

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

THAYNÁ DA SILVA CONSTANTINO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA NADPH OXIDASE NA NEFROGÊNESE NORMAL E NA
INDUÇÃO DE RETARDO DA NEFROGÊNESE PELA INFLAMAÇÃO MATERNA EM RATOS

Recife

2019

THAYNÁ DA SILVA CONSTANTINO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA NADPH OXIDASE NA NEFROGÊNESE NORMAL E NA
INDUÇÃO DE RETARDO DA NEFROGÊNESE PELA INFLAMAÇÃO MATERNA EM RATOS

Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em
fisiologia e bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de
mestre em fisiologia e bioquímica.

Área de concentração: Fisiologia e bioquímica

Orientação: Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho

Coorientação: Profa. Dra. Ana Durce O. da Paixão

Recife

2019

THAYNÁ DA SILVA CONSTANTINO

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Constantino, Thayná da Silva

Avaliação do papel da NADPH oxidase na nefrogênese normal e na indução de retardo da nefrogênese pela inflamação materna em ratos / Thayná da Silva Constantino - 2019.

59 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Leucio Duarte Vieira Filho

Coorientadora: Ana Durce O. da Paixão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Bioquímica. Recife, 2019.

Inclui referências

1. Estresse oxidativo 2. Inflamação materna 3. Programação intrauterina
I. Vieira Filho, Leucio Duarte (orient.) II. Paixão, Ana Durce O. da (coorient.) III. Título

571

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-095

AVALIAÇÃO DO PAPEL DA NADPH OXIDASE NA NEFROGÊNESE NORMAL E NA
INDUÇÃO DE RETARDO DA NEFROGÊNESE PELA INFLAMAÇÃO MATERNA EM RATOS

Dissertação apresentada ao programa de pós graduação em
fisiologia e bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos parciais para a obtenção do título de
mestre em fisiologia e bioquímica.

Aprovada em: 21.02.2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Profa. Dra. Ângela Amâncio Dos Santos
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Profa. Dra. Gardênia Carmen Gadelha Militão
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Recife

2019

A Deus digno de toda Honra e glória.

Aos meus familiares em especialmente a minha mãe Sônia Lima, a minha irmã Taynan Constantino, e a minha sobrinha Letícia Vitória, pelo apoio.

A Sandra Rodrigues e Edson Severino de Lima Junior (*In memorian*) por nunca desistirem de mim e sempre estiveram presentes em minha vida.

Aos meus amigos Marlene Bispo, Guilherme Lopes , Hiarajane e a todos que me apoiaram e incentivaram ao longo dessa Jornada.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Em Primeiro lugar agradeço a Deus, pois sem ele eu não teria forças para essa longa jornada.

Aos meus familiares em especial a minha mãe Maria Sônia Silva de Lima, minha irmã Taynan da Silva Constantino e minha sobrinha Letícia Vitória que me ajudaram a perseverar em meio as dificuldades.

Aos meus amigos que compartilharam do momentos difíceis das minhas conquitas, em especial Marlene Bispo, Guilherme Lopes, Anie Melo, Hiara Ferreira, Amanda Rosa, Vitória Almeida e Sarah.

Ao professor Dr. Leucio Duarte Vieira Filho pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta dissertação. Adquiri conhecimentos indispensáveis para o meu crescimento pessoal e profissional.

A professora Dra Ana Durce Oliveita Paixão, pela contribuição para meu aprendizado profissional.

A professora Dayane pela disponibilidade dos equipamentos indispensáveis para a realização de alguns experimentos.

Aos meus amigos integrantes do LFFR e LFPR , Linaldo, Edjair, Juiane , Regina, Natália, Larissa, Angélica, Marry, Lucas, Fernanda, Danyele, Beatriz pela força, incentivo constantes e pela ajuda nos experimentos.

Ao técnico de laboratório Nielson apoio constante e auxílio nos experimentos.

A Veterinária Cláudia pelos cuidados com os animais em estudo.

A todos os professores e amigos da pós-graduação de fisiologia e bioquímica.

A todos tiveram uma parcela de contribuição para o desenvolvimento desse trabalho, meu eterno obrigada.

RESUMO

A inflamação materna é uma condição correlacionada com prejuízo no desenvolvimento do feto e programação de hipertensão na vida adulta. O aumento do estresse oxidativo é um fator que parece permear esse mecanismo de programação. Contudo, em situações controle, espécies reativas de oxigênio também são importantes na interface mãe/feto. A NADPH oxidase tem um papel importante na produção de espécies reativas de oxigênio em vários tipos celulares, tornando-a um importante alvo. Dessa forma, é importante que se investigue o papel do status redox no desenvolvimento intrauterino. Investigamos, em ratos, o envolvimento da NADPH oxidase na elevação do estresse oxidativo materno/fetal que ocorre na inflamação induzida por administração de lipopolissacarídeo (LPS) na gestação, bem como a repercussão no desenvolvimento renal. Ratas (90 dias) foram tratadas com NaCl 0,9% (1 mL/kg, s.c., grupo Controle, n=16) ou LPS (0,5 mg/kg, s.c., n=16) nos dias 13, 15, 17 e 19 de gestação. Metade das mães recebeu tratamento com o inibidor da NADPH oxidase, apocinina (100 mg/kg, na água de beber), a partir do dia 0 de gestação. No 20º dia de gestação, as mães foram submetidas a coleta dos fetos e respectivas placentas. No fígado fetal e placentas, foram avaliados a peroxidação lipídica e os níveis de glutathiona reduzida (GSH). Na placenta foram avaliadas a atividade da NADPH oxidase e a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. No rim do feto foram avaliados marcadores de nefrogênese: área nefrogênica, α -actina de músculo liso (α -SMA), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e expressão de Bax e Bcl 2. O peso corpóreo dos fetos oriundos das mães submetidas ao LPS foi 10% menor ($P < 0,01$) do que dos fetos de mães Controle. A peroxidação lipídica na placenta e fígado fetal do grupo LPS foram cerca de 2 vezes maiores ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente) do que no Controle. O grupo LPS também apresentou uma redução de 40% ($P < 0,05$) nos níveis de GSH na placenta e fígado fetal. De forma semelhante ao que foi observado na peroxidação lipídica, as placentas obtidas de mães submetidas ao LPS apresentaram elevação de cerca de duas vezes ($P < 0,05$) na atividade da NADPH oxidase. A atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ foi 50% menor ($P < 0,01$) em placentas do grupo LPS em relação ao Controle. A inibição da NADPH oxidase pela apocinina preveniu a elevação do estresse oxidativo induzida pelo LPS, bem como a inibição da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ na placenta. Os fetos de mães submetidas a administração de LPS apresentaram maior (25%, $P < 0,01$) área nefrogênica e menor contagem de células PCNA-positivas (20%, $P < 0,05$) do que o grupo Controle, enquanto nenhuma alteração foi observada na imunomarcagem para α -SMA no córtex renal. Além disso, o LPS aumentou em duas vezes ($P < 0,01$) a expressão proteica de Bax e diminuiu em 50% ($P < 0,01$) a expressão de Bcl 2. O tratamento materno com apocinina preveniu a inibição da proliferação celular e o aumento do Bax, evitando, assim, o retardo da nefrogênese. Concluimos que a produção de superóxido mediada pela NADPH

oxidase é um mecanismo subjacente à elevação do estresse oxidativo no ambiente materno/fetal induzida pela inflamação materna, que pode estar correlacionada ao retardo da nefrogênese, através de alterações na proliferação e apoptose celular.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Inflamação materna. Programação intrauterina. NADPH oxidase. Nefrogênese.

ABSTRACT

Inflammation is a maternal adverse condition linked to intrauterine growth retardation and programming of hypertension in adult life. Increased oxidative stress is a factor that seems to permeate the programming mechanism. However, reactive oxygen species are also important in the mother/fetus interface under normal conditions. Thus, it is important to investigate the role of redox status in intrauterine development, and NADPH oxidase is an important target because of its significance in reactive oxygen species production in many cell types. We investigated, in rats, the involvement of NADPH oxidase in the elevation of maternal/fetal oxidative stress that occurs in inflammation induced by administration of lipopolysaccharide (LPS) during pregnancy, as well as the repercussion on renal development. Female rats (90 days) were treated with 0.9% NaCl (1 mL/kg, sc, Control group, n = 16) or LPS (0.5 mg/kg, sc, n = 16) on days 13, 15, 17 and 19 of gestation. Part of the dams received daily treatment with the NADPH oxidase inhibitor, apocynin (100 mg/kg, in drinking water), beginning at gestation day 0. On the 20th day of gestation, the mothers were submitted to collection of the fetuses and respective placentas. In fetal liver and placentas, it was evaluated lipid peroxidation and reduced glutathione levels (GSH), while NADPH oxidase activity and (Na⁺+K⁺)ATPase activity were evaluated in placenta. In the fetal kidney, nephrogenesis markers were evaluated: nephrogenic area, smooth muscle α -SMA, cell proliferation nuclear antigen (PCNA) and Bax and Bcl 2 expression. Body weight of fetuses from dams submitted to LPS was 10% lower (P<0.01) than control ones. Placental lipid and fetal liver peroxidation of the LPS group were about 2-fold higher (P<0.001 and P<0.01, respectively) than Control. The LPS group also presented 40% reduction (P<0.05) in GSH levels in the placenta and fetal liver. Similarly to what was observed in lipid peroxidation, the placentas obtained from LPS treated dams presented a two-fold increase (P<0.05) in NADPH oxidase activity, while the activity of (Na⁺+K⁺)ATPase was 50% lower (P <0.01). Inhibition of NADPH oxidase by apocynin prevented the elevation of oxidative stress induced by LPS, as well as the inhibition of (Na⁺+K⁺)ATPase activity in the placenta. Fetuses from mothers undergoing LPS administration had higher (25%, P<0.01) nephrogenic zone and lower PCNA-positive cell count (20%, P<0.05) than Control group, whereas no changes was observed in the renal cortical immunostaining for α -SMA. In addition, LPS increased Bax protein expression by two-fold (P<0.01) and decreased Bcl 2 expression by 50% (P<0.01). Maternal treatment with apocynin prevented the inhibition of cell proliferation and Bax protein increase, thus avoiding the delay of nephrogenesis. We conclude that NADPH oxidase-mediated superoxide production is a mechanism underlying the elevation of oxidative stress in maternal/fetal environment induced by maternal inflammation, which may be correlated with the nephrogenesis delay, through changes in cell proliferation and apoptosis.

Keywords: Intrauterine programming. Maternal inflammation. Oxidative stress. NADPH oxidase. Nephrogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Representação do desenvolvimento renal no curso da gestação humana	23
Tabela 1- Principais antioxidantes utilizados em modelos de programação intrauterina	28
Figura 2 - Representação da estrutura da NADPH oxidase	29
Figura 3- Representação da ativação da NOX e inibição	32
Figura 4 - Estrutura da apocinina	33
Figura 5 - Efeitos do LPS na ativação de NOX	34
Tabela 2- Parâmetros gerais da gestação, placenta e feto	42

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Peroxidação lipídica no fígado materno (A), placenta (B) e fígado fetal (C) no 20° dia de gestação	43
Gráfico 2- Níveis de GSH no fígado materno, placenta e fígado fetal	45
Gráfico 3- Produção basal de superóxido e atividade da NADPH oxidase em placentas obtidas no 20° dia da gestação	46
Gráfico 4- Atividade da (Na+K+) ATPase em placentas obtidas no 20° dia da gestação	47
Gráfico 5- Área nefrogênica dos fetos com 20° dias de vida gestacional	48
Gráfico 6- Número de células PCNA-positivas por glomérulo e densidade de marcação de alfa-actina de músculo liso, no córtex renal de ratos com 20° dias de gestação	49
Gráfico 7- Expressão proteica de Bax e BCL2 no rim de fetos com 20° dias de vida gestacional	50

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

- BSA Albumina bovina sérica
- CAT catalase
- CTBs citotrofoblastos
- DMSO Dimetilsulfóxido
- DTNB Acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico, do inglês *5,5-dithiobis(2 nitrobenzoic acid)*
- EDTA Ácido etilenodiamino tetra acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*
- EPM Erro padrão da média
- GPx glutationa peroxidase
- GSH glutationa reduzida
- H₂O₂ peróxido de hidrogênio
- IL interleucina
- LPS Lipopolissacarídeo
- MDA Malondialdeído
- NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, do inglês *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen*
- NOX NADPH oxidase
- O₂^{-•} radical superóxido
- OH^{-•} radical hidroxila
- OPAS Organização Pan -Americana de Saúde
- PBS salina tamponada com fosfato, do inglês *phosphate buffered saline*
- PCNA Antígeno nuclear de proliferação celular
- PMSF fluoreto de fenilmetano sulfonila, do inglês *phenylmethane sulfonyl fluoride*
- ROS Espécies reativas de oxigênio, do inglês *reactive oxygen species*
- SDS Dodecil sulfato de sódio, do inglês *sodium dodecyl sulfate*
- SOD superóxido dismutase
- TBA ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid*
- TBARS substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*
- TGF-β Fator de transformação de crescimento beta, do inglês *transforming growth factor β*
- TLR4 receptores *Toll-like 4*
- α-SMA α-actina de músculo liso, do inglês *α-smooth muscle actin*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
Efeitos da inflamação materna na programação intrauterina.....	17
Estresse oxidativo	18
Programação intrauterina de estresse oxidativo.....	19
Repercussões do estresse oxidativo e inflamação na interface materno-fetal.	20
Repercussões da programação intrtauterina de estresse oxidativo na atividade da (Na ⁺ +K ⁺)ATPase	22
Nefrogênese	23
Efeitos da perturbação intrauterina na nefrogênese	26
Terapias de prevenção da programação de inflamação e estresse oxidativo	28
A superfamília da NADPH oxidase	29
Efeitos da NADPH oxidase na placenta e nefrogênese	30
Apocinina	33
3. OBJETIVOS	35
GERAL	35
ESPECÍFICOS.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
Animais e tratamentos.....	36
Indução do processo inflamatório.....	37
Métodos analíticos	37
Avaliação do estresse oxidativo	37
Produção basal de superóxido e atividade da NADPH oxidase na placenta	38
Atividade da (Na ⁺ +K ⁺)ATPase	39
Imunohistoquímica	39
SDS-PAGE e Western Blotting.....	40
Análise estatística.....	41
5. RESULTADOS.....	42
Parâmetros Maternos, fetais e placentários no 20º dia da gestação.....	42
5.2. Peroxidação lipídica placentária e hepática materna e fetal	43
Níveis de GSH na placenta e fígado materno e fetal	43
Produção de ânions superóxido e atividade da NADPH oxidase na placenta	45
Atividade da (Na ⁺ +K ⁺)ATPase no tecido placentário	46
Efeitos da inflamação materna nos marcadores de nefrogênese.....	47
6. DISCUSSÃO	51
7. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

A regulação nutricional das interações hormonais materno-placentárias-fetais está correlacionada ao risco de desenvolvimento de diversas doenças crônico-degenerativas na vida adulta, de forma independente a fatores ambientais (Barker, 1989; Langley-Evans, 1999). Esses estudos sustentam a hipótese da programação fetal, onde sugere que insultos ambientais intrauterinos podem causar alterações adaptativas no feto e essas adaptações pode predispor ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Barker, 1995). Nesse contexto, podemos destacar os trabalhos do Dr. Barker, nos quais ele demonstra que alterações que afetem o ambiente fetal devem ser consideradas fundamentais na etiologia das doenças cardiovasculares (Barker et al 1986). As doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo: mais pessoas morrem anualmente por essas enfermidades do que por qualquer outra causa. Estima-se que 17,5 milhões de pessoas morreram por doenças cardiovasculares em 2012, representando 31% de todas as mortes em nível global (OPAS, 2017).

Inúmeros modelos experimentais de insultos maternos foram realizados no intuito de compreender o impacto do ambiente materno adverso na programação de doenças crônicas na vida adulta. Cada insulto resulta praticamente nas mesmas repercussões no feto, como a restrição de crescimento fetal (Perrone et al., 2016; Ojeda et al., 2008) elevação dos níveis pressóricos (Wang et al., 2014) e função vascular prejudicada (Goodfellow et al., 1998). A inflamação materna é uma importante situação clínica que pode perturbar o ambiente intrauterino, através da ativação do sistema imune inato, liberação mediadores pró-inflamatórios, afetando a perfusão e nutrição placentária (Wang, 2017). Dessa forma, pode acarretar em parto prematuro e baixo peso ao nascer (Rogers *et al.*, 2011), e em longo prazo, com desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Danesh et al.,2008), diabetes tipo II (Alexandraki *et al.*, 2006) e hipertensão arterial (Wei *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo está presente na interface materno-fetal uma vez que a gestação *per se* é uma situação de elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Mulheres grávidas apresentaram um aumento da peroxidação lipídica em comparação a mulheres não grávidas (Burton *et al.*,2011). A inflamação é comumente associada ao estresse oxidativo e vice-versa, uma vez que a produção de ROS podem estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias, o que pode aumentar ainda mais a geração de ROS por células alvo (Burton *et al.*,2011). Esse ambiente materno adverso pode afetar o desenvolvimento renal de diferentes maneiras como supra regulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, redução do

número de néfrons, mudanças nos transportadores de sódio, e estresse oxidativo renal (Paixão e Alexander, 2013).

Outros estudos também evidenciaram diversas repercussões da inflamação materna na nefrogênese, dentre elas diminuição do número de néfrons, hipertrofia glomerular, diminuição da excreção de sódio, diminuição do clearance de creatinina e aumento de infiltrados imunes (Galinsky *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Hao *et al.*, 2010). O estresse oxidativo também tem sido apontado como um importante fator que contribui para a fibrose renal (Wang, 2014).

A NADPH oxidase (NOX) tem papel importante em alguns mecanismos de proteção biológico isto é a sua ativação nem sempre está associado a patogênese de doença, uma vez que também é importante para a homeostase corporal. No entanto, em situações de desequilíbrio do estado redox é necessário a busca por terapias antioxidantes mais específicas, no intuito de prevenir danos colaterais ao órgão. Dados do nosso laboratório demonstraram que a administração materna de apocinina (um importante não tóxico inibidor da NOX), preveniu alterações funcionais na hemodinâmica renal, bem como o estresse oxidativo renal (Vieira *et al.*, 2018). Entretanto, ainda permanece obscuro os efeitos a curto prazo da inibição da NOX uma vez que a mesma tem papel fisiológico importante na interface materno fetal e na nefrogênese.

Com base nas evidências supramencionadas, investigamos, em ratos, se a NOX é responsável por alterações placentárias e na nefrogênese induzidas pela inflamação materna. Investigamos ainda se a inibição dessa via pode apresentar efeitos deletérios sobre marcadores de desenvolvimento renal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Efeitos da inflamação materna na programação intrauterina

A programação intrauterina proposta por Barker sugere que o ambiente materno adverso deve ser considerado um fator chave na etiologia das doenças cardiovasculares (Barker *et al.*, 1986). O baixo peso ao nascer tem sido associado ao desenvolvimento de hipertensão na vida adulta (Barker, 1989; Langley-Evans, 1999).

A insuficiência uteroplacentária acarreta em baixo peso ao nascer e retardo no desenvolvimento renal da prole, contribuindo para o desenvolvimento de hipertensão na vida adulta (Cuffe *et al.*, 2017). Ratas submetidas a restrição proteica no período da gestação, obtiveram diminuição do peso corpóreo, diminuição do volume renal além disso na vida adulta, apresentarem lesão renal e hipertensão arterial (Chaves *et al.*, 2011).

A inflamação materna repercute negativamente na interface materno-fetal e está envolvida na patogênese da hipertensão. A prole advinda de mães que sofreram inflamação no período da gestação, apresentaram aumento dos níveis pressóricos e hipertensão arterial (Wei *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2008) Além disso, induziu morte dos fetos, diminuição do peso corpóreo, retardo do desenvolvimento esquelético (Chen *et al.*, 2006).

Evidências apontam também a programação de disfunções cardiovasculares pela inflamação materna. Ratos advindos de mães expostas ao lipopolissacarídeo (LPS) no período da gestação apresentaram um aumento do índice cardíaco, de colágeno e fator de crescimento transformante- β (TGF- β) e conseqüentemente fibrose cardíaca (Chen *et al.*, 2015). Anormalidades morfológicas da artéria aorta bem como diminuição da reatividade vascular são observadas na prole de ratas expostas a inflamação na gestação (Zhao *et al.*, 2014).

As endotoxinas de bactérias gram-negativas (LPS) foram descobertas em 1892 (Pfeiffer, 1982) e caracterizadas em 1935 (Boivin e Mesrobeanu, 1935). Atualmente vem sendo amplamente utilizadas nos modelos de inflamação (wei *et al.*, 2007). Quando ativadas geram sinais auto-amplificatórios que culminam na liberação de citocinas pró-inflamatórias, pró fibróticas e também na produção de ROS (Lee *et al.*, 2003).

O LPS é estruturalmente composto por duas camadas de açúcar e uma camada lipídica, uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica, respectivamente. A porção lipídica é a que desencadeia maior resposta antigênica (Boivin e Mesrobeanu, 1935). Induz resposta inflamatória através da sua ligação a receptores Toll-like 4 (TLR4), que estão localizados na membrana celular; o reconhecimento do LPS pode ser feito por outras moléculas como a

proteína ligante de LPS, proteínas CD14, e proteínas MD-2. Essas proteínas nas formas solúveis podem transferir o LPS para o seu receptor TLR4 ou formar um complexo LPS-receptor-proteína (Machado, 2010).

Desde a descoberta do LPS numerosos modelos experimentais foram realizados afim de investigar a repercussão da inflamação materna no desenvolvimento intrauterino. O LPS proporciona além do aumento de mediadores pró-inflamatórios e pró-fibróticos como mencionado anteriormente, aumento da liberação de mediadores vasoconstritores como troboxano A2 e leucotrienos (Machado, 2010), que promovem vasoconstrição placentária e conseqüentemente diminuição do aporte de nutrientes, acarretando em restrição do crescimento fetal (Cotechini e Graham, 2015) e diminuição do peso corpóreo (Galinsky *et al*, 2011).

Essas alterações supramencionadas podem repercutir no desenvolvimento renal. (Hao *et al.*, 2010) apontaram que a prole advinda de mães que sofreram inflamação via LPS durante a gestação, apresentaram um aumento dos níveis pressóricos, diminuição da depuração de creatinina, proteinúria e diminuição do número de glomérulos, além do aumento do sistema renina angiotensina aldosterona intra-renal na vida adulta, predispondo ao desenvolvimento de hipertensão arterial. Além disso, diminuição do número de néfrons, aumento dos infiltrados de células imunes, e aumento da expressão de angiotensinogênio, também tem sido reportados (Rodríguez-Iturbe *et al*, 2004.)

Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um fator de elevada importância no mecanismo de programação intrauterina. O conceito de estresse oxidativo foi introduzido em 1985, e é um desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e / ou dano molecular (Sies *et al*, 2015). Os radicais livres são moléculas que possuem um número ímpar de elétrons na última camada eletrônica, isto o torna instável e altamente reativo, fazendo com que esteja sempre buscando capturar ou ceder elétrons das células à sua volta. O mecanismo de produção de radicais livres ocorre na membrana celular, citoplasma e na mitocôndria através da cadeia transportadora de elétrons.

As principais ROS são: ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH^{\cdot}), e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 não é um radical livre, porém é mais reativo que o $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} . A produção desses radicais é catalisada por enzimas como a NOX que é a principal enzima

produtora de ROS, juntamente com o ferro e o cobre através da reação de Fenton e Haber-Weiss respectivamente (Barbosa *et al.*, 2010).

No intuito de neutralizar ou prevenir a produção de ROS, alguns mecanismos de defesas antioxidantes são ativados. Em condições de estresse oxidativo, a produção de antioxidantes é regulada positivamente através da detecção de ROS, transdução de sinais, e supra-regulação de genes alvos para aumentar o nível de seus produtos, dessa forma, é gerado um sistema de retroalimentação negativa para eliminar de forma mais rápida a produção de ROS. As principais enzimas antioxidantes produzidas são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx). Essas enzimas possuem ações específicas, a CAT e GPx atuam inibindo a peroxidação lipídica, enquanto a SOD catalisa a desmutação do $O_2^{\cdot-}$ em oxigênio molecular e H_2O_2 (Lushchak, 2014).

O sistema renal é extremamente sensível ao estresse oxidativo, devido as diversas distribuições de NOXs (principal fonte de ROS) nos diversos segmentos renais: células mesangiais glomerulares, vasos renais, mácula densa, túbulo distal, membro espesso ascendente e ductos coletores (Chabrashvili *et al.*, 2002). Aumento de ânion superóxido pela NOX no rim pode alterar o transporte de sódio no ramo ascendente espesso da *vasa recta* que contribui para a diminuição do fluxo sanguíneo medular renal, diminuição da natriurese e desvio da curva de função renal para a direita, predispondo para o desenvolvimento da hipertensão arterial sistêmica (Cowley, 2008).

Programação intrauterina de estresse oxidativo

O estresse oxidativo vem sendo apontado como um dos mecanismos responsáveis pela programação de doenças tardias (Chen *et al.*, 2006). A exposição ao estresse intrauterino pode representar um mecanismo subjacente de homeostase do equilíbrio energético e função metabólica. Em particular, processos imunes e inflamatórios podem ser uma via candidata subjacente aos efeitos a longo prazo do estresse oxidativo intrauterino.

Respostas imunes pró-inflamatórias maternas e fetais produzidas por infecção do trato intra-uterino ou reprodutivo foram implicadas em desfechos fetais adversos. Ao longo da gestação o organismo materno produz grandes quantidades de cortisol que mantém seus níveis aumentados através da retroalimentação positiva via estímulo de liberação de hormônio de liberação de corticotropina placentário.(Neves *et al.*, 2007) A síntese de quimiocinas pró-inflamatórias (IL6, IL1b, IL10), tanto pela mãe quanto pelo feto potencializa ainda mais o quadro inflamatório causando aumento da contratilidade uterina (Wadhwa, 2005). Essas

respostas inflamatórias maternas e fetais também culminam com a síntese de mediadores vasoconstritores como o tromboxano, prejudicando a circulação e nutrição fetal (Oliveira *et al*, 2010).

Malti *et al*. 2014, avaliaram os efeitos do estresse oxidativo materno bem como da interação feto-placentária em um modelo de obesidade materna, onde foi observado variações do equilíbrio redox na placenta de recém-nascidos de mães obesas, bem como no aumento dos marcadores de estresse oxidativo associado à diminuição da oferta de antioxidantes. Em outro estudo, foi demonstrado que a exposição pré-natal ao estresse oxidativo acarreta metilação de genes relacionados à inflamação e adiposidade. O estresse pré-natal foi associado à diminuição da adiposidade infantil, enquanto que a metilação de IL6 de sangue do cordão umbilical foi associada ao aumento da adiposidade infantil em crianças mexicanas (Shaowei *et al*, 2016).

Outros estudos constataram um aumento da peroxidação lipídica na prole advinda de mães tratadas com 75 ug/kg de LPS bem como diminuição de glutathiona reduzida (GSH) (Chen *et al*, 2005), representando o papel do LPS também na indução do estresse oxidativo. Dados do nosso laboratório também demonstraram que a inflamação materna programou o estresse oxidativo bem como alterações na hemodinâmica renal. (Vieira *et al*, 2018).

Repercussões do estresse oxidativo e inflamação materna na interface materno-fetal.

A placenta é um órgão feto-materno que separa o feto do endométrio. É o local onde ocorrem as trocas gasosas e de nutrientes entre mãe e feto. É constituída por uma porção fetal originária do saco coriônico e uma porção materna chamada de decídua basal. As células deciduais são formadas quando as células do estroma (ou tecido conjuntivo) da decídua aumentam de tamanho em virtude do acúmulo de glicogênio e lipídios em seu citoplasma, como resposta aos níveis crescentes de progesterona no sangue da mãe. Muitas células da decídua degeneram próximo ao sincitiotrofoblasto, e juntamente com a circulação materna e as secreções uterinas, fornecem uma fonte nutricional rica para o embrião. O cordão umbilical está entre o embrião e a placenta, contendo no seu interior duas artérias e uma veia. As artérias circulam pelo cordão levando o sangue venoso do feto para a placenta, enquanto a veia carrega o sangue arterial da placenta para o feto (Wu *et al*, 2015).

O desenvolvimento placentário normal se inicia com a invasão do trofoblasto que é dividido por uma camada interna celular chamada de citotrofoblastos (CTBs) e uma camada externa chamada de sincitiotrofoblasto. Durante o primeiro trimestre de gravidez, as CTBs

diferenciam-se em uma população de células invasivas, denominadas CTBs extravagantes. Essas células invadem a parede uterina, transformando as artérias espirais uterinas em vasos de baixa resistência que permitem a entrega eficiente de sangue oxigenado ao feto em desenvolvimento. (Wu *et al.*, 2015).

Na placenta existem dois sistemas circulatórios: o uteroplacentário e o fetoplacentário. A circulação uteroplacentária é constituída das artérias uterinas espiraladas que trazem o sangue materno até os espaços intervilosos com uma pressão elevada (70-80 mm Hg). A circulação fetoplacentária é composta de duas artérias umbilicais e uma veia umbilical. As artérias umbilicais transportam o sangue do feto para a mãe e a veia umbilical transporta o sangue rico em O₂ e nutrientes da mãe para o feto (Wu *et al.*, 2015).

O transporte placentário de nutrientes para o feto é de extrema importância e é vulnerável a insultos na vida intrauterina, tornando a prole mais suscetível à doenças crônicas na vida adulta como hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes (Barker *et al.*, 1993)

A produção de mediadores inflamatórios tem sido associada a numerosas desordens perinatais como pré eclampsia, (Oliveira *et al.*, 2010) restrição do crescimento fetal (Ojeda *et al.*, 2008), morte fetal (Chen *et al.*, 2017) e aumento da contratilidade uterina ocasionando parto prematuro (Wadhwa, 2005). Essas complicações provavelmente estão associadas a estímulos excessivos de vias pró-inflamatórias, ocasionando a síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Esse elevado estado inflamatório pode acarretar em retardo do desenvolvimento fetal, baixo peso ao nascer, retardo do desenvolvimento esquelético (Chen *et al.*, 2017) e hipertensão arterial (Wei *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo também está associado a resposta inflamatória na gestação e a programação de doenças crônicas degenerativas como a hipertensão (Chen *et al.*, 2006). O Estímulo de ROS pode causar danos aos lipídeos, proteínas e DNA no tecido placentário, que induz uma forma de envelhecimento acelerado, o que pode acarretar insuficiência placentária e comprometimento da interação mãe-feto. (Sultana *et al.*, 2017).

A invasão trofoblástica deficiente implica mal controle da oxigenação do espaço interviloso na fase inicial da gravidez e na persistência das características primárias das artérias uterinas espiraladas, que mantêm sua elevada resistência o que culmina com um quadro de isquemia reperusão e alta produção de ROS. (Oliveira *et al.*, 2010). Essas alterações podem ainda impactar na disfunção de enzimas importantes como a (Na⁺+K⁺)ATPase e desequilibrar o transporte de nutrientes da mãe para o feto.

Repercussões da programação intrauterina na atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$

A transferência de substâncias através da barreira materno-fetal depende da espessura e extensão da barreira, bem como do gradiente de concentração da substância, ou da presença de mecanismos de transporte ativo. O transporte placentário de nutrientes para o feto é de extrema importância e é vulnerável a insultos na vida intrauterina, tornando a prole mais suscetível a doenças crônicas na vida adulta como hipertensão, doenças cardiovasculares e diabetes (Baker *et al.*, 1993).

As estruturas da placenta humana que merecem destaque são o sinciciotrofoblasto e as microvilosidades das células endometriais. A primeira estrutura é a mais importante, pois é responsável pelo fornecimento dos principais componentes estruturais e funcionais necessários para facilitar a manutenção da circulação materno fetal. A segunda estrutura é responsável por manter um ambiente favorável para a implantação do sinciciotrofoblasto. Esses tecidos dependem da força motriz do gradiente eletroquímico gerado pela $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$, dessa forma, a atividade enzimática da bomba também constitui o gerador de força para o crescimento do feto em desenvolvimento. (Johansson *et al.*, 2000).

A placenta, fisiologicamente, é fonte de radicais livres, no entanto em condições de insultos, (Ojeda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2014) a produção de radicais livres torna-se ainda mais aumentada, ocasionando um quadro de estresse oxidativo. A produção excessiva de ROS, pode repercutir negativamente na função da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ e diminuir o transporte de aminoácidos para o feto, uma vez que a peroxidação lipídica pode alterar a fluidez, potencial, permeabilidade da membrana (Dobretso, 1977) e conseqüentemente a atividade das enzimas $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ (Abad *et al.*, 2015).

Johansson *et al.*, 2003, demonstrou que a restrição do crescimento intrauterino provocou uma diminuição da atividade da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ na membrana microvilosa das placentas, contribuindo para o crescimento reduzido do feto.

A inibição da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$ ocasiona apoptose das células do sinciciotrofoblasto, demonstrando a importância da bomba para o funcionamento adequado do sinciciotrofoblasto e conseqüentemente da manutenção do equilíbrio da interface materno-fetal (Uddin *et al.*, 2007). Dessa forma, uma vez que a inflamação, bem como o estresse oxidativo, causam alterações na implantação do sinciciotrofoblasto e inibição da $(\text{Na}^+\text{K}^+)\text{ATPase}$, e esse desequilíbrio pode interferir no desenvolvimento renal da prole.

Nefrogênese

O rim é um órgão fundamental para manutenção da homeostase, sobretudo pelo balanço das características dos compartimentos fluidos corpóreos e pela excreção de resíduos nitrogenados. Suas unidades funcionais são representadas pelos néfron, que existem em número de cerca de 1.200.000 néfrons em cada rim humano. O néfron é constituído basicamente por uma unidade filtrante, o glomérulo, e um longo túbulo que realiza o processo de modulação do fluido que será excretado (Guyton e Hall, 2006).

A indução perinatal de alterações na nefrogênese são mais impactantes durante o estágio de desenvolvimento até 34-36 semanas de idade gestacional, ou seja, insultos nesse período pode alterar a maturação e organogênese renal (Gilbert *et al.*, 2007). Os genes, as moléculas de sinalização e os fatores de transcrição estabelecem identidade segmentar de néfrons e sua diferenciação funcional. Nos seres humanos, a conclusão da nefrogênese ocorre antes do nascimento a termo. No entanto, em bebês pré-termo, nascidos antes das 36 semanas de gestação, a maturação renal e o número final de néfrons só são obtidos no período pós-natal. A nefrogênese progride ao longo de três etapas de complexidade crescente (pronefro, mesonefro e metanefro), das quais as duas primeiras são transitórias e a terceira dá lugar à sua formação definitiva (Faa *et al.*, 2012) (FIGURA 1).

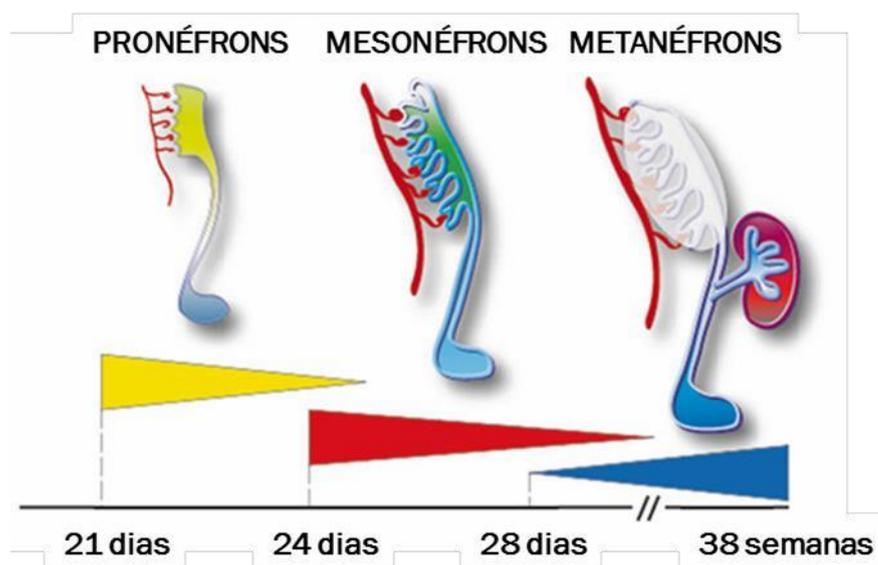


FIGURA 1. Representação do desenvolvimento renal no curso da gestação em humanos. Fonte: modificado de Faa *et al.*, 2012.

O Pronéfron é um órgão muito mais simples do que o rim mesonefrico ou metanefrico, aparece ao final da terceira semana e involui ao final da quarta. Consiste em três componentes principais: (1) um glomus / glomérulo filtrado de sangue; (2) os túneis pronefricos, que

conectam glomus com o ducto pronefrico; (3) o ducto pronefrico, que transporta os resíduos para a cloaca. As células epiteliais dos túneis pronefricos mostra a primeira diferenciação que evoluirá para uma das células mais complexas do nosso corpo: células tubulares proximais do rim maduro. Cada nefrótomo se transforma em uma vesícula alongada e desemboca em um canal coletor que se dirige para a cloaca. Este sistema excretor primitivo desaparece de forma gradual e precoce (Faa *et al.*, 2012).

O mesonefron se diferencia à partir da quarta semana do desenvolvimento de agrupamentos celulares mais caudais do cordão nefrogênico. Nestes agrupamentos celulares, aparecem cavidades que os transformam em vesículas mesonéfricas. Depois, alongam-se e transformam-se em túbulos mesonéfricos, em forma de “S”. Ao crescer, comunicam-se lateralmente com o vestígio do ducto pronefrico, chamado, a partir de agora, ducto mesonéfrico (ou ducto de Wolff), que desemboca nas paredes laterais da cloaca. A extremidade livre de cada túbulo mesonéfrico se dilata e forma um cálice que se invagina, associando-se a uma alça capilar, que forma o emaranhado capilar, ao qual envolve para constituir a cápsula glomerular (ou cápsula de Bowman). A seguir, a porção intermediária do túbulo mesonefrico se alonga e se contorce consideravelmente. Este desenvolvimento ocorre progressivamente em sentido craniocaudal. Assim, quando se formam os túbulos mesonéfricos da região lombar, os da região torácica já estão involuindo. Ao final do período embrionário (oitava semana), todo o mesonefro, exceto seu ducto e alguns túbulos, desaparecem (Faa *et al.*, 2012).

O rim metanefrico se desenvolve através de uma série de interações recíprocas entre o ducto de Wolff, que representa a evolução do ducto pronefrico e do mesênquima mesonefrico ambos provenientes do mesoderma intermediário. Desenvolve-se na região lombar do embrião desde o começo da quinta semana e dele derivam os néfrons definitivos. Do tronco do broto ureteral se origina o ureter e sua extremidade se dilata e forma a pélvis renal, os cálices maiores, os cálices menores e os tubos coletores. Formam-se primeiro as vesículas metanéfricas, que se alongam e originam os túbulos metanéfricos com forma de cálice e dão lugar à cápsula de Bowman que envolve o glomérulo renal, o restante do túbulo se diferencia nos diferentes segmentos que darão origem ao túbulo contorcido proximal, à alça de Henle e ao túbulo contorcido distal. O corpúsculo renal e os três segmentos citados, derivados do túbulo metanéfrico, constituem o néfron, cuja extremidade distal tem continuidade no túbulo coletor arqueado o número das unidades funcionais descritas aumenta por camadas concêntricas durante toda a vida pré-natal. Depois do nascimento não desenvolvem novos néfrons. (Faa *et al.*, 2011).

O desenvolvimento renal é um evento que depende fortemente de uma coordenada transição mesênquima-epitelial, ou seja, de uma diferenciação celular adequada. Esse processo é caracterizado por 4 estágios distintos. No 1º estágio ocorre reorganização do citoesqueleto para ativar a adesão celular, aquisição de marcadores de polaridade, expressão de adesão intercelular mediada por caderinas e junções de aderência e montagem da membrana basal. No 2º estágio, ocorre duas segmentações sequenciais na vesícula renal: a primeira dá origem ao corpo em forma de vírgula e a segunda origina o corpo em forma de S (essas duas segmentações dará origem aos diferentes segmentos dos néfrons). O 3º estágio é caracterizado por mudanças rápidas no desenvolvimento da vasculatura renal. O desenvolvimento das artérias e veias renais, com a origem das artérias aferentes e eferentes, o aparecimento dos tufo capilares glomerulares em contato estrito com a cápsula de Bowman e a diferenciação das células endoteliais do corpúsculo representam as mudanças mais importantes no desenvolvimento dos néfrons. O estágio IV caracteriza-se pela diferenciação e proliferação dos principais tipos de células que darão origem à evolução dos corpúsculos renais maduros, pela diferenciação das distintas células intersticiais que caracterizam as áreas cortical, medular e Peri-hilar, e pelo desenvolvimento do complexo justaglomerular (Potter *et al.*, 1943).

Efeitos da perturbação intrauterina na nefrogênese

A nefrogênese é um processo complexo e altamente regulamentado por fatores de crescimento, proliferação celular, diferenciação e genes que regulam a morfogênese da ramificação renal. Tendo em vista a sensibilidade do rim à perturbações intrauterinas, esses fatores reguladores pode sofrer alterações (Singh *et al.*, 2007). O curso do desenvolvimento renal de cada indivíduo pode ser modificado pela natureza, tempo, duração, gravidade de um insulto renal e vulnerabilidade do órgão afetado. O estresse oxidativo por exemplo, pode acarretar em uma diminuição do número de néfrons (Hotoura *et al.*, 2005).

Vários agentes, além do estresse oxidativo, podem interagir para modificar a nefrogênese antes mesmo do seu término, a exemplo da administração materna de agentes nefrotóxicos (Amann *et al.*, 2004; Hoy *et al.*, 2005), LPS (Galinsky *et al.*, 2011), bem como glicocorticóides (Figuerola *et al.*, 2005).

Diversos modelos experimentais de restrição do crescimento intrauterino e desnutrição proteica tem inúmeras repercussões que culminam para o retardo da nefrogênese e hipertensão arterial na vida adulta. Wlodek *et al.*, (2008), demonstrou que a restrição do crescimento fetal

ocasionou redução do número de néfrons associados ao aumento dos níveis pressóricos. A redução dos néfrons pode permanecer durante a vida adulta, uma vez que não são formados novos néfrons após o término da nefrogênese. A restrição do crescimento fetal também pode modular negativamente genes alvos importantes para o desenvolvimento renal (Carter, 2017). Ratas prenhes com restrição de nutrientes durante a janela crítica em que ocorre nefrogênese, obtém os recém-nascidos com um número reduzido de glomérulos por rim (Langley-Evans et al., 1999), hipertensão na vida posterior (Zimanyi et al., 2004; Franco et al., 2002; Woods et al., 2001) e glomerulosclerose (Nwagwu et al., 2000).

Outros modelos de perturbação intrauterina como a insuficiência útero placentária induziu apoptose das células renais e retardo na nefrogênese em ratos (Cuffe, 2017). Ratas prenhes expostas a administração de glicocorticóides bem como desnutrição proteica, obtiveram proles com aumento dos níveis pressóricos e desenvolvimento renal prejudicado (Woods et al., 2004). Em um modelo ovino, a exposição intra-uterina à corioamnionite ocasionou uma redução no número de néfrons e hipertrofia compensatória. (Galinsky et al., 2011).

O rim é um órgão fortemente afetado pelas respostas inflamatórias. Diversos estudos apontam o efeito do LPS na função renal. Já foi evidenciado em um modelo de lesão renal aguda, que o LPS induz fibrose renal, apoptose tubular e disfunção de α -actina de músculo liso (α -SMA), e a supressão da proteína ligante de LPS elimina seus efeitos (Castellano et al., 2014). Liu et al. (2015) demonstraram em um modelo de lesão renal aguda em ratos que o LPS induziu: apoptose túbulo intersticial, aumento de infiltrados inflamatórios nos túbulos renais, aumento dos níveis séricos de IL-6, IL-10 e fator de necrose tumoral α (TNF- α , do inglês *tumoral necrosis factor α*), injúria mitocondrial renal, aumento nos níveis de peroxidação lipídica e diminuição de marcadores antioxidantes, ressaltando também o papel do LPS na indução do estresse oxidativo renal.

Todos esses insultos citados anteriormente mesmo representando repercussões semelhantes no desenvolvimento renal, exibem particularidades e operam através de mecanismos distintos ainda não compreendidos.

Terapias de prevenção da programação de inflamação e estresse oxidativo

O impacto negativo da inflamação exacerbada e do estresse oxidativo na gestação e as repercussões na prole levou a uma busca de possíveis estratégias para proteger a placenta e o feto de complicações relacionadas, como o baixo peso ao nascimento e hipertensão na vida

adulta. A TABELA 1 mostra os principais antioxidantes utilizados nos diversos modelos experimentais de programação intrauterina adversa e os desfechos.

TABELA 1. Principais antioxidantes utilizados em modelos de programação intrauterina

ANTIOXIDANTE	MECANISMO DE INIBIÇÃO	EFEITOS NA PROGRAMAÇÃO	REF
Tempol	Mimetiza a ação da SOD, dismuta 2 moléculas de ânions: $O_2^{\cdot-}$ ou $^{\cdot-}OOH$.	Diminui estresse oxidativo, melhora a disfunção renal e a sinalização dos receptores de dopamina renais D1.	Wang <i>et al.</i> , 2014; Banday <i>et al.</i> , 2005
LCPUFA Omega-3	Supressão de fatores pró-inflamatórios e pró-oxidativos, por mecanismos ainda não totalmente compreendidos.	Diminui em doses moderadas o estresse oxidativo placentário, mas em doses altas tem um efeito inverso.	Leghi and Muhlhausler., 2016; Jones <i>et al.</i> , 2013; Jones <i>et al.</i> , 2014.
Ácido ascórbico	Antioxidante de múltiplas funções celulares, cofator enzimático, possui ação de desintoxicação.	Reduziu a morte fetal, o retardo do crescimento e do desenvolvimento esquelético pelo LPS. Reduziu estresse oxidativo placentário	Chen <i>et al.</i> , 2017. Gallo <i>et al.</i> , 2010.
PDTC	Inibe o NFκB(fator de transcrição nuclear κB)	Reverteu os aumentos na expressão gênica e no nível global de metilação do DNA. Preveniu hipertensão na prole adulta. Diminuiu a fibrose cardíaca induzida pelo LPS e melhorou o índice cardíaco.	Wang <i>et al.</i> , 2017; Wei <i>et al.</i> , 2003. Chen <i>et al.</i> , 2015.
Resveratrol	Efeitos anti-inflamatórios e tocolítics, inibe a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) e NOX. Ativa SIRT1(propriedade anti-inflamatória)	Preveniu o parto prematuro induzido por LPS, diminuiu a expressão de prostaglandina E2 (PGE2), COX-2 e NOX2 uterinos, melhorou o perfil endocanabinóide uterino. Preveniu a morte fetal induzida pela hipóxia.	Bourque <i>et al.</i> , 2012

A superfamília da NADPH oxidase

A NOX é uma enzima complexa multimérica que tem como função principal a de produzir ROS em diversos tipos celulares fagocíticos e não fagocíticos, possui 7 domínios transmembranares (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX 1 e DUOX2), 6 subunidades: 5 (gp91phox, p22phox, p40phox, p47phox e p67phox) e 1 subunidade (Rac1 ou Rac2). (FIGURA 2). É produzida em diversos tipos celulares fagocíticos e não-fagocíticos, pode ser modulada por citocinas e hormônios. Todas as isoformas de NOX funcionam como transportadoras de elétrons, e tem como função catalisar a formação $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 . Para que a NOX seja ativada é necessária a interação das suas cinco subunidades funcionais e adicionalmente a GTPase Rac. O Equilíbrio entre ativação (GTP-ligada) e inativação (GDP-ligada) regula as subunidades de membrana e citosólicas (BEDARD *et al.*, 2007).

$NADP^+$, H^+ e o $O_2^{\cdot-}$ são produzidos enquanto a NOX e o oxigênio são reduzidos. O $O_2^{\cdot-}$ gerado serve como alavanca para a produção de agentes oxidantes, incluindo halogênios oxidados e radicais livres. (Babior, 2017).

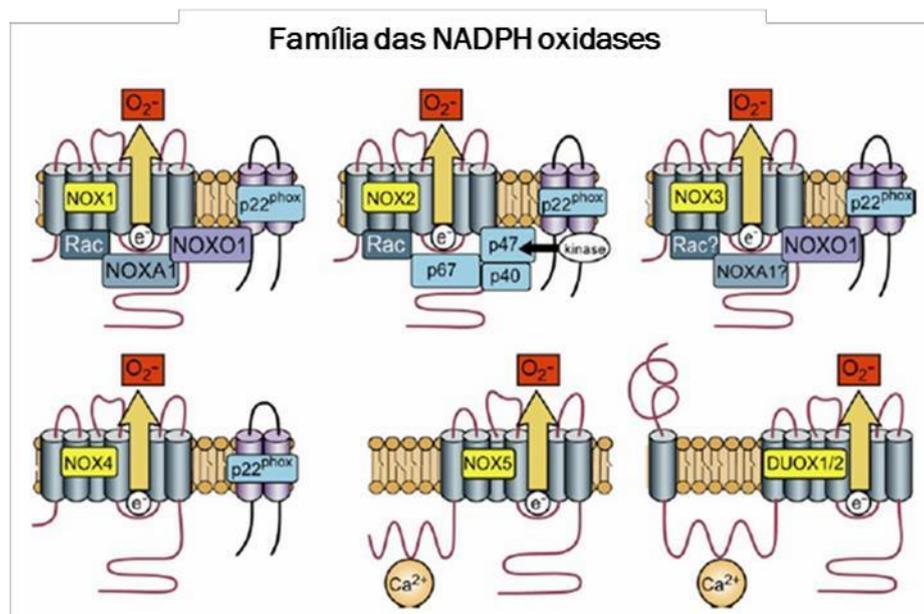


FIGURA 2. Superfamília da NADPH OXIDASE e ativação das suas isoformas. Mesmo sendo semelhantes às enzimas da família NOX possuem mecanismo de ativação diferente. Para que a NOX1 seja ativada é necessário interação com a subunidade p22phox, NOXA1 e GTPase Rac. B. para ativação de NOX 2 é necessário fosforilação de p47 fox. Embora não seja absolutamente necessário, o p40phox também se associa a este complexo e pode contribuir para a ativação. C Para a ativação de NOX 3 é necessário a interação com as subunidades p22phox e NOX1. D A ativação de NOX4 requer sua interação com P22fox, mas em sistemas reconstituídos é constitutivamente ativo sem o requisito para outras subunidades. Fonte: modificado de Bernard *et al.*, 2007.

O $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente dismutado em H_2O_2 espontaneamente ou em catalisação por SOD. Enquanto $O_2^{\cdot-}$ é o principal produto da reação catalisada por NOX, a cinética da

conversão para H_2O_2 parece variar entre isoformas de NOX. Por exemplo, apenas pequenas quantidades de $O_2^{\cdot-}$ e grandes quantidades de H_2O_2 são detectadas como resultado da atividade NOX4 e somente o H_2O_2 é detectado pelas atividades DUOX1 e DUOX2. (BEDARD et al., 2007). Cada isoforma de NOX é caracterizada por distribuição de tecido específica e mecanismo de ativação (Babior, 2017).

NOX2 e NOX 4 são as principais isoformas encontradas no rim. A NOX4 é predominantemente encontrada nas células tubulares renais e em outros tipos celulares, como por exemplo, as células mesangiais e podócitos (Harrison et al, 2009). A subunidade p67phox da NOX2 desempenha um papel importante no excesso de produção de ROS das mitocôndrias nos rins de ratos hipertensos SS, contribuindo para o desenvolvimento de hipertensão sensível ao sal.(Navar et al, 2004). Essas isoformas têm papel significativo na modulação de fatores inflamatórios, e pró-fibróticos como TNF- α , IL-6, TGF β , ERK1/2, MAPK, e na modulação da expressão gênica de fatores de transcrição, ocasionando, hipertrofia celular, apoptose de células mesangiais, alteração da transição epitélio-mesenquimal, diminuição do fluxo sanguíneo renal, e outras alterações da função renal.

Efeitos da NOX na placenta e nefrogênese

A NOX tem sido apontada como uma das principais vias de produção de agentes oxidantes e desenvolvimento de estresse oxidativo (Cheng et al., 2016). As enzimas membranares da NOX estão distribuídas em fagócitos (NOX2), células musculares lisas endoteliais e células epiteliais (NOX1), rim fetal humano (NOX3) e outros órgãos (Miyano et al., 2007), contribuindo para a patogênese de diversas doenças como Hipertensão arterial sistêmica, (Cowley et al., 2008) doenças neurológicas (Rastogi et al., 2017) disfunção endotelial ((Rabelo et al, 2010), fibrose renal.(Cheng et al, 2016).

A placenta possui uma produção basal de ROS para a manutenção da homeostase da interface materno fetal (Burton et al., 2011). No entanto em condições de estresse oxidativo, a produção de ROS é exacerbada e prejudica a organogênese placentária (Jauniaux et al., 2003). Ratas tratadas com LPS obtiveram proles com aumento dos níveis de MDA no rim, diminuição da SOD no soro, bem como disfunção dos receptores de dopamina D1 no rim e aumento dos níveis pressóricos (Wang et al., 2014). O aumento da produção de ROS está associado a numerosas desordens intrauterinas, incluindo o aborto espontâneo (Jenkins et al., 2000), pré- eclampsia (D'Souza et al., 2016) e restrição do crescimento intrauterino (Schoots et al, 2018).

O mecanismo pelo qual ROS gera disfunções placentárias parece estar envolvido com inativação de biomacromoléculas importantes para a implantação do trofoblasto e desordem do metabolismo celular, ocasionando disfunção endotelial e a elevada apoptose dos trofoblastos (Wu et al., 2015).

A produção de ROS no rim tem sido apontada como um dos principais fatores que contribuem para retardo da nefrogênese e a NOX está intimamente relacionada como principal fonte (Rabelo et al, 2010). E é amplamente distribuída nos diversos segmentos renais como: células mesangiais glomerulares, vasos renais, mácula densa, túbulo distal, membro espesso ascendente e ductos coletores (Chabrashvili T et al, 2002) tornando-a uma nova e promissora classe de alvos terapêuticos (Ximenes et al,2007). .

Uma vez ativada a NOX desencadeia uma ampla sinalização celular que culmina com a produção de ROS, estímulo de fatores pró-inflamatórios, pró-fibróticos, vias de apoptose. Para que a NOX seja ativada é necessário que ocorra a fosforilação da subunidade citosólica p47phox que está acoplada a p67phox, essa fosforilação pode ser mediada por vias de serinas cinases como MAPK, PKA, e a principal cinase de fosforilação que são as diversas isoformas da PKC (gama, beta, alfa e sigma) (Rastogi R et al., 2017).

Após fosforilação da subunidade citosólica da p47phox ocorre exposição de seu domínio SH3, translocação da mesma para a membrana plasmática e ativação da NOX. Esse processo leva a produção de ânions superóxido através de uma reação redox com o O₂ molecular e NADPH. A glicólise pode formar NADPH através do substrato glicose-6-fosfato que é desviado para o Shunt de hexose-monofosfato reduzindo NADP a NADPH. Dessa forma a NADPH e o oxigênio molecular servem como substrato para a produção de ânions superóxido, a alta produção de ânions superóxido pode estar envolvida na patogênese de diversas doenças e portanto, a inibição da NOX pode evitar danos celulares e morte celular, essa inibição pode funcionar através de várias vias, como mostrado na FIGURA 3 (Rastogi et al., 2017).

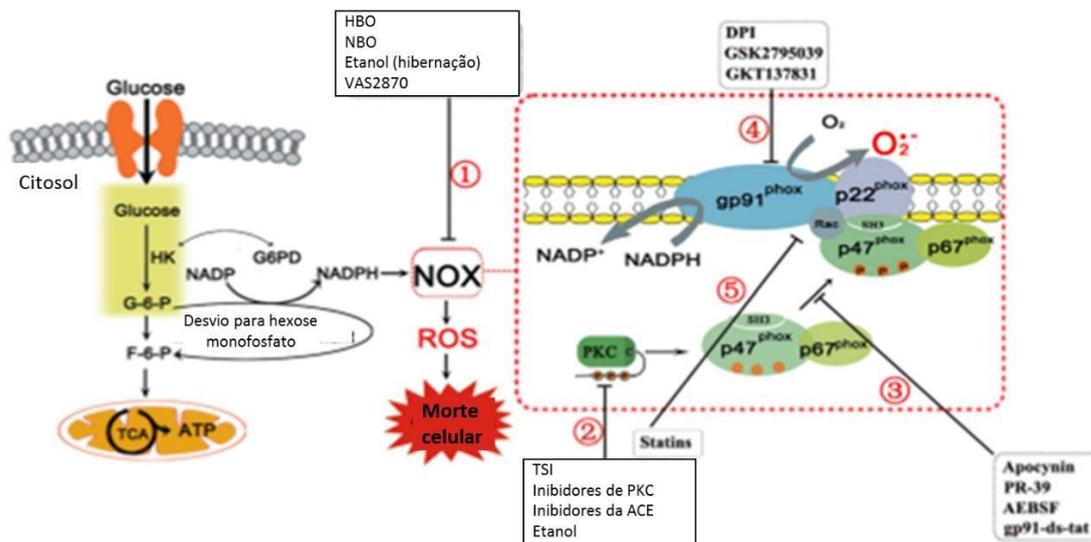


FIGURA 3. Ativação do complexo nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidase (NOX) e suas subunidades, vias de inibição de NOX pelos diferentes inibidores, são mostrados acima. Fonte: modificado de Rastogi et al., 2017.

A ação da NOX em alguns mecanismos de proteção e biológico é necessária para manter a homeostase corporal, no entanto em situações de desequilíbrio, a produção excessiva de ROS pode danificar a estrutura e função celular, como mencionado anteriormente, a atuação da NOX na patogênese de diversas doenças é extremamente complexa e ainda pouco elucidada, tornando-se um desafio para a descoberta de inibidores mais seletivos. No entanto, o objetivo da terapia medicamentosa é direcionar especificamente a NOX tendo em vista seus diferentes papéis. Essa inibição pode funcionar através de várias vias, porém, a via que vem sendo mais estudada é a inibição da translocação de p47phox pela apocinina.

Em diferentes modelos de estresse oxidativo, a apocinina inibiu os efeitos mediados pela NOX: houve redução dos danos renais em um modelo de lesão renal aguda por isquemia reperfusão (Altintas et al., 2013); diminuição da fibrose renal em um modelo de obstrução ureteral unilateral (Cheng et al., 2016); diminuição da lesão renal aguda induzida por LPS, através da diminuição da expressão de TLR4 e aumento dos níveis de GSH e SOD (Abdelmagged et al., 2016); diminuiu também a produção de ROS mediada pela angiotensina II no ventrículo esquerdo (Rugale et al, 2005); e diminuiu a produção de ROS no músculo cardíaco de ratos infartados (Bechara et al, 2014). Portanto, nota-se que a apocinina é um potente inibidor da NOX, no entanto seus efeitos na programação intrauterina do estresse oxidativo renal ainda são pouco elucidados.

Apocinina

A apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona) é uma metóxicatecol usada como um potente e não tóxico inibidor da ativação da NOX em fagócitos e células não fagocíticas. Foi primariamente descrita por Oswald Schmiedeberg, um farmacologista alemão, em 1883 e foi isolada pela primeira vez da raiz do cânhamo canadense (*Apocynum cannabinum*). Foi sugerido em um estudo sobre o efeito da NOX de fagócitos que a apocinina deve ser metabolizada por peroxidases para gerar um composto inibitório que pode ser mais potente que a própria apocinina (Kanegae *et al*, 2010) e atua inibindo a translocação de subunidades citoplasmáticas como mencionado na Figura 2 (Rastogi *et al.*, 2017). Ximenes *et al.* (2007) propuseram um mecanismo de oxidação da apocinina através de uma peroxidase neutrofílica (mieloperoxidase) (FIGURA 4).

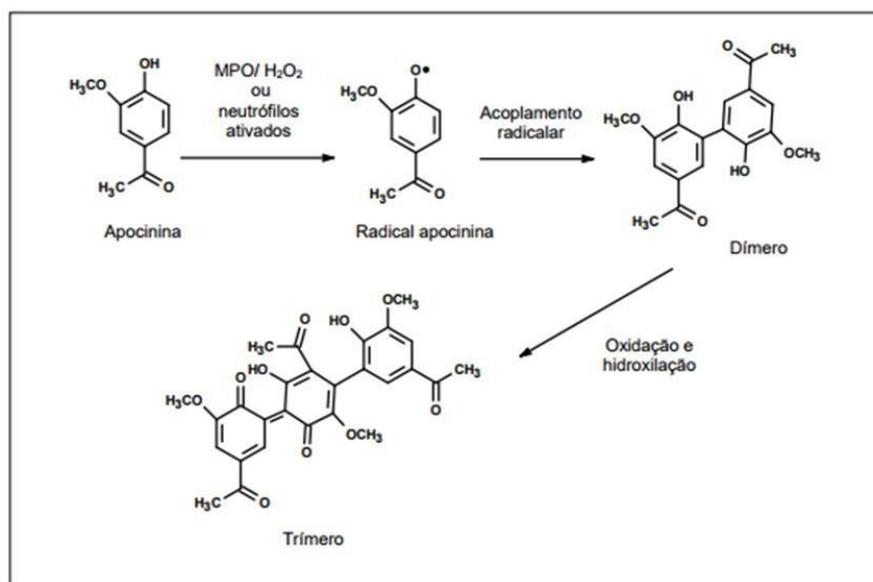


FIGURA 4. Mecanismo proposto para a oxidação da apocinina (Ximenes *et al.*, 2007).

Na literatura recente, há interesse crescente na apocinina como agente anti-inflamatório. Embora o seu espectro completo de atividades ainda não tenha sido plenamente compreendido, em muitos laboratórios a apocinina é utilizada sob uma grande variedade de condições experimentais como uma ferramenta para inibir a atividade de NOX. Tem sido demonstrado efeitos importantes da inibição da atividade da NOX na prevenção da hipertensão arterial e fibrose cardíaca induzidas por angiotensina II (Li *et al.*, 2013), bem como, em alterações funcionais da hemodinâmica renal programadas intrauterinamente (Vieira *et al*,

2018). A apocinina também diminui a injúria da medula espinhal através da supressão de fatores pró-inflamatórios (IL6-, IL1-b, TNF- α) e fatores pró-apoptóticos (caspase 3) (Sun, 2017).

Em modelos de endotoxemia pelo LPS, a apocinina também tem se mostrado eficaz na supressão do estresse oxidativo. Abdelmagedd *et al.* (2016) demonstraram a supressão de marcadores de estresse oxidativo, bem como aumento dos níveis de GSH (antioxidante) e diminuição da expressão de receptores TLR4, em um modelo de lesão renal aguda. A FIGURA 5 ilustra a provável ação inibitória da apocinina nas ROS gerada pela inflamação.

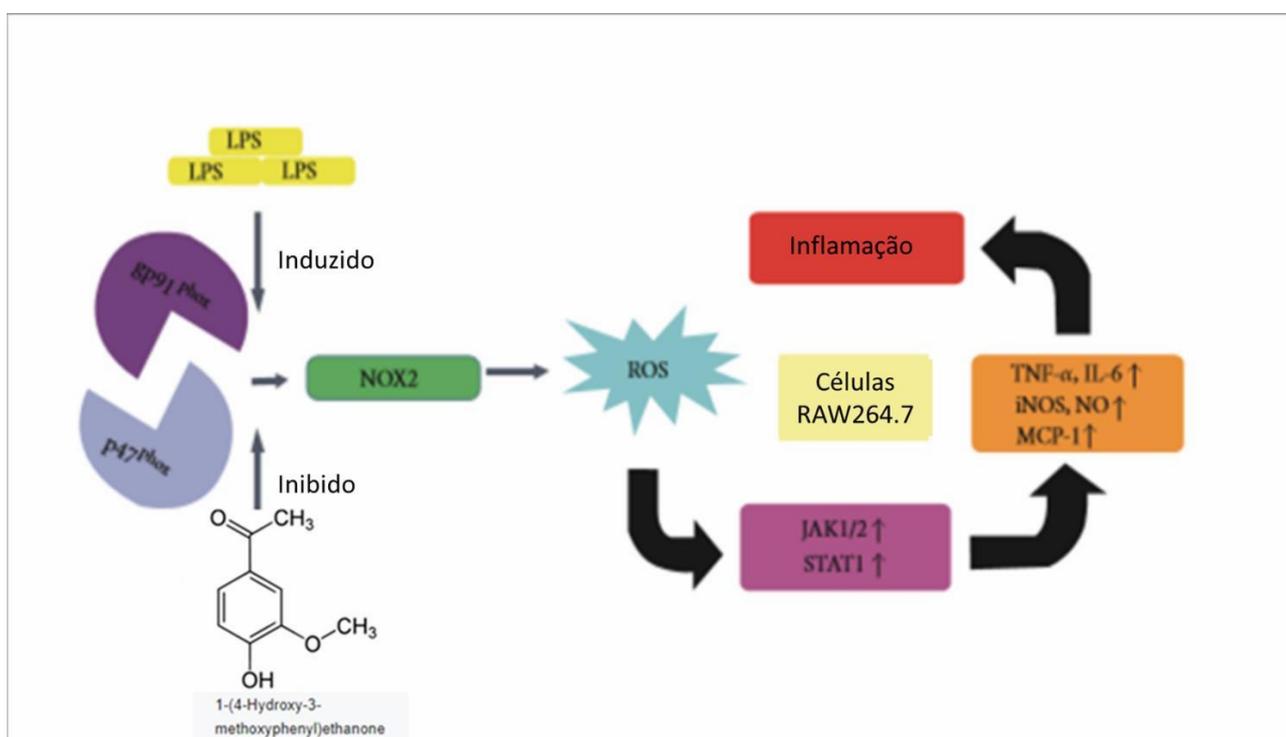


FIGURA 5. Efeitos do LPS na ativação de NOX e provável mecanismo de inibição por antioxidantes. Fonte: modificada de Abdelmagedd *et al.* 2016.

3. OBJETIVOS

GERAL

Investigar, em ratos, o papel da NADPH oxidase no desenvolvimento normal fetal, bem como, no retardo do desenvolvimento intrauterino induzido por endotoxemia materna. Além disso, investigar a repercussão sobre marcadores de nefrogênese.

ESPECÍFICOS

Avaliar, em ratas com 90 dias de vida, os efeitos da administração de LPS durante a gestação sobre:

- Ganho de peso corpóreo da matriz;
- Ingestão dietética;
- Peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida no fígado e na placenta;
- Peso placentário;
- Peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida na placenta;
- Produção basal de ânions superóxido e atividade da NADPH oxidase na placenta;
- Atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ na placenta.

Avaliar em fetos (20 dias de gestação) obtidos de ratas submetidas à administração de LPS durante a gestação:

- Peso corpóreo;
- Peso renal;
- Peroxidação lipídica e níveis de glutathiona reduzida no fígado;
- Marcadores de nefrogênese - área nefrogênica, expressão de antígeno nuclear de proliferação celular, alfa-actina de músculo liso, Bax e Bcl 2.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Animais e tratamentos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (Processo nº 23076.060473/2014 91). Foram utilizados ratos Wistar, mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco, em ciclo 12h/12h – claro/escuro, e temperatura em torno de 22°C. Ratas Wistar fêmeas com 90 dias de vida foram acasaladas com ratos machos férteis na proporção de 3:1. A observação do espermatozoide no lavado vaginal determinou o início da prenhez (dia 0 de gestação). As ratas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos; um grupo tratado com solução de NaCl 0,9% (1 mL/1 kg de peso corpóreo, via subcutânea; grupo Controle – C, n=8) e outro grupo submetido a indução de inflamação pela administração de LPS isolado de *E. coli* (0,5 mg/kg de peso corpóreo, via subcutânea; grupo LPS – L, n=7) nos dias 13, 15, 17 e 19 de gestação (Vieira-Filho et al., 2013). Parte das mães de cada grupo recebeu tratamento com apocinina (100 mg/kg de peso corpóreo, na água do bebedouro) a partir do dia 0 de gestação até o 20º dia, formando os grupos Controle+apocinina (grupo CA, n=9) e LPS+apocinina (grupo LA, n=8). No 20º dia da gestação, as ratas foram anestesiadas com pentobarbital (60 mg/kg) para realização da coleta do fígado, placentas e fetos. Os fetos machos foram pesados, bem como suas respectivas placentas. As placentas foram submetidas ao isolamento das camadas do labirinto+trofospôncio para avaliação de peroxidação lipídica, níveis de GSH, produção basal de ânions superóxido, atividade da NOX e atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase. Os fetos foram decapitados e submetidos à coleta do fígado e rim. No fígado foi avaliada a peroxidação lipídica e os níveis de GSH. Os rins foram coletados para avaliação de marcadores da nefrogênese: área nefrogênica, expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês *proliferating cell nuclear antigen*), alfa-actina de músculo liso (α -SMA, do inglês *smooth muscle actin- α*), e das proteínas pró- e anti-apoptótica, Bax e Bcl 2, respectivamente. Ao término da coleta de amostras, as mães foram eutanasiadas por exsanguinação e a prole fêmea por decapitação.

Indução do processo inflamatório

O processo inflamatório materno foi induzido através da administração subcutânea de 0,5 mg/kg de LPS. A administração do LPS consiste em uma forma efetiva de indução de inflamação materna que resulta em aumento do estresse oxidativo na placenta (Chen et al., 2006). O LPS é um componente estrutural que está presente na membrana de bactérias gram-negativas, que é forte indutor do sistema imune inato, podendo atuar em diferentes células como: monócitos, neutrófilos, plaquetas, células endoteliais, e, principalmente, em macrófagos. Inicialmente o LPS se liga a uma glicoproteína produzida pelo fígado do hospedeiro, o LBP (*Lipopolysaccharide binding protein*). O complexo LPS-LBP entra em contato com o receptor CD14 de macrófagos, e este por sua vez, facilita a ligação desse complexo com o TLR4, que inicia a geração do sinal transmembrana, ativando o NFκB. O NFκB segue até o núcleo e estimula a expressão de genes responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF-α, a IL-1 e a IL-6 (Kirsten, 2008).

Métodos analíticos

A concentração protéica em amostras de tecido foi determinada pelo método de fenol de Folin (Lowry et al., 1951), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

Avaliação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi avaliado em amostras de placenta e de fígado materno e fetal, através da mensuração da peroxidação lipídica e dos níveis de GSH. A peroxidação lipídica foi avaliada através da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com o método de Ohkawa et al.(1979). Amostras de placenta e de fígado foram homogeneizadas em solução KCl 1,15% EDTA 3 mM (1g/5 ml de solução). Em seguida cerca de 25 µl da amostra foi adicionada a tubos de reação contendo 475ul de reagente TBA previamente preparado com: SDS 8,1 %, Ácido acético 20% pH 3,5 ácido tiobarbitúrico (TBA, do inglês *thiobarbituric acid*) 8% e H₂O. A curva padrão de MDA foi preparada numa proporção de 1:100.000. Os tubos de reação foram homogeneizados e incubados no banho maria à 95°C durante 60 min, em seguida os tubos foram resfriados em água corrente e foi adicionado cerca de 0,5ml de álcool butílico, e então homogeneizados e centrifugados à 1000

× g por 10 minutos. Logo após cerca de 200 µl do sobrenadante foi pipetado na placa e lido em espectrofotometro a 535 nm.

O mesmo homogenato foi utilizado para determinação dos níveis de GSH através da dosagem de grupamentos sulfidrilas não-protéicos (Sedlak & Lindsay, 1968). As proteínas das amostras (cerca de 180 a 160 mg de tecido) foram precipitadas em solução KCl 1,15%+ EDTA 3mM e ácido tricloroacético 10% (TCA) . Em seguida as amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 1000 × g por 10 min. A curva padrão foi preparada a uma proporção de 1:8:4:2:1 a partir da diluição da solução mãe (cisteína). Em seguida, um volume do sobrenadante foi adicionado a um volume de meio de reação contendo TRIS 400 mM, EDTA 4 mM e DTNB 4 mM a um pH 8,9. A reação foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, e a absorbância foi mensurada em 420 nm. O resultado foi corrigido pela concentração de proteína do homogenato.

Produção basal de superóxido e atividade da NOX na placenta

A avaliação da atividade da NOX foi realizada através da quantificação de superóxido através da quimioluminescência derivada da lucigenina, conforme Paixão et al. (2013), nas amostras dos isolados do labirinto+trofospôncio da placenta. Amostras da placenta foram homogenizadas (1 g/7 mL) em uma solução RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritron X-100 1%, deoxicolato de sódio 1%, dodecilsulfato de sódio 0,1%), suplementada com coquetel inibidor de protease (AEBSF 2 mM, EDTA 1 mM, Bestatin 130 µM, E-64 14 µM, Leupeptin 1 µM, Aprotinin 0,3 µM), em banho-de-gelo. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12.000 × g por 12min a 4°C, e o sobrenadante (1 mg/ml de proteína) foi incubado por 2 minutos a 37°C em um meio de reação contendo, salina tamponada com fosfato (PBS, 0,02 M; pH 7,4) e NADPH 100 µM. A luminescência foi avaliada após a adição de lucigenina 10 µM, por 10 medidas captadas durante um intervalo de 30 segundos a 37°C, com o auxílio de um luminômetro (Varioskan Flash, Thermo Scientific) O resultado foi representado pelo somatório da luminescência obtida nas 10 medidas e expresso em unidade relativa de luz corrigida pela quantidade de proteína na amostra. A liberação de superóxido também foi avaliada na ausência de NADPH, e representou a produção basal de superóxido.

Atividade da (Na⁺+K⁺)ATPase

Amostras de placenta foram homogenizadas em solução I com um coquetel de inibidores de proteases contendo inibidor de tripsina 1,5mg/ml, PMSF +DMSO. A atividade (Na⁺+K⁺)ATPase nas amostras (0,1 mg/mL) foi calculada a partir da diferença de Pi liberado na ausência e presença de ouabaína 2 mM, em um meio de reação composto de de 50 mM Bis-Tris-Propano, pH 7,4, 0,2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂ e 120 mM NaCl. A reação de hidrólise foi iniciada pela adição de ATP (5 mM) e KCl (24 mM), e parada após 10 min pela adição de carvão ativado por HCl 0,1 M. O Pi liberado foi mensurado espectrofotometricamente (620 nm) numa alíquota de 0,5 mL do sobrenadante obtido após centrifugação da suspensão de carvão, a 2000 × g por 10 min.

Imunohistoquímica

Após a eutanásia, cada feto macho teve um rim coletado para avaliação da área nefrogênica e expressão de PCNA e α -SMA, através de estudos imunohistoquímicos, de acordo com Vieira-Filho et al. (2011). Os rins foram fixados em metacarnol (metanol, clorofórmio e ácido acético; 6:3:1) por 24 horas e mantidos em etanol 70%. Em seguida, as amostras foram desidratadas, diafanizadas, embebidas em parafina, e secções de 6 μ m foram obtidas com o auxílio de um micrótomo e montadas em lâminas de vidro silanizadas.

Após a montagem nas lâminas, os cortes foram reidratados e submetidos a imunomarcação para PCNA e α -SMA. Para isso, os cortes foram imersos em uma solução de bloqueio de peroxidase endógena contendo peróxido de hidrogênio 0,3% e azida sódica 0,1% por 30 min. Logo após, as lâminas foram lavadas (3 × 5 min) com PBS (pH 7,4). Em seguida, os cortes foram incubados em cuba úmida a 4°C overnight com o anticorpo primário desejado diluído em PBS+BSA 1%. Os anticorpos primários foram diluídos numa proporção de 1:50 tanto para a imunomarcação do PCNA quanto para a α -SMA. No dia seguinte, os cortes foram lavados (3 × 5 min) com PBS, e incubados durante 30 min a temperatura ambiente com os anticorpos secundários apropriados, diluído (1:200) em PBS+BSA 1%. As lâminas foram novamente lavadas (3 × 5 min) PBS, e incubadas em temperatura ambiente com o complexo avidina+biotina, por 30 min, de acordo com as indicações do fabricante (kit). Após uma nova lavagem, as lâminas foram incubadas em uma solução de revelação contendo hidrato de tetrahidrocloreto de 3,3-diaminobenzidino 2,4 mM, Tris HCl 50 mM (pH 7,6) e cloreto de níquel 0,044% a 37°C durante 10 min, e contra coradas com verde de metila 1%.

A marcação para PCNA foi determinada pela contagem do número de células com marcação positiva avaliadas em 30 glomérulos diferentes por rim fetal (usando um aumento de 400 ×), com o auxílio de um microscópio binocular (Nikon H550L). A avaliação foi realizada apenas em glomérulos claramente vascularizados, i.e. não foram considerados glomérulos imaturos (*s-shaped* ou *comma-shaped bodies*). A representação do número de células-positivas para PCNA de cada grupo foi determinado pela média aritmética do número médio de células marcadas por glomérulo avaliada em cada feto isoladamente.

A marcação de α -SMA foi mensurada na região tubulointersticial em 30 campos, medindo 20.000 μm^2 , para cada rim fetal, e expressa em razão da área total do córtex. A representação do parâmetro de marcação de α -SMA foi determinada pela média aritmética do valor médio obtido das medidas realizadas em cada feto isoladamente. A mensuração foi realizada com o auxílio do programa de computador *Image-Pro Plus* (Versão 6.0.0.260, *Media Cybernetics, Inc*) em imagens capturadas com um sistema de aquisição de imagens histológicas (Nikon H550L).

As lâminas marcadas para PCNA também serviram a avaliação da área nefrogênica, que representa a região subcapsular do córtex, onde ocorre de forma centrípeta o desenvolvimento inicial dos néfrons, e podem ser encontrados condensados mesenquimais e suas formas imaturas (vesículas, *s-shaped* e *comma-shaped bodies*). A área nefrogênica foi expressa em razão da área do córtex total (isto é, área nefrogênica mais área não-nefrogênica). Para obtenção dessa medida, imagens de 4 seções transversais do rim de cada feto foram divididas em 4 quadrantes. Em cada quadrante, foram mensuradas a área nefrogênica e a área total córtex com o auxílio do programa de computador *AxiVision* (versão 4.8.1.0, *Carl Zeiss Imaging Solutions*). Dessa forma, o valor médio da razão área nefrogênicas/córtex total das 4 medidas das 4 seções representou o valor de cada feto, que, em conjunto, foi utilizado para se obter a média do grupo.

Todas as avaliações foram realizadas por 2 experimentadores, sem que ambos tivessem conhecimento da origem da amostra.

SDS-PAGE e Western Blotting

A expressão protéica de Bcl 2 e Bax foi realizada através de imunoblotting em amostras do rim do feto que foram mantidas em nitrogênio líquido desde a eutanásia dos animais aos 20 dias de gestação. Para isso, as amostras foram descongeladas e imediatamente homogeneizadas (7 mL por grama de tecido) em solução RIPA (composta conforme descrito

acima) em banho-de-gelo. Em seguida, o homogenato foi centrifugado à $12.000 \times g$ por 12 min a 4°C , e o sobrenadante foi utilizado nas etapas seguintes. As proteínas ($80 \mu\text{g}$) foram separadas utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), e transferidas a uma membrana de PVDF (Hybond-P, G&E Healthcare). Logo após, as membranas de PVDF foram hidratadas (imersão em metanol por 1 min, seguido de água por 5 min), e depois lavadas ($3\times$) em salina tamponada com Tris + Tween 20 0,1% (TBS-T) e incubadas *overnight* com o anticorpo primário anti-Bcl 2 ou anti-Bax (diluição 1:500) a 4°C . Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T ($3 \times$ por 5 min) e incubadas durante 1 h com o anticorpo secundário *anti-rabbit* conjugado a peroxidase (diluição 1:5.000). Os blots foram visualizados após a adição do reagente quimiluminescente sensível à peroxidase captada com o auxílio de um sistema fotodocumentador (*Chemidoc MP System, Bio-Rad Laboratories*). A densitometria óptica das marcações foi avaliada através do software *ImageLab* (versão 5.2.1, *Bio-Rad Laboratories*), descontando-se a marcação de fundo local, e expressando em razão a marcação da proteína controle do carregamento β -actina.

Análise estatística

Todos os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). O padrão de distribuição de cada conjunto de dados foi avaliado com o auxílio do teste de normalidade Shapiro-Wilk, bem como através da observação da distribuição dos dados de cada parâmetro biológico em histogramas. A diferença entre os grupos foi avaliada através da análise de variância de duas vias (*2-way ANOVA*), seguida do teste de Bonferroni. A significância estatística foi considerada para $P < 0,05$. A análise estatística e a elaboração dos gráficos foi realizada com o auxílio do programa de computador GraphPad Prism 5.

5. RESULTADOS

Parâmetros Maternos, fetais e placentários no 20º dia da gestação.

A administração materna de LPS não influenciou o ganho de peso corpóreo, o consumo dietético materno e o peso placentário (Tabela 1). Também não foram observados efeitos do tratamento materno com apocinina nesses parâmetros. Por outro lado, no 20º dia de gestação, o peso corpóreo dos fetos oriundos das mães submetidas ao LPS foi 10% menor ($P < 0,01$) do que dos fetos de mães Controle. A alteração no peso corpóreo dos fetos induzida pelo LPS foi prevenida pela tratamento materno com apocinina ($C = LA, P > 0,05$), enquanto que a inibição da NOX não induziu alteração na prole do grupo Controle. Apesar das diferenças observadas no peso corpóreo, o peso renal foi semelhante entre os grupos experimentais.

Tabela 2. Parâmetros gerais da gestação, placenta e feto

	C	LPS	CA	LA
Ganho de peso corpóreo materno (g)	59 ± 6	60 ± 5	52 ± 5	50 ± 3
Consumo dietético (g/dia)	20 ± 2	22 ± 1	20 ± 1	18 ± 1
Peso placentário (g)	0,49 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,47 ± 0,01
Peso corpóreo fetal (g)	3,7 ± 0,1 ^a	3,3 ± 0,1 ^b	3,5 ± 0,1 ^{ab}	3,7 ± 0,1 ^a
Peso renal do feto (mg)	30 ± 1	30 ± 1	29 ± 1	31 ± 1

Dados apresentados como média ± EPM de 6–9 mães por grupo. Os dados de peso placentário, peso corpóreo e renal do feto foram calculados utilizando-se o valor médio obtido de cada ninhada de fetos machos, ou seja, o n experimental é semelhante ao n de mães utilizadas. O peso renal do feto representa a soma de ambos os rins. Letras sobrescritas diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$), usando *two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

5.2. Peroxidação lipídica placentária e hepática materna e fetal

A peroxidação lipídica na placenta e fígado materno e fetal foi avaliada pela mensuração de TBARS (GRÁFICO 1). O fígado das mães do grupo LPS apresentou peroxidação lipídica cerca de 4 vezes maior ($P < 0,01$) em relação ao grupo controle, enquanto que os níveis de TBARS na placenta e fígado fetal do grupo LPS foram 2 vezes maiores ($P < 0,001$ e $P < 0,01$, respectivamente). Nos grupos LPS tratados com apocinina, a peroxidação

lipídica em todos os tecidos avaliados foi semelhante ao grupo Controle. A apocinina não alterou os níveis de TBARS do grupo Controle.

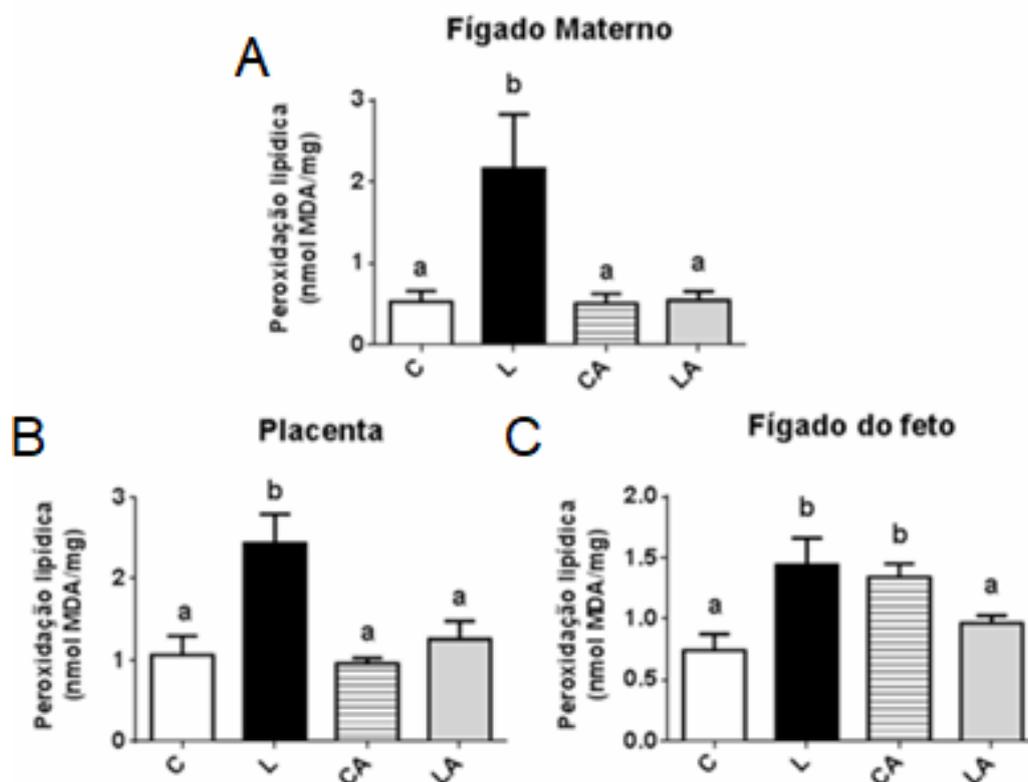


GRÁFICO 1. Peroxidação lipídica no fígado materno (A), placenta (B) e fígado fetal (C) no 20º dia de gestação. A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e expressa como quantidade de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína nas amostras. Dados apresentados como média \pm EPM. Letras sobrescritas diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$), usando *two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

Níveis de GSH na placenta e fígado materno e fetal

Os níveis de GSH, isto é da glutationa em sua forma reduzida, representam a principal reserva antioxidante endógena (Zhu et al., 2013). Os níveis de GSH no fígado materno foram semelhantes em todos os grupos experimentais FIGURA 2A. Por outro lado, podemos observar no grupo LPS uma redução de 40% ($P < 0,05$) nos níveis de GSH na placenta e fígado fetal em relação ao grupo Controle (B e C). A administração materna de apocinina preveniu a diminuição dos níveis de GSH induzida pelo LPS no fígado fetal, mas não na placenta. Por outro lado, o tratamento de mães Controle com apocinina induziu uma diminuição (40–50%, $P < 0,05$) dos níveis de GSH na placenta e fígado fetal.

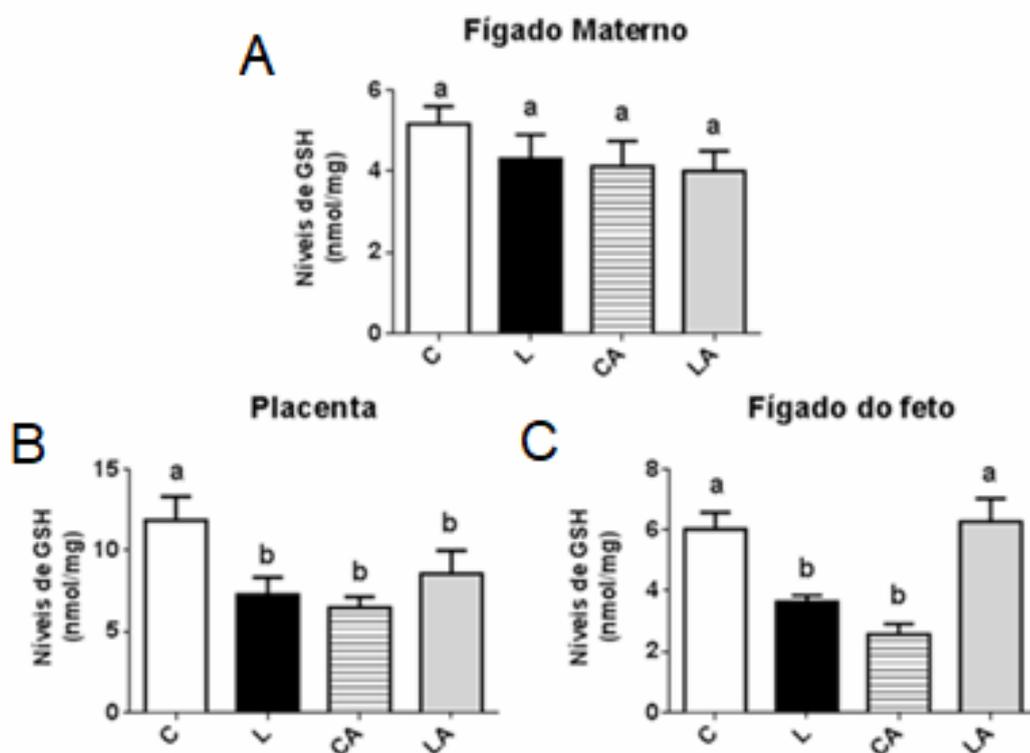


GRÁFICO 2. Níveis de glutatona reduzida (GSH) no fígado materno (A), placenta (B) e fígado fetal (C) no 20º dia de gestação. Os níveis de GSH foram estimados pela mensuração de grupamentos sulfidrilas não-proteicos e expressos por mg de proteína presentes nas amostras. Dados apresentados como média \pm EPM. Letras sobrescritas diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$), usando *two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

Produção basal de ânions superóxido e atividade da NOX na placenta

A produção basal de ânions superóxido e a atividade da NOX na placenta estão expressos no GRÁFICO 3. De forma semelhante ao que foi observado na peroxidação lipídica, as placentas obtida de mães submetidas ao LPS apresentaram elevação de cerca de duas vezes ($P < 0,05$) na produção de superóxido basal (3A) e dependente da NOX (3B) em relação ao grupo Controle. Por outro lado, o grupo LPS tratado com apocinina apresentou valores semelhantes de produção basal de ânion superóxido e atividade da NOX ao grupo Controle. A administração de apocinina não induziu qualquer alteração no grupo Controle.

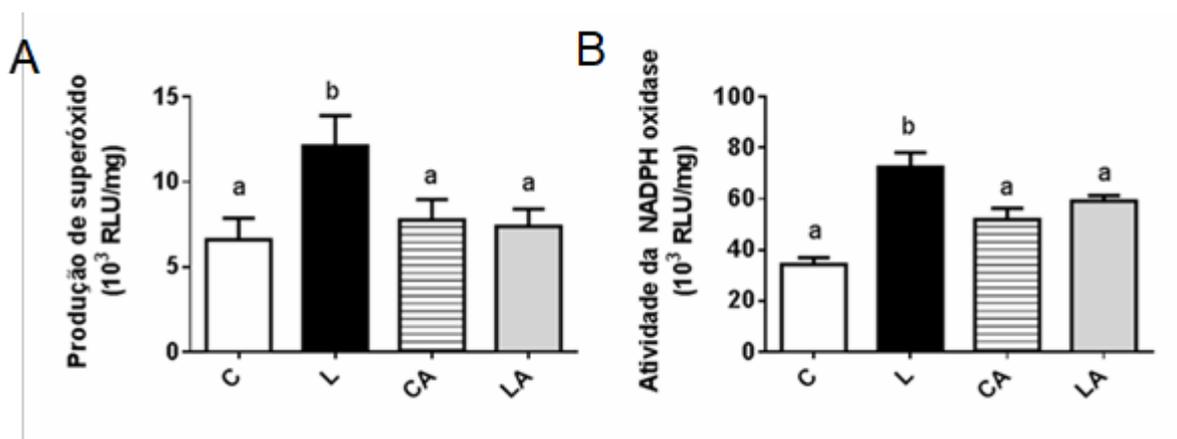
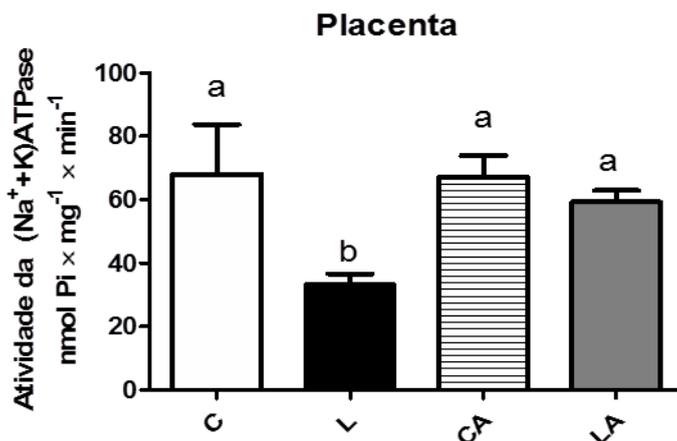


GRÁFICO 3. Produção basal de superóxido e atividade da NOX em placentas obtidas no 20º dia de gestação. A produção de superóxido foi mensurada pela luminescência derivada da oxidação da lucigenina na ausência (A) e presença (B) de NADPH 100 μ M. Os dados são expressos como unidades relativas de luminescência (RLU) corrigidos pela quantidade de proteína presente na amostra. Dados apresentados como média \pm EPM. Letras sobrescritas diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$), usando *two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

Atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase no tecido placentário

A atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase na placenta é de extrema importância para manutenção do transporte de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento do feto (Johansson et al., 2000). A atividade da ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase foi 50% menor ($P < 0,01$) no grupo LPS do que no grupo Controle. Por outro lado, a apocinina preveniu a redução da atividade da bomba de Na^+ e K^+ induzida pelo LPS, mas não alterou o parâmetro no grupo Controle (GRÁFICO 4).

GRÁFICO 4. Atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ em placentas obtidas no 20º dia de gestação. A atividade da bomba

de Na^+ e K^+ foi avaliada a partir da mensuração da hidrólise do ATP sensível a ouabaína, e expressão como fosfato inorgânico (Pi) produzido por mg de proteína presente na amostra por minuto de reação. Dados apresentados como média \pm EPM. Letras sobrescritas diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$), usando *two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

Efeitos da inflamação materna nos marcadores de nefrogênese

A área nefrogênica representa uma região subcapsular do córtex renal de intensa proliferação e diferenciação celular, e sua dimensão, aos 20 dias de vida fetal, está correlacionada negativamente com a nefrogênese (Vieira-Filho et al., 2011). Os fetos de mães submetidas a administração de LPS apresentaram maior (25%, $P < 0,01$) área nefrogênica do que os fetos Controle, enquanto que os fetos de mães LPS tratadas com apocinina apresentaram valores semelhantes a este último (GRÁFICO 5). A apocinina não induziu nenhum efeito no grupo Controle.

A nefrogênese também pode ser avaliada pela quantificação de células PCNA-positivas que indicam proliferação celular (Vieira-Filho et al., 2011). Os fetos do grupo LPS apresentaram contagem de células PCNA-positivas 20% menor ($P < 0,05$) do que o grupo Controle (FIGURA 6). O tratamento materno com apocinina não induziu qualquer efeito, isto é, os fetos do grupo Controle e LPS apresentaram valores semelhantes aos seus respectivos pares tratados com apocinina ($C = CA$ e $L = LA$; $P > 0,05$).

A transição epitélio-mesenquimal é um dos estágios finais da nefrogênese, e pode ser avaliada pela imunomarcção de α -SMA, indicando o estágio de diferenciação celular. A imunomarcção no córtex renal do feto para α -SMA foi semelhante entre os grupos Controle e LPS (FIGURA 6). Por outro lado, o tratamento materno com apocinina diminuiu a densidade de α -SMA no córtex renal dos fetos Controle e LPS, 25 ($P < 0,05$) e 37% ($P < 0,01$), respectivamente.

Adicionalmente, o rim dos fetos do grupo LPS apresentaram duas vezes maior ($P < 0,01$) expressão proteica de Bax (A), e 50% menor expressão proteica de Bcl 2 (B) ($P < 0,01$), em relação ao grupo Controle (GRÁFICO 7). O tratamento materno com apocinina preveniu a alteração da expressão de Bax induzida pelo LPS, mas não foi capaz de prevenir a alteração da Bcl 2. No grupo controle, o tratamento materno com apocinina não apresentou efeito sobre qualquer um dos marcadores de apoptose.

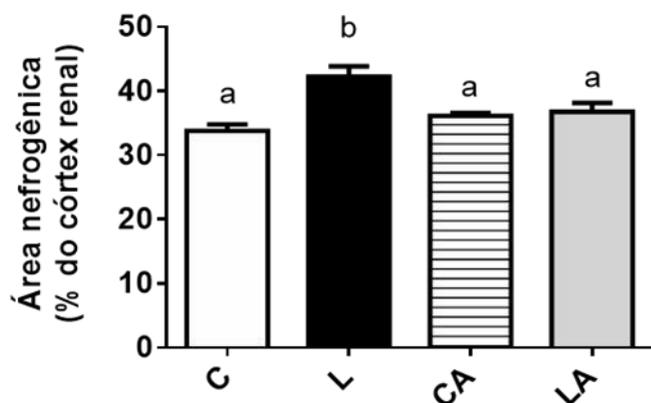
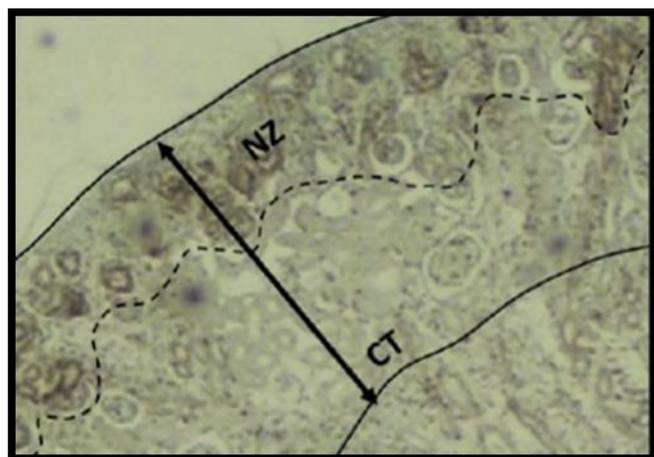


GRÁFICO 5. Área nefrogênica dos fetos com 20 dias de vida gestacional. A área nefrogênica representa a região subcapsular do córtex onde podem ser encontrados condensados mesenquimais e formas imatura do néfron (vesículas, *s-shaped* e *comma-shaped bodies*), e foi expressa em razão da área do córtex total. O painel superior ilustra a delimitação da área nefrogênica (NZ) em relação ao córtex total (CT) (modificado de Ribeiro et al., 2018). Dados apresentados como média \pm EPM de 5–8 animais por grupo experimental. Letras sobrescritas diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$), usando *two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

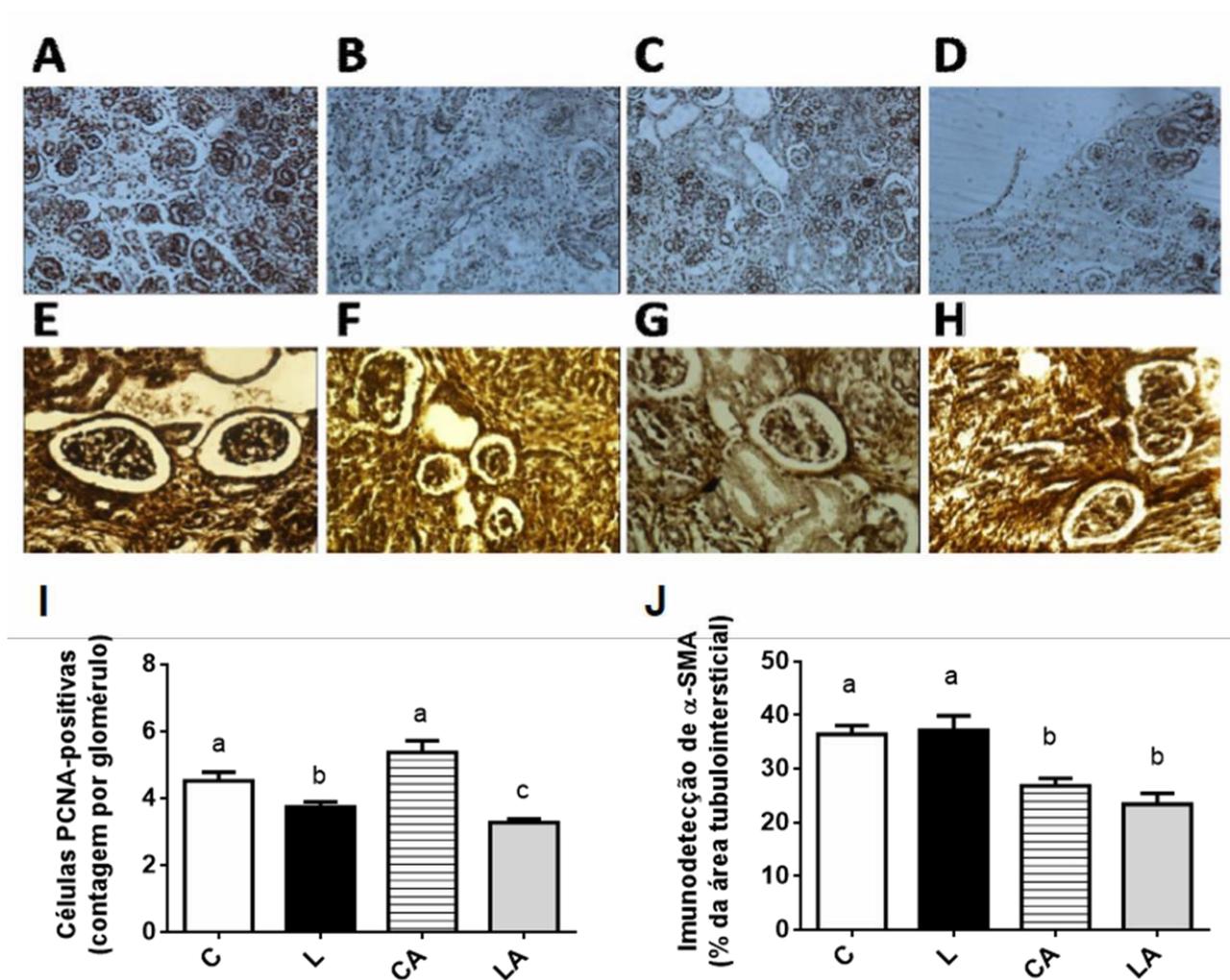


GRÁFICO 6. Número de células PCNA-positivas por glomérulo e densidade de marcação da α -actina de músculo liso (α -SMA) no córtex renal de fetos com 20 dias gestacionais. Os painéis A–D são campos (400 \times) representativos da imunomarcagem para PCNA nos grupos C, L, CA e LA, respectivamente. O número de células marcadas foi contada em 30 glomérulos diferentes por rim fetal. Os painéis E – H são campos representativos da imunomarcagem para α -SMA nos grupos C, L, CA e LA, respectivamente. A marcação de α -SMA foi mensurada na região tubulointersticial em 30 campos (20.000 μm^2) diferentes para cada rim fetal, e expressa em razão da área total do córtex. Dados apresentados como média \pm EPM de 5 animais por grupo experimental. Letras sobrescritas diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$), usando *two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

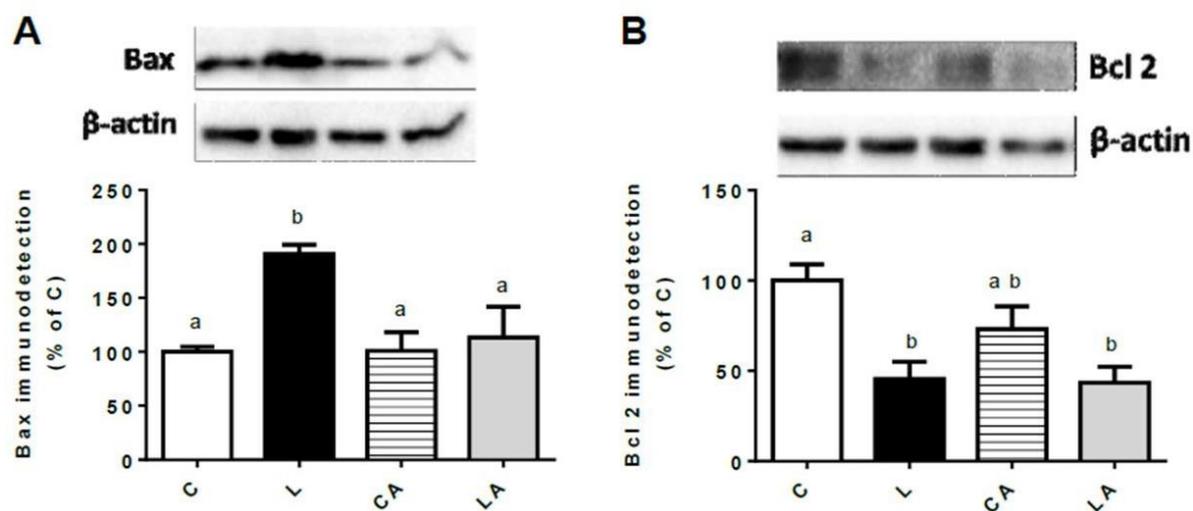


GRÁFICO 7. Expressão proteica de Bax (A) e Bcl 2 (B) no rim de fetos com 20 dias gestacionais. Os painéis superiores são imagens representativas da imunodeteção da proteína-alvo e do controle de carregamento β actina. Dados apresentados como média ± EPM de 5-7 ensaios por grupo experimental, utilizando amostras diferentes. Letras sobrescritas diferentes indicam médias significativamente diferentes ($P < 0,05$), usando *two-way ANOVA* seguido do teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra que a inibição da produção de ROS mediada pela NOX previne o retardo do crescimento intrauterino e o retardo da nefrogênese induzidos pela inflamação materna. Essas alterações envolvem efeitos da administração materna de LPS sobre a elevação da peroxidação lipídica e/ou redução da reserva antioxidante endógena (Wei *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2008), através, dentre outros fatores, da elevação da produção de superóxido mediada pela NOX. No rim do feto, a injúria induzida pela inflamação materna envolve diminuição da proliferação celular, elevação da expressão de fatores pró-apoptóticos e diminuição de fatores anti-apoptóticos, com indicação de participação da NOX.

Numerosas pesquisas mostram que a maioria das doenças crônicas degenerativas na vida adulta, como por exemplo a hipertensão, podem ter origem em insultos no período pré-natal. (Barker, 1990; Perrone *et al.*, 2016; Ushida *et al.*, 2017). Figueiroa *et al.* (2005) demonstraram que a administração materna de glicocorticoides resultou em aumento dos níveis pressóricos da prole bem como diminuição do número de glomérulos. A restrição de nutrientes no início da gestação de ovelhas programa a disfunção na organogênese renal da prole, com diminuição do número de néfrons e aumento da renina, predispondo a prole ao desenvolvimento de hipertensão na vida adulta. (Gilbert *et al.*, 2007). Dessa forma, percebemos a importância de se entender como a organogênese pode ser comprometida por eventos adversos maternos, para que estratégias terapêuticas precoces possam ser devidamente elaboradas.

O estresse pré-natal pode afetar o ambiente intrauterino de uma maneira que aumenta a susceptibilidade a consequências metabólicas diversas, como o baixo peso ao nascer e a obesidade (Tamashiro *et al.*, 2009). No caso da exposição materna ao LPS, há prejuízo na circulação uteroplacentária, diminuindo o aporte de oxigênio e nutrientes, através da liberação do NFκB, que por sua vez ativa citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, interleucinas (IL-16, IL-10, IL-8) TNF- α , interferon e também de mediadores vasoconstritores como tromboxano A2 e leucotrienos (Molvarec *et al.*, 2011; Machado, 2010). Essa resposta pode acarretar em uma restrição do crescimento fetal (T. Cotechini, Graham, 2015) e diminuição do peso corpóreo (Galinsky *et al.*, 2011). Nossos resultados mostraram que a exposição pré-natal ao LPS induziu diminuição do peso corpóreo fetal, contudo não alterou a ingestão alimentar materna, o peso corpóreo materno, nem o peso placentário. Dessa forma, o baixo peso fetal pode ter resultado de um desbalanço na interface materno-fetal.

A inflamação materna pode impactar a maturação fetal através de diversos mecanismos, como: mediadores inflamatórios (Vaziri et al, 2006), alterações do fluxo sanguíneo placentário (Cotechini et al., 2015); e alterações morfométricas placentárias (Cotechini et al., 2014). No presente estudo, as ratas expostas ao LPS no período da gestação apresentaram um aumento nos níveis de MDA no fígado (um importante marcador de peroxidação lipídica das membranas como resultado do dano oxidativo). Bem como diminuição dos níveis de GSH, uma principal não proteína sulfidril intracelular que desempenha um papel importante nos sistemas de defesa celular contra danos oxidativo (ROSS,1988), demonstrando o papel do LPS na ativação de vias Pró-oxidativas importantes como a NOX (Abdelmaged *et al*, 2016), uma enzima que tem papel central na geração de ROS em diversos tipos celulares. (Cheng *et al*,2017). E esse quadro de estresse foi repassado aos fetos, demonstrado pelo aumento significativo de MDA bem como diminuição de GSH no fígado fetal e placenta. Estudos anteriores constataram um aumento da peroxidação lipídica no fígado fetal e placenta bem como diminuição de GSH com administração materna de 75ug/kg de LPS. (Chen *et al*, 2005). Vieira *et al*, 2018, demonstrou que a inflamação materna programou aumento de estresse oxidativo na prole, bem como promoveu alterações na hemodinâmica renal.

A diminuição do transporte de nutrientes na placenta pela alteração na atividade transportadora da $(Na^+K^+)ATPase$ no tecido placentário é outra condição que pode estar associada ao retardo do desenvolvimento intrauterino (Johansson et al., 2003). Observamos que a administração materna de LPS induz diminuição na atividade da $(Na^+K^+)ATPase$ que parece estar correlacionada com elevação de ROS por uma via dependente da NOX. A peroxidação lipídica pode afetar a fluidez da membrana plasmática (Dobretsov et al., 1977), e assim impactar na atividade de enzimas ligadas a membrana (Li et al., 2010).

A NOX pode perturbar o ambiente intrauterino afetando o equilíbrio materno-placentário. (Burton et al., 2011) demonstraram que em gravidezes normais, há um importante envolvimento da produção de superóxido mediada pela NOX na interface fetal/maternal. Dessa forma, um insulto no ambiente intrauterino pela inflamação materna intensifica ainda mais a programação de doenças tardias. Nossos resultados apontaram que a produção de ROS foi aumentada pela ação da NOX, evidenciado pelo aumento da produção basal de ânions superóxido e aumento da atividade da NOX na placenta da prole advinda de mães tratadas com LPS. Estudos têm demonstrado a contribuição da NOX em numerosas desordens cardiovasculares (Vaziri, 2008, Rabêlo *et al*, 2010) e estresse oxidativo renal. (Rodríguez-Iturbe *et al*, 2004).

Um dos principais órgãos afetados por eventos adversos maternos é o rim ((Harrison et al, 2009), inclusive através de vias dependentes de elevação do estresse oxidativo (Vieira *et al*, 2018).O estágio IV da nefrogênese caracteriza-se pela diferenciação e proliferação dos principais tipos de células que darão origem à evolução dos corpúsculos renais maduros, e pela diferenciação das distintas células intersticiais. Propomos que glomérulos recém-formados e glomérulos imaturos no rim fetal durante esses estágios finais da nefrogênese seriam vulneráveis à inflamação materna. Nossos resultados demonstraram que a inflamação materna induziu um retardo da nefrogênese da prole evidenciado pelo aumento da zona nefrogênica, diminuição da proliferação celular no glomérulo e aumento de vias de sinalização pró-apoptóticas. Galinsky et al. (2011) demonstra que a inflamação materna, ocasiona uma redução no número de néfrons e hipertrofia renal compensatória. Estudos anteriores do nosso laboratório também demonstraram a programação da elevação dos níveis pressóricos bem como alterações na hemodinâmica renal(Vieira et al, 2018) na prole adulta pela inflamação materna.

Além disso, demonstramos que há participação da NOX nas alterações induzidas no desenvolvimento renal pela inflamação materna. A apocinina preveniu a alteração da zona nefrogênica induzida pelo LPS, ao mesmo tempo que evitou diminuição da proliferação celular renal e o aumento do mediador pró-apoptótico Bax. Em longo prazo, essas alterações podem culminar com esclerose glomerular, proteinúria (Harrison et al, 2009) e disfunção endotelial as arteríolas aferentes(Wang et al, 2003).

7.CONCLUSÕES

Podemos concluir que a produção de superóxido mediada pela NOX é um mecanismo subjacente à elevação do estresse oxidativo no ambiente materno/fetal induzida pela inflamação materna. Essa alteração, por consequência, pode estar correlacionada ao retardo do crescimento intrauterino e prejuízos no desenvolvimento renal do feto, através de alterações da proliferação celular e apoptose. Embora a apocinina tenha revertido alterações no desenvolvimento renal induzidas pelo LPS, em condições controle, ela promoveu suaves alterações na diferenciação celular. Apesar dessas alterações não terem sido suficiente para repercutir na nefrogênese, é necessária uma investigação mais profunda de seu papel.

REFERÊNCIAS

- ABAD, C; VALLEJOS *et al.* Na⁺, K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase activities in basal and microvillous syncytiotrophoblast membranes from preeclamptic human term placenta, **Hypertens Pregnancy**, Vol.34, No.1, p.65-79, fev 2015 .
- ABDELMAGEED, M.E *et al.* Apocynin ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats, **International Immunopharmacolog.** Vol, 30, p.163–170, 2016.
- ALTINTAS, R *et al.* The Protective Effects of Apocynin on Kidney Damage Caused by Renal Ischemia/Reperfusion, **Journal of Endourology**, May 2013, Vol 27, Number 5.
- ALEXANDRAKI, K; PIPERI, C; KALOFOUTIS, C. Singh, J. Inflammatory process in type 2 diabetes: the role of cytokines. **Ann N. Y. Acad. Sci**, v, 10, n.84, p.89–117, 2006.
- AMANN, K; PLANK ,C; DÖTSCH, J. Low nephron number—a new cardiovascular risk factor in children? **Pediatr Nephrol**, Vol 19, No.7, p.1319–23, December 2004.
- BANDAY, A.A *et al.* Tempol Reduces Oxidative Stress, Improv Insulin Sensitivity, Decreases Renal Dopamine D1 Receptor Hyperphosphorylation, and Restores D1 Receptor–G-Protein Coupling and Function in Obese Zucker Rats. **Diabetes**, Vol. 54, Jul, 2005.
- BARBOSA, K.B. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev.Nutrição**, Vol.23, No.4, 2010.
- BARIANI, V.M *et al.* Resveratrol protects from lipopolysaccharide-induced inflammation in the uterus and prevents experimental pretermbirth. **Molecular Human Reproduction**, p. 1–11, june 2017.
- BARKER D.J, OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **The lancet** , No.1, p.1077-1081, May 1986.
- BARKER,D.J; WINTER, P.D; OSMOND C, et al: Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The lancet**, No.2, p.577-580, 1989.
- BARKER,D.J: Intrauterine programming of adult disease. **Mol Med Today**, No.1, p.418-423, 1993.
- BABIOR B.B.M. NADPH Oxidase: An Update. **Blood**, Vol 93, No 5, p. 1464-1476.1999.
- BECHARA, L. R. G *et al* oxidase hyperactivity induces plantaris atrophy in heart failure rats. **International Journal of Cardiology**, 2014, vol.175, n° 3, p. 499–507.
- BEDARD, K; KRAUSE, K.H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases. **Physiol Rev** , Vol. 87, p. 245–313, 2007.
- BOIVIN, A; MESROBEANU, L. Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries. I. Considérations générales et exposé des technique utilisées. **Rev Immunol**, Vol. 1, p.553-569, 1935.
- BURTON,G.J; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. Best Practice & Research. **Clinical Obstetrics & Gynaecology**, No.25, p.287–299, 2011.
- CARTER, A.M. Gene expression and delayed nephrogenesis in the growth-restricted rat fetus and neonate. **Acta Physiologica**, Vol.24, Nov 2017.

CASTELLANO, G *et al.* Endothelial dysfunction and renal fibrosis in endotoxemia-induced oliguric kidney injury: possible role of LPS-binding protein. **Critical Care**, Vol.18 n°5, p.2-18, 2014.

CHABRASHVILI ,T *et al.* Expression and cellular localization of classic NADPH oxidase subunits in the spontaneously hypertensive rat kidney. **Hypertension**, Vol.39, p.269–274, 2002.

CHAVES,A.L; FERREIRA,R.N; ROCHA,V.N; MARTINI,M.V.C. Biometric Analysis and Kidney Morphologic of Rats Submitted to Gestational Protein Restriction. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.3, n. único, p. 13-20, 2011.

CHEN Y-H *et al.* Ascorbic acid protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. **Toxicology**, Vol.217, p.39–45, 2006.

CHEN, X *et al.* Prenatal Exposure to Lipopolysaccharide Results in Myocardial Fibrosis in Rat Offspring. **J. Mol. Sci**, 2015, Vol.16, p.10986-10996.

CHENG,X.I *et al.* Apocynin attenuates renal fibrosis via inhibition of NOXs-ROS-ERK-myofibroblast accumulation in UUO rats, **Free Radical Research**, vol. 50, n°8, p.840-852, May 2016.

COTECHINI,T; GRAHAM, C.H. Aberrant maternal inflammation as a cause of pregnancy complications: A potential therapeutic target? , Vol. 36, p.960-966, 2015.

COWLEY A.W.J.R. Renal Medullary Oxidative Stress, Pressure-Natriuresis, and Hypertension. **Hypertension**, vol52, p.777-786, 2008.

COWLEY A.W.J.R *et al.* Reactive oxygen species as important determinants of medullary flow, sodium excretion, and hypertension, **Am J Physiol Renal Physiol**, vol.308, p.179–F197, 2015.

CUFFE, J.S.M *et al.* Uteroplacental insufficiency in rats induces renal apoptosis and delays nephrogenesis completion. **Acta Physiologica**, vol 82, p.129, 2017.

DANESH, J *et al.* Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. **PLoS. Med**, v.5, n° 4, p. 1-12, April 2008.

DAKSHNAPRIYA,B *et al.* Toll-Like Receptor Activation, Vascular Endothelial Function, and Hypertensive Disorders of Pregnancy. **Pharmacological Research**, vol. 121, p. 14-21, 2017.

DILLINGH, M.R *et al.* Characterization of inflammation and immune cell modulation induced by low-dose LPS administration to healthy volunteers. **Journal of Inflammation**, 2014, Vol.11, n° 28, p2-9.

DOBRETSOV, G. E *et al.* The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. **FEBS**, Vol, 84, p.125–8, 1977.

ERIC JAUNIAUX, M.D *et al.* Comparison of ultrasonographic and Doppler mapping of the intervillous circulation in normal and abnormal early pregnancies. **Fertility and sterility**, Vol.79, No.1, Jan, 2003.

FAA G; GEROSA *et al.* Morphogenesis and molecular mechanisms involved in human kidney development. **J Cell Physiol**, 2012, Vol.227, p.1257–68.

FAA G *et al.* Kidney embryogenesis: how to look at old things with new eyes. Developmental nephrology: from embryology to metabolomics. **Hygeia Press**, p. 23–45, 2011.

FRANCO, M.D.O.C *et al.* Severe nutritional restriction in pregnant rats aggravates hypertension, altered vascular reactivity, and renal development in spontaneously hypertensive rats offspring. **J Cardiovasc Pharmacol**, 2002, Vol.3, p.369–77.

FIGUEROA, J.P *et al.* Alterations in Fetal Kidney Development and Elevations in Arterial Blood Pressure in Young Adult Sheep after Clinical Doses of Antenatal Glucocorticoids. **Pediatric research**, Vol. 58, N.3, 2005 .

GALINSKY, R *et al.* Effect of intra-amniotic lipopolysaccharide on nephron number in preterm fetal sheep. **Am J Physiol Renal Physiol**, 2011, Vol.301, No.2, p.280–5.

GALINSKY, R *et al.* Effect of intra-amniotic lipopolysaccharide on nephron number in preterm fetal sheep. **AJP-Renal Physiol**, Ago, 2011, Vol.301, No.2, p.280-5.

GALLO,C *et al.* Potential Therapeutic Effects of Vitamin E and C on Placental Oxidative Stress Induced by Nicotine: An In Vitro Evidence. **The Open Biochemistry Journal**, 2010, Vol.4, p.77-82.

GILBERT, J.S *et al.* Nutrient restriction impairs nephrogenesis in a gender-specific manner in the ovine fetus. **Pediatr Res**, Vol.61, p.42–7, 2007

GOODFELLOW, J *et al.* Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. **Cardiovasc** , Vol.40,p.600-606, 1998.

GUYTON, A.; HALL, J.E. Tratado de fisiologia médica. 11^oed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAO, X.Q *et al.* Prenatal exposure to lipopolysaccharide alters the intrarenal renin–angiotensin system and renal damage in offspring rats. **Hypertension Research**, Vol.33, p.76–82, 2010.

HARRISON, D.G, GONGORA, M.C. Oxidative stress and hypertension. **Med Clin North Am**, Vol .93, p.621-35,2009.

HOTOURA, E *et al.* Kidney development in the first year of life in small-for-gestational-age preterm infants. **Pediatr Radiol** , Vol.35, No.5 p.991–4, 2005.

HOY,W.E *et al.* Nephron number, hypertension, renal disease, and renal failure. **J Am Soc Nephrol**, 2005, Vol.16, p.2557–64.

HUGHSON, M.D *et al.* Hypertension, glomerular number, and birth weight in African Americans and white subjects in the southeastern United States. **Kidney**, Vol. 69, p.671-678, 2006.

H. SIES; D. JONES. Oxidative stress. **Elsevier Amsterdam**, vol 3, p. 45–48, 2007.

JONES M.L *et al.* Maternal Dietary Omega-3 Fatty Acid Supplementation Reduces Placental Oxidative Stress and Increases Fetal and Placental Growth in the Rat. **Biology of reproduction**, Vol.88, No.2, p.1–8, 2013.

JONES M.L; MARK, P.J; WADDELL, B.J .Maternal dietary omega-3 fatty acids and placental function. **J Reproduction**, 2014, Vol.147, p.143–152..

JOHANSSON, M *et al.* Activity and protein expression of Na⁺/K⁺ ATPase are reduced in microvillous syncytiotrophoblast plasma membranes isolated from pregnancies

complicated by intrauterine growth restriction. **J Clin Endocrinol Metab**, Jun, 2003, Vol.88, No.6 p.2831-7.

JOHNSON D. K *et al.* Inhibition of NADPH Oxidase Activation in Endothelial Cells by ortho -Methoxy-Substituted Catechols. **Endothelium**, vol. 9 n.3, p.191–203,2002

KANEGAE M. P. P *et al.* Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 393, n. 3,p. 551–554,2010.

LAM, G.Y; HUANQ, J ; BRUMELL, J.H. The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. **Semin Immunopathol**, Vol.32, p.415–430,Dez, 2010.

LANGLEY-EVANS ,S. ; WELHAM, S.J ; JACKSON, A.A. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. **Life Sci** , Vol.64, p.965–74, 1999.

LEE, J.J. et al. Blocking nf-kappab activation may be an effective strategy in the fever therapy. **Jpn j physiol.** v. 53, p. 367-375, 2003.

LEGHI, G.E; MUHLHAUSLER, B.S. The effect of n-3 lcpufa supplementation on oxidative stress and inflammation in the placenta and maternal plasma during pregnancy. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids.** v. 113, p. 33-39, 2016.

LI, M. *et al.* Effects of apocynin on oxidative stress and expression of apoptosis-related genes in testes of diabetic rats. **Molecular Medicine Reports.** v. 7, p. 47-52, 2013.

LIU, L. *et al.* Protective effects of edaravone, a free radical scavenger, on lipopolysaccharide induced acute kidney injury in a rat model of sepsis. **Int Urol Nephrol.** v. 47, n. 10, p. 1745-1752, 2015.

LIAO, W. et al. Prenatal exposure to zymosan results in hypertension in adult offspring rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.** v. 35, p. 1413-1418, 2008.

LUSHCHAK, V.I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact.** v. 224, n. 5, p. 164-175, 2014.

MACHADO, S.S. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFKB. **Revista da biologia**, v. 4, 2010.

MALTI, N. *et al.* Oxidative stress and maternal obesity: Feto-placental unit interaction. **Placenta.** v. 35, p. 411-416, 2014.

NAVAR, L. G; NISHIYAMA, A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? **Current Opinion in Nephrology and Hypertension.** v. 13, n. 1, p. 107-115, 2004.

MIYANO, K.; SUMIMOTO, H. Role of the small gtpase rac in p22phox-dependent nadph oxidases. **Biochimie.** v. 89, p. 1133-1144, 2007.

MOLVAREC, A. *et al.* Serum leptin levels in relation to circulating cytokines, chemokines, adhesion molecules and angiogenic factors in normal pregnancy and preeclampsia. **Reproductive Biology and Endocrinology.** v. 9, p. 1-9, 2011.

NWAGWU, M.O.; COOK, A.; LANGLEY-EVANS, S.C. Evidence of progressive deterioration of renal function in rats exposed to a maternal low-protein diet in utero. **Br J Nutr.** v. 83, p. 79-88, 2000.

NEVES. C.; MEDINA, L.J.; DELGADO, L.J. Alterações Endócrinas e Imuno-modulação na Gravidez. **Arquivos de medicina.** v. 21, n. 5-6, p. 175-182, 2007.

OJEDA, N.B.; GRIGORE, D.; ALEXANDER, B.T. Intrauterine Growth Restriction: Fetal Programming of Hypertension and Kidney Disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**. v. 15, n. 2, p. 101-106, 2008.

OLIVEIRA, L.G.; KARUMANCHI, A.; SASS, N. Preeclampsia: oxidative stress, inflammation and endothelial dysfunction. **Rev Bras Ginecol Obstet**. v. 32, n. 12, p. 609-616, 2010.

OPAS. Pervalência de doenças cardiovasculares, 2017. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5253:doencas-cardiovasculares&Itemid=1096. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

PAIXÃO, A.D.; ALEXANDER, B.T. How the Kidney Is Impacted by the Perinatal Maternal Environment to Develop Hypertension. **Biology of reproduction**. v. 89, n. 6, p. 144, 2013.

PEDRO ROSSO, M.D. Nutrition and maternal-fetal exchange. **Am J Clin Nutr**. v. 34, p. 744-755, 1981.

PELELI, A. *et al.* Renal denervation attenuates hypertension and renal dysfunction in a model of cardiovascular and renal disease, which is associated with reduced NADPH and xanthine oxidase activity. **J Redox Biolog**. v. 13, p. 522-527, 2017.

PERRONE, S. *et al.* Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated disease. **World Journal Clin Pediatr**. v. 5, n. 1, p. 172-181, 2016.

PFEIFFER, R. Untersuchungen über das Cholera Gift. **Z Hyg**. v. 11, p. 393-411, 1892.

POTTER, E.L; THIERSTEIN, S.T. Glomerular development in the kidney as an index of fetal maturity. **J Pediatr**, 1943, v. 22, p. 695-706.

RABÊLO, L.A. *et al.* Redox Unbalance: NADPH Oxidase as Therapeutic Target in Blood Pressure Control. **Arq Bras Cardiol**. v. 94, n. 5, p. 684-693, 2010.

RASTOGI, R. *et al.* NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. **Front Cell Neurosci**. v. 10, p. 301, 2017.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B. *et al.* Oxidative stress, renal infiltration of immune cells, and salt-sensitive hypertension: all for one and one for all. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, 2004, v. 286, n. 4, p. 606-616.

ROGERS, L.K.; VELTEN, M. Maternal inflammation, growth retardation, and preterm birth: Insights into adult cardiovascular disease. **Life Sciences**. v. 89, p. 417-421, 2011.

RUGALE, C. *et al.* Prevention and Reversal by Enalapril of Target Organ Damage in Angiotensin II Hypertension. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, 2005, v. 6, n. 3, p. 154-160.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**. v. 4, p. 180-183, 2015.

SIMON, C.; EVANS, L. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. **Life Sciences**. v. 60, n. 15, p.1213-1221, 1997.

SULTANA, Z. *et al.* Oxidative stress, placental ageing- related pathologies and adverse pregnancy outcomes. **Am J Reprod Immunol**. v. 77, p. 1-10, 2017.

SUN, Y. *et al.* Therapeutic effect of apocynin through antioxidant activity and suppression of apoptosis and inflammation after spinal cord injury. **Experimental and therapeutic medicine**. v. 13, p. 952-960, 2017.

SCHOOTS, M.H. *et al.* Oxidative stress in placental pathology. **Placenta**. v. 69, p. 153-161, 2018.

SHAOWEI, W.U. *et al.* Prenatal stress, methylation in inflammation-related genes, and adiposity measures in early childhood: the progress cohort study. **Psychosomatic Medicine**. 2016.

BOURQUE, S.L. *et al.* Maternal resveratrol treatment during pregnancy improves adverse fetal outcomes in a rat model of severe hypoxia. **Placenta**. v. 33, p. 449-452, 2012.

UDDIN, M.N. *et al.* Examination of the cellular mechanisms by which marinobufagenin inhibits cytotrophoblast function. **J Biol Chem**. v. 283, n. 26, p. 17946-17953, 2008.

USHIDA, T. *et al.* Persistence of risk factors associated with maternal cardiovascular disease following aberrant inflammation in rat pregnancy. **Biology of Reproduction**. p. 1-10, 2017.

VAZIRI, N.D. Causal Link Between Oxidative Stress, Inflammation, and Hypertension. **Kidney diseases**. v. 2, p. 1-10, 2008.

VAZIRI, N.D; RODRIGUEZ-ITURBE, B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. **Nat Clin Pract Nephrol**. v. 2, p. 582-593, 2006.

VIEIRA-FILHO, L.D. *et al.* Renal molecular mechanisms Munderlying altered Na+ handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. **Br J Nutr**. v. 24, p. 1-13, 2014.

VIEIRA-FILHO, L.D. *et al.* Oxidative stress induced by prenatal LPS leads to endothelial dysfunction and renal haemodynamic changes through angiotensin II/NADPH oxidase pathway: Prevention by early treatment with α -tocopherol. **Molecular Basis of Disease**. p. 1-33, 2018.

WADHWA, P.D. Psychoneuroendocrine processes in human pregnancy influence fetal development and health. **Psychoneuroendocrinology**. v. 30, p. 724-743, 2005.

WANG, X. *et al.* Prenatal Lipopolysaccharide Exposure Results in Dysfunction of the Renal Dopamine D1 Receptor in Offspring. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 76, p. 242-250, 2014.

WANG, J. *et al.* Prenatal Exposure to Lipopolysaccharide Alters Renal DNA Methyltransferase Expression in Rat Offspring. **Plos One**. v. 12, n. 1, 2017.

Wang, D. C. Y. *et al.* Role of oxidative stress in endothelial dysfunction and enhanced responses to angiotensin II of afferent arterioles from rabbits infused with angiotensin II. **J Am Soc Nephrol**. v. 14, n. 11, p. 2783-2789, 2003.

WEI, Y.L.; LI, X.H.; ZHOU, J.Z. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats. **Acta Pharmacol**. v. 28, n. 5, p. 651-6, 2007.

WOODS, L.L.; WEEKS, D.A. Prenatal programming of adult blood pressure: role of maternal corticosteroids. **AJP-Regul Integr Comp Physiol**. v. 289, p. 955-962, 2005.

WOODS, L.L. *et al.* Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. **Pediatr**. v. 49, p. 460-467, 2001.

WU, F.; TIAN, F.J.; LIN, Y. Oxidative Stress in Placenta: Health and Diseases. **Bio med research international**. p.1- 15, 2015.

WLODEK, M.E. *et al.* Growth restriction before or after birth reduces nephron number and increases blood pressure in male rats. **International Society of Nephrology**, vol. 74, n 2, p.187-195, 2008.

XIMENES, V.F *et al.* The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: Proposal for NADPH oxidase inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 457, n. 2, p.134-141, 2007.

ZHAO, S. *et al.* Lipopolysaccharide Exposure during Pregnancy Leads to Aortic Dysfunction in Offspring Rats. **Plos One**. v. 9, n. 7, 2014.

ZIMANYI, M.A.; BERTRAM, J.F.; BLACK, M.J. Does a nephron deficit in rats predispose to saltsensitive hypertension? **Kidney Blood Press Res**. v. 27, p. 239-247, 2004.