH"	"SUCC"	"NADH"	"SUCC"
15 dias	C	76,3 ± 1,8	111,1 ± 13,4	18,1 ± 1,5	55,8 ± 0,9	42 ± 0,3	1,9 ± 0,1
	T	81,3 ± 4,1	112,7 ± 11,0	20,9 ± 1,9	60,0 ± 1,6	3,8 ± 0,5	1,8 ± 0,1
	T	98,7 ± 10,6	132,7 ± 4,1	30,6 ± 4,2	59,6 ± 0,9	3,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
30 dias	C	86,4 ± 2,2	130,6 ± 8,7	24,3 ± 1,9	67,1 ± 1,6	3,6 ± 0,3	1,9 ± 0,1
	C	66,6 ± 5,6	74,5 ± 10,8	9,7 ± 0,7	19,4 ± 1,9	6,8 ± 0,4	3,7 ± 0,2
	T	51,3 ± 7,5*	69,9 ± 12,9	9,1 ± 0,5	21,4 ± 3,6	5,6 ± 0,5*	3,1 ± 0,0
60 dias	C	60,4 ± 7,2	63,9 ± 15,6	9,1 ± 0,5	20,5 ± 4,1	6,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1
	T	60,1 ± 2,6	61,4 ± 13,5	9,5 ± 0,2	18,1 ± 2,0	6,2 ± 0,1	3,3 ± 0,0
	T	100,5 ± 9,6	109,9 ± 3,3	11,0 ± 0,1	44,1 ± 1,9	7,9 ± 0,3	2,4 ± 0,0
180 dias	C	77,3 ± 7,8*	104,8 ± 7,3	13,0 ± 4,6	45,3 ± 3,6	6,2 ± 0,5*	2,3 ± 0,1
	C	91,5 ± 10,6	125,3 ± 2,3	17,7 ± 2,5	52,0 ± 2,9	5,2 ± 8,3	2,4 ± 0,1
	T	83,7 ± 5,4	120,6 ± 12,3	19,1 ± 3,8	47,3 ± 3,4	5,0 ± 5,9	2,6 ± 0,4

TABELA 1 - Velocidades de Respiração nos estados 3 (V3) e 4 (V4) e Controle Respiratório (CR) de Animais Controles e Tratados: Substratos: Glutamato (5 mM) e Malato (5 mM) ("NADH") ou Succinato (5 mM), na presença de rotenona (5 µM) ("SUCC"). * p < 0,05, one way ANOVA, Bonferroni post hoc test, relativo aos animais controles com a mesma idade.

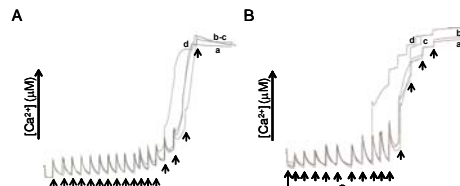


Figura 5 – Medida de captação de Ca²⁺ por mitocôndrias isoladas de cérebro de animais controles e tratados com 15 (Painel A) e 180 (Painel B) dias de idade. Mitocôndrias isoladas de cérebro (MC) (0,5 mg/ml) de fêmeas de proles controles (linha a) e tratadas (linha b) e machos de proles controles (linha c) e tratados (linha d) foram incubadas em meio de reação na presença de ADP (200 µM) e oligomicina (1 mg/mL). As setas correspondem a adições de Ca²⁺ (5 µM).

CONCLUSÃO

A privação protéica gestacional resulta em disfunções cerebrais envolvendo a cadeia respiratória mitocondrial, notadas pela diminuição da velocidade de respiração com substratos do complexo I. Estas disfunções ocorrem paralelamente ao estabelecimento da hipertensão arterial neste modelo, como evidenciado nas medidas de pressão arterial.