

Medicina veterinária/ Patologia Animal

TRATAMENTO COM PORFIRINAS DE MANGÃNES (MnPs) PROTEGE CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO CAUSADO PELO HIPOTIREOIDISMO MATERNO E MELHORA O DESENVOLVIMENTO FETO-PLACENTÁRIO

Letícia Dias Mendonça¹, Jeane Martinha dos Anjos Cordeiro¹, Bianca Reis Santos¹, Isabela Oliveira de Macedo¹, Luciano Cardoso Santos¹, Erikles Macêdo Barbosa Santos¹, Emilly Oliveira Santos¹, Mário Sérgio Lima de Lavor¹, José Ferreira Sarmento-Neto², Júlio Santos Rebouças², Gilson de Freitas Silva³ Juneo Freitas Silva^{1*}.

1. Centro de Microscopia Eletrônica, Departamento de Ciências Biológicas, UESC, Ilhéus, Brasil.
2. Departamento de Química, CCEN, UFPB, João Pessoa, Brasil.
3. Departamento de Química, ICEX, UFMG, Belo Horizonte, Brasil.

Resumo

O estresse oxidativo (EO) está envolvido na disfunção placentária causada pelo hipotireoidismo materno. As porfirinas de manganês (MnPs) tem apresentado alto potencial antioxidante, embora não tenham sido avaliadas em doenças gestacionais. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial terapêutico de duas formulações de MnPs, MnIIIIT2EPyP (MnP I) e MnIIIIT5B3EPyP (MnP II), na restrição feto-placentária causada pelo hipotireoidismo materno. O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil e o tratamento com as MnPs I e II iniciou-se no 8º dia de gestação. As MnPs I e II aumentaram o peso fetal das ratas hipotireoideas, além da MnP I aumentar o peso dos órgãos fetais. As MnPs restabeleceram a morfologia da zona juncional e aumentaram a vascularização na placenta. As MnPs bloquearam o aumento de HIF1 α e 8-OHdG, marcadores de hipóxia e dano oxidativo, causado pelo hipotireoidismo, mostrando níveis de expressão semelhante ao controle, além de terem aumentado a expressão proteica de SOD1, Cat e GPx1. Conclui-se que as MnPs melhoram o desenvolvimento feto-placentário de ratas hipotireoideas e protegem contra o estresse oxidativo.

Autorização legal: CEUA nº 002/17

Palavras-chave: antioxidantes; metaloporfirinas; disfunção tireoidiana.

Apoio financeiro: CNPq, FAPESB, UESC.

Trabalho selecionado para a JNIC: UESC

Introdução

Doenças gestacionais como pré-eclâmpsia, restrição de crescimento intrauterino, aborto recorrente e diabetes mellitus gestacional estão associadas à ocorrência de estresse oxidativo na interface materno-fetal (BURTON et al., 2009; FOLLI et al., 2012). Recentemente, demonstramos que o hipotireoidismo materno, outra importante doença gestacional, também causa estresse oxidativo na interface materno-fetal de ratas (SANTOS et al., 2021a), sendo que esta doença está associada a aborto, pré-eclâmpsia, e neonatos com baixo peso (SILVA; OCARINO; SERAKIDES, 2018). Além disso, em ratas, o hipotireoidismo materno compromete a morfologia, angiogênese e imunologia placentária, além da migração trofoblástica intrauterina (SILVA et al., 2012, 2014, 2015).

Como a hipofunção tireoidiana compromete a atividade antioxidante (CHAKRABARTI et al., 2016), o uso de antioxidantes sintéticos ou naturais no tratamento da disfunção placentária causada pelo hipotireoidismo materno pode ser promissor, inclusive na prevenção de outras doenças gestacionais que apresentam o estresse oxidativo na sua patogênese (AOUACHE et al., 2018). Neste sentido, estudos têm demonstrado que porfirinas de manganês (MnPs) apresentam grande potencial terapêutico no controle do estresse oxidativo em modelos de acidente vascular cerebral, isquemia renal e radioproteção por apresentarem alto poder antioxidante e mínima toxicidade (BATINIC-HABERLE et al., 2012). No entanto, até o momento, nenhum estudo foi realizado com MnPs para o tratamento de doenças gestacionais que cursam com estresse placentário.

Dessa forma, como o hipotireoidismo causa estresse oxidativo na interface materno-fetal de ratas (SANTOS et al., 2021a), a hipótese deste estudo é que as MnPs podem impedir ou reduzir as alterações feto-placentárias causadas pelo hipotireoidismo materno. Assim, o objetivo foi avaliar o potencial terapêutico de duas formulações de MnPs, MnIIIIT2EPyP e MnIIIIT5B3EPyP, na restrição feto-placentária de ratas com hipotireoidismo.

Metodologia

Foram utilizadas ratas Wistar (7-8 animais por grupo) neste estudo. Os animais foram divididos em

grupos controle, hipotireoideo, hipotireoideo tratado com MnIIIT2EPyP (MnP I) e hipotireoideo tratado com MnIIIT5B3EPyP (MnP II). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA n° 002/17) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC).

O hipotireoidismo foi induzido pela administração diária de propiltiouracil (4mg/rata/dia) em água destilada, por sonda orogástrica, durante todo o experimento até o dia da eutanásia. As fêmeas do grupo controle receberam a mesma quantidade de água destilada como placebo. Depois de três dias do início da indução ao hipotireoidismo, as ratas em proestro foram acasaladas e a presença de espermatozoides na citologia vaginal foi considerado como dia 0 de gestação (DG). O tratamento com as MnPs I e II (0,1mg/rata/dia) foi intraperitoneal (IP) e iniciou-se no 8° DG e todos os animais foram eutanasiados no 18° DG. Foram avaliados o desenvolvimento feto-placentário, a histomorfometria placentária e a expressão de marcador de hipóxia (fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF1 α)), enzimas antioxidantes (superóxido dismutase 1 (SOD1), catalase (CAT), glutathione peroxidase 1 (GPx1), glutathione transferase (GST)) e marcador de dano oxidativo ao DNA (8-OHdG) por imunohistoquímica, qPCR e ensaios enzimáticos.

Na avaliação do desenvolvimento feto-placentário foram pesados a unidade útero-placenta e os fetos individualmente, como também os órgãos fetais (coração, fígado, pulmões e rins). Na histomorfometria placentária foram avaliadas a espessura da zona juncional e do labirinto placentário e a proporção de células trofoblásticas e seios vasculares que estava presente nessas camadas.

Na imunohistoquímica foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) com revelação pela diaminobenzidina (DAB). A análise morfométrica da área de imunomarcagem em pixels em cada camada da placenta foi realizada pelo software WCIF ImageJ (Media Cybernetics Manufacturing, Rockville, MD, USA).

Na qPCR, a extração do RNA foi realizada com Trizol e após transcrição reversa e realização das reações de amplificação, a expressão dos genes alvo foi avaliada pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizando como normalizador o gene *polymerase II subunit A (Polr2a)* de *Rattus norvegicus*.

Nos ensaios enzimáticos foi avaliada a atividade enzimática de SOD, GST e catalase.

Os dados foram analisados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste *Student Newman Keuls* (SNK). As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados e Discussão

A administração das metaloporfirinas de manganês MnIIIT2EPyP (MnP I) e MnIIIT5B3EPyP (MnP II) não somente melhorou o desenvolvimento fetal e a morfologia e vascularização placentária de ratas com hipotireoidismo materno, como protegeu contra a hipóxia e o estresse oxidativo na interface materno-fetal desses animais. Este é o primeiro estudo a avaliar o potencial terapêutico de MnPs em uma doença gestacional associada a estresse oxidativo, além de ser o primeiro a avaliar a MnIIIT5B3EPyP (MnP II) em um modelo experimental.

Na avaliação dos parâmetros maternos e placentários, o tratamento com as MnPs foi capaz de aumentar o baixo peso fetal apresentado pelas ratas hipotireoideas ($p < 0,05$). Interessantemente, o tratamento com a MnPI também aumentou os pesos dos órgãos fetais (fígado, rins, coração, pulmões) das ratas hipotireoideas, que estavam reduzidos em relação ao controle ($p < 0,05$). Esse aumento dos órgãos fetais é importante para o desenvolvimento adequado do feto, visto que o desenvolvimento intrauterino e o tamanho ao nascimento são aspectos determinantes da saúde natal (SHARMA; SHASTRI; SHARMA, 2016).

Com relação a morfologia placentária, as MnPs restabeleceram a população de células de glicogênio da zona juncional, uma vez que o tratamento reduziu a proporção de células de glicogênio que estava aumentado no grupo hipotireoideo ($p < 0,01$), de modo que se igualasse ao grupo controle ($P > 0,05$). Esse aumento de células de glicogênio em ratas hipotireoideas também já foi demonstrado em outro estudo (SILVA *et al.*, 2012). Além disso, a regularização na população de células de glicogênio após o tratamento com as MnPs indica um possível restabelecimento da diferenciação adequada das células trofoblásticas durante a formação e desenvolvimento da placenta ou da sua migração adequada em direção a decídua, visto que trabalhos já sugerem o envolvimento das células de glicogênio no processo de invasão e remodelamento das artérias espiraladas uterinas (WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018). Outros estudos também têm demonstrado que alterações na população dessas células podem estar relacionadas com a gênese de doenças gestacionais em modelos experimentais, principalmente em situações que ocorre crescimento fetal alterado (AKISON *et al.*, 2007). No labirinto placentário, o tratamento com ambas as MnPs não somente aumentaram a área ocupada por seio vascular materno como também a área ocupada por capilar fetal, que estava reduzida no grupo hipotireoideo em relação ao controle ($P < 0,05$). A maior vascularização na placenta das ratas hipotireoideas causada pelas MnPs também favorece o maior peso fetal, pois permite maior aporte de oxigênio e nutrientes para o feto em desenvolvimento. Corroborando com os nossos resultados, Zhou *et al.*, (2015) demonstraram *in vitro* um aumento da angiogênese em células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVECs) quando tratadas com outra formulação de MnP (MnTBAP), sugerindo um efeito pró-angiogênico das MnPs.

As MnPs foram capazes de reduzir a expressão de HIF1 α ($P < 0,01$) e 8-OHdG ($P < 0,001$) na interface materno-fetal das ratas hipotireoideas, dois biomarcadores de hipóxia celular e dano oxidativo ao DNA, respectivamente (ROSARIO; KONNO; SOARES, 2008; URBANIAK *et al.*, 2020). Essa diminuição da hipóxia celular e do dano oxidativo na interface materno-fetal das ratas hipotireoideas pode estar associada à atuação dessas MnPs que possuem ação mimética à SOD e potente ação catalítica de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RABBANI *et al.*, 2009). Nesse sentido, os resultados deste estudo indicam que as MnPs I e II possuem

efeitos protetores contra a hipóxia e o estresse oxidativo placentário causados pelo hipotireoidismo materno e que a MnP II, que até então não tinha sido avaliada *in vitro* e *in vivo*, mostrou ter efeitos citoprotetores similares à MnP I contra o estresse oxidativo.

Também foi avaliada a expressão e atividade das principais enzimas antioxidantes envolvidas no controle do EO. Ambas as porfirinas foram capazes de aumentar de forma semelhante a expressão proteica placentária e/ou decidual de SOD1 e GPx1/2 nas ratas hipotireóideas ($p < 0,05$). De forma interessante, a MnP II, diferentemente da MnP I, também foi capaz de aumentar a expressão proteica decidual e placentária de catalase ($p < 0,01$), demonstrando que na interface materno-fetal de ratas a MnP II apresenta maior potencial no aumento de enzimas antioxidantes que a MnP I. Além disso, ambas as porfirinas foram capazes de restaurar a expressão gênica placentária de *Gpx1*, se igualando ao controle, além de reduzir a maior expressão gênica de *Sod1* causada pelo hipotireoidismo ($p < 0,01$), demonstrando o potencial dessas MnPs na regulação do estado redox celular. Os resultados referentes à imunomarcagem e expressão gênica das enzimas antioxidantes deste estudo estão de acordo com Cheng *et al.* (2015) que demonstraram que o tratamento com a MnTM-4PyP em um modelo *in vitro* de estresse oxidativo utilizando neurônios corticais de rato expostos a peróxido de hidrogênio (H₂O₂) aumentou significativamente os níveis de SOD1, SOD2 e CAT e reduziu a expressão gênica de *Sod1* e *Cat*.

No entanto, as MnPs não foram capazes de aumentar a baixa atividade enzimática de SOD, CAT e GST causada pelo hipotireoidismo ($P < 0,01$). Este resultado difere de estudos prévios que verificaram o aumento da atividade enzimática de enzimas antioxidantes após o uso de MnPs (ZHANG *et al.*, 2019). Contudo, esses estudos já realizados foram em modelos *in vitro*, destoando deste estudo que além de ser *in vivo* abrange um modelo de doença gestacional, que até o presente não tinha sido utilizado para a avaliação das MnPs. Possivelmente, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes avaliadas no presente estudo possa ser alcançado, conforme os estudos *in vitro*, utilizando doses maiores das MnPs, embora mais estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese.

Em conjunto, nossos resultados permitem sugerir que os tratamentos com as MnPs I e II, mesmo não aumentando a atividade enzimática placentária de SOD, catalase e GST nas ratas hipotireóideas, foram capazes de proteger contra o estresse oxidativo na interface materno-fetal desses animais, pois não somente reduziram a expressão de HIF1 α e 8-OHdG, como aumentaram a expressão proteica placentária e/ou decidual de SOD1, catalase e GPx1/2 e restauraram a expressão gênica placentária de *Sod1* e *Gpx1*.

Conclusões

Este estudo demonstrou que o tratamento com as MnPs I e II melhora o desenvolvimento feto-placentário de ratas hipotireóideas e protege contra a hipóxia e o estresse oxidativo causado pelo hipotireoidismo na interface materno-fetal, sugerindo potenciais alternativas terapêuticas para disfunções gestacionais que cursam com estresse oxidativo.

Referências bibliográficas

- AKISON, L. K.; NITERT, M. D.; CLIFTON, V. L.; MORITZ, K. M.; SIMMONS, D. G. Review: Alterations in placental glycogen deposition in complicated pregnancies: Current preclinical and clinical evidence. **Placenta**, v. 54, p. 52–58, 1 jun. 2017.
- AOUACHE, R.; BIQUARD, L.; VAIMAN, D.; MIRALLES, F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 5, p. 1496, maio 2018.
- BATINIC-HABERLE, I.; SPASOJEVIC, I.; TSE, H. M.; TOVMASYAN, A.; RAJIC, Z.; CLAIR, D. K. S.; VUJASKOVIC, Z.; DEWHIRST, M. W.; PIGANELLI, J. D. Design of Mn porphyrins for treating oxidative stress injuries and their redox-based regulation of cellular transcriptional activities. **Amino acids**, v. 42, n. 1, p. 95, 2012.
- BURTON, G. J.; CINDROVA-DAVIES, T.; TURCO, M. Y. Placental Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress in the Pathophysiology of Unexplained Intrauterine Growth Restriction and Early Onset Preeclampsia. **Placenta**, v. 30, n. SUPPL., p. 43–48, mar. 2009.
- CHAKRABARTI, S. K.; GHOSH, S.; BANERJEE, S.; MUKHERJEE, S.; CHOWDHURY, S. Oxidative stress in hypothyroid patients and the role of antioxidant supplementation. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 20, n. 5, p. 674, set. 2016.
- CHENG, K. Y.; GUO, F.; LU, J. Q.; CAO, Y. Z.; WANG, T. C.; YANG, Q.; XIA, Q. MnTM-4-PyP Modulates Endogenous Antioxidant Responses and Protects Primary Cortical Neurons against Oxidative Stress. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 21, n. 5, p. 435–445, 1 maio 2015.
- FOLLI, F.; CORRADI, D.; FANTI, P.; DAVALLI, A.; PAEZ, A.; GIACCARI, A.; PEREGO, C.; MUSCOGIURI, G. The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus Micro- and Macrovascular Complications: Avenues for a Mechanistic-Based Therapeutic Approach. **Current Diabetes Reviews**, v. 7, n. 5, p. 313–324, 12 set. 2012.
- RABBANI, Z. N.; Spasojevic, I.; Zhang, X.; Moeller, B. J.; Haberle, S.; Vasquez-Vivar, J.; Dewhirst, M. W.; Vujaskovic, Z.; Batinic-Haberle, I. Antiangiogenic action of redox-modulating Mn(III) meso-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin, MnTE-2-PyP(5+), via suppression of oxidative stress in a mouse model of breast tumor. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 47, n. 7, p. 992–1004, 8 jul. 2009.
- ROSARIO, G. X.; KONNO, T.; SOARES, M. J. Maternal hypoxia activates endovascular trophoblast cell invasion. **Developmental Biology**, v. 314, n. 2, p. 362–375, fev. 2008.
- SANTOS, B. R.; CORDEIRO, J. M. DOS A.; SANTOS, L. C.; SANTOS, E. O.; OLIVEIRA, L. S. DE.; BARBOSA, E. M.; MACEDO, I. O.; SARMENTO-NETO, J. F.; REBOUÇAS, J. S.; SILVA, G. DE F.; SILVA, J. S. Manganese porphyrin-based treatment blocks placental stress caused by maternal hypothyroidism and improves placental morphogenesis and fetal development in a rat experimental model. **XX Congress of the Brazilian Society for Cell Biology**. Anais...São Paulo: Brazilian Society for Cell Biology, 2021a.

11. SHARMA, D.; SHASTRI, S.; SHARMA, P. Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects. **Clinical Medicine Insights Pediatrics**, v. 10, p. 67, jan. 2016.
12. SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 7, p. 923–931, 2012.
13. SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Fetal growth restriction in hypothyroidism is associated with changes in proliferative activity, apoptosis and vascularisation of the placenta. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 7, p. 923–931, 2012.
14. SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Maternal thyroid dysfunction affects placental profile of inflammatory mediators and the intrauterine trophoblast migration kinetics. **Reproduction**, v. 147, n. 6, p. 803–816, 2014.
15. SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Placental angiogenic and hormonal factors are affected by thyroid hormones in rats. **Pathology - Research and Practice**, v. 211, n. 3, p. 226–234, 1 mar. 2015.
16. SILVA, J. F.; OCARINO, N. M.; SERAKIDES, R. Thyroid hormones and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 99, n. 5, p. 907–921, 2018.
17. URBANIAK, S. K.; BOGUSZEWSKA, K.; SZEWCZUK, M.; KÁZMIERCZAK²⁰ BARAŃSKA, J.; KARWOWSKI, B. T. 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 202, 3 jan. 2020.
18. WOODS, L.; PEREZ-GARCIA, V.; HEMBERGER, M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 570, 27 set. 2018.
19. ZHANG, C.; HAO, X.; CHANG, J.; GENG, Z.; WANG, Z. Mn-TAT PTD-Ngb attenuates oxidative injury by an enhanced ROS scavenging ability and the regulation of redox signaling pathway. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 27 dez. 2019.
20. ZHOU, Q. Q.; GENSCHE, C.; KELLER, C.; SCHMITT, H.; ESSER, J.; MOSER, M.; LIAO, J. K. MnTBAP stimulates angiogenic functions in endothelial cells through mitofusin-1. **126 Vascular Pharmacology**, v. 72, p. 163–171, 23 maio 2015.