



BÁRBARA VACCARI CARDOSO

**ESTUDO DE ALFA-ADRENOCEPTORES CENTRAIS NA
MODULAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL EM RATOS
SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA GESTACIONAL**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

BÁRBARA VACCARI CARDOSO

**ESTUDO DE ALFA-ADRENOCEPTORES CENTRAIS NA
MODULAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL EM RATOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA GESTACIONAL**

Orientador: José Antonio Rocha Gontijo

Coorientadora: Patricia Aline Boer

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em Ciências

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DE MESTRADO DEFENDIDA PELA ALUNA BÁRBARA VACCARI CARDOSO
E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ ANTONIO ROCHA GONTIJO

Assinatura do Orientador

Campinas

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C179e Cardoso, Bárbara Vaccari, 1989-
Estudo de alfa-adrenoceptores centrais na modulação da
função renal em ratos submetidos à restrição proteica
gestacional / Bárbara Vaccari Cardoso. -- Campinas, SP : [s.n.],
2014.

Orientador : José Antonio Rocha Gontijo.
Coorientador : Patricia Aline Boer.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Desenvolvimento fetal. 2. Hipertensão. 3. Sistema
nervoso central. 4. Desnutrição proteica. 5. Testes de função
renal. I. Gontijo, José Antonio Rocha, 1956-. II. Boer, Patricia
Aline. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of central alpha-adrenoceptors on renal function
modulation in rats submitted to gestational protein restriction

Palavras-chave em inglês:

Fetal development

Hypertension

Central nervous system

Protein malnutrition

Kidney function tests

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

José Antonio Rocha Gontijo [Orientador]

Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira

Débora Simões de Almeida Colombari

Data de defesa: 30-07-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

BÁRBARA VACCARI CARDOSO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). PATRÍCIA ALINE BOER

MEMBROS:

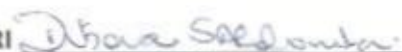
1. PROF(A). DR(A). JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO



2. PROF(A). DR(A). ALEXANDRE LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA



3. PROF(A). DR(A). DEBORA SIMÕES DE ALMEIDA COLOMBARI



Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 30 de julho de 2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais João e Corina e ao meu irmão João Augusto, meus exemplos de dedicação, persistência e amor.

Sem vocês, nada teria valido a pena.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

***“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade”***

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, à Ele toda a minha gratidão;

Ao meu orientador, o professor Gontijo, pela oportunidade de me tornar parte de seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada em meu trabalho, por toda a orientação, humildade e paciência, e por me apresentar à neurociência, esse fascinante e viciante campo do conhecimento.

À professora Patrícia, minha coorientadora e primeira orientadora, por acreditar em meu potencial mesmo quando eu tinha pouco a oferecer, por me introduzir na pesquisa e por sempre conscientizar-nos sobre o respeito à vida animal.

Ao Dr. Figueiredo, por seu carisma e disposição pelo ensino. À Flávia, pela dedicação e prontidão em me ajudar sempre.

À Amanda e Érica, por me ensinarem a cirurgia estereotáxica, pela paciência e pelo suporte sempre que necessário.

Aos colegas do Laboratório de Metabolismo Hidrossalino, por toda ajuda profissional e pela agradável convivência diária, foi um prazer trabalhar com todos vocês. Aos amigos Daniel, Canale, Augusto e Carmen, pelos conselhos, descontração e por todo o apoio profissional e pessoal. À Letícia, pela amizade, compreensão e desabafos.

A todos os funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental que, com vossos trabalhos, tornaram o meu possível.

A Capes, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro. À Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e ao programa de Fisiopatologia Médica, pelo apoio à realização dessa pesquisa.

Aos amigos da minha gloriosa UNESP de Botucatu, em especial à Paper, Penumbra e Pelé, que mesmo fisicamente separadas nunca estiveram distantes, por todo o companheirismo, prontidão e amizade sempre.

À Marcela, Andresa, Janaína e Gabriela, minhas companheiras de república, pela convivência diária, pela troca de experiências, por todo companheirismo e por tornarem meus dias em Campinas muito mais prazerosos.

À Juliana, pela longa amizade e apoio incondicional, pela disposição em sempre me ouvir e ajudar, pelo conforto em saber que lhe tenho como amiga.

À minha família - minha avó, tias e primos: “os *Vaccaris*” -, por todo o carinho e conchego que me proporcionaram na volta pra casa.

Aos meus pais, João e Corina, e ao meu irmão, o Adu, a quem devo tudo que sou, por todo o amor e apoio incondicionais, por fazer de meus sonhos, os seus sonhos.

Resumo

RESUMO

Estudos têm mostrado que a restrição proteica gestacional programa o fenótipo da prole a fim de torná-lo compatível com o provável ambiente encontrado na vida pós-natal. No entanto, se a oferta nutricional tornar-se abundante após o nascimento, aumenta-se o risco etiológico de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a hipertensão arterial, na prole adulta. Um importante fator que contribui para esse processo é a alteração do metabolismo hidrossalino, caracterizado pela alta retenção de sódio nesse modelo. Visto que o rim é o principal órgão de controle hidroeletrolítico e sua função é minuciosamente modulada pelo sistema nervoso por meio da transmissão catecolaminérgica central, alterações nesse sistema teriam um papel fundamental nas modificações da função renal e, conseqüentemente, na etiologia da hipertensão arterial. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as implicações da transmissão noradrenérgica central mediada por α -adrenoceptores sobre o balanço hidroeletrolítico renal em ratos machos adultos submetidos à restrição proteica durante o período fetal. Ratas Wistar prenhes foram submetidas à dieta hipoproteica durante a gestação e, na prole de machos, foi realizado a caracterização antropométrica e pressórica. Na idade adulta, estes animais foram submetidos à implantação de uma cânula intracerebroventricular para microinjeção de antagonistas $\alpha 1$ - e $\alpha 2$ -adrenoceptores durante a avaliação de função renal pelo clearance de lítio e creatinina. Os animais submetidos à restrição proteica durante o desenvolvimento fetal apresentaram significativa redução do peso ao nascer e aumento da pressão arterial sistólica. O estudo da função renal revelou que o estímulo simpatomimético por epinefrina frente ao bloqueio prévio de $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais promoveu antidiurese acentuada, bem como elevação significativa da natriurese nesses animais. Os resultados sugerem que a massiva retenção de sódio e água observada nesse modelo experimental se deve, pelo menos em parte, à uma possível alteração da atividade e/ou número de $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais, isolada ou em conjunto com modificações na sinalização adrenérgica mediada por $\alpha 1$ -adrenoceptores

presentes no sistema nervoso central de animais programados. O estudo também mostra que a retenção renal de sódio ocorre nos segmentos proximais e pós proximais do nefro e, não são acompanhados por alterações na filtração glomerular. Assim, o presente trabalho demonstrou que alterações na transmissão catecolaminérgica central mediada por α -adrenoceptores possui um importante papel no estabelecimento e/ou manutenção da hipertensão arterial na prole de mães submetidas à restrição proteica gestacional.

Abstract

ABSTRACT

Studies have shown that gestational protein restriction programs the offspring phenotype in order to make it compatible with the likely environment found in postnatal life. However, if the nutrient supply becomes abundant after birth, it increases the etiological risk of developing cardiovascular diseases such as hypertension in adult offspring. An important factor contributing to this process is the alteration of the salt and water metabolism characterized by high sodium retention in this model. Since the kidney is the main hydroelectrolytic control organ and its function is thoroughly modulated by the nervous system through central catecholaminergic transmission, alterations in this system may have a key role in the renal function changes and, consequently, in the etiology of hypertension. Therefore, the aim of this study was to evaluate the implications of central noradrenergic transmission mediated by α -adrenoceptors in the renal fluid and electrolyte balance in adult male rats subjected to protein restriction during the fetal period. Pregnant Wistar rats were subjected to a low protein diet during pregnancy and blood pressure and anthropometric characterization were performed in the male offspring. In adulthood, these animals underwent an intracerebroventricular cannula implantation towards microinjection of α 1- and α 2-adrenoceptors antagonists during the evaluation of renal function by creatinine clearance and lithium excretion. The animals submitted to protein restriction during fetal development showed significant reduction in the birth weight and increased systolic blood pressure. The renal function study revealed that the sympathomimetic stimulation by epinephrine with prior blockade of central α 2-adrenoceptors promoted marked antidiuresis, as well as a significant increase in natriuresis level in these animals. The results suggest that the massive sodium and water retention observed in this experimental model is due, at least in part, to a possible change in activity and/or number of central α 2-adrenoceptors, alone or in conjunction with changes in α 1-adrenoceptors-mediated signalling in the central nervous system of programmed animals. The study also shows that renal sodium retention occurs in the proximal and post-proximal nephron segments and are not accompanied by

changes in glomerular filtration. Thus, the present study demonstrated that changes in central catecholaminergic transmission mediated by α -adrenoceptor plays an important role in the establishment and/or maintenance of hypertension in the offspring of rats subjected to gestational protein restriction.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

11 β -HSD2	11 β -hidroxiesteroide-desidrogenase tipo 2
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADR	Adrenalina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
Ang II	Angiotensina II
AT2R	Receptor AT2 de angiotensina II
AVP	Arginina-vasopressina
Ca ⁺²	Cálcio
CCr	Clearance de creatinina
DAG	Diacylglicerol
Dahl-SS	Ratos Dahl sensíveis ao sal
Dahl-SR	Ratos Dahl resistentes ao sal
Ep	Epinefrina
FEK+	Fração de excreção de potássio
FENa	Fração de excreção de sódio
FEPNa	Fração de excreção proximal de sódio
FEPPNa	Fração de excreção pós-proximal de sódio
GDP	Guanosina difosfato
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GTP	Guanosina trifosfato
i.c.v.	Intracerebroventricular
IP3	Inositol trifosfato
LC	Locus coeruleus
LP	<i>Low protein</i>
NA	Noradrenalina
NCC	Cotransportador Na ⁺ /Cl ⁻

NHE3	Trocador Na^+/H^+
NKCC2	Cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$
NP	<i>Normal protein</i>
NTS	Núcleo do trato solitário
ODN	Oligodeoxinucleotídeo
PG	Propilenoglicol
PIP ₂	Fosfatidilinositol bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PLD	Fosfolipase D
PRA	Prazosin
PVN	Núcleo paraventricular
RVLM	Medula ventrolateral rostral
SON	Núcleo supra-óptico
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
YOH	Yohimbine

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas normoproteica e hipoproteica.....	58
Figura 1: Adrenoceptores no neurônio noradrenérgico.....	44
Figura 2: Processo de aferição da pressão arterial sistólica por plestimografia caudal.....	53
Figura 3: Aparato estereotáxico para implantação da cânula-guia.....	55
Figura 4: Etapas de estudo da função renal.....	57
Figura 5: Averiguação do local de microinjeção.....	61
Figura 6: Consumo diário das dietas NP e LP.....	65
Figura 7: Peso ao nascer de machos da prole.....	66
Figura 8: Correlação entre peso ao nascer e número de filhotes.....	66
Figura 9: Evolução da massa corpórea da prole ao longo das semanas de vida.....	67
Figura 10: Evolução da pressão arterial sistólica da prole com 8, 10 e 12 semanas de vida.....	68
Figura 11: Volume urinário ao longo do tempo após estímulo adrenérgico central.....	69
Figura 12: Fração de excreção de sódio ao longo do tempo após estímulo adrenérgico central.....	70
Figura 13: Curva dose-resposta da fração de excreção de sódio da prole nos diferentes tempos de coleta após estímulo adrenérgico central.....	71
Figura 14: Fração de excreção proximal de sódio ao longo do tempo após estímulo adrenérgico central.....	72
Figura 15: Fração de excreção pós-proximal de sódio ao longo do tempo após estímulo adrenérgico central.....	73
Figura 16: Fração de excreção de potássio ao longo do tempo após estímulo adrenérgico central.....	74
Figura 17: Volume urinário 120 minutos após bloqueio α 1-adrenoceptor.....	75

Figura 18: Fração de excreção de sódio ao longo do tempo após bloqueio α 1-adrenoceptor.....	76
Figura 19: Fração de excreção proximal de sódio ao longo do tempo após bloqueio α 1-adrenoceptor.....	77
Figura 20: Fração de excreção pós-proximal de sódio ao longo do tempo após bloqueio α 1-adrenoceptor.....	78
Figura 21: Fração de excreção de potássio ao longo do tempo após bloqueio α 1-adrenoceptor.....	79
Figura 22: Volume urinário ao longo do tempo após bloqueio α 2-adrenoceptor...	81
Figura 23: Volume urinário ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Yoh e Yoh+Ep300.....	82
Figura 24: Fração de excreção de sódio ao longo do tempo após bloqueio α 2-adrenoceptor.....	83
Figura 25: Fração de excreção proximal de sódio ao longo do tempo após bloqueio α 2-adrenoceptor.....	85
Figura 26: Fração de excreção pós-proximal de sódio ao longo do tempo após bloqueio α 2-adrenoceptor.....	86
Figura 27: Fração de excreção de potássio ao longo do tempo após bloqueio α 2-adrenoceptor.....	87

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO	13
ABSTRACT	17
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	21
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	23
1. INTRODUÇÃO	27
1.1 Programação Fetal e Hipertensão Arterial.....	32
1.2 Programação Fetal e Sistema Catecolaminérgico Central.....	35
1.3 Sistema catecolaminérgico central.....	37
1.3.1 Núcleos noradrenérgicos.....	37
1.3.2 Adrenoceptores.....	39
1.3.2.1 α 1-adrenoceptores.....	40
1.3.2.2 α 2-adrenoceptores.....	41
1.3.2.2.1 Adrenoceptores pré-sinápticos.....	43
2. OBJETIVOS	45
2.1 Objetivos gerais.....	47
2.1 Objetivos específicos.....	47
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Animais.....	51
3.2 Acompanhamento da massa corporal.....	53
3.3 Aferição da pressão arterial sistólica.....	53
3.4 Estereotaxia.....	54
3.5 Microinjeções.....	55
3.6 Estudo da Função Renal.....	55
3.7 Drogas.....	58
3.8 Grupos de estudo.....	58
3.8.1 Resposta renal à microinjeção de diferentes doses de epinefrina.....	58
3.8.2 Adrenoceptores envolvidos na função renal.....	58

3.9 Determinação das Concentrações de Sódio, Lítio, Potássio e Creatinina Plasmáticas e Urinárias.....	59
3.10 Fórmulas para Cálculo do Clearance e da Fração de Excreção.....	60
3.10.1 Clearance de Creatinina (CCr).....	60
3.10.2 Fração de Excreção de Sódio (FENa).....	60
3.10.3 Fração de excreção de Potássio (FEK).....	60
3.10.4 Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa).....	60
3.10.5 Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa).....	61
3.11 Averiguação do local de injeção.....	61
3.12 Análise Estatística dos Resultados.....	62
4. RESULTADOS.....	63
4.1 Caracterização Antropométrica e Pressórica.....	65
4.2 Testes Funcionais Renais	68
4.2.1 Estímulo adrenérgico central.....	68
4.2.1 Bloqueio α 1-adrenoceptor.....	74
4.2.2 Bloqueio α 2-adrenoceptor.....	79
5. DISCUSSÃO.....	89
6. CONCLUSÃO.....	99
7. ANEXOS.....	101
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105

1. Introdução

Os organismos vivos são capazes de interagir com o ambiente físico a fim de produzirem respostas adaptativas que lhes confirmem melhores chances de sobrevivência e reprodução. Baseado nisso, há um crescente número de evidências que demonstram claramente que o ambiente intrauterino, influenciado por condições ambientais maternas, gera pistas para que o feto em desenvolvimento produza respostas adaptativas que permitam a modulação da função de tecidos e órgãos críticos para a sobrevivência pós-natal. Lucas (1991) denominou esse fenômeno de “*programação fetal*” e, em 1992, Hales e Barker propuseram a “*hipótese do fenótipo econômico*”, na qual presumem que adversidades intrauterinas geram uma série de adaptações fisiológicas e/ou metabólicas no feto em desenvolvimento a fim de aumentar as suas chances de sobrevivência.

A programação fetal é baseada na premissa de “*plasticidade do desenvolvimento*”, a qual considera que o organismo é plástico ou sensível ao seu ambiente em períodos específicos de seu desenvolvimento. Isso ocorre porque um genótipo, influenciado por eventos intrauterinos específicos, é capaz de produzir diferentes fenótipos, maximizando assim a diversidade fenotípica a fim de fornecer melhor ajuste ao ambiente pós-natal (CALKINS & DEVASKAR, 2011). Esse fenômeno ocorre através de modificações epigenéticas, que geram alteração no padrão de expressão gênica no feto em desenvolvimento sem modificações na sequência de nucleotídeos do DNA. Tal processo é possível por meio de acetilação, metilação, ubiquitinação ou fosforilação das histonas responsáveis pelo empacotamento da molécula de DNA, o que culmina em mudanças no padrão de expressão gênica (GODFREY et al., 2007). Dessa forma, se as condições ambientais pós-natal, até a vida adulta, forem compatíveis às intrauterinas, a sobrevivência do organismo é garantida. Caso contrário, se os dois ambientes forem incompatíveis, essas adaptações tornam-se desvantajosas aumentando a susceptibilidade a doenças na idade adulta (GLUCKMAN & HANSON, 2004).

As primeiras evidências de programação do desenvolvimento foram feitas por Rose, em 1964, que notou que indivíduos cujos irmãos foram abortados espontaneamente ou morreram durante a infância apresentavam alto risco de

desenvolvimento de isquemia cardíaca. Forsdahl (1977) relatou que regiões da Noruega com alto índice de mortalidade infantil apresentavam concomitantemente índices elevados de morte por doenças cardiovasculares. Entretanto, foram os estudos epidemiológicos realizados em Hertfordshire, Reino Unido, no final dos anos de 1980 e início dos anos de 1990, que permitiram que Barker e colegas propusessem que eventos ocorridos durante a vida fetal poderiam influenciar o desenvolvimento de doenças na idade adulta. Usando uma coorte de homens e mulheres nascidos durante o período de 1911-1932, eles identificaram que a mortalidade por doença cardíaca coronária (BARKER et al., 1989), bem como a ocorrência de hipertensão arterial (BARKER et al., 1990), síndrome metabólica (BARKER et al., 1993) e diabetes tipo 2 (HALES et al., 1991) eram mais prevalentes em indivíduos que apresentaram baixo peso ao nascer. Do mesmo modo, utilizando-se uma coorte de 15.000 homens e mulheres suecos nascidos entre 1915 e 1929, Leon e colaboradores (1998) observaram a ocorrência significativamente maior de doença cardíaca isquêmica em indivíduos que possuíram menor peso ao nascer. Além disso, uma revisão de literatura relacionando o peso ao nascer com diabetes tipo 2 notou que, para cada 1kg de aumento no peso ao nascer, o risco de diabetes tipo II na vida adulta diminuiu em aproximadamente 25% (WHINCUP et al., 2008). Dessa forma, o baixo peso ao nascer tem sido considerado um marcador de adversidade ambiental durante o desenvolvimento embrionário. No entanto, deve-se ressaltar que este parâmetro não é um pré-requisito para que a programação fetal ocorra.

Diante da incompatibilidade entre os ambientes pré e pós-natal, há forte tendência para que o déficit no crescimento fetal, moldado por adversidades no ambiente intrauterino e evidenciado pelo baixo peso ao nascer, seja recuperado com a melhora das condições nutricionais pós-natais. Como resultado, observa-se um crescimento exponencial durante os estágios iniciais de vida, denominado de crescimento “*catch-up*”, e corresponde a uma resposta natural do organismo à inicial privação de nutrientes. O baixo peso ao nascer seguido por esse período de rápido crescimento é obtido por meio de altas taxas de ganho de massa corpórea em tecido gorduroso. Além de menor ganho de peso em massa magra (GALE et

al., 2001) a deposição da gordura ocorre preferencialmente em estoques viscerais ao invés de depósitos subcutâneos (MODI et al., 2006). Essa alteração do metabolismo pode atuar como fator causal adicional na programação de doenças em longo prazo, tais como resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão arterial e aumento do risco de desenvolvimento de síndrome metabólica (BARKER, 2004; HALES & BARKER, 2001).

A gama de condições ambientais com capacidade de alterar os processos de desenvolvimento fetal pode incluir desde fatores nutricionais (MCMILLEN & ROBINSON, 2005) a estressores psicológicos ou fisiológicos (LAZINSKI et al., 2008), bem como desequilíbrios na sinalização endócrina entre a progenitora e o feto (SECKL, 2004). As consequências na vida adulta podem variar de acordo com o intervalo de duração do insulto ao longo do período gestacional e/ou lactação, uma vez que diferentes tecidos e órgãos possuem intervalos distintos de crescimento e diferenciação celular. Muitos estudos têm pontuado principalmente os efeitos da programação do desenvolvimento sobre o estabelecimento de doenças cardiovasculares e metabólicas na prole adulta. Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que a submissão da progenitora às alterações dietéticas durante todo o período gestacional pode causar modificações morfofuncionais renais em seus descendentes, que repercutirão futuramente em alterações na pressão arterial e na morfologia e expressão gênica renal (MESQUITA et. al., 2010; VACCARI et al., 2013; SENE et al., 2013).

Tem sido demonstrado que um dos mecanismos pelos quais as adversidades gestacionais potencializam a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças na vida adulta está associado com a exposição excessiva do feto aos glicocorticoides maternos. A placenta expressa altos níveis da enzima 11 β -hidroxiesteroide-desidrogenase tipo 2 (11 β -HSD2), que é capaz de inativar o excesso de glicocorticoides maternos ao catalisar a reação de conversão do cortisol em cortisona em humanos e corticosterona em 11-dehidrocorticosterona em roedores (EDWARDS et al., 1993). Sendo assim, os tecidos fetais sensíveis a glicocorticoides durante seu desenvolvimento ficam protegidos por essa barreira enzimática (MEANEY et al., 2007). Contudo, o estresse nutricional durante a

gestação reduz a quantidade e atividade da 11 β -HSD2 placentária, permitindo que altos níveis de glicocorticoides maternos atinjam o feto em desenvolvimento, o que programa a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças (BENEDIKTSSON et al., 1997; EDWARDS et al., 1993; SECKL, 1998). De fato, em um modelo de restrição proteica materna, a inibição pré-natal da síntese de glicocorticoides preveniu o desenvolvimento de hipertensão arterial na prole adulta (LANGLEY-EVANS, 1997). Além disso, um estudo realizado por O'Regan (2008) mostrou que o tratamento pré-natal com dexametasona, um corticosteroide sintético, promoveu aumento da sensibilidade às catecolaminas e hipertensão em ratos da prole. Nestes animais, o estudo *in vitro*, usando mesentério isolado estimulado por noradrenalina e arginina-vasopressina (AVP), demonstrou maior efeito vasoconstritor em ratos de mães tratadas com dexametasona quando comparados com ratos controle (O'REGAN et al., 2008).

1.1 Programação Fetal e Hipertensão Arterial

Muitos trabalhos a respeito de programação fetal têm avaliado o impacto de perturbações ao longo do período gestacional e neonatal sobre o controle da homeostase corpórea em longo prazo. Em vista disso, os mecanismos de estabelecimento de hipertensão arterial durante a vida adulta nesses indivíduos programados têm se tornado um assunto de grande interesse. Visto que o rim é o principal órgão de controle do metabolismo hidrossalino e devido ao extenso período de tempo necessário para que esse órgão se desenvolva e amadureça, as alterações permanentes na estrutura e função renal são alvos de extensos estudos de hipertensão programada. Os componentes renais, morfológicos e funcionais, mais bem caracterizados atualmente como moldáveis por eventos de programação do desenvolvimento fetal são: número de nefros, sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), manipulação renal de sódio e nervos simpáticos renais (KETT & DENTON, 2011). Alterações nesses sistemas, ocasionadas pela programação fetal, podem atuar como fatores causais no desenvolvimento da hipertensão arterial na prole adulta, ao mesmo tempo em que, exceto o número de

nefros, podem representar respostas adaptativas ocasionadas pela elevação da pressão arterial.

Brenner e colaboradores (1998) propuseram que o baixo peso ao nascer poderia estar relacionado com a redução do número de nefros, o que predisporia à diminuição da excreção renal de sódio e o consequente aumento na susceptibilidade de desenvolvimento de hipertensão arterial no indivíduo adulto. A fim de manter a função renal adequada, a perda de nefro promove hiperfiltração e hipertrofia compensatória dos glomérulos remanescentes. Entretanto, essa adaptação causa hipertensão intraglomerular, o que prejudica o funcionamento do glomérulo e perpetua o ciclo-vicioso de perda de nefros (ZANDI-NEJAD et al., 2006). De fato, estudos de estereologia renal realizados em nosso laboratório demonstraram redução de aproximadamente 27% no número de nefros em ratos adultos submetidos à restrição proteica durante o período gestacional (MESQUITA et al., 2010) e de 35% na prole de ratas submetidas à restrição alimentar severa durante a gestação (VACCARI et al., 2013) quando comparados ao grupo controle. Apesar disso, em ambos os estudos mencionados acima, a taxa de filtração glomerular total não sofreu alterações significativas, evidenciando a ocorrência de hiperfiltração nos glomérulos remanescentes como postulado por Brenner e colaboradores (1998).

Trabalhos com programação do desenvolvimento, utilizando-se principalmente a exposição fetal a glicocorticoides exógenos e a redução proteica na dieta materna como modelos experimentais, têm mostrado como resultados na prole o aumento dos níveis de proteína, de RNAm e/ou da atividade de muitos canais renais de sódio, incluindo o trocador Na^+/H^+ (NHE3), o cotransportador $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ (NKCC2) e o cotransportador Na^+/Cl^- (NCC) (DAGAN et al., 2007; DAGAN et al., 2009; DAGAN et al., 2008), além de aumento na reabsorção tubular proximal e no transporte de cloro no ramo espesso ascendente medular da alça de Henle (DAGAN et al., 2007; DAGAN et al., 2009). Dagan e colaboradores (2008) verificaram que a prole de ratas expostas a dexametasona durante o período gestacional apresentava volume de noradrenalina (NA) renal elevado na 3ª semana de vida, bem como aumento dos níveis proteicos de NHE3, NKCC2 e

NCC com 8 semanas de idade. A fim de avaliar o papel do sistema nervoso simpático renal nessas alterações, foi realizado a denervação renal nesses animais na 6ª semana de vida, que se mostrou capaz de abolir o aumento dos níveis proteicos desses transportadores de sódio e de atenuar a pressão arterial (DAGAN et al., 2008). Assim, as alterações observadas na manipulação renal de sódio podem ser resultantes do aumento da atividade simpática renal nesses animais.

Outro mecanismo importante de controle da pressão arterial e que sofre alterações frente a distúrbios durante o desenvolvimento fetal é o SRAA. Apesar da diversidade de modelos de programação fetal empregados, a maioria dos estudos têm demonstrado redução nos níveis de angiotensina II (Ang II) e na expressão de seus receptores no rim de neonatos, o que vêm sendo associado com a diminuição do brotamento uretérico e do número de nefros observados nesse modelo (YOSYPIV, 2009; KETT & DENTON 2010; SONG et al., 2010). No sistema nervoso central, a Ang II tem como função facilitar a neurotransmissão nas terminações nervosas (BALT et al., 2003; DE JONGE et al., 1982), a liberação de catecolaminas por meio de mecanismos pré-sinápticos (DENDORFER et al., 1998) e diminuição de sua recaptação nesse local (RAASCH et al. 2004), sendo também capaz de afetar α -adrenoceptores pós-sinápticos (EIKENBURG, 1984; RICHER et al., 1984). Assim, a ativação do sistema renina-angiotensina central promove aumento da atividade do sistema nervoso simpático que, por sua vez, contribui significativamente para o controle da pressão arterial (DAMPNEY et al., 2005). Dessa forma, as possíveis alterações na expressão de constituintes desse sistema no cérebro, ocasionadas por eventos de programação fetal, pode contribuir significativamente para o desenvolvimento ou manutenção de doenças encontradas no indivíduo adulto.

Evidenciando a importância de modificações na atividade dos nervos simpáticos renais em animais submetidos às adversidades intrauterinas no posterior desenvolvimento de hipertensão, Alexander e colaboradores (2005) demonstraram, em um estudo de denervação renal em animais com hipertensão programada, que a destruição bilateral dos nervos renais é capaz de abolir

completamente a elevada pressão arterial observada nesse modelo experimental. Esse efeito parece ser específico para os animais que sofreram programação do desenvolvimento, visto que não houve diferença na pressão arterial entre a prole controle denervada e a prole controle *sham* (ALEXANDER et al., 2005).

Sendo assim, as alterações renais em modelos experimentais de programação fetal como redução no número de nefros e modificações na manipulação renal de sódio, no SRAA e na atividade dos nervos simpáticos renais inter-relacionam-se e formam o quadro patológico encontrado no indivíduo adulto. No entanto, o organismo possui outro centro modulador da homeostase corpórea, o sistema catecolaminérgico central, que pode igualmente sofrer modificações funcionais advindas da programação fetal e, assim, controlar diferencialmente os diversos órgãos e sistemas biológicos do indivíduo.

1.2 Programação Fetal e Sistema Catecolaminérgico Central

Otto Loewi, em 1921, descobriu que uma determinada substância química liberada pelas terminações nervosas possuía o poder de transmitir o efeito da estimulação simpática para o coração (LOEWI, 1921). Trinta anos de estudos nessa área do conhecimento foram necessários para estabelecer que essa substância tratava-se da NA (VON EULER, 1951), que logo após foi encontrada também no cérebro (VOGT, 1954) e em diferentes grupos de neurônios (DAHSLTRÖM & FUXE, 1964).

Diversos estudos têm demonstrado que a função dos sistemas cardiovascular e renal é modulada pelo sistema nervoso central por meio da transmissão catecolaminérgica central. A utilização de uma grande variedade de metodologias e modelos experimentais em pesquisas nesse campo do conhecimento revela a organização e regulação altamente complexa desse sistema, que é capaz de modular a atividade de uma gama de regiões cerebrais envolvidas no controle autonômico da pressão sanguínea por meio da interação entre as catecolaminas NA e adrenalina (ADR) com seus receptores específicos, denominados adrenoceptores.

De modo geral, a atividade noradrenérgica central possui fins homeostáticos, sendo recrutada e acionada como parte da resposta do sistema nervoso central às alterações fisiológicas (MORILAK et al., 2005). Entretanto, quando essa ativação torna-se persistente, seu papel passa a ser, em grande parte, prejudicial ao organismo, sendo o alto fluxo simpático, a partir do cérebro, uma característica comum observada nos mais prevalentes tipos de doenças do sistema cardiovascular (KASPAROV & TESCHEMACHER, 2008).

A relação entre a atividade noradrenérgica central e o estabelecimento da hipertensão tem sido extensivamente documentada em trabalhos científicos utilizando principalmente ratos espontaneamente hipertensos (SHR) como modelo experimental (ISAAC, 1980; PATEL et al., 1981; ESLER et al., 1995; OPARIL et al., 1996). Uma vez que alterações na transmissão noradrenérgica podem ser detectadas em cultura de tecido cerebral de animais ainda em estágios iniciais de vida, antes mesmo da elevação da pressão arterial (VEERASINGHAM et al., 2005), é plausível supor que o sistema catecolaminérgico central pode atuar como um possível fator causal no desenvolvimento da hipertensão. Corroborando isso, estudos mostraram que a depleção de NA central em ratos SHR jovens e pré-hipertensos preveniu a elevação pressórica caracteristicamente observada neste modelo (HAEUSLER et al., 1972; ERINOFF et al., 1975).

Em alguns trabalhos científicos tem sido evidenciado o papel do sistema noradrenérgico central no desenvolvimento de doenças em animais que sofreram programação do desenvolvimento fetal por restrição nutricional. Soto-Moyano e colaboradores (1998), por meio da restrição de 40% no conteúdo alimentar oferecido diariamente às ratas prenhes nas duas últimas semanas gestacionais, verificaram aumento significativo na concentração de NA em todo o tecido cerebral da prole ao nascimento, bem como aumento na liberação dessa catecolamina no córtex visual. Em outro trabalho, Keller e colaboradores (1982) verificaram que, em ratos adultos cujas mães foram submetidas à restrição proteica a partir do 14º dia gestacional, ocorreu diminuição de 27% e 35% no número de ligações de α e β -adrenoceptores centrais, respectivamente, sem quaisquer alterações significativas tanto nas constantes de dissociação desses receptores quanto na

afinidade pelo ligante. Segundo os autores do estudo, tais efeitos podem ser consequência da maior liberação de catecolaminas, condição esta que foi induzida pela permanente ativação dos neurônios noradrenérgicos centrais e, portanto, esses resultados podem ser interpretados como uma forma de adaptação pós-sináptica com o objetivo de balancear essa hiperatividade neuronal (KELLER et al., 1982). No entanto, é importante ressaltar que nesse estudo a prole recebeu a mesma dieta materna até atingir 50 dias de vida, ou seja, a incompatibilidade entre os ambientes pré e pós-desenvolvimento fetal, necessária para gerar discrepâncias funcionais, ocorreu mais tardiamente.

Para completo entendimento do papel modulador desempenhado pelo sistema catecolaminérgico central, é necessário compreender como ele está organizado no sistema nervoso central e quais as vias utilizadas para transmissão do sinal noradrenérgico.

1.3 Sistema catecolaminérgico central

- **1.3.1 Neurônios noradrenérgicos**

Um único neurônio noradrenérgico, que é responsável pela produção e liberação das catecolaminas, pode dar origem a uma variedade de axônios colaterais. Suas projeções atingem diversas regiões do cérebro e da medula espinhal, característica esta que os torna capazes de modular, no sistema nervoso central, a atividade de áreas distantes dos núcleos noradrenérgicos de origem (MOORE & BLOOM, 1979; SZABADI, 2013).

Seus corpos celulares encontram-se aglomerados em diferentes núcleos no tronco cerebral inferior (ponte e bulbo), denominados núcleos noradrenérgicos, e cada um deles possui papel modulador específico (SZABADI, 2013). A atividade dos neurônios C1 na medula ventrolateral rostral (RVLM), por exemplo, ativa o tônus simpático e estimula o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal em determinadas circunstâncias tais como dor, hipóxia e hipotensão (ABBOTT et al., 2012). A ativação desses neurônios está relacionada com o aumento da pressão arterial e

eles geralmente apresentam-se hiperativos na hipertensão neurogênica (REIS et al., 1984; TESCHEMACHER et al., 2008; ABBOTT et al., 2012). Um estudo de microamperometria em neurônios C1, visualizados por meio de vetores virais específicos, revelou que as varicosidades presentes nesses neurônios noradrenérgicos liberam maior quantidade de transmissor em ratos SHR quando comparados com ratos normotensos, pressupondo que nesses animais, uma vez no espaço extracelular, o impacto dessas catecolaminas sob seus alvos é maior, assim como o fluxo simpático (TESCHEMACHER et al., 2008).

O grupo A2 localizado no núcleo do trato solitário (NTS), por sua vez, possui função inibitória simpática e atua como um mecanismo homeostático anti-hipertensivo (REIS et al., 1977; DUALE et al., 2007). A fim de avaliar o sistema cardiovascular frente ao bloqueio da atividade dos neurônios A2, Duale et al. (2007) utilizaram vetores virais para expressar canais de potássio nesses neurônios, promovendo assim a hiperpolarização de suas membranas e seu consequente silenciamento elétrico. Como resultado, os autores observaram aumento na instabilidade da pressão arterial, sem que houvesse alterações no reflexo barorreceptor cardíaco e na frequência cardíaca, o que indica que os neurônios A2 são constituintes essenciais de um circuito central de regulação crônica da pressão arterial. Uma importante evidência desse papel do NTS no controle da homeostase corpórea se revela no fato de que seus neurônios enviam impulsos noradrenérgicos excitatórios ao núcleo supra-óptico (SON) do hipotálamo (ONAKA et al., 1995), o que promove a ativação de $\alpha 1$ -adrenoceptores nesse local que, por sua vez, induzem a liberação de oxitocina AVP (RANDLE et al., 1996). A AVP, em especial, é sintetizada pelos neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular (PVN) e SON do hipotálamo (LANDGRAF et al., 1990; NIELSEN et al., 1993) e é secretada pela pituitária posterior em resposta ao aumento da concentração de sódio ou diminuição da pressão sanguínea (GRINDSTAFF & CUNNINGHAM, 2001).

Já os efeitos cardiovasculares do maior e mais denso aglomerado de neurônios noradrenérgicos, o grupo A6 no locus coeruleus (LC), são complexos e ainda não bem descritos, provavelmente devido aos múltiplos papéis do LC em

integrar a informação sensorial e coordenar o estado de atenção, vigilância e motivação (ASTON-JONES & COHEN, 2005; CARTER et al., 2010; O'DONNELL et al., 2012; TANG et al., 2014).

A NA liberada a partir das varicosidades dos axônios noradrenérgicos pode atuar como transmissor sináptico ao interagir com os neurônios adjacentes. Além disso, essa substância pode também ser liberada no espaço intersticial e difundir-se no fluido extracelular ou cérebro-espinhal, como consequência de diferenças entre gradientes de energia, até finalmente atingir as células-alvo, as quais podem variar desde neurônios noradrenérgicos até células da glia, como os astrócitos (FUXE et al., 2010). Os neurônios do LC, por exemplo, cujos axônios são altamente ramificados e com grande número de varicosidades que liberam alta quantidade de transmissor, possuem menos de 10% de suas projeções para o córtex cerebral formando sinapses convencionais entre neurônios (COHEN et al., 1997).

- **1.3.2 Adrenoceptores**

As ações da NA e da ADR são mediadas por adrenoceptores, farmacologicamente divididos em três principais grupos: $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - e β -adrenoceptores (RUFFOLO, 1991). No sistema nervoso central, esses receptores são encontrados em neurônios e células da glia e podem pertencer a qualquer uma das classes citadas acima (SZABADI & BRADSHAW, 1991).

Os adrenoceptores pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G (GPCR) (WOLFF et al., 1987). Diante da ligação com o agonista e sua consequente ativação, eles sofrem alteração em sua conformação. Como resultado, o domínio citoplasmático do receptor adquire alta afinidade pelo trímero $\alpha\beta\gamma$, e essa ligação acarreta na dissociação da guanosina difosfato (GDP) da subunidade $G\alpha$, que é substituída pela guanosina trifosfato (GTP) (RANG & DALE, 2012). Como resultado, ocorre a dissociação do trímero e liberação das subunidades $G\alpha$ -GTP e $G\beta\gamma$, que podem associar-se com diversas enzimas e

canais iônicos, ativando ou inibindo diferentes cascatas de sinalização intracelular (RANG & DALE, 2012).

A subunidade α da proteína G é classificada em 4 principais tipos, os quais possuem seletividade diferente aos receptores e efetores, sendo eles: Gas, Gai, Gao e G α q (RANG & DALE, 2012). Dessa forma, cada adrenoceptor é capaz de ligar-se e ativar apenas certos tipos de proteínas G, o que garante a especificidade da resposta produzida pela ligação das catecolaminas com seu receptor.

○ 1.3.2.1 α 1-adrenoceptores

Os efeitos intracelulares advindos da ligação da NA ou da ADR à α 1-adrenoceptores centrais são mediados pela ligação desses receptores à subunidade G α q (SUMMERS & MCMARTIN, 1993). Essa subunidade ativa a enzima fosfolipase C (PLC), que quebra um fosfolípido de membrana, o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂), em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) (RANG & DALE, 2012). O DAG ativa a proteína quinase C (PKC), que catalisa a reação de fosforilação de uma variedade de proteínas intracelulares, enquanto que o IP3 promove a liberação de cálcio (Ca⁺²) de compartimentos intracelulares, o que aumenta a concentração citosólica desse íon (RANG & DALE, 2012).

A relação entre a ativação de α 1-adrenoceptores centrais e a modulação da função renal e cardiovascular já tem sido evidenciada por muitos trabalhos científicos. Uma série de estudos mostrou que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de agonista α 1-adrenoceptor promove liberação do peptídeo AVP, aumenta a atividade da renina plasmática e eleva a pressão arterial (GANONG et al. 1982; BROOKS et al. 1986; LEFFLER et al. 1987). No entanto, esses resultados não são constatados em todos os trabalhos. Ota e colaboradores (1990), por exemplo, não observaram os efeitos da microinjeção i.c.v. de agonista α 1-adrenoceptor sobre a liberação de tais hormônios, bem como sobre o balanço hidroeletrólítico renal e a pressão arterial em cachorros anestesiados.

Wainford (2008) demonstrou que as vias de sinalização da subunidade G α q, acionadas após ativação de α 1-adrenoceptores centrais, possuem papel importante na modulação da liberação da AVP e do fluxo urinário. Utilizando linhagens de ratos resistentes e sensíveis ao sal (Dahl-SR e Dahl-SS, respectivamente), Wainford e Kapusta (2010) notaram que a constância nos níveis plasmáticos de AVP e no balanço hidroeletrolítico renal em ratos Dahl-SR, mesmo após o consumo de uma dieta rica em sal, se dava devido à diminuição seletiva nos níveis de expressão da proteína G α q no PVN. Segundo os autores do estudo, isso seria um mecanismo contrarregulador para prevenir o aumento na secreção de AVP e o acúmulo excessivo de água (WAINFORD & KAPUSTA, 2010). Em contraste, a elevação nos níveis plasmáticos de AVP e a retenção de água, observados em ratos Dahl-SS após consumo de dieta rica em sal, estão associados com a ausência de supressão das vias da proteína G α q no PVN (WAINFORD & KAPUSTA, 2010).

○ 1.3.2.2 α 2-adrenoceptores

As vias de sinalização envolvidas na resposta intracelular resultante da interação do ligante à α 2-adrenoceptores centrais são, em sua maioria, advindas da ativação da subunidade G α i (REMAURY et al., 1993; EASON & LIGGETT, 1995). Essa subunidade inibe a ação da enzima adenil ciclase, diminuindo assim a formação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), um nucleotídeo responsável pela ativação de proteínas quinases que, por sua vez, regulam a função de diversas outras proteínas celulares (RANG & DALE, 2012). Dessa forma, α 2-adrenoceptores centrais fazem parte de um mecanismo inibitório simpático central, cuja ativação culmina em resposta depressora cardiovascular e renal (RANG & DALE, 2012).

Os α 2-adrenoceptores centrais podem também ter seus efeitos fisiológicos mediados pela ativação de vias de sinalização da subunidade G α s (EASON & LIGGETT, 1995). Ao contrário da subunidade G α i, a ativação da G α s estimula a ação da enzima adenil ciclase, o que aumenta a formação de AMPc (RANG &

DALE, 2012). Esse acoplamento de $\alpha 2$ -adrenoceptores à subunidade $G_{\alpha s}$ pode ocorrer em decorrência de altas concentrações de agonista ou após a inibição da subunidade $G_{\alpha i}$ (EASON & LIGGETT, 1995; WADE et al., 1999).

O dímero $\beta\gamma$, liberado após ativação da proteína G_{α} , pode também atuar como regulador da função neuronal por modificar a atividade de canais iônicos, inibindo os canais de Ca^{+2} e ativando os canais de K^{+} (HEIN, 2006). Além disso, $\alpha 2$ -adrenoceptores podem também se ligar diretamente a outros efetores além da proteína G, incluindo canais de Ca^{+2} , PLC e fosfolipase D (PLD) (HEIN, 2006).

Esse receptor é altamente expresso em regiões envolvidas no controle central da função cardiovascular e da homeostase de fluidos e eletrólitos (RUFFOLO et al., 1991). Diversos trabalhos mostram que a sua estimulação provoca uma série de efeitos como natriurese, queda na liberação tanto de AVP quanto do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de aldosterona plasmática, bem como diminuição na atividade dos nervos simpáticos renais, na frequência cardíaca e na pressão arterial (REID et al., 1975; GANONG et al., 1982; KIMURA et al., 1984; BROOKS et al., 1986; KOEPKE & DIBONA, 1986; OTA et al., 1990).

A fim de avaliar as respostas cardiovascular e renal decorrentes da ativação de determinadas subunidades G_{α} acopladas à $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais, Wainford e Kapusta (2011) realizaram um estudo no qual utilizaram oligodeoxinucleotídeo (ODN) para promover diminuição seletiva na expressão das subunidades $G_{\alpha i}$, $G_{\alpha s}$ ou $G_{\alpha o}$ em ratos conscientes. Dessa forma, foi possível avaliar o efeito fisiológico resultante da administração i.c.v. de um agonista $\alpha 2$ -adrenoceptor sob tais condições. Como resultado, os autores constataram que as vias de sinalização da subunidade $G_{\alpha i}$, desencadeadas pela ativação de $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais, são essenciais na regulação da pressão arterial e da excreção urinária de sódio, uma vez que a resposta hipotensora e natriurética resultante do estímulo $\alpha 2$ -adrenérgico foi abolida em animais pré-tratados com $G_{\alpha i}$ -ODN (WAINFORD & KAPUSTA, 2011). Além disso, a diminuição da expressão da subunidade $G_{\alpha s}$ converteu a resposta hipotensora decorrente da ativação de $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais em resposta hipertensiva imediata e profunda (WAINFORD & KAPUSTA, 2011). Portanto, as respostas fisiológicas

produzidas pela ativação de $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais são influenciadas pela disponibilidade e/ou níveis de expressão proteica cerebral de subunidades específicas da proteína $G\alpha$ (WAINFORD & KAPUSTA, 2011).

▪ **1.3.2.2.1 Adrenoceptores pré-sinápticos**

Os adrenoceptores podem também estar presentes em toda a extensão de um neurônio noradrenérgico do sistema nervoso central. Esses receptores pré-sinápticos são exclusivamente $\alpha 2$ -adrenoceptores, cuja principal função é modular a liberação de catecolaminas.

$\alpha 2$ -adrenoceptores pré-sinápticos podem estar localizados em diferentes porções do neurônio (Figura 1). Aqueles de localização somato-dendrítica são capazes de atenuar ou inibir a frequência dos impulsos nervosos ao longo do axônio (HUANG et al., 2012), enquanto que os $\alpha 2$ -adrenoceptores localizados na membrana das terminações nervosas, quando ativados, inibem ou diminuem a liberação de neurotransmissores simpáticos (STARKE, 2001). Dessa maneira, a NA liberada na fenda sináptica pode suprimir sua posterior liberação. Essa diminuição da quantidade de NA disponível reduz, conseqüentemente, a ativação de adrenoceptores pós-sinápticos.

Esse efeito é um mecanismo de realimentação negativa importante e muitos trabalhos relacionam o desenvolvimento e estabelecimento de hipertensão arterial com alterações na atividade neuronal ou no padrão de liberação de neurotransmissores mediados por $\alpha 2$ -adrenoceptores pré-sinápticos. Tsuda e Masuyama (1991), por exemplo, notaram que a atenuação da inibição da liberação de neurotransmissores mediada por $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais e periféricos pode levar ao estabelecimento do estado hipertensivo. Além disso, a restrição da liberação de NA mediada por $\alpha 2$ -adrenoceptores no córtex cerebral é atenuada em SHR quando comparado com ratos controle (Russell et al., 2000).

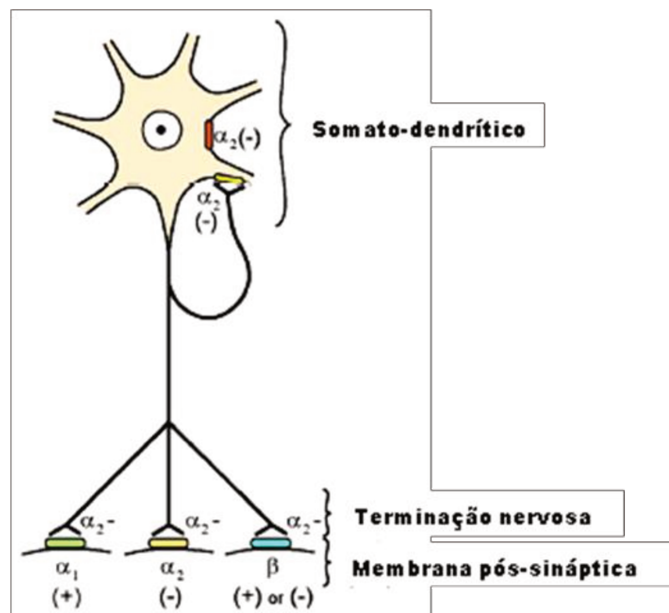


Figura 1: Esquema representativo da localização de receptores farmacologicamente sensíveis (adaptado de Szabadi, 2013).

Diante do que foi apresentado, levantamos a hipótese de que as alterações na função renal, apresentadas pela prole adulta submetida à restrição proteica durante o desenvolvimento fetal, se devam, pelo menos em parte, a possíveis disfunções no sistema noradrenérgico central desses animais, especialmente no que diz respeito à sinalização de α -adrenoceptores centrais.

2. Objetivos

2.1 Objetivos gerais:

Esse estudo experimental foi desenvolvido a fim de avaliar as implicações de possíveis alterações na transmissão noradrenérgica central mediada por α -adrenoceptores sobre a modulação do balanço hidroeletrolítico renal em ratos machos adultos submetidos à restrição proteica durante o período fetal.

2.2 Objetivos específicos:

Avaliar, na prole de machos adultos cujas mães foram submetidas à restrição proteica gestacional, comparativamente aos controles:

- ✚ a pressão arterial sistólica;
- ✚ o balanço hidroeletrolítico renal frente ao estímulo simpatomimético por diferentes doses de epinefrina;
- ✚ o papel de α -adrenoceptores centrais na modulação da função renal.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Hidrossalino do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental – FCM/UNICAMP de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, sendo a pesquisa submetida e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP, protocolo nº 2766-1. Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* var, *albinus*, Rodentia, Mammalia) com 3 semanas de vida, recém desmamados, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB - UNICAMP, Campinas, SP. Os animais foram mantidos em ambiente fechado com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, iluminação artificial com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e oferta de água e ração padrão para roedores *ad libitum*.

Ao completarem 11 semanas de vida, iniciou-se o processo de acasalamento, no qual 2 a 3 fêmeas foram colocadas em gaiolas que continham 1 macho por aproximadamente 15 horas em ambiente escuro. Para averiguação de prenhez após esse período, foi realizado esfregaço vaginal. Quando detectada a presença de espermatozoides, as ratas foram consideradas prenhes e passaram a receber dieta conforme os respectivos grupos, sendo eles: NP (normal protein), que recebeu dieta normoproteica contendo 17% de caseína *ad libitum* durante toda a gestação e LP (low protein), alimentadas com dieta hipoproteica com 6% de caseína *ad libitum* durante toda a gestação. As dietas normoproteica e hipoproteica foram confeccionadas pela Pragsoluções Biociências (Tabela 1). O peso das ratas prenhes, bem como o consumo de dieta foram mensurados durante todo o período gestacional.

Tabela 1. Composição, em gramas, das dietas normoproteica e hipoproteica correspondentes a 1kg de ração.

Ingredientes	Normoproteica (17%)	Hipoproteica (6%)
Amido de milho	410,10	484,80
Caseína	188,90	66,70
Amido dextrinizado	130,50	159,00
Sacarose	100,00	121,00
Óleo de soja	70,00	70,00
Celulose microcristalina	50,00	50,00
Mix mineral AIN 93	35,00	35,00
Mix vit AIN 93	10,00	10,00
L cistina	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5
BHT	0,014	0,014

Após o nascimento, as dietas foram retiradas e trocadas pela dieta comercial inicial, normossódica e normoproteica, a fim de promover a incompatibilidade entre os ambientes pré e pós-natal. A ninhada foi ajustada para um total de 8 filhotes a fim de garantir que todos tivessem a mesma oferta de alimento. Os animais excedentes foram sacrificados por decapitação no primeiro dia de vida. Ao completarem 28 dias de vida, realizou-se o desmame. Apenas os machos da prole foram utilizados para os estudos subsequentes, sendo as fêmeas da prole, bem como os machos e as fêmeas utilizados para o acasalamento, sacrificados posteriormente em câmara de CO₂.

Análise das Variáveis:

Foram analisadas as seguintes variáveis na prole de machos: 1) peso ao nascer; 2) evolução semanal da massa corporal; 3) pressão arterial sistólica na 8^a, 10^a e 12^a semanas de vida; 4) função renal frente a doses crescentes de epinefrina e de bloqueadores adrenérgicos.

3.2 Acompanhamento da massa corporal

O peso ao nascer da prole foi mesurado, assim como foi acompanhada semanalmente a evolução da massa corpórea dos filhotes machos até estes completarem 16 semanas de vida. As aferições foram realizadas em balança digital semi-analítica (AL500 Denver Instruments - USA) no período matutino.

3.3 Aferição da pressão arterial sistólica

Ao completarem 8 semanas de vida, os ratos machos foram submetidos à aferição da pressão arterial sistólica caudal pelo método de plestimografia de cauda (Programmed Electro-Sphygmomanometer Pe-300, Narco Bio-Systems USA), descrita previamente por Lovemberg (1987). Para tanto, cada animal foi colocado durante 5 a 8 minutos em uma caixa suficientemente aquecida para promover vasodilatação da artéria caudal. Em seguida, o animal foi introduzido em um contentor e, em sua cauda, colocou-se um esfigmomanômetro adaptado para ratos que, por sua vez, é conectado a um transdutor computadorizado IITC MODEL 31. Ao inflar o esfigmomanômetro, ocluía-se o fluxo sanguíneo na artéria caudal que, ao ser desobstruído pela liberação de ar através de uma válvula, possibilitava o registro da pressão arterial sistólica. Para cada animal, fez-se 5 aferições, sendo a média destas considerada como o valor da pressão arterial de cada animal. A Figura 2 ilustra o processo de aferição da pressão arterial.

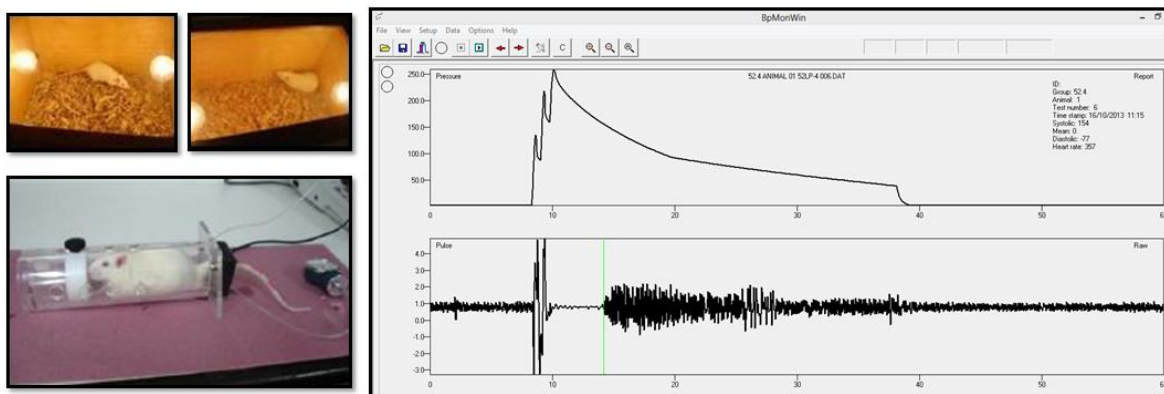


Figura 2: Aferição da pressão arterial sistólica por plestimografia caudal.

3.4 Estereotaxia

A cirurgia estereotáxica foi feita em todos os machos da prole NP e LP com 14 semanas de vida. A anestesia foi realizada pela via intraperitoneal por meio da administração de uma associação entre os fármacos cloridrato de cetamina (Agener, Brasil) na dose de 75 mg/Kg, cloridrato de xilasina (Calier, Brasil) na dose de 10 mg/Kg e sulfato de atropina na dose de 0,1ml/100mg.

Após tricotomia do campo cirúrgico, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (Stoelting Co, Modelo 234, USA), com o crânio fixado pelo rochedo temporal e incisivos superiores. Em seguida, foi realizada antissepsia do local cirúrgico com iodo a 1% em solução alcoólica e, subsequentemente, realizou-se uma incisão na linha média do escalpo para obtenção da posição da sutura sagital. O tecido subcutâneo foi removido, bem como o periósteo, por raspagem com auxílio de uma pinça e de algodão. Já com a superfície craniana exposta e ajustada em posição horizontal, entre bregma e lambda (barra dos incisivos ajustada a 3 mm abaixo da linha interaural), dois orifícios foram feitos nos ossos parietais com o uso de uma broca elétrica, com o propósito de fixação de parafusos destinados a ancorar a prótese ao crânio do animal. Tomando-se o bregma como referência e seguindo as coordenadas do Atlas de Paxinos e Watson (2007), foi feito outro orifício para implante de cânulas-guias, sendo estas de 0,7 mm de diâmetro e 15 mm de comprimento, confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas. As cânulas foram direcionadas ao ventrículo cerebral lateral esquerdo, cujas coordenadas são: anteroposterior = 0,2 mm; médio-lateral = 1,5 mm; dorsoventral: -4,5 mm. Posteriormente, o crânio foi revestido com acrílico dental (JET, Brasil) para a fixação das cânulas-guia e fios de aço inoxidável foram introduzidos nestas cânulas para evitar entupimentos. Ao término da cirurgia, cada animal recebeu, por via intramuscular, uma injeção de 0,3 mL de Pentabiótico (Fort Dodge, Brasil). Os animais, após serem retirados do estereotáxico, foram colocados em gaiolas individuais por um período de sete dias para recuperação pós-cirúrgica. A Figura 3 demonstra o animal posicionado em um aparelho estereotáxico antes do início do processo cirúrgico.



Figura 3: Aparato estereotáxico e posicionamento do animal para implantação da cânula-guia.

3.5 Microinjeções

Uma agulha dental conectada a um tubo de polietileno (PE-20; Becton-Dickinson, EUA) e a uma microseringa Hamilton graduada de 10 μL foram utilizadas para as injeções das drogas no ventrículo cerebral lateral esquerdo. Para monitoramento da microinjeção, observou-se o deslocamento de uma bolha de ar no tubo de polietileno. O volume final total de cada microinjeção foi de 3 μL . Após o término da infusão, a agulha foi mantida por mais alguns instantes para evitar refluxo da droga pela cânula-guia.

3.6 Estudo da Função Renal

Nas duas semanas subsequentes à cirurgia estereotáxica, os animais foram submetidos ao estudo da função renal através do clearance de creatinina e lítio. Cada animal foi submetido duas vezes a esse procedimento, com 15 e 16 semanas de vida, obedecendo 1 semana de intervalo entre eles. As drogas injetadas foram diferentes nesses dois períodos e escolhidas aleatoriamente.

Quatorze horas antes do início dos experimentos, os animais receberam uma solução de cloreto de lítio 0,06 mEq/100 g de peso corporal, administrada por gavagem. A ração foi então retirada de forma com que os animais ficassem *overnight* em jejum para ração sólida, sendo a água ingerida *ad libitum*. Passado esse tempo, os animais receberam duas sobrecargas hídricas por gavagem de 5% do peso corporal, com intervalo de 60 minutos entre elas, a fim de se obter um fluxo urinário regular e estável. Ao final da última sobrecarga hídrica, os animais foram submetidos à primeira microinjeção i.c.v. de 3 µl do fármaco. A partir deste momento, cada rato foi colocado em gaiolas metabólicas individuais, sem restrição de movimentos, para a coleta de urina, a qual foi feita através de funis, adequadamente adaptados sob as gaiolas metabólicas, que direcionavam o fluxo aos tubos cônicos graduados em 0,2 mL. Após 30 minutos, a urina coletada foi devidamente armazenada e nomeada como -30 min. Os animais foram então sujeitos à segunda microinjeção i.c.v. de 3 µl da droga. Em seguida, a urina foi coletada de 30 em 30 minutos, identificando-se cada uma delas, até se completarem 120 minutos de coleta. No final, somaram-se 5 volumes de urina, sendo estes determinados como: 1) -30 min; 2) 30 min; 3) 60 min; 4) 90 min e 5) 120 min.

Posteriormente, os animais foram anestesiados com 75mg/kg de cetamina e 10mg/kg de xilasina e submetidos à coleta de sangue obtido através dos vasos da cauda. Foram retirados 1,5 mL de sangue em micro-tubos contendo 20µL de heparina. As amostras foram então centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos. Finalmente, o plasma e a urina foram armazenados sob refrigeração (-20°C) para posteriores dosagens. A Figura 4 fornece uma ilustração esquemática de todas as etapas do estudo da função renal.

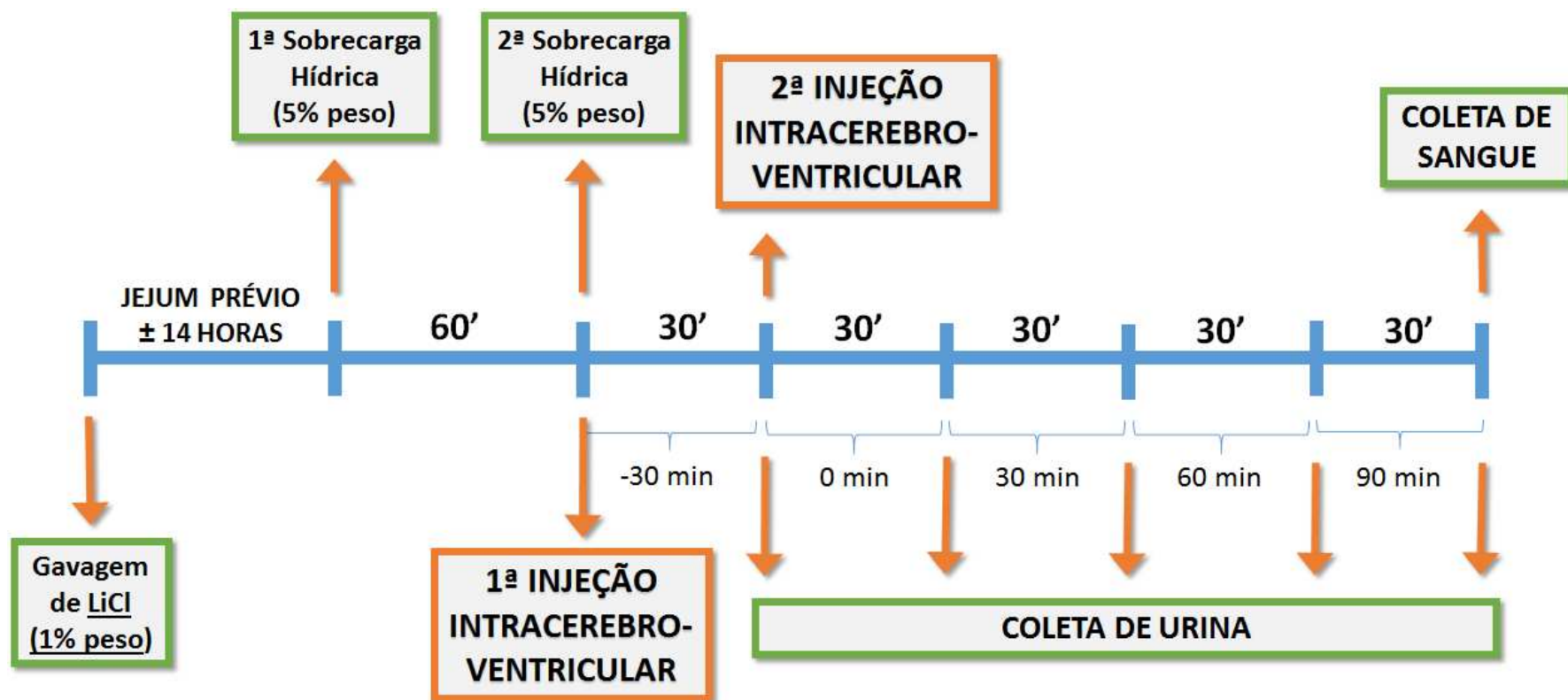


Figura 4: Ilustração esquemática das etapas de estudo da função renal.

3.7 Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas: Cloridrato de Epinefrina (Sigma), Cloridrato de Prazosin (Sigma) e Cloridrato de Yohimbine (Sigma). Para dissolução do Cloridrato de Epinefrina, foi usado solução salina (NaCl) 0,9%, enquanto que o Cloridrato de Prazosin e o Cloridrato de Yohimbine foram inicialmente dissolvidos em propilenoglicol, seguido pela adição de solução salina 0,9% morna, na proporção de 3 ml de propilenoglicol para 2 ml de salina 0,9% (CORRÊA & PERES-POLON, 1995). Esse solvente será denominado pela abreviatura *PG*.

3.8 Grupos de estudo

- **3.8.1** *Resposta renal à microinjeção de diferentes doses de Epinefrina*

Para esse estudo, foram utilizadas diferentes doses de epinefrina (Ep), sendo estas de 100 nmol (Ep100), 300 nmol (Ep300) e 1000 nmol (Ep1000), bem como solução salina 0,9% (Sal). Para obtenção de uma amostra de urina basal, ainda sem efeito dos fármacos, foi microinjetado primeiramente solução salina 0,9%. Após 30 minutos, ocorreu a segunda microinjeção. Os subgrupos advindos da divisão da prole NP e LP de acordo com as microinjeções realizadas foram: 1) Sal + Sal; 2) Sal + Ep100; 3) Sal + Ep300; 4) Sal + Ep1000.

- **3.8.2** *Adrenoceptores envolvidos na função renal:*

Nessa abordagem, foi utilizado Prazosin (PRA), um antagonista seletivo α_1 -adrenoceptor, na dose de 4 nmol e Yohimbine (YOH), um antagonista seletivo α_2 -adrenoceptor, na dose de 50 nmol. A Ep300 foi microinjetada trinta minutos após aplicação desses bloqueadores.

Para certificar que o solvente PG não interferiu nos resultados e visando avaliar o efeito dessas drogas sobre a função renal sem posterior estímulo adrenérgico com Ep300, foi também realizado a microinjeção i.c.v. primeiramente do solvente PG, seguido da administração de PRA ou YOH. Dessa forma, os subgrupos advindos da divisão da prole NP e LP de acordo com as microinjeções realizadas nesse estudo foram: 1) Pra + Ep300; 2) Yoh + Ep300; 3) PG + Pra; 4) PG + Yoh.

3.9 Determinação das Concentrações de Sódio, Lítio, Potássio e Creatinina Plasmáticas e Urinárias

A creatinina plasmática e urinária foram determinadas pelo método calorimétrico por espectrofotometria utilizando-se um espectrofotômetro Micronal (Modelo 383, São Paulo). As concentrações plasmáticas de sódio, lítio e potássio foram determinadas por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo, Brasil). Essa metodologia baseia-se no fato de que os metais alcalinos, quando elevados a uma temperatura alta, absorvem energia da fonte de calor e passam ao estado de excitação em sua forma atômica. Quando estes átomos resfriam, voltam ao estado normal não excitado e reemitem sua energia absorvida por radiação com comprimentos de onda específicos, alguns dos quais ocupam a região visível da luz (Na^+ : 589 nm, Li^+ : 670 nm, K^+ : 768 nm). Um metal alcalino aspirado através de uma chama de baixa temperatura, na forma nebulizada, emite, depois de excitado pelo calor da chama, uma onda de frequência discreta, a qual pode ser isolada por um filtro ótico. Uma vez que a emissão é proporcional ao número de átomos excitados, a concentração do íon na amostra pode ser determinada.

3.10 Fórmulas para Cálculo do Clearance e da Fração de Excreção

▪ 3.10.1 Clearance de Creatinina (CCr):

Representa a depuração plasmática da creatinina por unidade de tempo pela totalidade dos glomérulos renais funcionantes, calculada pela fórmula ($U \times V^1 / P$), sendo U a concentração urinária de creatinina, V^1 o fluxo urinário por minuto e P a concentração plasmática de creatinina. Os resultados foram expressos em $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ peso corporal.

▪ 3.10.2 Fração de Excreção de Sódio ($FENa$):

Representa a fração de carga filtrada de sódio e excretada pela urina num determinado período de tempo, calculada pela fórmula ($C_{Na}/C_{Cr} \times 100$), sendo C_{Na} o clearance de sódio e o C_{Cr} , o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

▪ 3.10.3 Fração de excreção de Potássio (FEK^+):

Representa a fração de carga filtrada de potássio e excretada pela urina num determinado período de tempo, calculada pela fórmula ($C_K/C_{Cr} \times 100$), sendo C_K o clearance de potássio e o C_{Cr} , o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

▪ 3.10.4 Fração de excreção proximal de sódio ($FEPNa$):

Representa a fração de carga filtrada de sódio e excretada ao longo do túbulo proximal do nefro, calculada pela fórmula ($C_{Li}/C_{Cr} \times 100$), sendo C_{Li} o clearance de lítio e o C_{Cr} , o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

▪ **3.10.5 Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa):**

Representa a fração de carga filtrada de sódio e excretada ao longo dos segmentos distais do túbulo proximal do nefro, calculada pela fórmula ($C_{Na}/C_{Li} \times 100$), sendo C_{Na} o clearance de sódio e o C_{Li} , o clearance de lítio. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

3.11 Averiguação do local de injeção

Após 2 a 3 dias da realização do segundo clearance de lítio e creatinina, os animais foram anestesiados com 75mg/kg de cetamina e 10mg/kg de xilasina e, em seguida, receberam microinjeção i.c.v. de 5µl de Azul de Evans. Os cérebros foram então removidos por decapitação e a presença do Azul de Evans no ventrículo lateral foi avaliada (Figura 5). As amostras provenientes de animais que não tiveram as cânulas-guia inseridas no local correto foram descartadas.

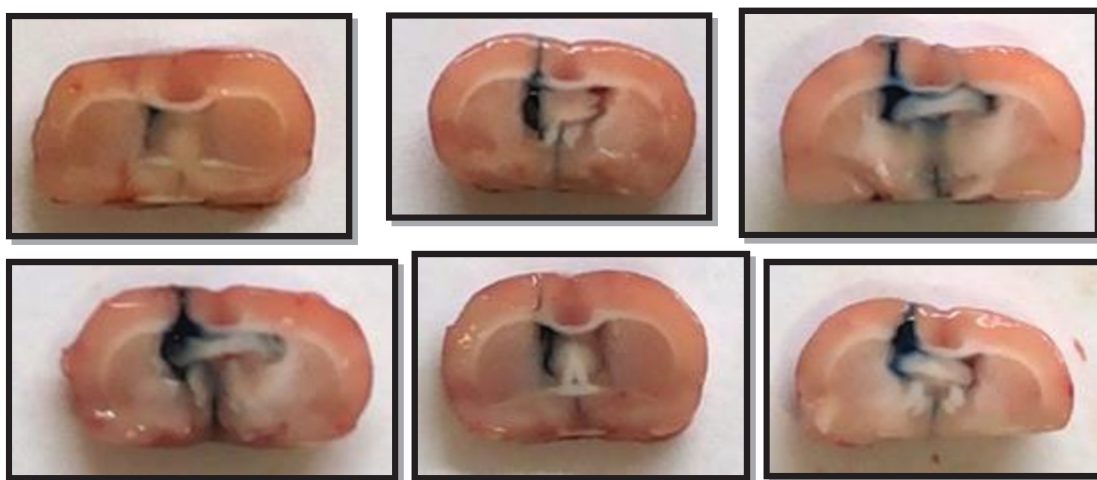


Figura 5: Visualização do corante Azul de Evans a fim de averiguar a correta canulação do ventrículo cerebral lateral.

3.12 Análise Estatística dos Resultados

A análise estatística empregada foi o Teste-t Student para testes paramétricos e Mann-Whitney para testes não paramétricos. Para duas ou mais variáveis utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com *Post hoc* Bonferroni. Para elaboração da curva dose–resposta foi realizado análise de regressão não-linear. Os resultados foram expressos como média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$). Os softwares utilizados em todos os testes estatísticos foram GraphPad InStat version 3.05, GraphPad Software, San Diego Califórnia USA e GraphPad Prism 3, Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc.

4. Resultados

4.1 Caracterização Antropométrica e Pressórica

O consumo diário das duas diferentes dietas ofertadas às ratas prenhes foi mensurado a fim de certificar que ambas seriam ingeridas na mesma quantidade (Figura 6). A inexistência de diferença significativa entre elas indica que não ocorreu compensação proteica pelas genitoras LP, o que assegura que o modelo experimental adotado nesse trabalho foi, de fato, a programação fetal por restrição proteica gestacional.

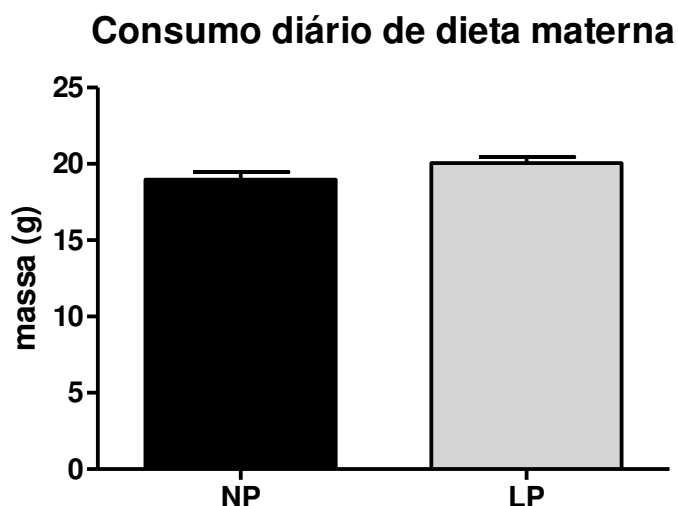


Figura 6: Consumo diário de dieta normoproteica, NP (n=36), e hipoproteica, LP (n=51), por ratas prenhes. Valores representam média $\pm$ EPM. Teste *t* de Student.

Os estudos realizados na ninhada de machos provenientes das genitoras NP e LP mostraram que o consumo de dieta com baixas quantidades proteicas durante todo o período gestacional promove redução significativa no peso ao nascer da prole (Figura 7). Porém, quando avaliado a correlação entre o número total de filhotes por ninhada e o peso ao nascer dos machos da prole, ela é significativa apenas na prole LP (Figura 8).

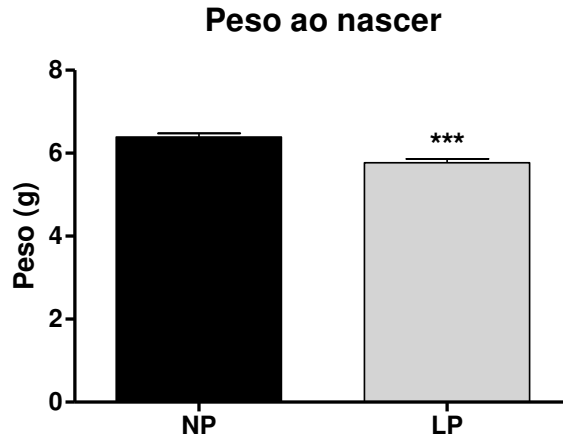


Figura 7: Peso ao nascer de machos da prole NP (n=39) e LP (n=52). Valores representam média ± EPM. Teste *t* de Student, *** $p < 0,0001$.

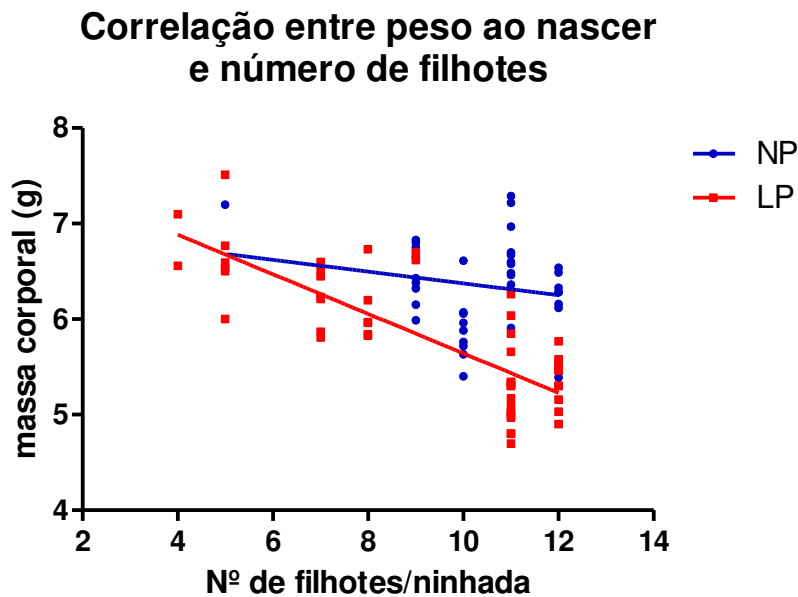


Figura 8: Correlação entre o peso ao nascer de machos da prole e o número total de filhotes por ninhada nos grupos NP (Pearson $r = -0,185$; $p = 0,13$; $n = 38$) e LP (Pearson $r = -0,800$; $p < 0,0001$; $n = 52$). As linhas representam a regressão linear dos dados (NP, $r^2 = 0,034$; LP, $r^2 = 0,64$).

Quando avaliada a evolução da massa corpórea da prole ao longo das semanas de vida (Figura 9), é possível notar que não há mais diferenças significativas entre NP e LP já na primeira semana, persistindo esse quadro até a sexta semana de vida. Na sétima e décima semanas, no entanto, a prole LP volta a apresentar massa corpórea significativamente menor do que aquela apresentada pelo grupo controle e, a partir da décima segunda semana, esse quadro se repete e perpetua-se até o final das mensurações, com 16 semanas de vida.

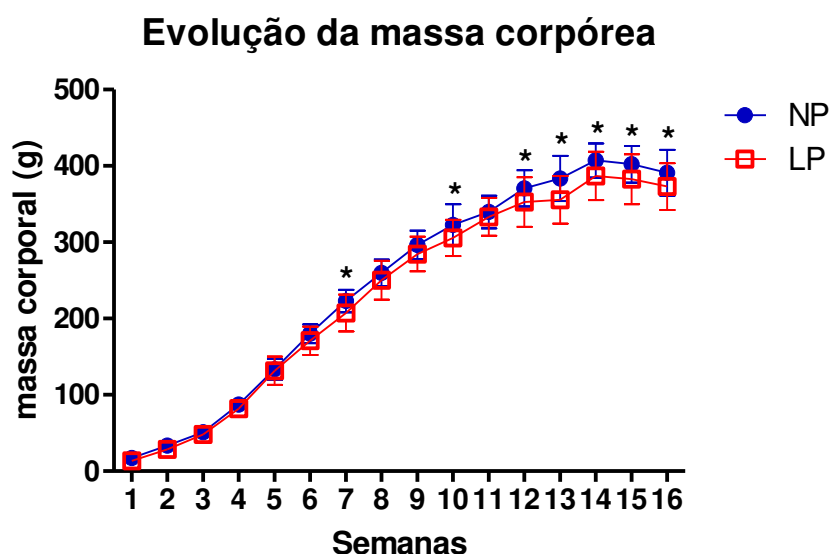


Figura 9: Evolução da massa corpórea da prole NP (1 n=30; 2 n=41; 3 n=38; 4 n=49; 5 n=56; 6 n=54; 7 n=46; 8 n=47; 9 n=47; 10 n=56; 11 n=33; 12 n=37; 13 n=31; 14 n=44; 15 n=49; n=48) e LP (1 n=32; 2 n=53; 3 n=45; 4 n=48; 5 n=71; 6 n=62; 7 n=48; 8 n=61; 9 n=66; 10 n=50; 11 n=35; 12 n=51; 13 n=32; 14 n=50; 15 n=65; n=41) ao longo das semanas de vida. Valores representam média $\pm$ DPM. ANOVA *pos thoc* Bonferroni, * $p < 0,01$.

Em associação com o baixo peso ao nascer, a restrição de proteínas na dieta materna também está diretamente relacionada com o desenvolvimento de hipertensão arterial na prole adulta (MESQUITA *et al.*, 2010). A Figura 10 mostra a evolução da pressão arterial caudal sistólica de animais NP e LP durante a oitava, décima e décima segunda semanas de vida.

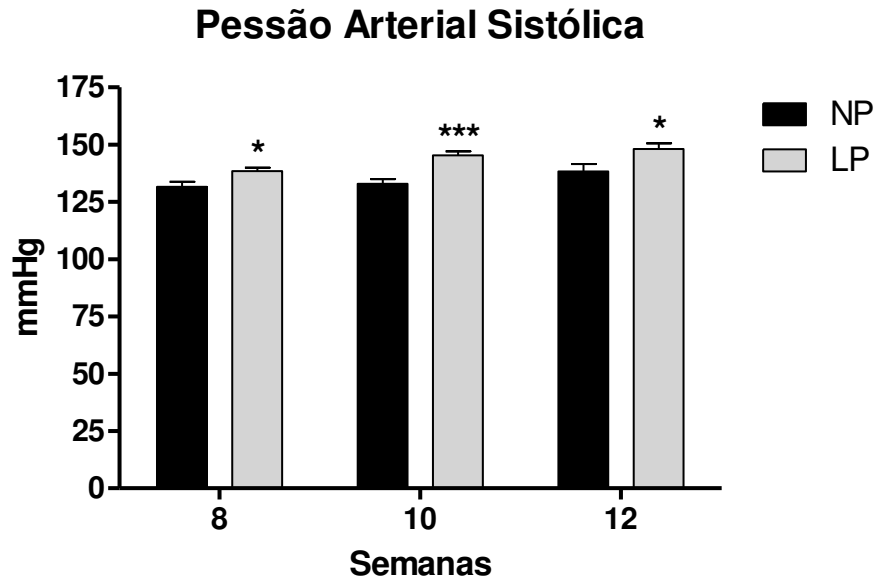


Figura 10: Efeito da nutrição materna sobre a pressão arterial caudal sistólica na 8^a, 10^a e 12^a semanas de vida da prole NP (8: n=32; 10: n=24; 12: n=17) e LP (8: n=31; 10: n=36; 12: n=24). Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.2 Testes Funcionais Renais

4.2.1 Estímulo adrenérgico central

Diferentes doses de epinefrina foram microinjetadas i.c.v. a fim de avaliar o efeito do estímulo adrenérgico central sobre a função renal em animais submetidos à restrição proteica gestacional. A figura 11 mostra o efeito central desse fármaco sobre o volume urinário. Observando-se somente os animais NP, a epinefrina a 300 nmol foi capaz de promover diurese significativa após 120 minutos de estudo quando comparado com os resultados provenientes da microinjeção i.c.v. de solução salina isotônica nesse mesmo grupo experimental. A diurese também foi observada nos animais LP, a qual foi desencadeada por 100 nmol de epinefrina aos 90 minutos de teste. O aumento do volume urinário em

todos os grupos ao longo do tempo é consequência da sobrecarga hídrica ao qual o animal foi submetido durante o clearance de lítio e creatinina.

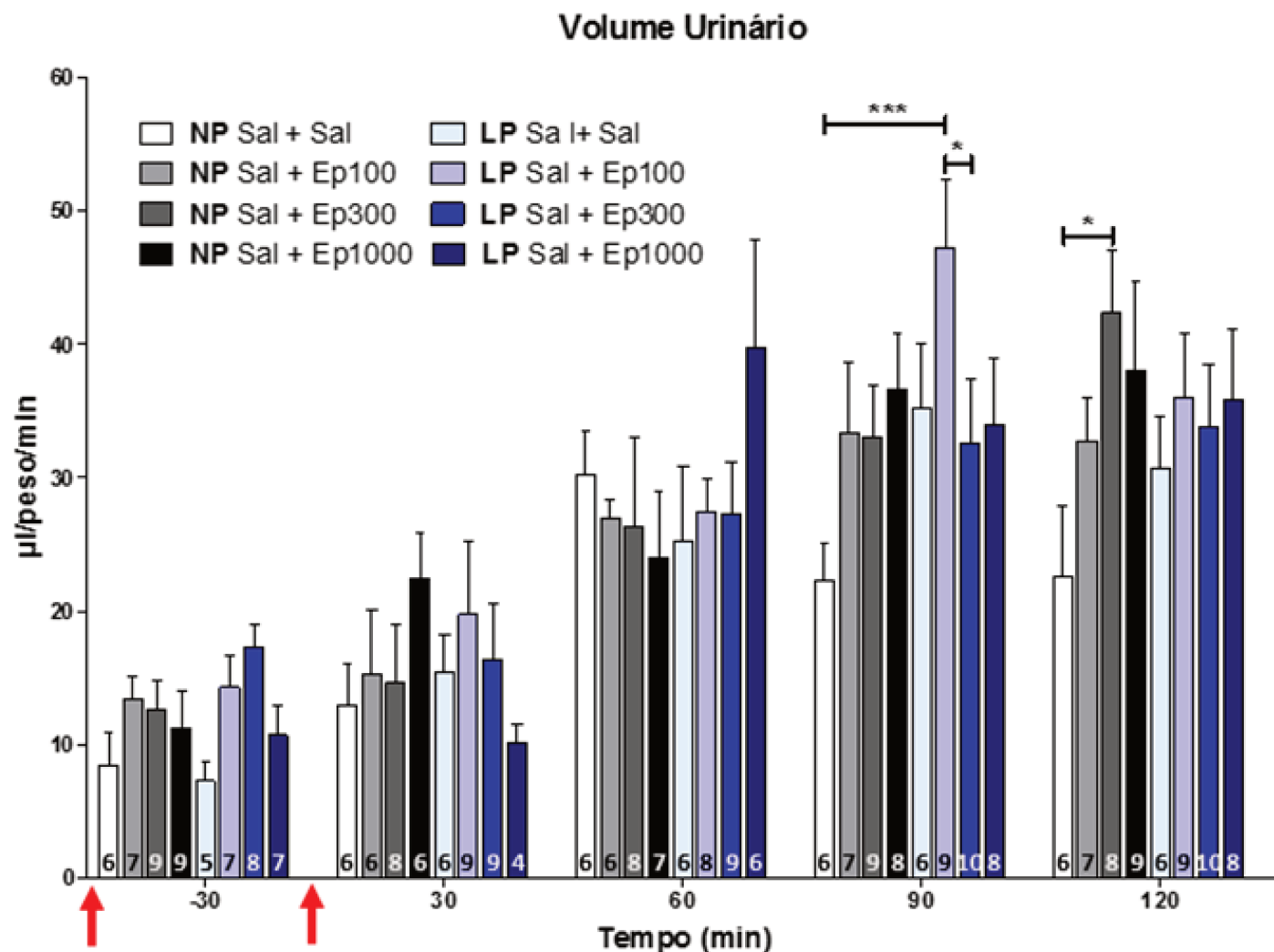


Figura 11: Volume urinário ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de solução salina 0,9% e/ou epinefrina nas doses 100, 300 e 1000 nmol em animais NP (escala de cinza) e LP (escala de azul). As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,050$; *** $p < 0,001$.

Quanto à fração de excreção total de sódio, 1000 nmol de epinefrina foi capaz de promover natriurese nos animais NP quando comparado com animais desse mesmo grupo que recebeu apenas microinjeção de solução salina isotônica (Figura 12). Este valor foi estatisticamente significativo após 30 minutos de coleta

e, embora não significativo, 300 nmol de epinefrina também promoveu ligeiro aumento na FENa nesse grupo. Essa resposta natriurética foi se reduzindo conforme o andamento do experimento. Em contraste, o grupo LP não sofreu alterações nesse parâmetro frente às diversas doses de epinefrina microinjetadas no ventrículo lateral. Esses animais exibiram apenas um aumento não significativo 120 minutos após a administração de 100 nmol da droga.

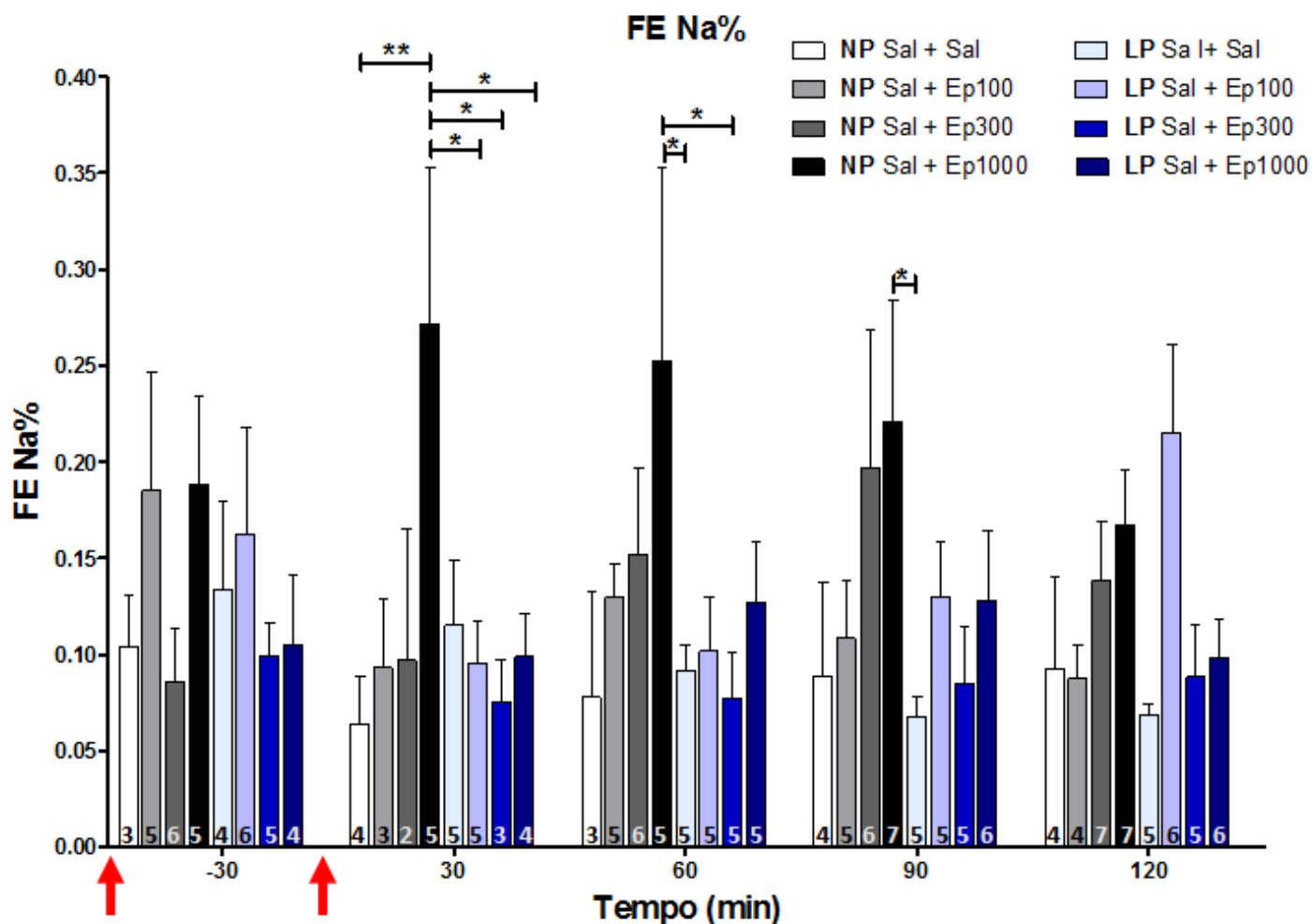


Figura 12: Fração de excreção de sódio ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de solução salina 0,9% e/ou epinefrina nas doses 100, 300 e 1000 nmol em animais NP (escala de cinza) e LP (escala de azul). As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,050$; ** $p < 0,01$.

A curva dose-resposta da FENa foi plotada para cada tempo avaliado (Figura 13) e os valores de EC50 dos animais NP para 30, 60, 90 e 120 minutos de coleta foram, respectivamente: log2,860; log2,774; log2,203; log2,181. A determinação dos valores de EC50 para os animais LP foi impossibilitada pela ausência de resposta renal desse grupo frente ao estímulo adrenérgico.

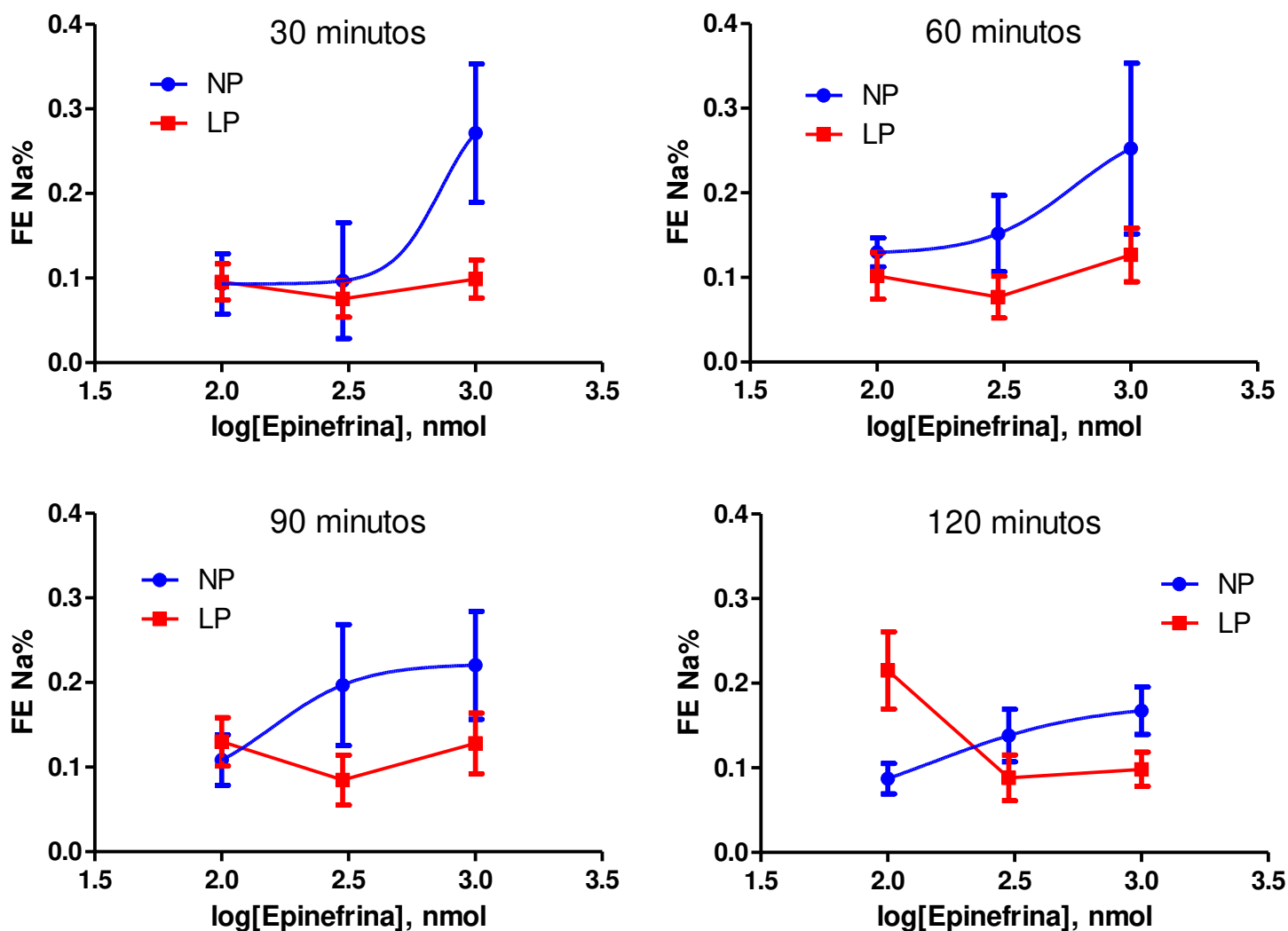


Figura 13: Curva dose-resposta da fração de excreção de sódio após 30, 60, 90 e 120 minutos da microinjeção i.c.v. de diferentes doses de epinefrina na prole NP e LP. Valores representam média $\pm$ EPM. Análise de regressão não-linear.

Quando avaliado a excreção de sódio nas diferentes porções dos túbulos renais, fica evidente que a resposta natriurética resultante do estímulo por epinefrina central a 1000 nmol é consequência do aumento na fração de excreção desse íon na porção proximal do nefro, como mostrado na figura 14. A manipulação renal de sódio na porção pós-proximal do nefro, por sua vez, não sofreu alterações (Figura 15).

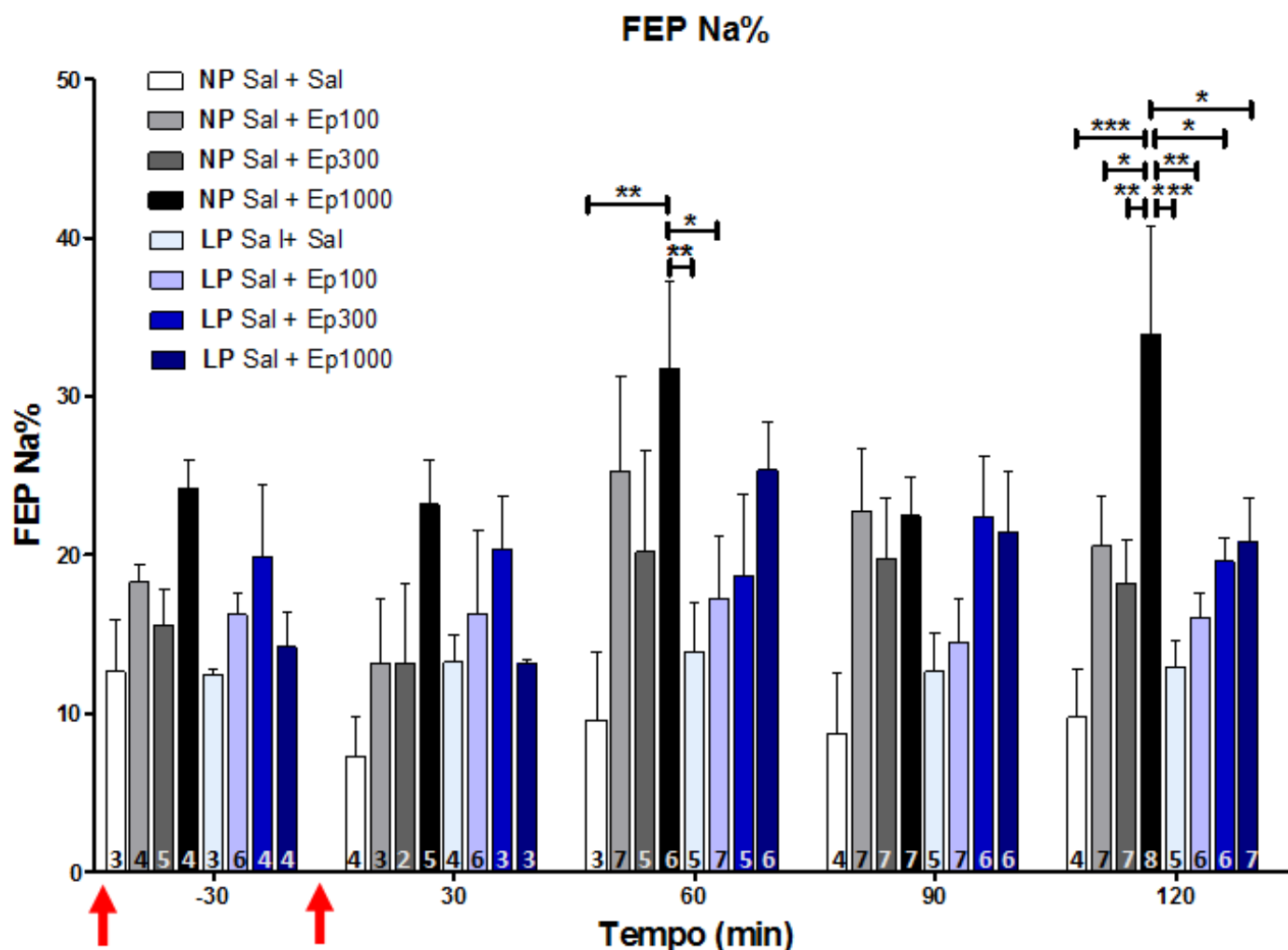


Figura 14: Fração de excreção proximal de sódio ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de solução salina 0,9% e/ou epinefrina nas doses 100, 300 e 1000 nmol em animais NP (escala de cinza) e LP (escala de azul). As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,050$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

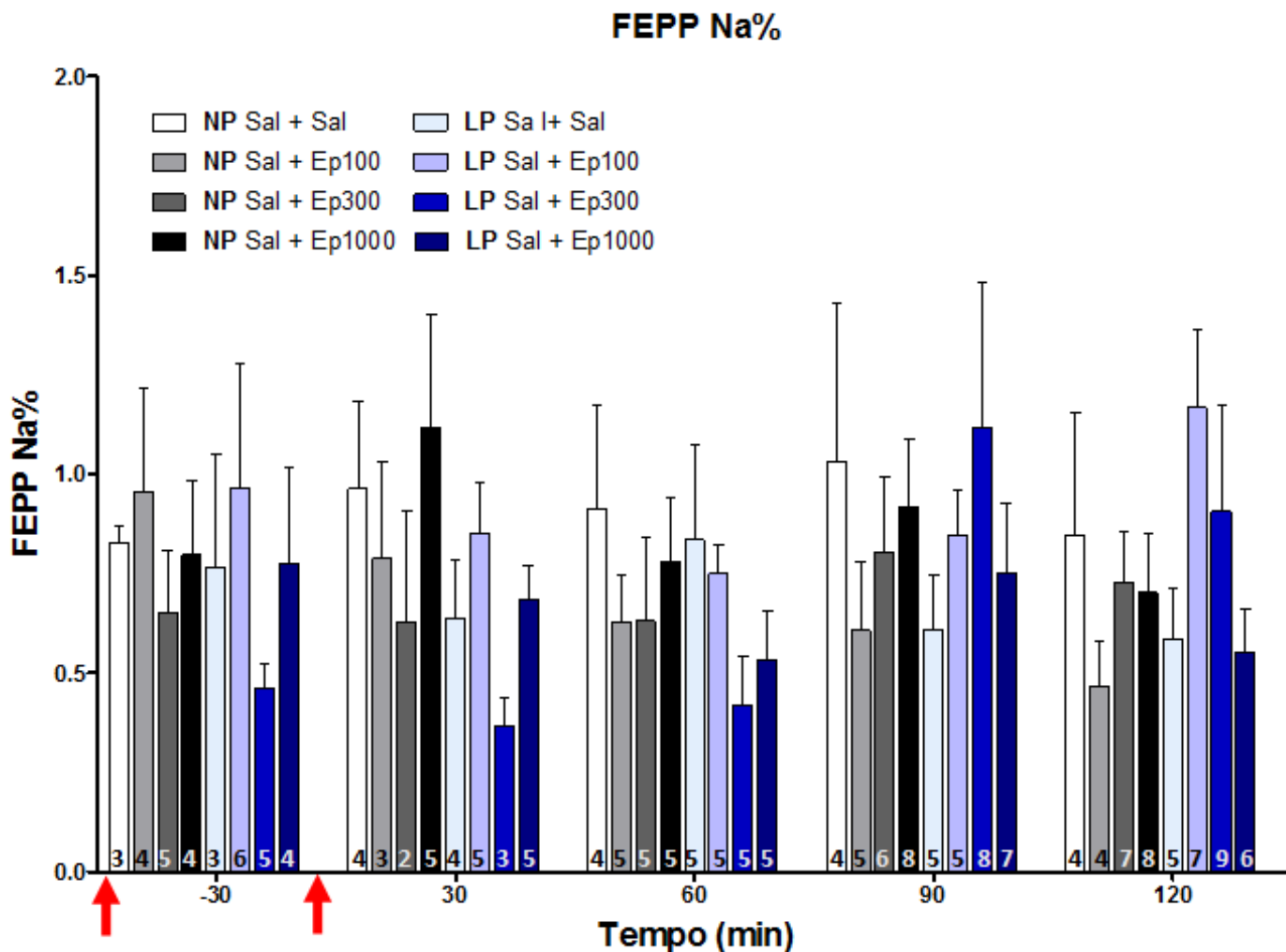


Figura 15: Fração de excreção pós-proximal de sódio ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de solução salina 0,9% e/ou epinefrina nas doses 100, 300 e 1000 nmol em animais NP (escala de cinza) e LP (escala de azul). As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni.

A fração de excreção de potássio apresentou-se elevada após 60 minutos da microinjeção i.c.v. de epinefrina a 300 e 1000 nmol (Figura 16) no grupo LP.

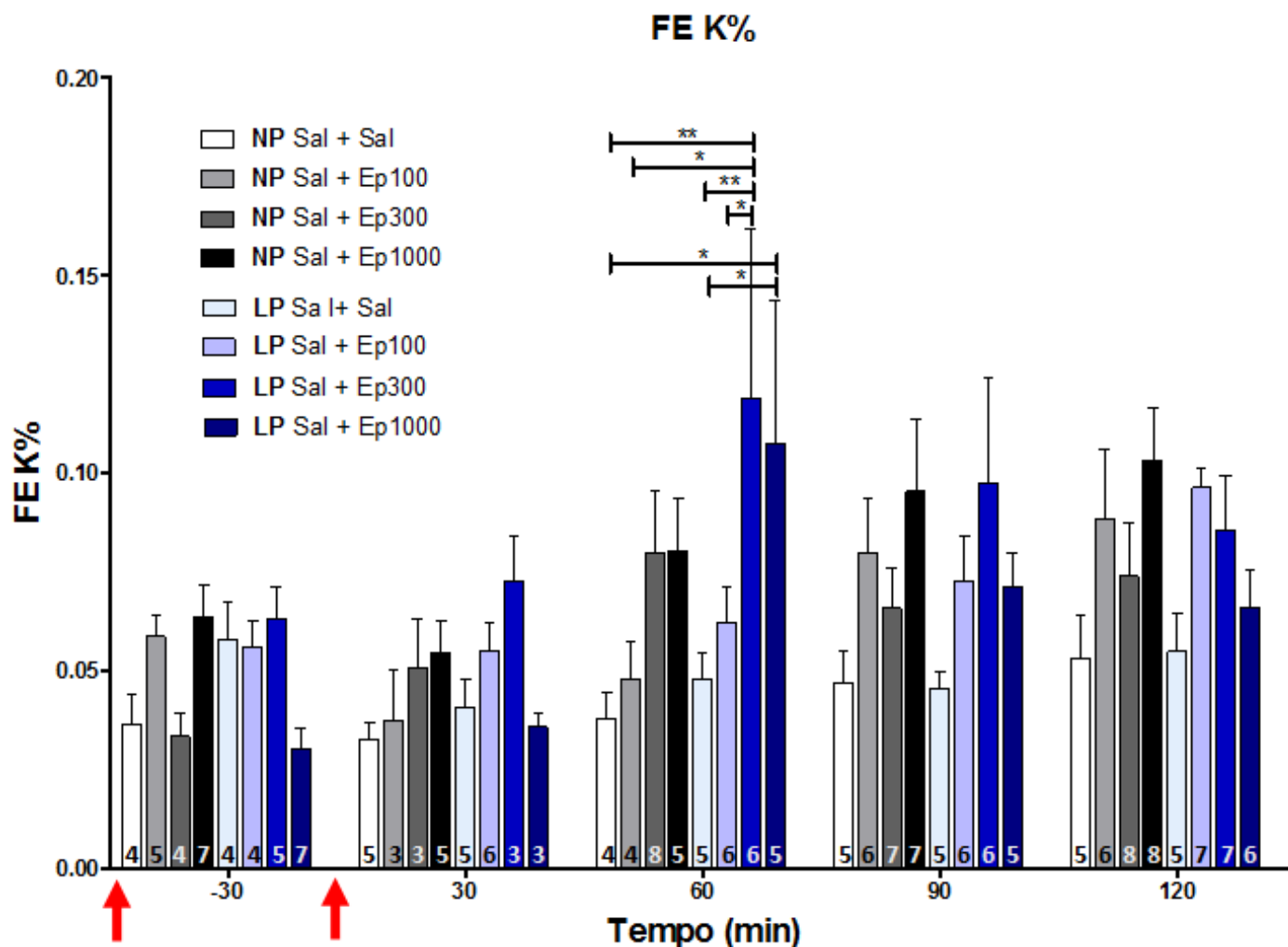


Figura 16: Fração de excreção de potássio ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de solução salina 0,9% e/ou epinefrina nas doses 100, 300 e 1000 nmol em animais NP (escala de cinza) e LP (escala de azul). As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,050$; ** $p < 0,01$.

4.2.2 Bloqueio $\alpha 1$ -adrenoceptor

A função renal de ratos submetidos à programação do desenvolvimento fetal foi avaliada após o bloqueio central com o antagonista $\alpha 1$ -adrenoceptor, Prazosin. Para critério de comparação, estarão representadas nos gráficos as

respostas renais decorrentes da administração i.c.v. das seguintes combinações de fármacos: solução salina isotônica (Sal + Sal); Ep300 com microinjeção prévia de solução salina 0,9% (Sal + Ep300); PRA com microinjeção prévia de seu solvente (PG + Pra) e, finalmente, Ep300 com bloqueio prévio com PRA (Pra + Ep300).

Com relação ao volume urinário, o bloqueio de $\alpha 1$ -adrenoceptores centrais promoveu diurese no tempo 120 minutos tanto no grupo controle quanto em animais sujeitos à restrição proteica gestacional (Figura 17). Tal resposta é similar àquela apresentada por animais NP submetidos ao estímulo adrenérgico central por 300 nmol de epinefrina. O gráfico da resposta ao longo de todo o tempo de teste está disponível na seção anexo deste documento.

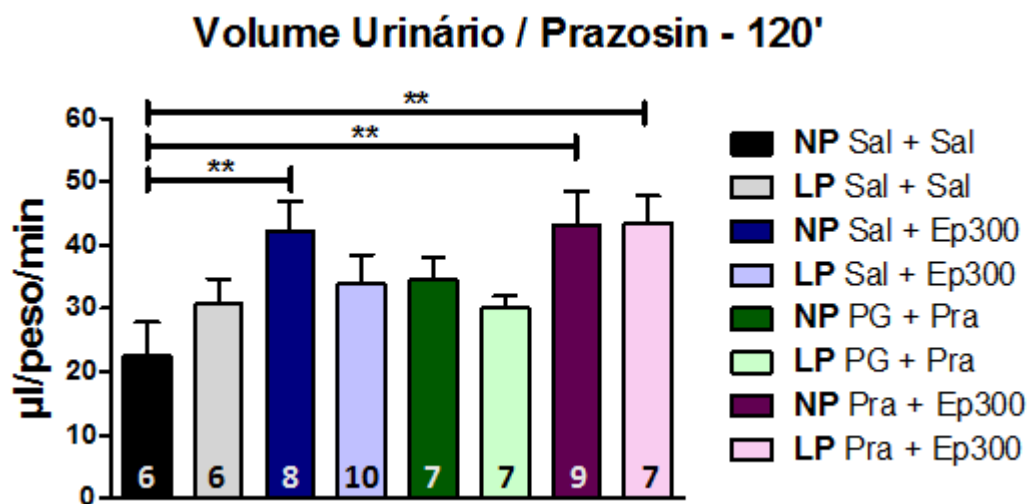


Figura 17: Volume urinário dos grupos NP e LP no tempo 120 minutos após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Pra e Pra+Ep300. Os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, ** $p < 0,01$.

A manipulação renal tubular de sódio, em especial na porção proximal do nefro, sofreu alterações decorrentes do bloqueio $\alpha 1$ -adrenoceptor, sendo essas modificações diferentes entre os grupos NP e LP. Quanto à fração de excreção total desse íon, PRA não foi capaz de alterar a natriurese observada nos animais

controle após administração de epinefrina central (Figura 18). O grupo LP, por sua vez, não sofreu qualquer alteração nesse parâmetro entre os diversos fármacos administrados. Embora sem significância estatística, é possível notar, examinando-se apenas os dados referentes à PG+Pra e Pra+Ep300, que o bloqueio $\alpha 1$ -adrenoceptor tende a aumentar a FENa em NP, o que não ocorre nos animais LP.

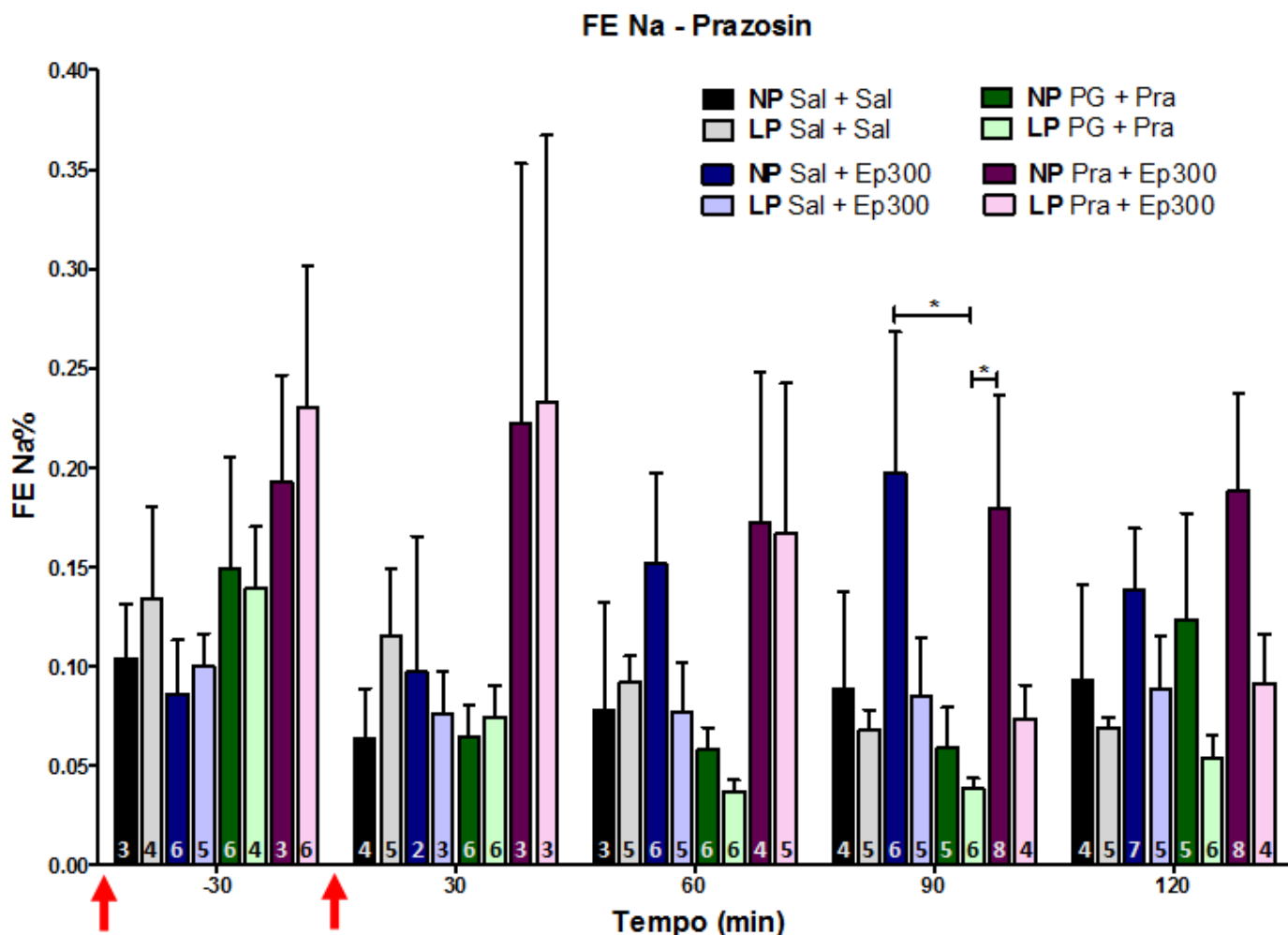


Figura 18: Fração de excreção de sódio dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Pra, e Pra+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$.

Quanto à FENa na porção proximal do nefro (Figura 19), os animais NP e LP apresentaram aumento nesse parâmetro após a microinjeção de PRA no tempo -30 minutos. Essa elevação permanece durante praticamente todo o período de experimento no grupo NP, enquanto que, nos animais LP, a excreção proximal de sódio diminuiu a partir de 60 minutos de experimento.

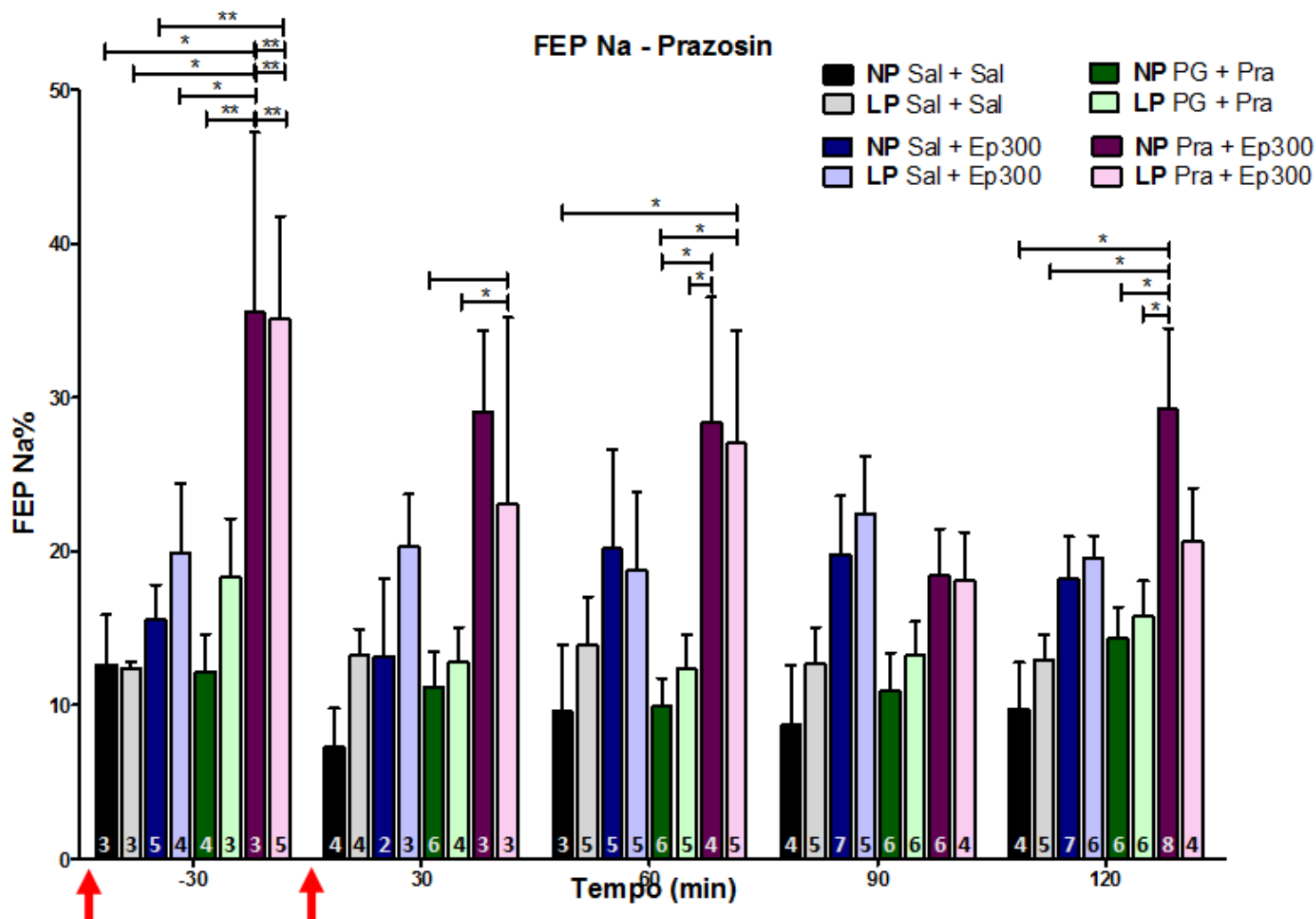


Figura 19: Fração de excreção proximal de sódio dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Pra, e Pra+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Não há alterações significativas na FEPPNa (Figura 20). Já a FEK+ apresenta apenas um ligeiro aumento no grupo LP após 60 minutos da microinjeção de 300 nmol de epinefrina (Figura 21).

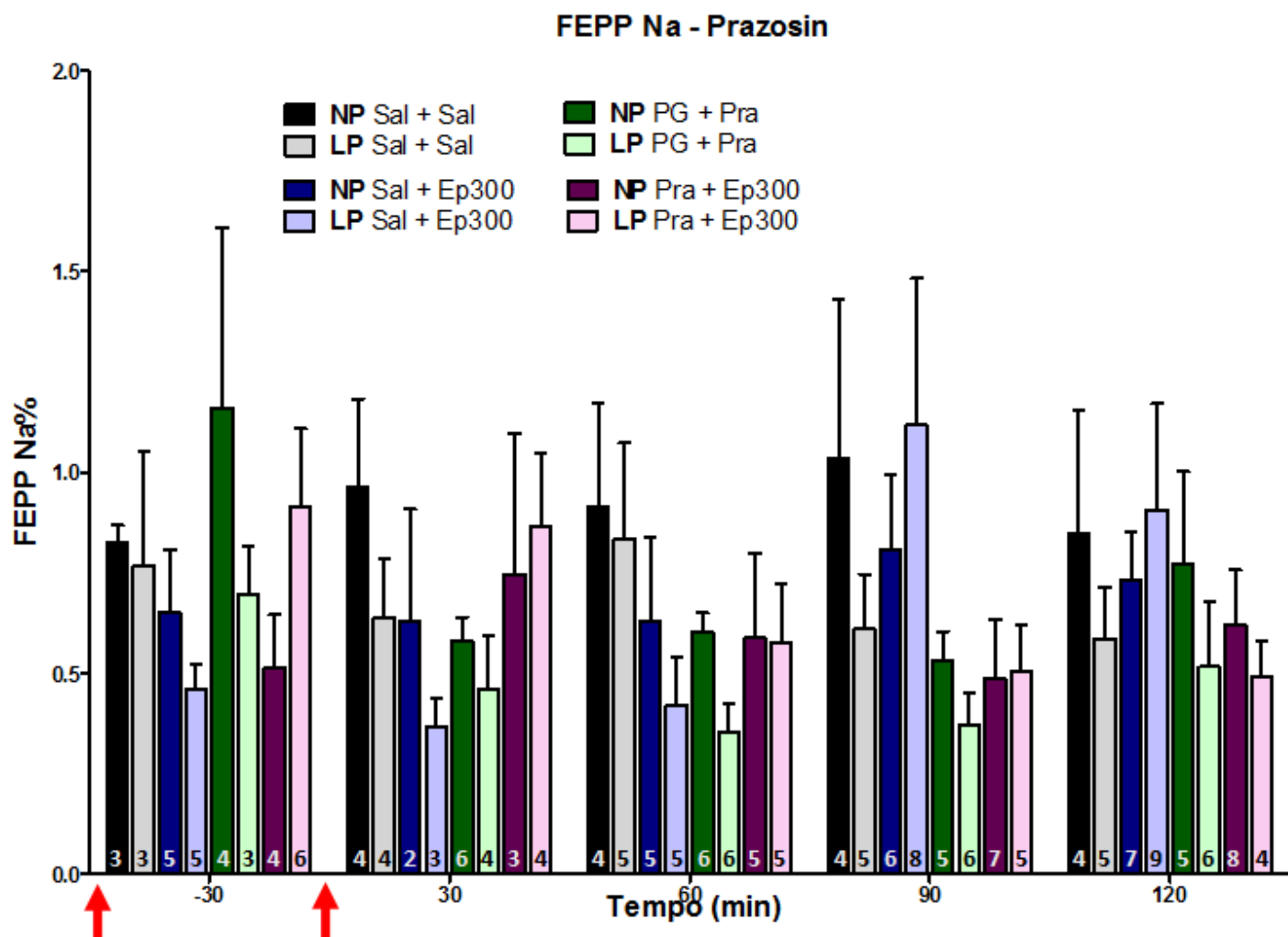


Figura 20: Fração de excreção pós-proximal de sódio dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Pra, e Pra+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni.

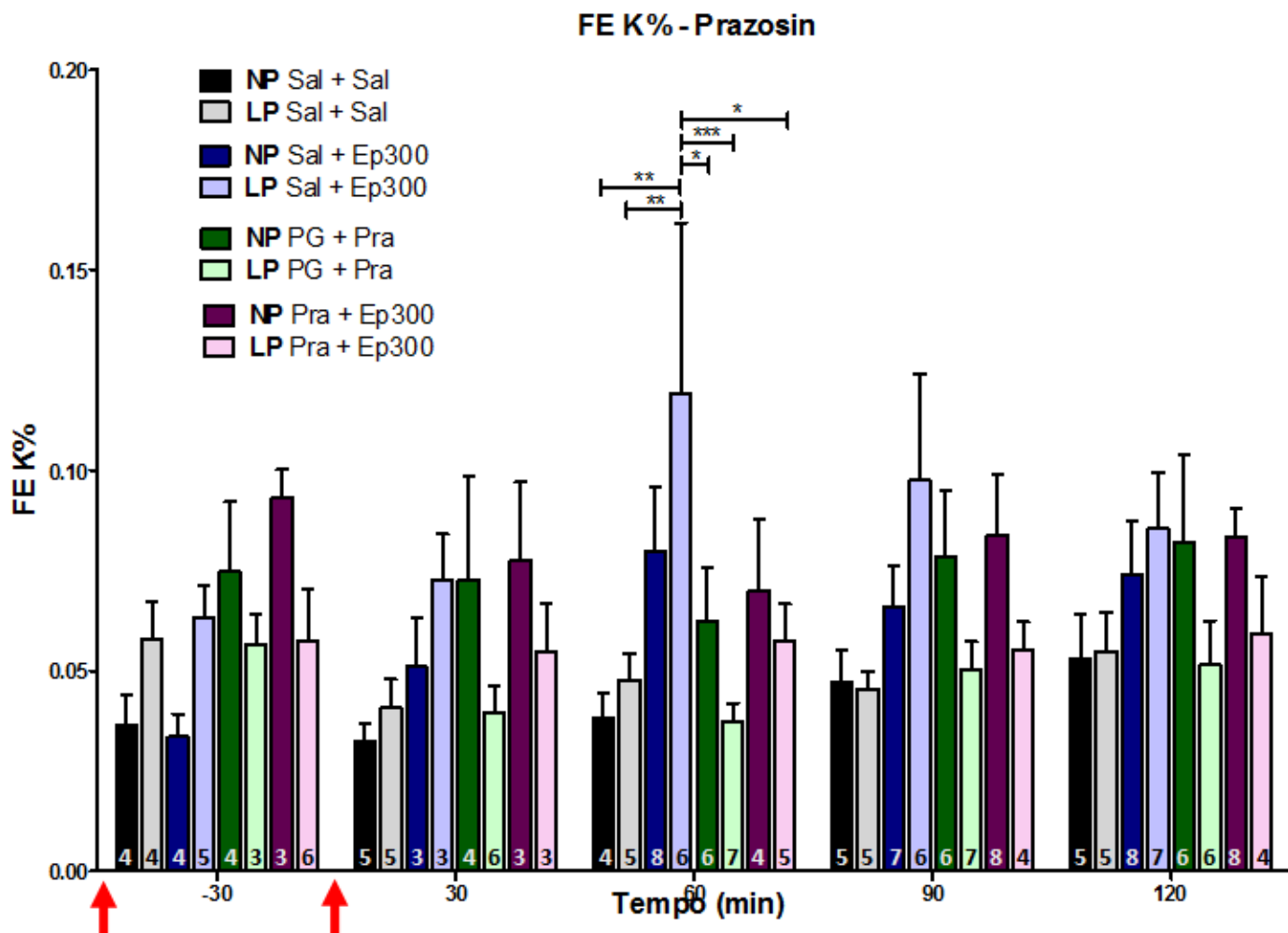


Figura 21: Fração de excreção de potássio dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Pra, e Pra+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.3 Bloqueio $\alpha 2$ -adrenoceptor

A função renal de ratos submetidos à programação do desenvolvimento fetal também foi avaliada após o bloqueio com o antagonista $\alpha 2$ -adrenoceptor, YOH.

Quanto ao volume urinário, os grupos NP e LP comportaram-se de forma diferenciada após a microinjeção i.c.v. dos fármacos, como evidenciado na figura 22. Para melhor visualização, os resultados obtidos pela administração de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Yoh e Yoh+Ep300 foram plotados em gráficos individualizados (Figura 23).

De forma geral, o estímulo simpatomimético por 300 nmol de epinefrina promoveu diurese de mesma magnitude em NP e em LP ao longo do tempo. Decorridos 120 minutos de experimento, o volume urinário em animais NP, que receberam microinjeção central de epinefrina, apresentou significância estatística quando comparado com animais do mesmo grupo que receberam apenas solução salina isotônica no ventrículo lateral, o que confirma que a diurese observada após o estímulo adrenérgico central não é decorrente da sobrecarga hídrica ao qual os animais foram submetidos.

Quando observado os dados referentes ao volume urinário frente ao bloqueio de $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais, é possível notar que a resposta resultante é antidiurética. Após um período inicial de aumento no volume urinário devido à sobrecarga hídrica, os animais NP e LP PG+Yoh apresentaram o mesmo padrão de diminuição nesse parâmetro, que se inicia no tempo 60 minutos. Ainda nesse tempo, há diferença significativa no grupo NP entre os animais que receberam apenas solução salina 0,9% e aqueles que receberam microinjeção de YOH com administração prévia do solvente PG.

Esse padrão de resposta resultante da administração de PG+Yoh é muito similar àquele observado para animais NP que receberam microinjeção i.c.v. de epinefrina com bloqueio prévio de $\alpha 2$ -adrenoceptores, com a diferença de que nesse último grupo, a diminuição no volume urinário se inicia aos 30 minutos de teste. Em contrapartida, o grupo LP Yoh+Ep300 apresentou uma diminuição drástica na quantidade de urina excretada logo após a segunda microinjeção, de 300 nmol de epinefrina. Devido a isso, a curva do volume urinário em animais LP Yoh+Ep300, embora muito semelhante àquela apresentada pelos grupos NP PG+Yoh, LP PG+Yoh e NP Yoh+Ep300, apresenta um comportamento de resposta atrasada com relação aos demais.

Volume Urinário - Yohimbine

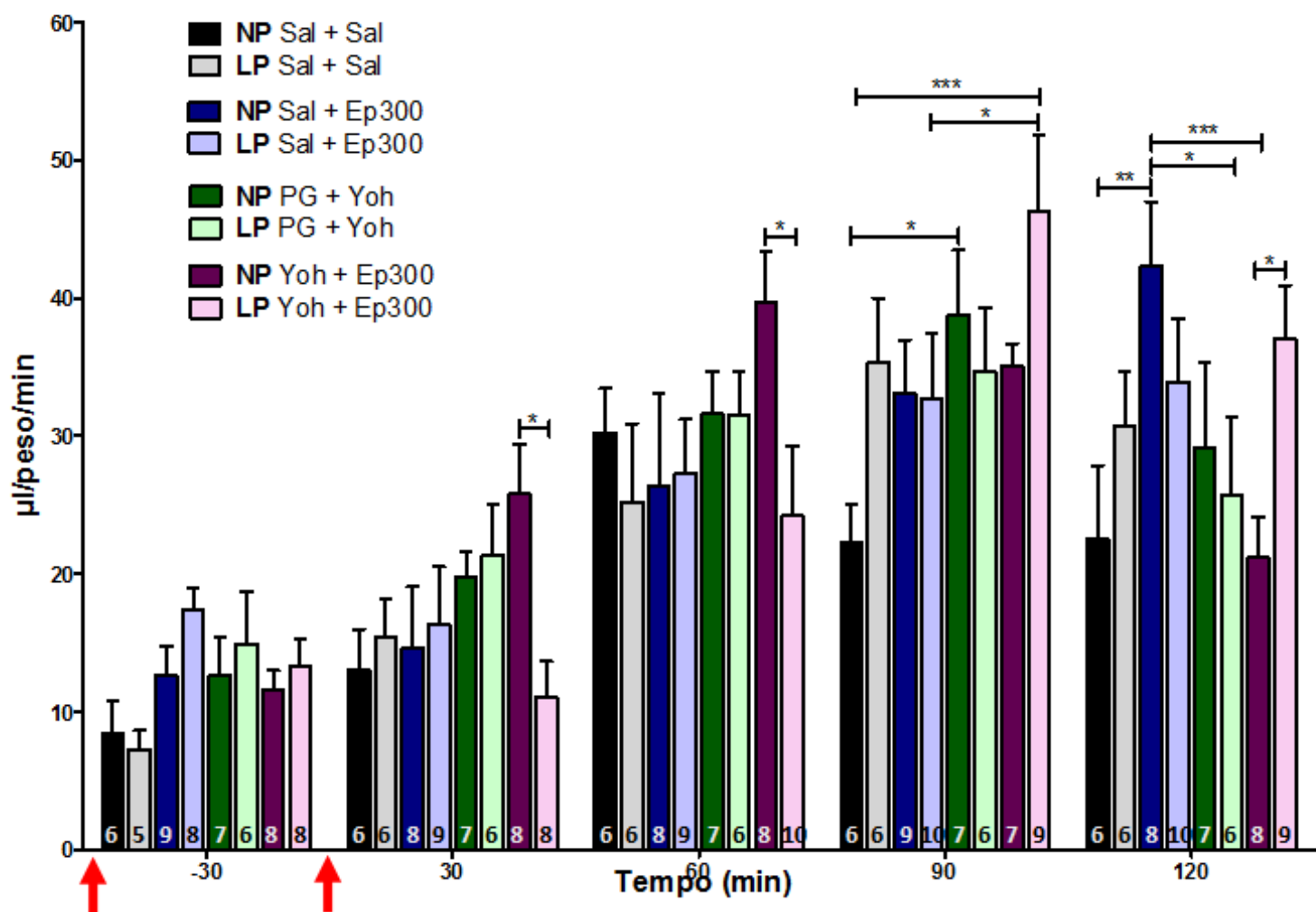


Figura 22: Volume urinário dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Yoh, e Yoh+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

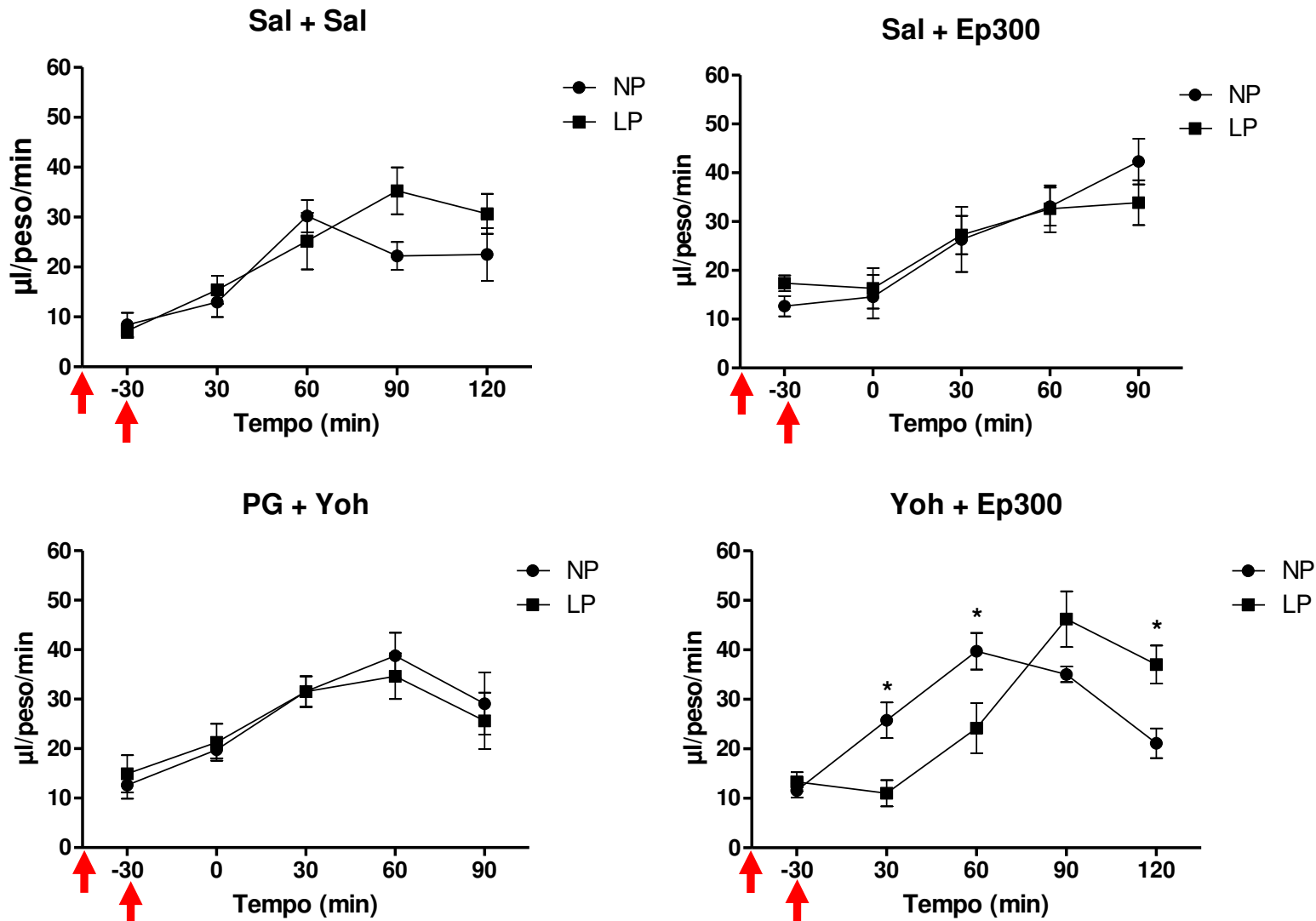


Figura 23: Volume urinário dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Yoh, e Yoh+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$.

A manipulação tubular renal de sódio em animais submetidos à restrição proteica gestacional sofreu consideráveis alterações após o estímulo adrenérgico com bloqueio prévio de $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais. A figura 24 ilustra o aumento significativo na FENa nesses animais nos tempos 60, 90 e 120 minutos. Essa

natriurese acentuada foi observada apenas no grupo LP Yoh+Ep300 e, no tempo 90 minutos, seu valor chega a ser 5,7 vezes maior do que o valor apresentado pelos animais NP que receberam a mesma combinação de fármacos.

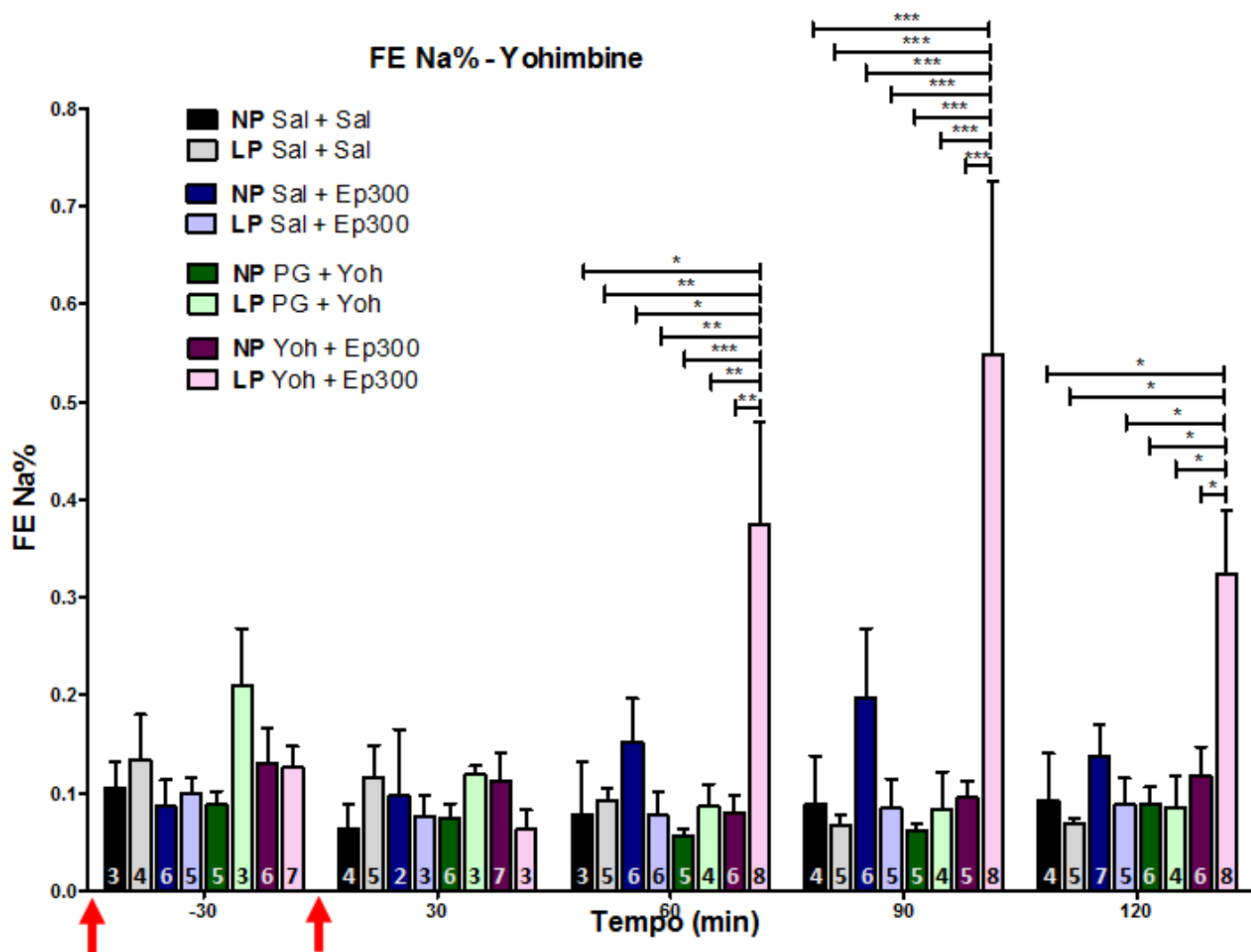


Figura 24: Fração de excreção de sódio dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+ Yoh, e Yoh+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Quando avaliado separadamente a manipulação renal de sódio nas diferentes porções do nefro, é possível aferir que tanto a porção proximal (Figura 25) quanto a porção pós-proximal (Figura 26) contribuem para os elevados índices de natriurese observado no grupo LP Yoh+Ep300.

A fração de excreção proximal de sódio foi elevada não só nos animais LP submetidos à administração central de epinefrina com bloqueio prévio de $\alpha 2$ -adrenoceptores, mas também em animais NP que foram sujeitos ao mesmo tipo de tratamento. No entanto, a natriurese observada nesse último grupo caracteriza-se por ser lenta e gradual, tornando-se estatisticamente significativa apenas no tempo 90 e 120 minutos, ao passo que o perfil natriurético dos animais LP apresenta-se elevado de forma mais imediata, já no tempo 60 minutos.

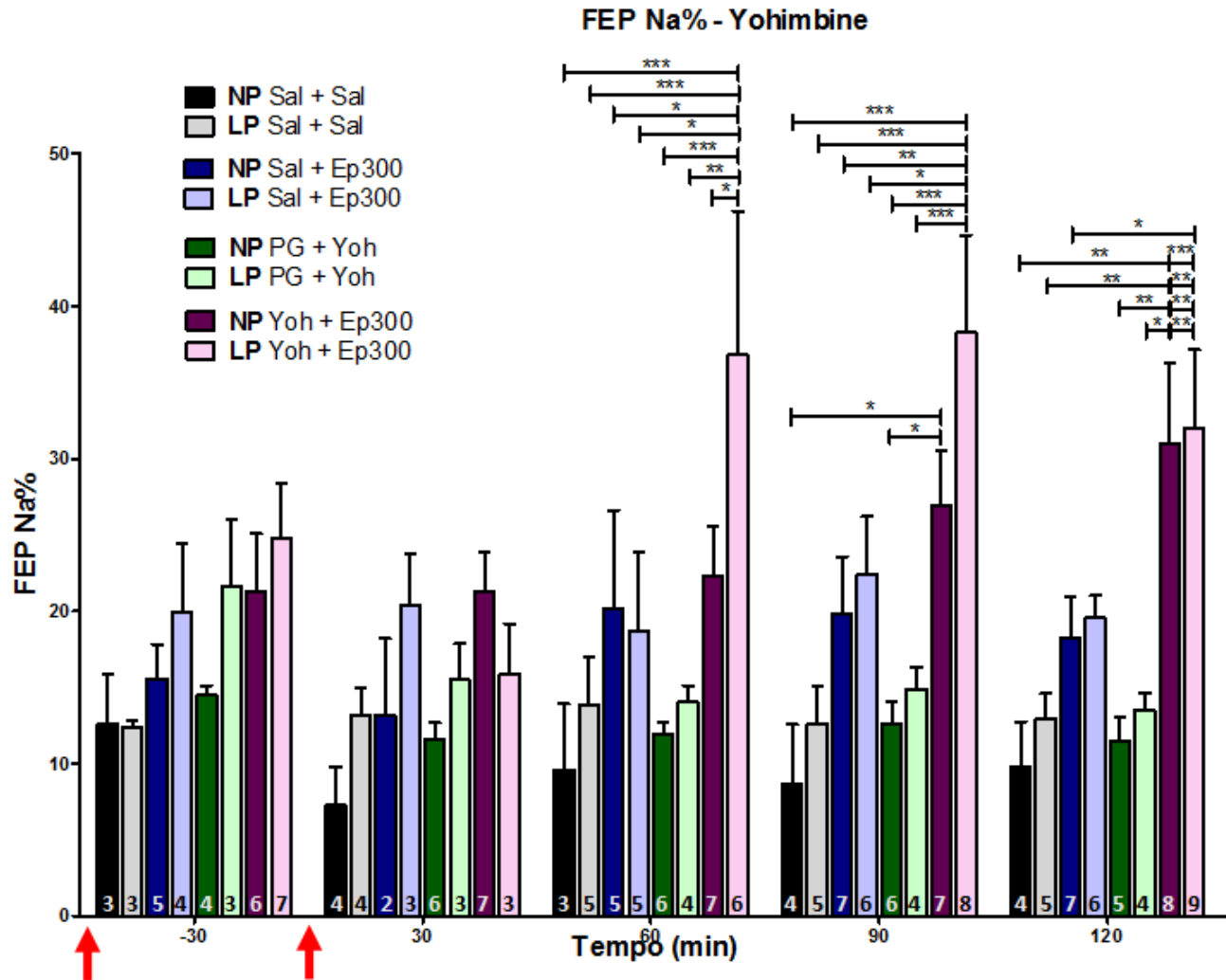


Figura 25: Fração de excreção proximal de sódio dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Yoh, e Yoh+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

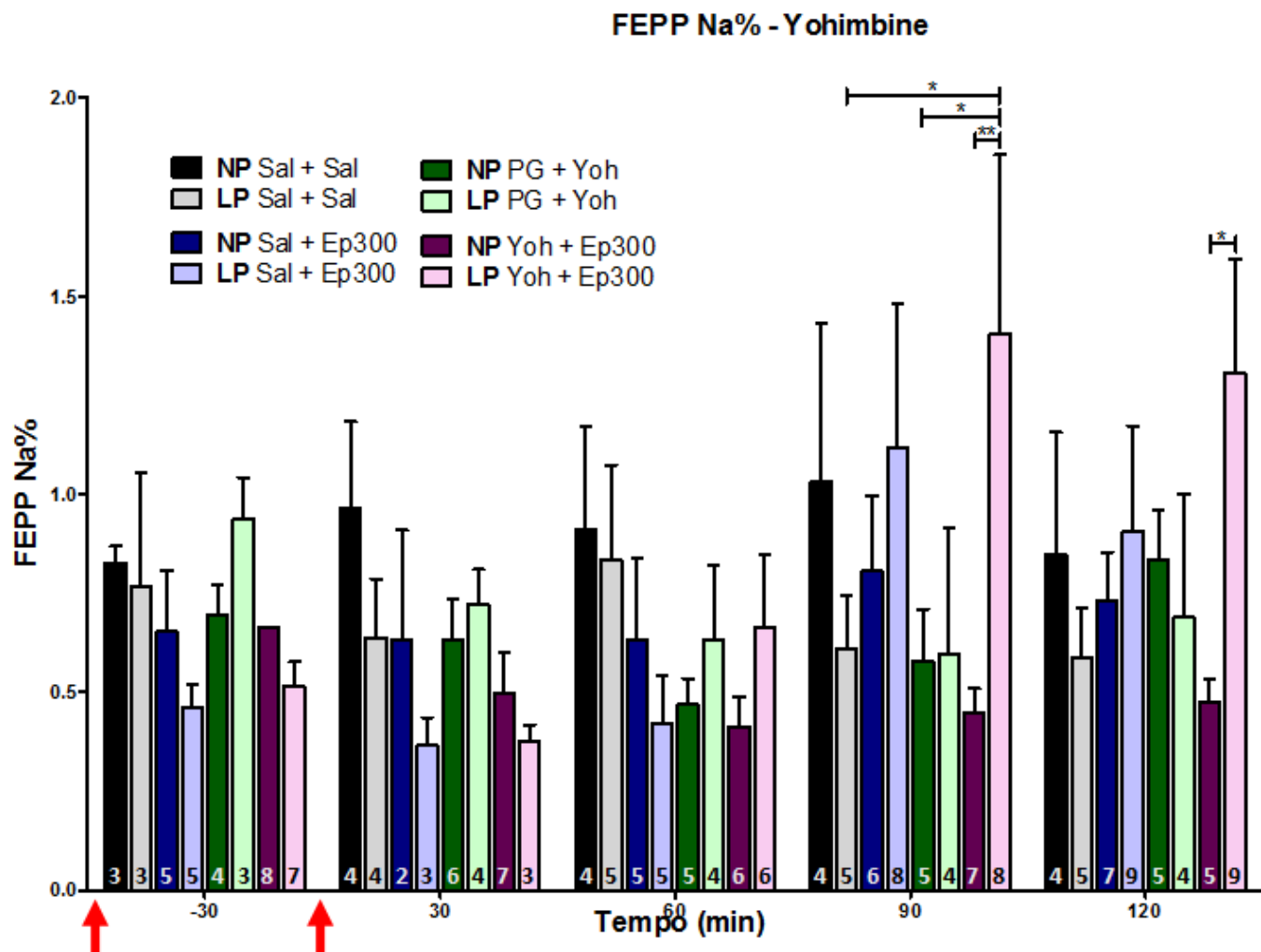


Figura 26: Fração de excreção pós-proximal de sódio dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+ Yoh, e Yoh+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Quanto à FEK+, os animais LP Yoh+Ep300 apresentaram aumento significativo nesse parâmetro nos tempos 60 e 90 minutos (Figura 27). Da mesma forma, o grupo LP Sal+Ep300 também exibiu elevação na fração de íons potássio excretados no tempo 60 minutos, como já descrito anteriormente.

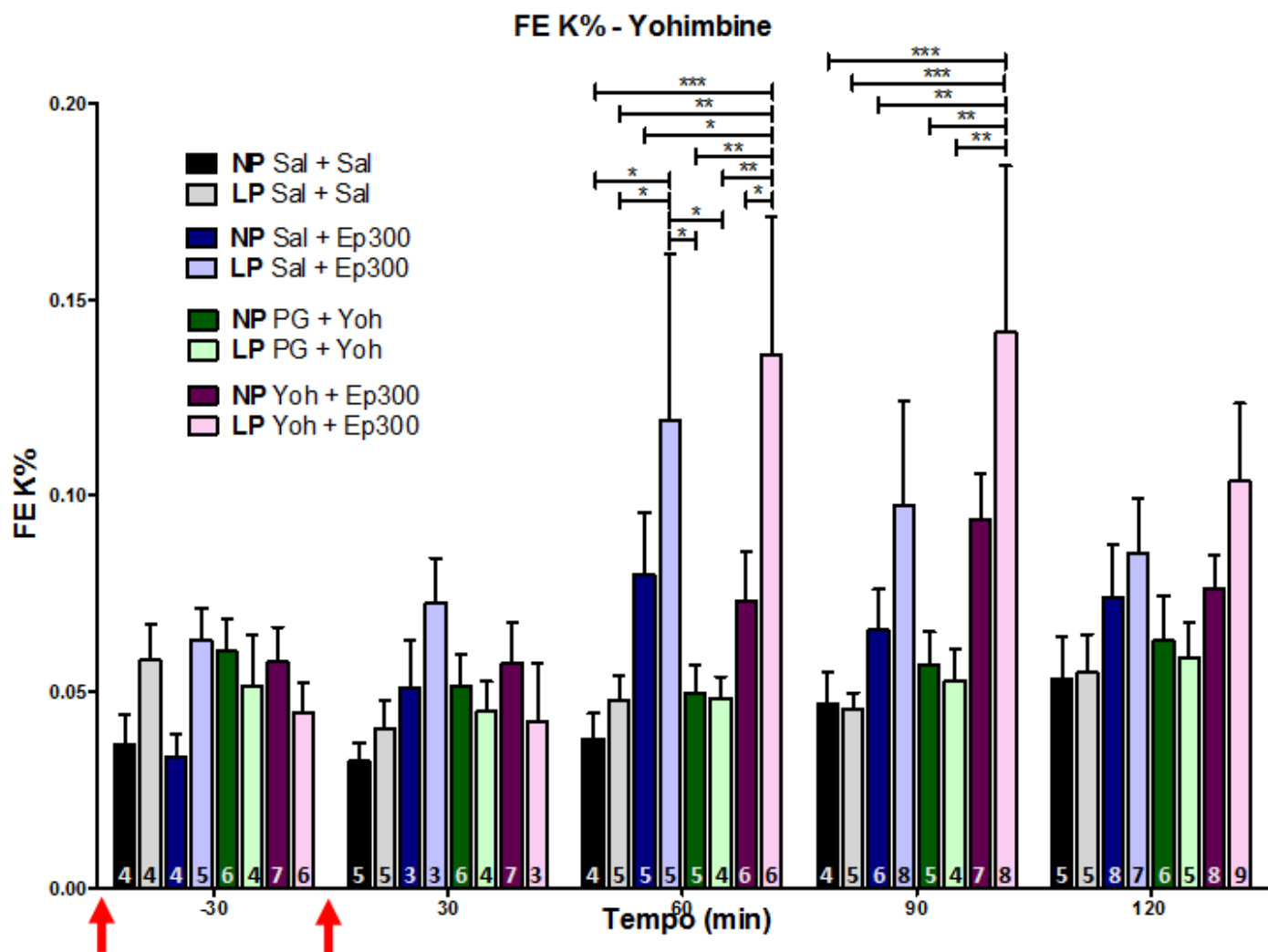


Figura 27: Fração de excreção de potássio dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Yoh, e Yoh+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções e os valores nas barras indicam o n. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA *post hoc* Bonferroni, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5. Discussão

As condições ambientais nas quais se processa o desenvolvimento embrionário têm se tornado cada vez mais relevantes no entendimento acerca dos estados de saúde ou de doença no qual se encontra um indivíduo na idade adulta. Não apenas a herança gênica proveniente dos genitores influencia as características fenotípicas encontradas na prole, mas também os fatores ambientais maternos, por meio de processos epigenéticos, podem interferir na combinação genotípica dos descendentes.

As alterações na morfologia e função de órgãos e sistemas durante a ontogênese são guiadas pelos indícios fornecidos pelo ambiente intrauterino, com o objetivo de garantir maiores chances de sobrevivência frente ao ambiente pós-natal. Uma vez que evidências do fenômeno de programação fetal está presente não só em humanos, como também em primatas não humanos e diversos outros modelos animais, deve ser presumido que se trata de um processo altamente conservado ao longo da evolução e, portanto, confere vantagens adaptativas Darwinianas (HARRIS & SECKL, 2011). Assim, diante do baixo suprimento proteico, ocorre uma série de alterações no desenvolvimento renal do feto que culminam na geração de um sistema poupador, caracterizado pela intensa retenção de água e eletrólitos e pelo menor número de nefros (KETT & DENTON, 2011). No entanto, todas essas alterações podem ter efeitos deletérios ou mal adaptativos se o ambiente no qual ocorreu a programação do indivíduo não corresponder com o ambiente extrauterino encontrado pós-desenvolvimento embrionário. Ou seja, se a restrição proteica nos estágios iniciais de vida programa um “fenótipo econômico”, mas a oferta desse nutriente é abundante na vida adulta, como resultado, aumenta-se o risco etiológico de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e metabólicas na prole (GLUCKMAN & HANSON, 2004). A hipótese original concebendo esta ideia é conhecida como “Hipótese de Barker” e, mais recentemente, tem ganhado maior visibilidade pelo surgimento da expressão DOHaD (*Developmental Origins of Health and Adult Disease*) (BARKER & BAGBY, 2005; GLUCKMAN & HANSON, 2006).

Diversos trabalhos têm comprovado que as adversidades intrauterinas diminuem efetivamente a atividade da enzima 11 β -HSD2 placentária (BERTRAM

et al., 2001; LANGLEY-EVANS et al., 1996) e postula-se que o consequente excesso na transferência de glicocorticoides maternos para o feto seria um fator determinante na programação da hipertensão arterial (LANGLEY-EVANS, 1997) e da sensibilidade às catecolaminas (O'REGAN et al., 2008) no adulto, bem como do baixo peso ao nascer (BENEDIKTSSON et al., 1997a; EDWARDS et al., 1993; SECKL, 1998). Os resultados obtidos nesse trabalho confirmam a redução do peso ao nascer de machos da prole, corroborando estudos que utilizam o mesmo modelo experimental de programação fetal (MESQUITA et al., 2010; LOPES et al., 2013). No entanto, quando observado o número de filhotes por ninhada, nota-se que a prole proveniente de mães LP, que apresentaram quantidade reduzida no número de filhotes, não exibiu redução de seu peso ao nascimento, mesmo exposta a uma possível sobrecarga de glicocorticoides maternos. Sendo assim, nesse estudo, podemos sugerir que o nascimento de uma progênie menor se deve mais ao fato do baixo suprimento proteico para o desenvolvimento do feto do que a diminuição da atividade dessa enzima placentária. Apesar do tratamento não influenciar a quantidade de filhos por progenitora, a ocasional redução no número da ninhada em ratas LP garantiria menor divisão do pouco aporte de proteína entre a prole e, portanto, cada animal teria maior disponibilidade desse nutriente para o seu desenvolvimento.

Além disso, foi também observado no presente estudo, o rápido ganho de massa corpórea da prole LP nas primeiras semanas de vida a despeito de seu baixo peso ao nascer. Eriksson e Forsén (2002) relataram o alto risco de ocorrência de doenças cardíacas coronárias em indivíduos que apresentaram redução no peso ao nascimento seguido de crescimento *catch-up* durante a infância. Essa rápida recuperação do crescimento com a melhora das condições nutricionais pós-natais representa alterações no metabolismo que podem estar relacionadas à programação de doenças em longo prazo como resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão arterial e síndrome metabólica (BARKER, 2004; HALES & BARKER, 2001).

A elevação da pressão arterial na prole submetida à restrição proteica gestacional, outro parâmetro observado em eventos de programação fetal, ocorreu

já na 8ª semana de vida, quando se iniciaram as mensurações, e foi mantida nesse mesmo patamar na 10ª e 12ª semanas. Apesar de não ser possível, com esse trabalho, determinar o momento exato no qual ocorreu essa elevação, esse estudo corrobora dados existentes na literatura que relacionam as alterações dietéticas durante o desenvolvimento intrauterino com o aumento da pressão arterial na prole adulta (WOODALL et al., 1996; MESQUITA et al., 2010; VACCARI et al., 2013; ROGERS et al., 2014). É amplamente conhecido que os rins, por meio de alterações na sua função ou hemodinâmica, possuem um papel essencial na patogênese da hipertensão arterial por promover a retenção de sódio (JOHNS et al., 2011; BOER et al., 2005; HALL et al., 2012). Embora ainda haja discussões a respeito dos mecanismos precisos que promovem essa elevação da pressão arterial em animais programados, sabe-se que o controle renal do balanço hidroeletrólítico possui um importante papel nesse processo, uma vez que foi evidenciado que esses animais apresentam natriurese reduzida, a qual é resultante, principalmente, do aumento da reabsorção de sódio nos segmentos tubulares contorcidos proximais (MESQUITA et al., 2010).

A excreção urinária de água e eletrólitos é modulada pelo sistema nervoso central (GONTIJO & KOPP, 1994; DIBONA, 2000; JOHNS et al., 2011). A importância dos nervos simpáticos renais na resposta antinatriurética observada em eventos de programação fetal é evidenciada em estudos mostrando que a denervação renal crônica é capaz de reverter essa excessiva reabsorção de sódio (ALEXANDER et al., 2005; CUSTÓDIO, 2014 - dados não publicados). Por outro lado, é amplamente conhecido que a resposta dos rins frente ao estímulo simpatomimético central é completamente inversa àquela observada após o estímulo simpático periférico, visto que a administração de agonista noradrenérgicos em diferentes regiões cerebrais promove natriurese acentuada (SILVA-NETTO et al., 1986; GONTIJO et al., 1991; CHIU & SAWYER, 1974; ROHMEISS et al., 1995). Tendo em conta a falta de estudos avaliando a participação da modulação simpática central em modelos de programação fetal, o presente estudo visou elucidar, pelo menos em parte, o papel do sistema noradrenérgico central no estabelecimento das alterações no balanço

hidroeletrolítico renal encontradas em indivíduos adultos cujas progenitoras sofreram alterações na composição proteica de sua dieta durante o período gestacional.

Esse estudo endossou os dados existentes na literatura que mostram que o estímulo adrenérgico central promove diurese (MORRIS et al., 1977; BEAL & BLIGH, 1980; OTA et al., 1990). No entanto, o aumento no volume urinário ocorreu apenas de forma pontual, 120 minutos após a microinjeção i.c.v. de 300 nmol de epinefrina no grupo controle e 60 minutos após a administração central de 100 nmol do fármaco nos animais tratados. O bloqueio de α 1-adrenoceptores centrais não alterou essa resposta diurética provocada pelo estímulo simpatomimético central, enquanto que o bloqueio de α 2-adrenoceptores não só aboliu a resposta da epinefrina como também desencadeou redução expressiva no volume urinário. Essa resposta antidiurética proveniente da microinjeção de YOH foi observada em ambos os grupos independentemente da posterior microinjeção i.c.v. de epinefrina. No entanto, quando ocorreu, de fato, a administração adrenérgica central após o bloqueio prévio de α 2-adrenoceptores, os animais LP apresentaram resposta antidiurética mais acentuada do que o grupo controle, como mostrado na figura 23.

Apesar da existência de relatos na literatura a respeito do efeito diurético desencadeado pelo estímulo adrenérgico central, não há descrição prévia desses efeitos em animais que sofreram programação do desenvolvimento fetal. É conhecido que a administração i.c.v. de agonista α 1-adrenoceptor promove aumento da liberação de AVP, bem como elevação da atividade da renina plasmática e da pressão sanguínea (GANONG et al., 1982; BROOKS et al., 1986; LEFLIER et al., 1987), ao passo que o estímulo central de α 2-adrenoceptores está relacionado à queda na liberação de AVP e da aldosterona plasmática. Baseado nisso, levantamos a hipótese de que os mecanismos centrais de síntese e secreção desse peptídeo estariam alterados nos animais programados como consequência de modificações na sinalização adrenérgica mediada por α 1-adrenoceptores. Dessa forma, o bloqueio de α 2-adrenoceptores centrais

promoveria diminuição na inibição da liberação de AVP, ao mesmo tempo em que reduziria os sítios de competição para a ligação das catecolaminas à $\alpha 1$ -adrenoceptores. Estes, uma vez estimulados, atuariam na liberação desse peptídeo, resultando na retenção renal de água. A resposta acentuada do grupo LP à epinefrina exógena denota aumento da capacidade de resposta desses receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, seja por elevação em seu nível de expressão ou à sua sensibilização.

Tem sido documentado em numerosos trabalhos científicos que o estímulo simpatomimético central promove aumento da excreção de sódio (MORRIS *et al.*, 1977; BEAL & BLIGH, 1980; KIMURA *et al.*, 1981; GANONG *et al.*, 1982; Brooks *et al.* 1986), o que também foi observado nesse estudo em animais controle. A dose de 10^3 nmol foi capaz de promover natriurese à custa de aumento na excreção de sódio na porção proximal do nefro. Essa resposta, no entanto, não foi observada no grupo LP.

Quando avaliada a função renal frente ao bloqueio de $\alpha 1$ -adrenoceptores centrais, observa-se que esse tratamento não foi capaz de reverter a natriurese provocada pela epinefrina no grupo controle, o que pressupõe que parte significativa do controle central da homeostase de sódio seja mediado principalmente por $\alpha 2$ -adrenoceptores. De fato, já é bem documentado na literatura que a ativação desses receptores está relacionada à resposta natriurética renal. (REID *et al.*, 1975; GANONG *et al.*, 1982; KIMURA *et al.*, 1984; BROOKS *et al.*, 1986; OTA *et al.*, 1990). Os animais NP e LP, no entanto, passam a excretar mais sódio 30 minutos após a administração prévia e isolada de PRA. Essa resposta é acentuadamente atenuada após a administração de epinefrina em animais LP, particularmente após 90 minutos da microinjeção. Essa atenuação da resposta natriurética não foi observada em ratos NP. Este efeito reduzindo a excreção de sódio em ratos da prole LP ocorre fundamentalmente na porção proximal do nefro (Figura 19), o que nos leva a propor que essa retenção de sódio seja modulada pela hiperestimulação de $\alpha 2$ -adrenoceptores centrais. Embora o presente estudo não permita afirmar a existência de um número maior de

receptores α 2-adrenérgicos em áreas do SNC da prole de ratos LP, os resultados podem sugerir uma hiperatividade destes receptores neste grupo de animais, o que poderia estar contribuindo para a retenção de sódio. Contrariamente ao presente estudo, relatos na literatura relacionam a ativação de α 2-adrenoceptores centrais com a diminuição da pressão arterial (KIMURA et al., 1984; BROOKS et al., 1986; KOEPKE & DIBONA, 1986). Estes aspectos serão discutidos adiante.

Quando avaliado o balanço eletrolítico renal frente ao bloqueio de α 2-adrenoceptores com YOH, nota-se que a resposta antinatriurética observada nos animais programados é acentuadamente revertida por uma acentuada natriurese a partir de 60 minutos após a injeção de YOH+Ep300, comprovando que esses α 2-adrenoceptores atuam efetivamente promovendo redução da excreção renal de sódio no grupo de animais programados. Esta resposta natriurética induzida pela administração concomitante de YOH e epinefrina ocorre nos segmentos proximais e pós-proximais do nefro. Uma vez que a administração central de AVP promove uma significativa natriurese (ISHIKAWA et al., 1996; NISHIDA et al., 1997), o aumento lento e gradual na FENa na porção proximal e pós-proximal do nefro nos animais LP Yoh+Ep300 (Figuras 25 e 26) ocorre, pelo menos parcialmente, como resultado da secreção desse peptídeo pela hipófise posterior em consequência da ativação de α 1-adrenoceptores.

Segundo estudos de Wainford e Kapusta (2011), as respostas fisiológicas produzidas pela ativação de α 2-adrenoceptores centrais são influenciadas pela disponibilidade e/ou níveis de expressão cerebral das subunidades específicas G α i ou G α s da proteína G. Os α 2-adrenoceptores medeiam seus efeitos intracelulares ao ativar principalmente a via de sinalização da subunidade G α i, que resulta na geração de uma resposta simpático inibitória sobre os sistemas cardiovascular e renal (WAINFORD & KAPUSTA, 2011). Como tem sido observado, podemos aventar a possibilidade de estar ocorrendo na prole LP, após estímulo adrenérgico, o acoplamento de α 2-adrenoceptores à subunidade G α s como decorrência de altas concentrações de agonista ou por um *downregulation* da subunidade G α i (Eason and Liggett, 1995; Wade et al., 1999).

De fato, Soto-Moyano e colaboradores (1994) observaram aumento nos níveis de liberação central de NA em modelos animais de programação do desenvolvimento fetal por alterações na dieta da progenitora. Assim, podemos sugerir que, em animais LP, possa estar ocorrendo alteração nas vias de sinalização intracelular dos receptores α 2-adrenérgicos, cuja hiperativação e/ou aumento do número de receptores estaria culminando na reabsorção intensa de sódio observado nesses animais programados. Dessa forma, o bloqueio desses α 2-receptores permitiu restaurar a excreção renal de sódio no grupo LP para níveis próximos àqueles observados em animais normais. Esse fenômeno também explicaria a provável elevação da pressão arterial associada à retenção de sódio e água na prole dos animais LP.

Recentemente, de Lima e colaboradores (2013) demonstraram, por imunistoquímica, redução na expressão de AVP no PVN e SON do hipotálamo em prole de animais submetidos à restrição proteica gestacional (de LIMA et al., 2013). Assim, no presente estudo, a liberação de AVP resultante do estímulo de α 1-adrenoceptores centrais, atuando como um fator adicional que modula a excreção renal de sódio, poderia estar significativamente atenuada em animais LP pelos achados de Lima e colaboradores, apoiando os nossos resultados. Após o estímulo adrenérgico com bloqueio prévio de α 2-adrenoceptores centrais, a redução de um estado de hiperatividade de α 2-receptores associado a um aumento da estimulação α 1-adrenérgica pós-receptora promoveria uma elevação da natriurese em LP.

De forma geral, esses resultados sugerem que as alterações no balanço hidroeletrólítico renal, observadas em animais adultos submetidos à restrição proteica durante o desenvolvimento fetal, estão relacionadas, pelo menos em parte, às alterações na transmissão noradrenérgica central mediada por α -adrenoceptores. Embora o exato mecanismo subjacente a esse processo não esteja ainda claramente elucidado, esse estudo possibilita a formulação de uma série novas perguntas a serem estudadas.

6. Conclusão

A restrição proteica durante o desenvolvimento fetal promove redução do peso ao nascer, elevação da pressão arterial sistólica e alterações na sinalização noradrenérgica central mediada por α -adrenoceptores. A massiva retenção de sódio observada nesse modelo experimental se deve, pelo menos em parte, pela alteração da atividade de α 2-adrenoceptores centrais, que também atuam na retenção renal de água em animais programados em conjunto com α 1-adrenoceptores presentes no sistema nervoso central.

Assim, alterações na transmissão noradrenérgica central estão relacionadas ao estabelecimento de modificações no balanço hidroeletrolítico renal que, por sua vez, contribuem para o desenvolvimento e/ou manutenção da hipertensão arterial observado em modelo experimental de programação fetal.

7. Anexos

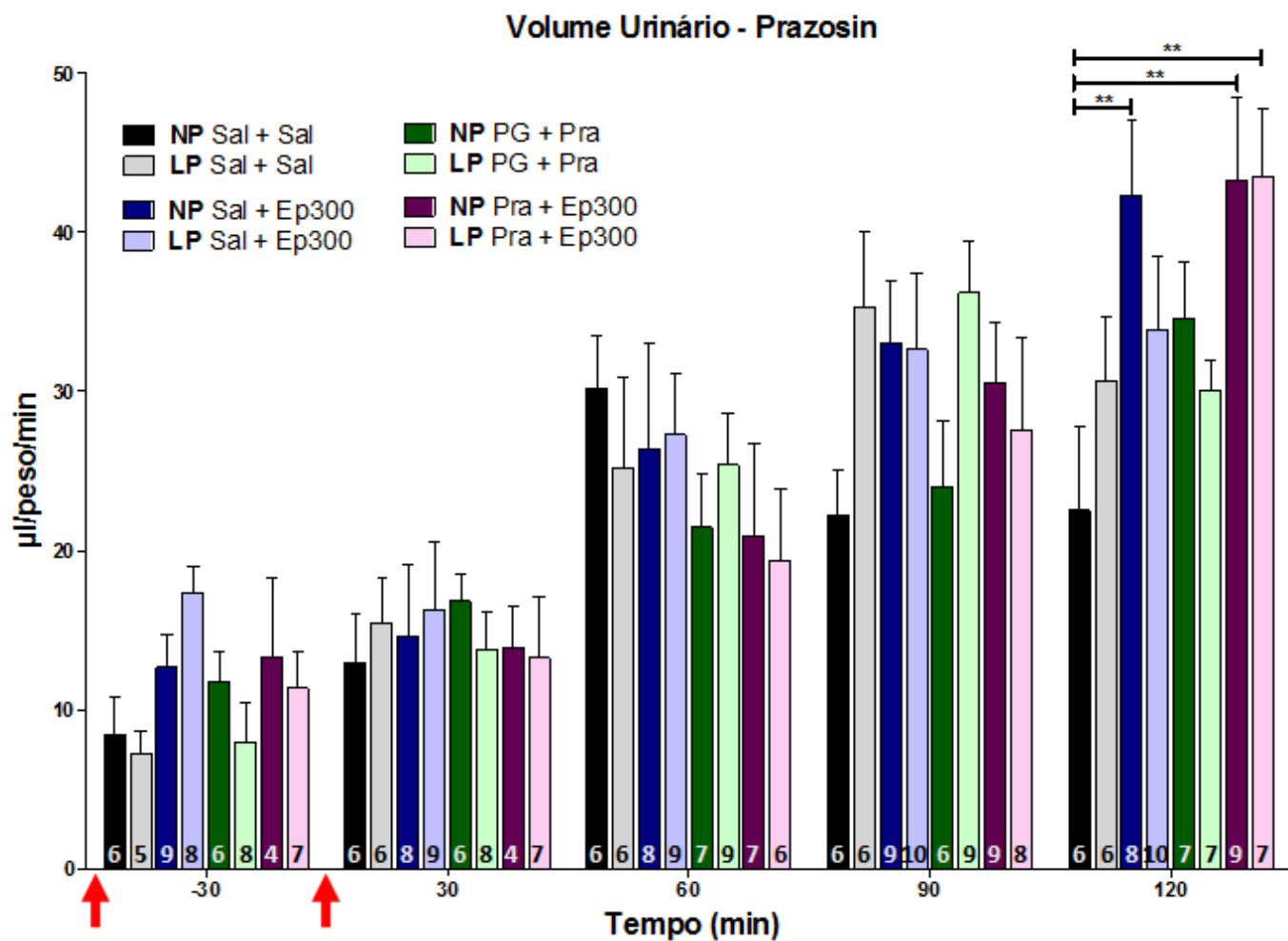


Figura 1: Volume urinário dos grupos NP e LP ao longo do tempo após microinjeção i.c.v. de Sal+Sal, Sal+Ep300, PG+Pra e Pra+Ep300. As setas indicam o momento das microinjeções. Valores representam média $\pm$ EPM. ANOVA posthoc Bonferroni $**p < 0,01$.

8. Referências Bibliográficas

Alexander BT, Hendon AE, Ferrell G, Dwyer TM. Renal denervation abolishes hypertension in low birth weight offspring from pregnant rats with reduced uterine perfusion. *Hypertension*. 2005; 45:754–758.

Abbott SB, Kanbar R, Bochorishvili G, Coates MB, Stornetta RL, Guyenet PG. C1 neurons excite locus coeruleus and A5 noradrenergic neurons along with sympathetic outflow in rats. *J Physiol*. 2012.

Aston-Jones G, Cohen JD. Adaptive gain and the role of the locus coeruleus-norepinephrine system in optimal performance. *J Comp Neurol*. 2005; 493:99-110.

Balt JC, Mathy MJ, Pfaffendorf M, Van Zwieten PA. Sympatho-inhibitory actions of irbesartan in pithed spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003;17:83-91.

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989; 2:577–580.

Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ*. 1990; 301:259–262.

Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM: Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993; 36:62–67.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004; 23:588S-95S.

Barker DJ e Bagby SP. Developmental antecedents of cardiovascular disease: a historical perspective. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16:2437-2544.

Beal AM, Bligh J. Diuretic effect of intraventricular and intravenous infusion of noradrenaline in conscious sheep. *Q. J. Exp. Physiol.* 1980; 65:321-333.

Benediktsson R, Calder AA, Edwards CR, Seckl JR. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997; 46:161-6.

Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens.* 1998; 1:335-347.

Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology.* 2001; 142:2841–2853.

Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA. Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): role of renal nerves. *Life Sci.* 2005; 76:1805-1815.

Brooks DP, Share L, Crofton JT. Central adrenergic control of vasopressin release. *Neuroendocrinology.* 1986; 42:416-420.

Bylund DB, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U Bylund DB¹, Eikenberg DC, Hieble JP, Langer SZ, Lefkowitz RJ, Minneman KP, Molinoff PB, Ruffolo RR Jr, Trendelenburg U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol Rev.* 1994; 46(2):121-36.

Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2011; 41(6):158-76.

Carter ME, Yizhar O, Chikahisa S, Nguyen H, Adamantidis A, Nishino S, Deisseroth K, de LL. Tuning arousal with optogenetic modulation of locus coeruleus neurons. *Nat Neurosci.* 2010; 13:1526-1533.

Chiu PJS, Sawyer WH. Third ventricular injection of hypertonic sodium chloride and natriuresis in cats. *Am J Physiol* 1974; 226:63-469.

Cohen Z, Molinatti G, & Hamel E. Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997; 17, 894-904.

Corrêa FM, Peres-Polon VL. Central alpha 1-adrenoceptors mediate the pressor response to intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanesthetized rats. *Neuropharmacology.* 1995; 34(7):793-8.

Dagan A, Gattineni J, Cook V, Baum M. Prenatal programming of rat proximal tubule Na⁺/H⁺ exchanger by dexamethasone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292:1230–1235.

Dagan A, Kwon HM, Dwarakanath V, Baum M. Effect of renal denervation on prenatal programming of hypertension and renal tubular transporter abundance. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008; 295:29–34.

Dagan A, Habib S, Gattineni J, Dwarakanath V, Baum M. Prenatal programming of rat thick ascending limb chloride transport by lowprotein diet and dexamethasone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009; 297:93–99.

Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurones in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurones. *Acta Physiol Scand.* 1964; 62:232:1–55.

Dahlström A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*. 1964; 20(7):398-9.

Dampney RA¹, Horiuchi J, Killinger S, Sheriff MJ, Tan PS, McDowall LM. Long-term regulation of arterial blood pressure by hypothalamic nuclei: some critical questions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005; 32:419-25.

De Jonge A, Knape JT, Van Meel JC, Kalkman HO, Wilffert B, Thoolen MJ, Timmermanns PB, Van Zwieten PA. Effect of converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade on the vasoconstriction mediated by α 1- and α 2-adrenoceptor stimulation in pithed normotensive rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1982; 321:309-313.

De Lima MC, Scabora JE, Lopes A, Mesquita FF, Torres D, Boer PA, Gontijo JA. Early changes of hypothalamic angiotensin II receptors expression in gestational protein-restricted offspring: effect on water intake, blood pressure and renal sodium handling. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2013; 14(3):271-82.

Dendorfer A, Raasch W, Tempel K, Dominiak P. Interactions between the renin-angiotensin system (RAS) and the sympathetic system. *Basic Res Cardiol*. 1998; 93: 24-29.

DiBona GF. Neural control of the kidney: functionally specific renal sympathetic nerve fibers. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 279:R1517-1524.

Duale H, Waki H, Howorth P, Kasparov S, Teschemacher AG, Paton JF. Restraining influence of A2 neurons in chronic control of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research* 2007; 76:184-193.

Eason MG, Liggett SB. Identification of a Gs coupling domain in the amino terminus of the third intracellular loop of the α_2A -adrenergic receptor. Evidence for distinct structural determinants that confer Gs versus Gi coupling. *J Biol Chem.* 1995; 270:24753–24760.

Edwards CR1, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet.* 1993; 34:355-357.

Eikenburg DC. Effects of captopril on vascular noradrenergic transmission in SHR. *Hypertension.* 1984; 6:660-665.

Erinoff L, Heller A, Oparil S. Prevention of hypertension in the SH rat: effects of differential central catecholamine depletion. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975; 150:748–754.

Esler MD, Lambert GW, Ferrier C, Kaye DM, Wallin BG, Kalff V, Kelly MJ, Jennings GL. Central nervous system noradrenergic control of sympathetic outflow in normotensive and hypertensive humans. *Clin Exp Hypertens.* 1995; 17:409–423.

Fillenz M. *Noradrenergic Neurons.* Cambridge: Cambridge University Press; 1990.

Forsdahl, S. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med.* 1967;31:91-95.

Loewi O. Über humorale Uebertragbarkeit der Herzenwirkung. *Pflügers Arch ges Physiol.* 1921; 237:504–514.

Fuxe K, Dahlström AB, Jonsson G, Marcellino D, Guescini M, Dam M, Manger P, & Agnati L. The discovery of central monoamine neurons gave volume transmission to the wired brain. *Prog Neurobiol.* 2010; 90:82-100.

Gale CR, Martyn CN, Kellingray S, Eastell R, Cooper C. Intrauterine programming of adult body composition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:267–272.

Ganong, W.F., Chalett, J., Jones, H., Jr., Kaplan, S.L., Karteszi, M., Stith, RD. & Van De Kar, L.D. Further characterization of putative alpha-adrenergic receptors in brain that affect blood pressure and the secretion of ACTH, GH and renin in dogs. *Endocrinol. Exp. (Bratisl).* 1982; 16:191-205.

Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15:183–187.

Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of health and disease: an overview. In: Gluckman PD and Hanson MA. *Developmental origins of health and disease.* Cambridge: Cambridge University Press; 2006. p. 1-5.

Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD, Hanson MA. Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of health and disease. *Pediatr Res.* 2007; 61(5 Pt 2):5R-10R.

Gontijo JA, Garcia WE, Figueiredo JF, Silva-Netto CR, Furtado MR. Renal water handling evaluated by lithium clearance following adrenergic and cholinergic stimulation of the lateral hypothalamic area. *Braz J Med Biol Res.* 1991; 24:837-842.

Gontijo JR, Kopp UC. Renal sensory receptor activation by calcitonin gene-related peptide. *Hypertension.* 1994; 23:1063-1067.

Gluckman PD, Hanson MA. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15:183–187.

Grindstaff RR, Cunningham JT. Cardiovascular regulation of vasopressin neurons in the supraoptic nucleus. *Exp Neurol* 2001; 171:219–226.

Haeusler G, Finch L, Thoenen H. Central adrenergic neurones and the initiation and development of experimental hypertension. *Experientia*. 1972; 28:1200–1203.

Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, Winter PD. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ*. 1991; 303:1019–1022.

Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992; 35:595–601.

Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. 2001; 60:5–20.

Hall JE, Granger JP, do Carmo JM, da Silva AA, Dubinion J, George E, Hamza S, Speed J, Hall ME. Hypertension: physiology and pathophysiology. *Compr Physiol*. 2012; 2:2393–2442.

Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav*. 2011; 59(3):279–89.

Hein L. Adrenoceptors and signal transduction in neurons. *Cell Tissue Res*. 2006; 326:541–551.

Huang HP¹, Zhu FP, Chen XW, Xu ZQ, Zhang CX, Zhou Z. Physiology of quantal norepinephrine release from somatodendritic sites of neurons in locus coeruleus. *Front Mol Neurosci*. 2012; 6:5:29.

Isaac L. Clonidine in the central nervous system: site and mechanism of hypotensive action. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1980; 2(Suppl. 1):S5–19.

Ishikawa S, Fujita N, Fujisawa G, Tsuboi Y, Sakuma N, Okada K, Saito T. Involvement of arginine vasopressin and renal sodium handling in pathogenesis of hyponatremia in elderly patients. *Endocr J.* 1996; 43:101-108.

Johns EJ, Kopp UC, DiBona GF. Neural control of renal function. *Compr Physiol.* 2011; 1:731-767.

Kasparov S & Teschemacher AG. Altered central catecholaminergic transmission and cardio-vascular disease. *Experimental Physiology.* 2008; 93:725-740.

Keller EA, Munaro NI, Orsinger OA. Perinatal undernutrition reduces alpha and beta adrenergic receptor binding in adult rat brain. *Science.* 1982; 215:1269-1270.

Kett MM, Denton KM. Renal Programming: cause for concern? *Am J Physiol Regul Comp Physiol.* 2011; 300:791-803.

Kimura T, Share L, Wang BC, Crofton JT. The role of central adrenoceptors in the control of vasopressin release and blood pressure. *Endocrinology.* 1981; 108:1829-1836.

Kimura T, Shoji M, Iitake K, Ota K, Matsui K, Yoshinaga K. The role of central α_1 - and α_2 -adrenoceptors in the regulation of vasopressin release and the cardiovascular system. *Endocrinology.* 1984; 114:1426-1432.

Koepeke JP, DiBona GF. Central adrenergic receptor control of renal function in conscious hypertensive rats. *Hypertension.* 1986; 8:133-141.

Landgraf R, Malkinson T, Horn T, Veale WL, Lederis K, Pittman QJ. Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am J Physiol* 1990; 258:155–159.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR. Maternal dietary protein restriction, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension. *Placenta*. 1996; 17:169–172.

Langley-Evans SC. Hypertension induced by foetal exposure to a maternal lowprotein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J. Hypertens*. 1997; 15:537–544.

Lazinski MJ, Shea AK, Steiner M. Effects of maternal prenatal stress on offspring development: a commentary. *Arch Womens Ment Health*. 2008; 11:363–375.

Leffler CW, Busija DW, Share L, Crofton JT, Brooks DP, Beasley DG, Green RS, Mirro R. Adrenergic mediation of vasopressin secretion in newborn pigs. *Am J Physiol*. 1987; 253(3 Pt 2):489-493.

Leon DA, Lithell HO, Vågerö D, Koupilová I, Mohsen R, Berglund L, Lithell UB, McKeigue PM. Reduced fetal growth rate and increased risk of death from ischaemic heart disease: cohort study of 15,000 Swedish men and women born 1915–29. *BMJ*. 1998; 317:241–245.

Lopes A, Torres DB, Rodrigues AJ, Cerqueira JJ, Pêgo JM, Sousa N, Gontijo JA, Boer PA. Gestational protein restriction induces CA3 dendritic atrophy in dorsal hippocampal neurons but does not alter learning and memory performance in adult offspring. *Int J Dev Neurosci*. 2013; 31(3):151-6.

Lovenberg W. Techniques for measurements of blood pressure. *Hypertension*. 1987; 9:15-16.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991; 156:38-50.

Manning J, Beutler K, Knepper MA, Vehaskari VM. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283:202–206.

McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev.* 2005; 85:571–633.

Meaney MJ, Szyf M, Seckl JR. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol Med.* 2007; 13:269-77.

Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant.* 2010; 25(2):380-388.

Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43(11):1010-1018.

Modi N, Thomas EL, Harrington TA, Uthaya S, Dore CJ, Bell JD. Determinants of adiposity during preweaning postnatal growth in appropriately grown and growth-restricted infants. *Pediatr Res.* 2006; 60:345–348.

Moore RY, Bloom FE. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. *Annu Rev Neurosci.* 1979; 2:113-168.

Morilak DA, Barrera G, Echevarria DJ, Garcia AS, Hernandez A, Ma S, Petre CO. Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2005; 29:1214-1224.

Morris M, McCann SM, Orlas R. Role of transmitters in mediating hypothalamic control of electrolyte excretion. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 1977; 55:1143-1154.

Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, Harris HW. Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:11663–11667.

Nishida Y, Hosomi H, Bishop VS. Long-term effects of AVP-induced neurohumoral interaction via area postrema on body fluid and blood pressure. *Am J Physiol*. 1997; 273:1696-703.

O'Donnell J, Zeppenfeld D, McConnell E, Pena S, & Nedergaard M (). Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem Res*. 2012; 37:2496-2512.

O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. Prenatal dexamethasone 'programmes' hypotension, but stress-induced hypertension in adult offspring. *J Endocrinol*. 2008; 196:343-352.

Onaka T, Luckman SM, Antonijevic I, Palmer JR, Leng G. Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarii to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience*. 1995; 66:403–412.

Oparil S, Chen Y-F, Peng S, Wyss JM. Anterior hypothalamic norepinephrine, atrial natriuretic peptide, and hypertension. *Front Neuroendocrinol*. 1996; 17:212–246.

Ota K1, Kimura T, Shoji M, Inoue M, Sato K, Ohta M, Yamamoto T, Tsunoda K, Abe K, Yoshinaga K. Effects of intracerebroventricular administration of adrenoceptor-agonists on the regulation of renal water and electrolytes handling through endocrine, renal and hemodynamic function. *Tohoku J Exp Med.* 1990; 162(1):27-39.

Patel KP, Ciriello J, Kline RL. Noradrenergic mechanisms in brain and peripheral organs after aortic nerve transection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1981; 240:481–486.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th ed. Amsterdam; Boston: Academic Press/Elsevier; 2007.

Raasch W, Dominiak P, Ziegler A, Dendorfer A. Reduction of vascular noradrenaline sensitivity by AT1 antagonists depends on functional sympathetic innervation. *Hypertension.* 2004; 44:346-351.

Randle JC, Mazurek M, Kneifel D, Dufresne J, Renaud LP. Alpha 1-adrenergic receptor activation releases vasopressin and oxytocin from perfused rat hypothalamic explants. *Neurosci Lett.* 1986; 65:219–223.

Rang HP, Dale MM. Pharmacology. 7th ed. Edinburgh: Elsevier/Churchill-Livingstone, 2012.

Reid IA, MacDonald DM, Pachnis B, Ganong WF. Studies concerning the mechanism of suppression of renin secretion by clonidine. *J Pharmacol Exp Ther.* 1975; 192:713-721.

Reis DJ, Doba N, Snyder DW, Nathan MA. Brain lesions and hypertension: chronic lability and elevation of arterial pressure produced by electrolytic lesions and 6-hydroxydopamine treatment of nucleus tractus solitarii (NTS) in rat and cat. *Progress in Brain Research* 1977; 47:169-188.

Reis DJ, Ross CA, Ruggiero DA, Granata AR, Joh TH. Role of adrenaline neurons of ventrolateral medulla (the C1 group) in the tonic phasic control of arterial pressure. *Clin Exp Hypertens*. 1984; 6:221-241.

Remaury A, Larrouy D, Daviaud D, Rouot B, Paris H. Coupling of the alpha 2-adrenergic receptor to the inhibitory G-protein Gi and adenylate cyclase in HT29 cells. *Biochem J*. 1993; 292:283–288.

Richer C, Doussau MP, Giudicelli JF: Influence of captopril and enalapril on regional vascular alpha-adrenergic receptor reactivity in SHR. *Hypertension*. 1984; 6:666-674.

Rogers JM, Ellis-Hutchings RG, Grey BE, Zucker RM, Norwood J Jr, Grace CE, Gordon CJ, Lau C. Elevated blood pressure in offspring of rats exposed to diverse chemicals during pregnancy. *Toxicol Sci*. 2014; 137(2):436-446.

Rohmeiss P, Beyer C, Nagy E, Tschöpe C, Hohle S, Strauch M, Unger T. NaCl injections in brain induce natriuresis and blood pressure responses sensitive to ANG II AT1 receptor. *Am J Physiol* 1995; 269:282–288.

Rose, G. Familial patterns in ischaemic heart disease. *Br J Prev and Soc Med*. 1964; 18:75-80.

Ruffolo RR Jr, Nichols AJ, Stadel JM, Hieble JP. Structure and function of alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Rev*. 1991; 43(4):475-505.

Russell V, Allie S & Wiggins T. Increased noradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder – the spontaneously hypertensive rat. *Behav Brain Res.* 2000; 117,69–74.

Seckl JR. Physiologic programming of the fetus. *Clin. Perinatol.* 1998; 25:939–964.

Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and longterm programming. *Eur J Endocrinol.* 2004; 151(suppl 3):U49–U62.

Sene LB, Mesquita FF, de Moraes LN, Santos DC, Carvalho R, Gontijo JAR, Boer PA. Involvement of renal corpuscle microRNA expression on epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats. *PLoS ONE.* 2013; 8(8):e71310.

Silva-Netto CR, Jackson RH, Colindres RE. Cholinergic stimulation of the hypothalamus and natriuresis in rats: role of the renal nerves. *Am J Physiol.* 1986; 250:322-328.

Snyder DW, Nathan MA & Reis DJ. Chronic lability of arterial pressure produced by selective destruction of the catecholamine innervation of the nucleus tractus solitarius in the rat. *Circ Res.* 1978; 43:662–671.

Song R, Spera M, Garrett C, Yosypiv IV. Angiotensin II-induced activation of c-Ret signaling is critical in ureteric bud branching morphogenesis. *Mech Dev.* 2010; 127:21–27.

Soto-Moyano R1, Alarcon S, Hernández A, Pérez H, Ruiz S, Carreño P, Kusch C, Belmar J. Prenatal malnutrition-induced functional alterations in callosal connections and in interhemispheric asymmetry in rats are prevented by reduction of noradrenaline synthesis during gestation. *J Nutr.* 1998; 128:1224-1231.

Starke K. Presynaptic autoreceptors in the third decade. Focus on α_2 -adrenoceptors. *J Neurochem.* 2001; 78:685–693.

Summers RJ1, McMartin LR. Adrenoceptors and their second messenger systems. *J Neurochem.* 1993; 60:10-23.

Szabadi E. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *J Psychopharmacol.* 2013; 27(8):659-693.

Szabadi E, Bradshaw CM (Eds.). *Adrenoceptors: Structure, Mechanisms, Function, Advances in Pharmacological Sciences.* Basel: Birkhauser Verlag; 1991.

Tang F, Lane S, Korsak A, Paton JF, Gourine AV, Kasparov S, & Teschemacher AG. Lactate-mediated glia-neuronal signaling in the mammalian brain. *Nature Communications.* 2014; 5:3284.

Teschemacher AG, Wang S, Raizada MK, Paton JF, Kasparov S. Area-specific differences in transmitter release in central catecholaminergic neurons of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2008; 52:351-358.

Tsuda K, Masuyama Y. Presynaptic regulation of neurotransmitter release in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1991; 18:455-467.

Veerasingham SJ1, Yamazato M, Berecek KH, Wyss JM, Raizada MK. Increased PI3-kinase in presympathetic brain areas of the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 2005; 96:277-279.

Vaccari B, Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Fetal kidney programming by severe food restriction: Effects on structure, hormonal receptor expression and urinary sodium excretion in rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2013; 0(0):1–14.

Vogt M. The concentration of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after administration of drugs. *J Physiol.* 1954; 123:451–481.

Von Euler US. The nature of adrenergic nerve mediators. *Pharmacol Rev.* 1951; 3:247–277.

Wade SM, Lim WK, Lan KL, Chung DA, Namamori M, Neubig RR. G(i) activator region of $\alpha(2A)$ -adrenergic receptors: distinct basic residues mediate G(i) versus G(s) activation. *Mol Pharmacol.* 1999; 56:1005–1013.

Wainford RD, Kurtz K, Kapusta DR. Central G-alpha subunit protein-mediated control of cardiovascular function, urine output, and vasopressin secretion in conscious Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol.* 2008; 295:535–542.

Wainford RD, Kapusta DR. Hypothalamic paraventricular nucleus G alpha q subunit protein pathways mediate vasopressin dysregulation and fluid retention in salt-sensitive rats. *Endocrinology.* 2010; 151(11):5403-5414.

Wainford RD, Kapusta DR. Functional selectivity of central $G\alpha$ -subunit proteins in mediating the cardiovascular and renal excretory responses evoked by central $\alpha(2)$ -adrenoceptor activation in vivo. *Br J Pharmacol.* 2012; 166(1):210-20.

Whincup PH, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S, Barrett-Connor E, Bhargava SK, Birgisdottir BE, Carlsson S, de Rooij SR, Dyck RF, Eriksson JG, Falkner B, Fall C, Forsén T, Grill V, Gudnason V, Hulman S, Hyppönen E, Jeffreys M, Lawlor DA, Leon DA, Minami J, Mishra G, Osmond C, Power C, Rich-Edwards JW, Roseboom TJ, Sachdev HS, Syddall H, Thorsdottir I, Vanhala M, Wadsworth M, Yarbrough DE. Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *JAMA.* 2008; 300:2886–2897.

Wolff DW, Gesek FA, Strandhoy JW. In vivo assessment of rat renal alpha adrenoceptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987; 241:472–476.

Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman PD. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res*. 1996; 40(3):438-43.

Yosypiv IV. Renin-angiotensin system-growth factor cross-talk: a novel mechanism for ureteric bud morphogenesis. *Pediatr Nephrol*. 2009; 24:1113–1120.

Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and Kidney Disease: the role of fetal programming. *Hypertension*. 2006; 77:502-508.