



UNICAMP

VINICIUS CANALE

**ESTUDO FUNCIONAL E MORFOLÓGICO RENAL DA PROLE DE
RATOS CUJAS MÃES FORAM SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO
PROTEICA GESTACIONAL: EFEITO DO TRATAMENTO COM
RAPAMICINA**

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

VINICIUS CANALE

**ESTUDO FUNCIONAL E MORFOLÓGICO RENAL DA PROLE DE
RATOS CUJAS MÃES FORAM SUBMETIDAS À RESTRIÇÃO
PROTEICA GESTACIONAL: EFEITO DO TRATAMENTO COM
RAPAMICINA**

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo

Coorientadora: Dra. Flávia Fernandes Mesquita

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 Mestre em Ciências.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE
APRESENTADA PELO ALUNO VINICIUS CANALE E ORIENTADO
PELO PROF. DR. JOSÉ ANTÔNIO 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

C16e Canale, Vinicius, 1986-
Estudo funcional e morfológico renal da prole de ratos cujas mães foram submetidas à restrição proteica gestacional : efeito do tratamento com rapamicina / Vinicius Canale. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Jose Antonio Rocha Gontijo.
Coorientador: Flávia Fernandes Mesquita.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Desnutrição proteica. 2. mTORC1. 3. Proteinúria. 4. Hipertensão. 5. Retardo do crescimento fetal. 6. Sirolimo. I. Gontijo, Jose Antonio Rocha, 1986-. II. Mesquita, Flávia Fernandes. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The functional and morphological renal study and the rapamycin treatment effects in the male offspring rats whose mother underwent gestational protein restriction

Palavras-chave em inglês:

Protein malnutrition

mTORC1

Proteinuria

Hypertension

Fetal growth retardation

Sirolimus

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Jose Antonio Rocha Gontijo [Orientador]

Marilda Mazzali

Terezila Machado Coimbra

Data de defesa: 30-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

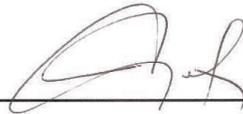
VINICIUS CANALE

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

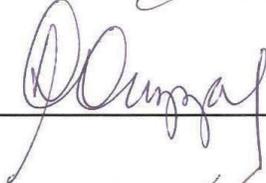
Coorientador (a) PROF(A). DR(A). FLÁVIA FERNANDES MESQUITA

MEMBROS:

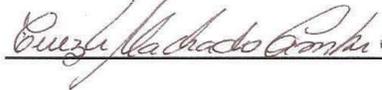
1. PROF(A). DR(A). JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO



2. PROF(A). DR(A). MARILDA MAZZALI



3. PROF(A). DR(A). TEREZILA MACHADO COIMBRA



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

Data: 30 de maio de 2014

*Amar o perdido
deixa confundido
este coração.*

*Nada pode o olvido
contra o sem sentido
apelo do não.*

*As coisas tangíveis
tornam-se insensíveis
à palma da mão.*

*Mas as coisas fúndas,
muito mais que lindas,
essas ficarão.*

Carlos Drummond de Andrade

*Este trabalho é dedicado com todo o meu amor e saudade à
Helena Maria Canale Barros, in memoriam.*

AGRADECIMENTOS

Não pouparei palavras aqui.

Agradeço a Deus pelo dom da vida. Por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho que foi árduo e desafiador desde o início, repleto de dificuldades profissionais e pessoais que, no entanto, me ajudaram a amadurecer como aluno, pesquisador e ser humano. Agradeço por todos os obstáculos e por muitas vezes Ele não dar ouvidos às minhas lamentações porque agora, vejo o quanto Ele me ama e como seus caminhos são os melhores.

Agradeço aos meus pais pela educação, pelos valores, pela fé e por todos os sacrifícios já feitos para que pudessem proporcionar um futuro profissional a cada um dos seis filhos. Agradeço a minha família, cunhados, por serem exatamente aquilo que preciso para me tornar uma pessoa melhor. Eles sabem o quanto do meu “tempo livre” foi sacrificado para a confecção deste trabalho. Agradeço por aturarem as minhas crises, minha falta de paciência, por cada sorriso proporcionado, cada lágrima derramada juntos...

Agradeço a Arielle Salgado que mesmo distante foi capaz de me proporcionar carinho, paz, esperança e amor. Sua participação foi importante não apenas em ser os ouvidos atentos e o conforto nas horas difíceis, mas também, por me motivar e me apoiar a ampliar os horizontes e ir a busca de novos sonhos que antes os meus medos não me permitiam.

Ao professor Dr. José Antonio Rocha Gontijo por me permitir desenvolver este trabalho em seu laboratório sob sua orientação, pela confiança e por sempre motivar seus alunos a adquirirem um melhor senso crítico científico.

A minha coorientadora Dra. Flávia Fernandes Mesquita por, muito mais do que valiosos conselhos e orientações científicas, ser um exemplo de conduta profissional e ética.

A professora Dra. Patrícia Aline Boer por estar constantemente presente no laboratório e por sua disposição em ajudar e contribuir no desenvolvimento deste, e

de todos os outros trabalhos em andamento no laboratório de metabolismo hidrossalino.

Agradeço à todos os atuais colegas de trabalho Noemi, Agnes, Dani, Helô, Alessandra, Gabriel, Ana Letícia, Silmara e Jéssica pelo bom convívio e pelo bom ambiente de trabalho. Obrigado por em certos minutos cruciais, darem aquela ajuda em que parecia que todo o trabalho de 2 anos poderia estar indo por água abaixo. Agradeço também por todos os outros alunos que já passaram pelo laboratório de metabolismo hidrossalino na qual tive o prazer de trabalhar conjuntamente.

De forma especial, agradeço à Ize por ter me ajudado imensamente com os experimentos principalmente na reta final. Muito mais do que a ajuda técnica e prática de bióloga, obrigado pelas conversas, conselhos e desabafos me ajudando como uma verdadeira psicóloga! De forma especial também à trupe: Bahzinha, Augustinho e Locão (Daniel) pelo excelente convívio, companheirismo, ajuda, risadas, desabafos, happy hours, etc. Já não os chamo de colegas de trabalho, mas sim, amigos.

Agradeço ao Prof. Dr. Nelson Lutaif, Profa. Dra. Marilda Mazzali e ao representante da Pfizer, pela valiosa Rapamicina e pelo livro no qual pude apenas começar a entender a complexa atividade molecular da mTOR.

Ao Prof. Dr. Carlos Lenz Cesar do Instituto de Física e aos funcionários do INFABIC, Mariana e Vitor pela ajuda, suporte técnico e extrema boa vontade na aquisição das imagens por microscopia confocal.

Aos alunos e técnicos do laboratório de fisiopatologia renal, Camila, Virgínia e Elisa pela ajuda com anticorpos e corte dos tecidos renais.

A todos os funcionários do Núcleo de Medicina Experimental, funcionários do biotério, às meninas da limpeza (em especial à Cida e Ivonete) e a todos que contribuíram em algum momento direta e indiretamente para a execução deste trabalho.

Agradeço à UNICAMP e ao Programa de Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas.

À CAPES e FAPESP pelo financiamento deste trabalho.

*“Não tenho talento especial algum.
Sou apenas apaixonadamente curioso”.*

Albert Einstein

“Estando em viagem, entrou numa aldeia, e certa mulher chamada Marta, recebeu-o em sua casa. Sua irmã chamada Maria, ficou sentada aos pés do Senhor, escutando-lhe a palavra. Marta estava ocupada pelo muito serviço e, parando por fim, disse: ‘Senhor, a ti não importa que minha irmã me deixe assim sozinha a fazer o serviço? Dize-lhe, pois, que me ajude’. O Senhor, porém respondeu: ‘Marta, Marta, tu te inquietas e te agitas por muitas coisas, no entanto, pouca coisa é necessária, até mesmo uma só. Maria, com efeito, escolheu a melhor parte, que não lhe será tirada”.

Lucas 10, 38-42

RESUMO

Já está bem documentado que a dieta hipoproteica em ratos durante a gestação produz efeitos no crescimento fetal, uma persistente elevação na pressão arterial e disfunções no desenvolvimento renal da prole. Alterações na pressão arterial parecem estar relacionadas à acentuada redução no número de nefros que acaba por causar um quadro de hipertrofia e hiperfluxo nos nefros remanescentes como adaptação para equilibrar a taxa de filtração, no entanto, os mecanismos utilizados para esta adaptação culminam com o surgimento de albuminúria. Este processo acaba por causar esclerose glomerular culminando em um ciclo, comprometendo cada vez mais os nefros remanescentes. O desenvolvimento deste quadro pode levar à síndrome nefrótica e posteriormente à doença renal terminal. Acredita-se que o principal fator atuante na programação fetal neste modelo é devido à exposição exacerbada do feto aos glicocorticoides materno, o que acaba por comprometer a correto desenvolvimento e diferenciação de tecidos e órgãos, e na expressão ou atividade de uma série de receptores e enzimas. Recentemente, tem surgido a hipótese de que a atividade da mTORC poderia estar envolvida no surgimento de doenças na idade adulta neste modelo experimental. Este trabalho teve por objetivo avaliar se a inibição da mTORC através do tratamento com rapamicina em animais programados poderia ser benéfico, inibindo o surgimento de complicações relacionadas com a estrutura glomerular e como seria seu efeitos sistêmico, sobre a função renal e pressão arterial sistêmica. Ratos Wistar receberam ração com baixa proteína (6% LP) e dieta controle (17% NP) durante o período gestacional. A prole de machos foi tratada com rapamicina diluída em DMSO (5%) e administrada via intraperitoneal na dose de 1mg/kg, 3 vezes por semana, a partir da 4^a semana de vida até a 12^a semana. A aferição da pressão arterial sistólica foi realizada nas idades 8, 12 e 16. Foi observado que nos grupos que receberam rapamicina, a pressão artéria sistólica elevou-se consideravelmente em todas as idades. A avaliação da função renal foi realizada através de clearance de creatinina e lítio nas mesmas idades e

observamos que durante todo o tratamento, o grupo NP que recebeu rapamicina excretou mais sódio, na porção pós-proximal do túbulo. Além disso, não houve diferença na taxa da filtração glomerular em nenhuma das idades. Quando a proteinúria foi avaliada, observamos que o grupo programado LP sem rapamicina, apresentou evolução com o passar das semanas sendo significativamente maior a partir das 12^a e 16^a semanas, no entanto, os grupos que receberam rapamicina, não apresentaram a mesma evolução, indicando preservação da estrutura glomerular. Os presentes resultados demonstram que apesar de a rapamicina ter elevado a pressão arterial em ambos os grupos, há uma indicação de que os animais programados tem um controle menos eficaz no controle da pressão arterial através da função renal. Mesmo diante da pressão elevada, a rapamicina foi capaz de inibir injúrias à barreira de filtração.

ABSTRACT

It is well established that a low protein diet in rats during pregnancy causes effects on fetal growth, a persistent elevation in blood pressure and renal dysfunction in the offspring at a later age. Alterations in blood pressure seem to be related to the marked reduction in the number of nephrons which ultimately causes an overflow and hypertrophy in the remaining nephrons in the attempt to adapt its balance on the filtration rate. However, the mechanisms used for this adaptation results in the appearance of albuminuria. This process might cause glomerular sclerosis culminating in a cycle, increasing the damage to the remaining nephrons. The development of this framework can lead to nephrotic syndrome and subsequently to ESRD. It is believed that the main factor in the fetal programming model is the fetus overexposure to maternal glucocorticoids, which ultimately compromises the proper development and differentiation of tissues and organs. Additionally, the expression and the activity of a number of receptors and enzymes is also affected. Recently, in this experimental model, there has arisen the hypothesis that the activity of mTORC could be involved in the onset of disease in adulthood. This study assess whether the inhibition of mTORC, through the treatment with rapamycin in programmed animals, could be beneficial by inhibiting the onset complications related to glomerular structure and its affect on renal function and blood pressure. Wistar female rats were fed with low protein (6 % LP) or control diet (17 % NP) during pregnancy. The male offspring were treated with rapamycin diluted in DMSO (5 %) and administered intraperitoneally at a dose of 1mg/kg, 3 times per week, from the 4th week of life until the 12th week. The measurement of systolic blood pressure was measured at 8, 12, and 16 weeks old. We noticed that in the groups treated with rapamycin the arterial systolic pressure rose considerably in all ages. The assessment of renal function was performed by creatinine clearance and lithium at the same ages as the blood pressures assessment. The NPR group that received rapamycin had an increase in sodium excretion at the post- proximal tubule during the whole treatment. Additionally,

there was no difference in the rate of glomerular filtration rate at any age among the groups. When proteinuria was assessed, we found that the programmed Group LP without rapamycin, showed an increase along the weeks and as expected, the groups that have received rapamycin did not show the same trend, indicating preservation in the glomerular structure. The present results demonstrate that rapamycin caused increase in the blood pressure in both groups however, it was able still to inhibit the injury into the filtration barrier. Additionally, there is an indication that the programmed animals, has a less effective control in the blood pressure and the excretion of sodium, even when the treatment is interrupted.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

11 β -HSD2	11 Beta hidróxido esteroide desidrogenase do tipo 2
4EBP1	<i>Eukaryote initiation factor binding protein 1</i>
AMP	<i>Adenosine monophosphate-activated protein</i>
ANOVA	Análise de variância
ATG1	<i>Autophagy regulatory kinase 1</i>
BCAA	Aminoácidos de cadeia ramificada
CCr	Clearance de creatinina
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas da Unicamp
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
CK	<i>Clearance</i> de potássio
CLi	<i>Clearance</i> de Lítio
CNa	<i>Clearance</i> de sódio
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FE K ⁺	Fração de excreção de potássio
FE Na ⁺	Fração de excreção de sódio
FEP Na ⁺	Fração de excreção proximal de sódio
FEPP Na ⁺	Fração de excreção pós-proximal de sódio

Freq	Frequência Cardíaca
Freq SD	Desvio padrão da média da frequência cardíaca
HPA	Hipotálamo – Pituitária – Adrenal
IGF-1	Fator de Crescimento <i>Insulin-Like</i> – 1
IUGR	<i>Intra uterine growth restriction</i>
kDa	Quilo Dalton
KO	<i>Knock out</i>
Méd Sis	Média pressão arterial sistólica
mEq	Mili equivalentes
mmHG	Milímetros de mercúrio
mTORC1	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 1</i>
mTORC2	<i>Mammalian Target of Rapamycin Complex 2</i>
P.A.S.	Pressão arterial sistólica
PI3	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RPM	Rotações por minuto
S6K	<i>Ribossomal kinase S6</i>
SD Sis	Desvio padrão da média da pressão arterial sistólica
SRA	Sistema renina angiotensina
TFG	Taxa de filtração glomerular
TORC	<i>Target of Rapamycin Complex</i>
TSC1	<i>Tuberous sclerosis 1</i>
VEGF	Fator de Crescimento Vascular Endotelial

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados totais da mensuração da massa corporal.....90

Tabela 2. Dados totais da aferição arterial sistólica.....91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Figura representativa do preparo da rapamicina.	43
Figura 2. Figura representativa da aferição da pressão arterial	44
Figura 3. Figura representativa do software Image J.....	48
Figura 4. Imunolocalização da Nefrina nos glomérulos de animais com 16 semanas.....	63
Figura 5. Imunolocalização de Podocina nos glomérulos de animais com 16 semanas.....	64
Figura 6. Merge das fotomicrografias nefrina e podocina.....	65
Figura 7. Merge em maior detalhe da estrutura de fenestração.	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Evolução do ganho de massa corporal ao nascimento	51
Gráfico 2. Massa corporal dos animais ao longo do tratamento.	52
Gráfico 3. Ganho da massa corporal ao longo do tratamento.	53
Gráfico 4. Pressão Arterial Sistólica com 8 semanas.	54
Gráfico 5. Pressão Arterial Sistólica com 12 semanas.	54
Gráfico 6. Pressão Arterial Sistólica com 16 semanas	54
Gráfico 7. Evolução da pressão arterial ao longo do tratamento.....	55
Gráfico 8. Taxa de Filtração Glomerular 8 semanas	56
Gráfico 9. Fração de Excreção Proximal de Na ⁺ 8 semanas	56
Gráfico 10. Fração de Excreção Pós-Proximal de Na ⁺ 8 semanas	56
Gráfico 11. Fração de Excreção de Na ⁺ 8 semanas.	56
Gráfico 12. Fração de Excreção de Potássio 8 semanas	57
Gráfico 13. Taxa de Filtração Glomerular 12 semanas.	57
Gráfico 15. Fração de Excreção Pós-Proximal de Na ⁺ 12 semanas.	58
Gráfico 16. Fração de Excreção de Na ⁺ 12 semanas..	58
Gráfico 17. Fração de Excreção de Potássio 12 semanas..	58
Gráfico 18. Taxa de Filtração Glomerular 16 semanas	59
Gráfico 19. Fração de Excreção Proximal de Na ⁺ 16 semanas.	59
Gráfico 20. Fração de Excreção Pós-Proximal de Na ⁺ 16 semanas	59
Gráfico 21. Fração de Excreção de Na ⁺ 16 semanas	59
Gráfico 22. Fração de Excreção de Potássio 16 semanas.	60
Gráfico 23. Evolução da Proteinúria.	60
Gráfico 24. Expressão de Nefrina por western blotting	61
Gráfico 25. Área do tufo glomerular.....	62
Gráfico 26. Intensidade de pixels da nefrina.	62
Gráfico 27. Intensidade de pixels da podocina	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1 Programação Fetal: Evidências Epidemiológicas e Experimentais ..	28
1.2 A Dieta Hipoproteica Gestacional e seus Efeitos sobre a Pressão Arterial Sistêmica e a Estrutura Glomerular	31
1.3 Implicação da mTORC para a função e desordem glomerular	35
1.4 Objetivos.....	39
2 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3 RESULTADOS	50
3.1 Dados ao nascimento	51
3.1.1 Massa corporal do nascimento à lactação.....	51
3.1.2 Ganho ponderal do início da administração de Rapamicina ao final do tratamento.....	51
3.2 Evolução da Pressão Arterial nos diferentes grupos estudados	53
3.3 Resultados da Função Renal	55
3.3.1 Estudo da Função Renal nos animais com 8 semanas	55
3.3.2 Estudo da Função Renal nos animais com 12 semanas	57
3.3.3. Estudo da Função Renal nos animais de 16 semanas.....	58
3.4 Resultados da Proteinúria.....	60
3.5 Estudo da Expressão Renal de Nefrina.....	61
3.5.1 Expressão de Nefrina por western blotting	61
3.6 Análise da estrutura glomerular	62
3.6.1 Área glomerular	62
3.6.2 Intensidade de pixels pela imunomarcacão	62
3.6.3 Imunolocalização de nefrina	63
3.6.4 Imunolocalização de Podocina	64
3.6.5 Merge das marcações para nefrina e podocina.....	65

3.6.6	Análise ampliada das imagens	66
4	DISCUSSÃO.....	67
4.1	Sobre os efeitos da programação fetal no peso corporal da prole de machos ao nascimento	68
4.2	Sobre o efeito da rapamicina: no peso corporal da prole durante o tratamento	68
4.3	Sobre a pressão arterial sistólica	69
4.4	Sobre o efeito da rapamicina na função renal	71
4.5	Sobre o efeito da rapamicina na proteinúria	72
4.6	Discussão sobre a expressão de Nefrina	74
4.7	Sobre a estrutura glomerular	75
5	CONCLUSÃO	76
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
7	ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO



É cada vez mais evidente que as interações genes e fatores ambientais são capazes de alterar nosso estado de saúde e promover doença na vida adulta, principalmente, se estas alterações ocorrem no período intrauterino ou inicial da vida pós-natal. Nos últimos anos, evidências demonstram que exposições à fatores externos, principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento intrauterino, são particularmente importantes levando em consideração, o período de desenvolvimento dos tecidos e órgãos, estabelecendo adaptações morfofuncionais na prole necessárias para que esta responda aos desafios impostos pelo ambiente (LANGLEY-EVANS 2009).

Nas ultimas décadas houve grande avanço no entendimento de como estes fatores interagem de maneira epigenética acarretando alterações fenotípicas na ausência de modificações genômicas permitindo que haja transmissão hereditária adaptativa fisiológica ou relacionada ao desenvolvimento das doenças na vida adulta.

1.1 Programação Fetal: Evidências Epidemiológicas e Experimentais

Há diversos estudos epidemiológicos e de coorte históricos que exemplificam como a interação dos fatores ambientais durante o período gestacional é capaz de determinar alterações na saúde de indivíduos ou populações na idade adulta. Em um destes estudos, investigou-se pessoas que foram gestadas durante a “*Fome Holandesa*”, período em que houve uma escassez severa de alimento em regiões da Europa, durante e após a II Guerra Mundial devido ao corte de suprimentos imposto pelo exército alemão. Resumidamente, os achados deste estudo mostraram: recém-nascidos menores, com baixo peso ao nascer associado a reduzida circunferência craniana (ROSEBOOM et al. 2001). Na idade adulta, estes indivíduos apresentaram alterações no metabolismo da glicose, intolerância à insulina, problemas coronarianos, elevação da pressão arterial, dislipidemia e obesidade. Observou-se também que cada complicação encontrada na vida adulta estava associada a

exposição à fome durante períodos específicos do desenvolvimento gestacional (PAINTER et al. 2005; ROSEBBOM et al. 2006), sendo que os indivíduos expostos à fome no início da gestação, foram os que apresentaram maiores complicações na idade adulta.

Barker e Osmond (1986), através de investigações epidemiológicas, conseguiram identificar uma correlação positiva entre os níveis de mortalidade infantil e a taxa de mortalidade em adultos como consequência de doenças coronarianas (BARKER e OSMOND 1986). Mais tarde em outro estudo, foi possível identificar correlação entre o baixo peso ao nascer e doenças coronárias da idade adulta (BARKER et al 1989) sendo sugerido por estes autores que a desnutrição durante a gestação poderia contribuir para o baixo peso ao nascer e que conseqüentemente, estar associado a problemas cardiovasculares e desajustes metabólicos na idade adulta, em resposta à desnutrição que permanentemente alterou estruturas, funções e o metabolismo corpóreo (BARKER et al. 1993). Hales e Barker (2013) concluíram que a exposição a fatores nutricionais durante a gestação, determina a adaptabilidade funcional de órgãos e sistemas e a susceptibilidade do recém-nascido ao desenvolvimento de doenças na vida adulta. Desta forma, o ambiente intrauterino, *a priori*, determina as possíveis circunstâncias ambientais as quais o feto estará exposto após o nascimento e, as modificações estruturais e funcionais que permitiriam ao recém-nato maiores chances de sobrevivência. Na maioria das vezes, no entanto, estas modificações contribuem para o desenvolvimento de doenças em longo prazo, se estas adaptações são contraditórias com o ambiente encontrado após o nascimento (HALES e BARKER 2013).

Com base nos dados encontrados nestes estudos, muitos modelos experimentais em animais de várias espécies têm sido propostos na tentativa de elucidar este fenômeno denominado então como “Programação Fetal”. A programação fetal pressupõe que alterações nas funções de órgãos específicos é resultado da exposição intrauterina à condições ambientais adversas (HOET e HANSON, 1999; ARMITAGE et al. 2004). De fato, os estudos desenvolvidos em

modelos animais até o momento, tem proporcionado uma vasta gama de conhecimento sobre as alterações e resposta do embrião/feto ainda *in utero*, com posterior avaliação das respostas permanentes que tais animais apresentam na idade adulta. Um grande número de estudos sobre programação fetal em camundongos, ratos e ovelhas (RAE et al. 2001) tem sido desenvolvidos com a exposição intrauterina da prole a diferentes fatores dentre os quais, hipóxia placentária, tabagismo (SUTER et al. 2013), estresse nutricional (BISPHAM et al. 2003), e estado vigil (THOMAL et al. 2010) e, avaliando como estes afetam as funções reprodutiva (GUZMAN et al. 2006; RHIND et al. 2001), renal (MESQUITA et al. 2010) e o perfil metabólico (TAMASHIRO e MORAN 2010; BERTRAM e HANSON 2001) destes animais.

Em modelos nos quais se utiliza o estado nutricional materno como um fator de insulto tem sido demonstrado que um dos mecanismos pelos quais ocorre a programação envolve a ativação do eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA), resultando em uma excessiva liberação materna de glicocorticoides. Os mecanismos envolvidos na regulação da passagem de glicocorticoides maternos através da placenta para o feto são reconhecidos como determinantes para o desenvolvimento intrauterino e as manifestações pós-natais. A passagem de glicocorticoides através da mãe para o feto, é regulada principalmente pela barreira placentária, tendo como principal componente a enzima 11 β -hidróxido-esteroide-desidrogenase do tipo 2 (11 β -HSD2) que catalisa a conversão de glicocorticoides ativos em metabólitos inertes (MARK et al. 2009; ÖSTREICHER et al. 2010). No entanto, estudos tem demonstrado que sob condições crônicas de estresse (estresse materno físico ou emocional, ou administração de corticosterona ou dexametasona), ha uma redução nos níveis placentários de 11 β -HSD2, proporcionando alterações na idade adulta da prole da expressão hipocampal para os receptores de glicocorticoides (GR) e mineralocorticoides (MR) (LEVITT et al. 1996; TAMASHIRO e MORAN 2010; LOPES et al, 2013). Welberg e colaboradores (2005), relataram que o estresse agudo (através da restrição dos movimentos) no período gestacional, é capaz de elevar a atividade enzimática da 11 β -HSD2 em 160%, aumentando a eficiência da barreira

placentária, porém, nas situações de estresse crônico, aonde os movimentos foram restringidos por longos períodos, a atividade da enzima caiu consideravelmente, permitindo que altos níveis de glicocorticoides atravessassem a barreira placentária chegando até o embrião ou feto (WELBERG et al. 2005).

Sabe-se que os glicocorticoides tem papel fundamental durante o desenvolvimento, influenciando na diferenciação e maturação das células e tecidos. As consequências na expressão fenotípica frente a uma superexposição pré-natal aos glicocorticoides podem não ser evidentes logo após o nascimento, porém, a influência que ele exerce durante a gestação pode emergir na vida adulta, quando a demanda dos tecidos aumenta com a puberdade, gestação, envelhecimento ou como resposta a insultos ambientais (FOWDEN e FORHEAD 2008).

As alterações morfológicas induzidas pelos glicocorticoides estão relacionadas com uma maturação prematura das linhagens celulares, proporcionando uma redução na celularidade dos tecidos e órgãos. Estas modificações comprometem a funcionalidade destes órgãos frente às necessidades e demandas de elevação da carga funcional. Os glicocorticoides podem também interferir na expressão de receptores, canais iônicos, transportadores, enzimas, fatores de crescimento e na cascata de sinalização pós-receptora. Estas alterações acabam por interagir promovendo o surgimento de doenças na vida adulta (FOWDEN e FORHEAD 2009).

1.2 A Dieta Hipoproteica Gestacional e seus Efeitos sobre a Pressão Arterial Sistêmica e a Estrutura Glomerular

O modelo de programação fetal utilizando a dieta hipoproteica é denominado na literatura como modelo de Restrição do Crescimento Intrauterino (IUGR, sigla em inglês). Está bem definido que a dieta hipoproteica em ratos durante a gestação e/ou lactação, produz efeitos sobre o crescimento fetal, uma persistente elevação na pressão arterial e disfunções no desenvolvimento

estrutural e funcional renal da prole (LANGLEY-EVANS 2009; MESQUITA et al. 2010). Estudos demonstram que não há alterações significativas nos níveis de renina e angiotensina II (AngII) plasmáticas neste modelo, porém, outros demonstram que o aumento na atividade do sistema renina angiotensina-aldosterona resulta de uma elevada atividade na enzima conversora de angiotensina (ECA) e da expressão dos receptores do tipo 1 de AngII nos rins (MESQUITA et al., 2010; McMULLEN et al. 2004; VEHASKARI et al. 2001; LANGLEY-EVANS e JACKSON, 1995). Alterações na pressão arterial sistêmica neste modelo experimental parecem estar relacionadas à acentuada redução no número de nefros com redução da excreção urinária de sódio, além de demonstrada disfunção local da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAS) (MESQUITA et al. 2010). Estudos recentes em nosso laboratório identificaram que os animais que sofreram IUGR apresentaram, na idade adulta, massiva proteinúria, simplificação podocitária, redução na massa renal e aumento na expressão de TGF- β glomerular (SENE et al. 2013). Outros achados incluem: redução na expressão dos receptores de tipo I de AngII na região hipotalâmica e no núcleo do trato solitário (NTS), queda na marcação de central de vasopressina e do número de neurônios do NTS (LIMA et al. 2013; SCABORA et al. 2013).

Como descrito acima, durante a restrição proteica gestacional outro achado importante associado a hipertensão arterial foi a queda no número de nefros. Esta redução do número de unidades funcionais renais causa uma situação de hipertrofia e hiperfluxo dos nefros remanescentes como um mecanismo adaptativo no sentido de manter próximo ao normal a taxa de filtração glomerular, no entanto, em longo prazo estas alterações hemodinâmicas glomerulares tem como consequência a elevação na reabsorção tubular de sódio, elevação da pressão intraglomerular que culmina com alterações morfológicas e funcionais de células epiteliais glomerulares e, o surgimento de albuminúria (PUDDU et al. 2009; HOSTETTER et al. 2001). Este processo promove a esclerose glomerular culminando em um ciclo, comprometendo cada vez mais a função dos nefros remanescentes (BRENNER e ANDERSON 1992). Na verdade,

a hiperfiltração é modulada por diversos fatores humorais dentre os quais se incluem o sistema renina-angiotensina (RAS), a liberação de VEGF-1, de fator de crescimento insulina-like (IGF-1), e de óxido nítrico (SCHREUDER 2006).

Para compreender melhor a hiperfiltração e conseqüentemente os danos ao glomérulo exercido pela elevação da pressão intraglomerular em longo prazo, é importante o entendimento da estrutura morfológica glomerular. A pressão nos capilares glomerulares gera uma tensão na parede dos vasos, que deve ser contrabalanceada pelas células endoteliais e podócitos. Como as células endoteliais não possuem um citoesqueleto adequado para essa função, os podócitos exercem a resistência necessária através do ancoramento de seus processos (pedicelos) à matriz extracelular. Alguns trabalhos demonstram *in vitro*, que os podócitos são sensíveis ao estiramento causado pela elevada pressão capilar glomerular, afetando a organização do citoesqueleto, ciclo celular, produção hormonal, transdução de sinal e expressão de genes nestas células. (SENE et al. 2013; FRIEDRICH et al. 2006; MORTON et al. 2004).

Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas, derivadas embriologicamente das células mesenquimais e são importantes na manutenção da barreira de filtração glomerular. Do corpo celular estendem-se processos citoplasmáticos primários, secundários e os pedicelos entrelaçados entre si, com junções intercelulares formando uma membrana fenestrada, mantendo poros ou fendas de filtração, que se ancoram na membrana basal glomerular via integrinas, (QUAGGIN e KREIDBERG 2008). O sistema de contratilidade dos pedicelos consiste de um sistema de micro túbulos (actina, α -actina e miosina) ligados à membrana glomerular basal, através de proteínas, tais como: vinculina, talina e outras integrinas, fixando-se ao colágeno IV, vimentina e laminina. O citoesqueleto de actina se liga a diversas proteínas que regulam e estabilizam a morfologia do podócito. Estes filamentos intermediários são os elementos contentores de tensão que permitem manter a integridade celular e sua rigidez (WELSH e SALEEM 2012). Qualquer alteração na cadeia de actina ou nas proteínas reguladoras podem modificar a estrutura podocitária e a sua funcionalidade. Suscintamente,

são identificadas como funções podocitárias a constituição de uma barreira de filtração eletronegativa, a manutenção da estrutura capilar glomerular, a regulação do coeficiente de ultrafiltração, a manutenção da pressão intraglomerular e da taxa de filtração glomerular, a síntese e manutenção da membrana glomerular basal e, a produção e secreção de fatores endoteliais de crescimento (VEGF) (FUCHSHOFER et al. 2011; SHANKLAND 2006), sendo sensível ao estiramento exercido pela pressão arterial sistêmica (MORTON et al. 2004).

Já as células mesangiais, são encontradas na base do tufo glomerular e são similares às células do músculo liso podendo contribuir na resposta da vasculatura glomerular em resposta aos estímulos. Em algumas complicações glomerulares, como por exemplo, a esclerose mesangial difusa, há um acúmulo da matriz mesangial ao redor da vasculatura na membrana glomerular basal, onde se presume que as células mesangiais são as precursoras deste acúmulo, e que pode interferir dramaticamente na função renal. Historicamente acreditava-se que as células mesangiais eram responsáveis pelo papel de contração dentro do glomérulo, permitindo aos capilares resistirem à pressão gerada dentro do endotélio. No entanto, sabe-se hoje que a interação entre os podócitos, células mesangiais e endoteliais são as chaves reguladoras para a manutenção da estrutura e função do tufo glomerular (QUAGGIN e KREIDBERG 2008).

A membrana basal glomerular é uma estrutura trilaminar a qual estão ancorados o endotélio e células epiteliais viscerais ultra-diferenciadas, os podócitos, sendo um importante componente na barreira da permeabilidade seletiva que restringe a passagem para o espaço de filtração glomerular de proteínas com alto peso molecular (> 60kDa) e, carregadas eletronegativamente. Os principais componentes estruturais da membrana basal glomerular são: colágeno IV, laminina e proteoglicano, heparan-sulfato.

Há um número crescente de relatos mostrando que o aumento da pressão intraglomerular causa danos aos podócitos, no entanto, estes danos parecem ocorrer secundariamente na presença de: hipertensão arterial sistêmica, nefropatia diabética, glomerulopatias primárias, dislipidemia e ao reduzido número

de nefros (SHANKLAND 2006). A presença de uma elevação dos níveis de albuminúria constitui o principal indicador de modificações estruturais da barreira de filtração glomerular (diafragma fenestrado), seja por perda da eletronegatividade da barreira ou por aumento no diâmetro dos poros, resultado de desordens do endotélio e da estrutura dos processos podais. O desenvolvimento deste quadro pode levar à síndrome nefrótica e à doença renal terminal (BERTUCCIO 2011). Por outro lado, mutações em genes que codificam proteínas que compõem o diafragma fenestrado de filtração, tais como nefrina e podocina, causam doenças glomerulares congênitas, com presença de massiva proteinúria associada a dano podocitário. (MENZEL e MOELLER 2010; RUOTSALAINEN et al. 1999).

Durante o desenvolvimento, a nefrogênese envolve sequências bem definidas e orquestradas para o correto desenvolvimento do rim e de suas estruturas funcionais. Shen e colaboradores (2010) utilizando técnicas de eletroforese proteica em duas dimensões e espectrometria de massa, identificou que animais recém-nascidos cujas mães foram submetidos a dieta hipoproteica gestacional apresentam alterações na expressão de 21 proteínas quando comparadas ao grupo controle. Estas proteínas encontradas têm principalmente função metabólica, óxido-redução, proliferação celular, apoptose e função estrutural, a vimentina (SHEN et. al 2010).

1.3 Implicação da mTORC para a função e desordem glomerular

Target of Rapamycin (TOR) é uma proteína Serina/Treonina quinase bem conservada e encontrada no citoplasma dos eucariotos em dois complexos proteicos distintos em suas funções e estrutura, a TORC1 e TORC2. Contudo, de uma forma geral, possuem função regulatória do metabolismo e crescimento celular. O complexo TOR1 em mamíferos (mTORC1), é ativado em resposta à

fatores de crescimento tais como a insulina, *Insulin-Like Growth Factor 1* (IGF1), aminoácidos e pelo estado energético celular (ZINZALLA et al 2010).

Desde a descoberta da rapamicina (inibidor específico da mTORC) produzido pela bactéria *Streptomyces hygroscopicus* encontrada em amostras de solo da Ilha de Páscoa, tem havido grande interesse na determinação dos mecanismos biológicos dos efeitos da rapamicina em diferentes células e tecidos. Estes efeitos, predominantemente inibitórios incluem mudanças no tamanho e proliferação celular, na redução da tradução de mRNA e, no processo apoptótico (LAMMING e SABATINI 2010). Na verdade, mTORC1 é um regulador central do crescimento celular, e é constituído pelas proteínas mTOR, raptor, mLST8 e PRAS40, enquanto que o complexo 2 é composto por mTOR, rictor, sin1 e mLTS8. O complexo mTOR1 é inibido pela rapamicina enquanto que, o complexo mTOR2 não é, diretamente, inibido por ela. Os substratos da mTORC1 incluem: a quinase *ribosomal S6* (S6K), o *eukaryote initiation fator 4E binding protein* (4EBP1) e a quinase regulatória de autofagia, ATG1. Enquanto a mTORC1 é responsável pelo crescimento celular, transcrição de proteínas, biogênese e autofagia, a mTORC2 está implicada na organização do citoesqueleto e polarização da célula (WATANABE et al. 2011; LI e GUAN 2010).

A ativação da mTORC1 é regulada por uma grande variedade de estímulos extra e intracelulares. A ativação por fatores de crescimento e a insulina, é mediada principalmente pela via *Phosphatidylinositol-3-kinase-AKT* (PI3K-AKT). Sua ativação também ocorre pelo estado energético da célula, mediado pelo AMP quinase. Ambas as vias acima, a PI3K-AKT, como a AMP quinase, ativam indiretamente a atividade da mTORC inibindo respectivamente, as proteínas PRAS40 e TSC1, que atuam como reguladoras negativas da mTORC (LI e GUAN 2010).

Contudo, um dos mais potentes estímulos para a ativação de mTORC são os aminoácidos, principalmente os de cadeia ramificada (BCAAs), sendo fundamental a participação destes na regulação do crescimento celular. Na ausência dos aminoácidos, a mTORC não pode ser ativada eficientemente por

outros estímulos, tal como ocorre com a insulina contudo, ainda não se sabe exatamente como essa ativação ocorre (LI e GUAN 2010). Além do mais, evidências têm demonstrando que os elevados níveis circulantes de aminoácidos de cadeia ramificada têm um papel importante na determinação e desenvolvimento de doenças como a obesidade, resistência a insulina e o câncer através da hiperativação da mTORC (GULATI e THOMAS 2010).

A mTORC1 é peça fundamental no crescimento celular e sua atividade é fortemente regulada durante o período de desenvolvimento embrionário. A comprovação desta evidencia pode ser confirmada em animais *knock-out* para mTORC1, ou suas subunidades, resultando em morte embrionária. Além do mais, a sua hiperativação tem sido frequentemente observada no câncer, sugerindo um papel importante no desenvolvimento de tumores e também em outras doenças humanas, tais como: doenças autoimunes, Doença de Parkinson, hipertrofia cardíaca, resistência à insulina e até mesmo no envelhecimento (WULLSCHEGER et al. 2006). Atualmente, a rapamicina tem sido empregada como tratamento imunossupressor para pacientes transplantados renais e já é aprovada como droga para estágios avançados de câncer renal (LI e GUAN 2010). Contudo, o sucesso clínico no tratamento de neoplasias pela inibição da mTORC, ainda é controversa devido à sua própria complexidade de função, estrutura e sinalização (WATANABE et al 2011).

Um fator determinante para o crescimento e desenvolvimento embrionário é o transporte de nutrientes através da placenta. O transporte de aminoácidos pela placenta ocorre de forma ativa e requer transportadores específicos resultando em uma maior concentração de aminoácidos do lado fetal. Dentre estes, encontram-se os transportadores de taurina, sistema A e o sistema L, sendo que o *down-regulation* destes transportadores, está associado às características apresentadas em modelos experimentais de IUGR. De fato, Scabora e colaboradores (2013) demonstraram que a suplementação dietética com taurina nos animais que receberam dieta hipoproteica durante a gestação, evitou que parte das características apresentadas por animais programados, tais como antinatriurese e

hipertensão arterial, se manifestassem na idade adulta (SCABORA et al 2013). Supõe-se que a restrição proteica promove uma menor oferta ou redução da atividade dos transportadores destes aminoácidos na placenta, e estas alterações estejam relacionadas com as alterações cardiorenais e metabólicas evidenciadas nestes animais, na idade adulta (ROOS et al. 2009). Na verdade, Jansson e colaboradores (2006), identificaram que a redução do transporte transplacentário de taurina é a causa principal das alterações observadas na IUGR, e estas estão relacionadas com a baixa atividade tissular de mTORC (Jansson et al. 2006). Em suporte desta hipótese, Teodoro e colaboradores (2012), trabalhando com o modelo de IUGR por restrição proteica, suplementaram as mães durante a gestação com leucina a 4% sendo capaz de atenuar os sinais da programação fetal sobre a redução da massa corporal total, e das massas de rins, fígado, baço e pâncreas. Este autor correlaciona estes achados à elevação da atividade da mTORC (TEODORO et al. 2012).

Tendo em conta os aspectos acima, a atividade da mTORC tem sido implicada nos mecanismos de ação da programação fetal decorrente da redução do fluxo placentário e induzida pela redução da oferta de nutrientes. Nestes casos o menor aporte de aminoácidos essenciais, proporciona uma redução da atividade da mTOR no período gestacional, e que posteriormente, supõe-se que uma hiperativação na vida pós-natal, frente ao ambiente com maior oferta estabeleça uma situação que propicia ao desenvolvimento de doenças na vida adulta. Além desse possível papel sobre a programação fetal relacionada com a alterada atividade da mTORC, estudos têm investigado que a ativação desta via esteja envolvida nas causas fisiopatológicas da nefropatia diabética. (WULLSCHEGER et al. 2006). Neste contexto, recentemente, pesquisadores têm demonstrado que a administração sistêmica de rapamicina é capaz de atenuar o desenvolvimento de nefropatia diabética, no entanto os mecanismos envolvidos ainda são desconhecidos. Inoki e colaboradores (2011) relataram que a ativação de mTORC1 em podócitos é responsável por grande parte das alterações glomerulares encontradas na nefropatia diabética, tais como lesão podocitária, espessamento da membrana basal glomerular, expansão mesangial e proteinúria.

Em seus resultados este grupo demonstrou que o tratamento com rapamicina reduziu a hipertrofia glomerular, o espessamento da membrana glomerular, a expansão mesangial e perda podocitária, a infiltração de macrófagos e albuminúria, sendo também capaz de manter a citoarquitetura dos processos podocitários, mesmo nos animais diabéticos (INOKI et al. 2011; MORI et al. 2009).

1.4 Objetivos

Tendo em conta as fundamentações acima, o presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos do tratamento com rapamicina sobre a função renal, pressão arterial sistólica e na estrutura glomerular de ratos jovens e adultos que foram submetidos a desnutrição proteica gestacional.

Objetivos Específicos:

- ❖ Avaliação da função renal e pressão arterial sistêmica de animais que sofreram estresse nutricional gestacional e os efeitos da rapamicina sobre estes fatores.
- ❖ Investigar se a administração de rapamicina é capaz de preservar ou até mesmo de recuperar a estrutura glomerular através de estudos morfológicos e imunocitoquímicos através de proteínas de interesse.

2 *MATERIAIS E MÉTODOS*



O estudo foi realizado utilizando ratos da linhagem Wistar HanUnib provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigações Biológicas da Unicamp (CEMIB). Toda a metodologia segue normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) Protocolo 2747-1.

Os ratos foram obtidos com idade entre 3 e 4 semanas e realocados no biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, mantidos em ambiente fechado com temperatura controlada de $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ e iluminação artificial com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. Durante este período foram alimentados com ração comercial (Nuvilab CR-1, Nuvital) *ad libitum* e água *ad libitum*.

Delineamento experimental

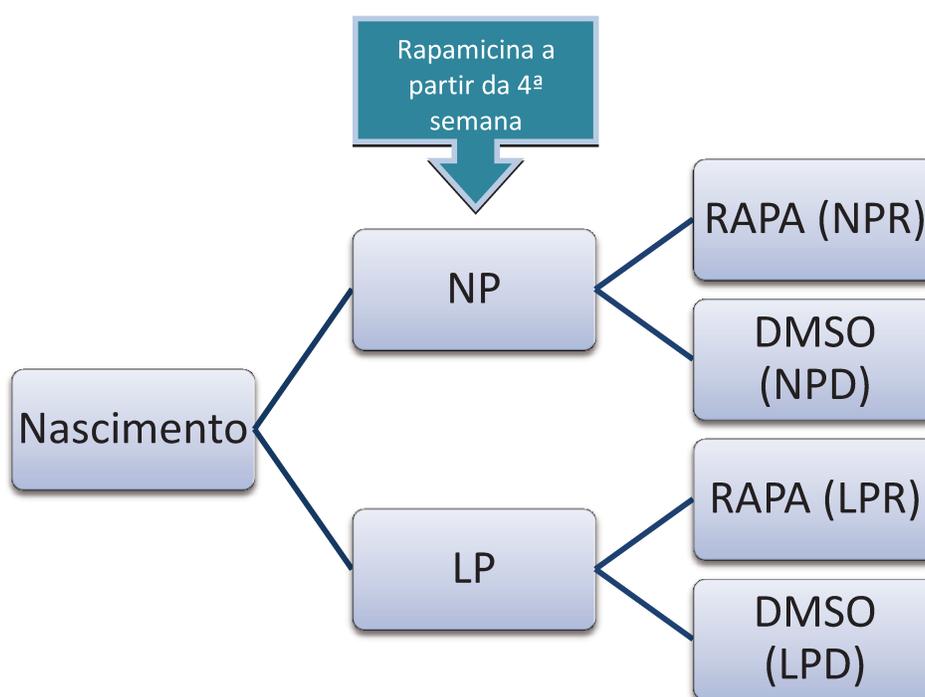
Quando atingiram a idade de 12 semanas iniciou-se o acasalamento deixando sempre duas fêmeas para cada macho, durante todo o ciclo escuro. Após esse período, a confirmação do acasalamento foi realizada através de esfregaço vaginal para verificação de espermatozoides e, quando estes eram encontrados, as fêmeas eram consideradas prenhes e então divididas em 2 grupos iniciais:

- Grupo NP que recebeu ração *normal protein* (NP, 17% caseína) *ad libitum*
- Grupo LP que recebeu ração *low protein* (LP, 6% caseína) *ad libitum*

As mães de ambos os grupos receberam esta ração durante todo o período gestacional até o dia do parto, retornando, imediatamente após, para a ração padrão comercial para animais roedores de laboratório, para que não houvesse interferência desta sobre o período de lactação. As mães foram pesadas semanalmente para o controle do ganho ponderal durante a gestação. Imediatamente após o nascimento, a prole foi pesada e o número de crias verificado. A ninhada foi equilibrada mantendo sempre 8 filhotes por mãe. Ao término do período de lactação machos e fêmeas foram separados, pela verificação da distancia ano-genital, descartando-se as fêmeas. Estabeleceu-se o

acompanhamento do ganho de peso da prole pós-natal, semanalmente até a 4ª semana de vida.

Quando os animais atingiram 4 semanas de vida, foram então divididos em 4 grupos: os animais que receberam apenas o veículo (DMSO a 5%, diluído em solução fisiológica estéril), foram denominados NPD e LPD e os grupos que receberam o tratamento com rapamicina, denominados NPR e LPR. O veículo ou a droga foram administrados por 8 semanas, até a 12ª semana de vida.



Tratamento

Para o tratamento com rapamicina foi utilizado o medicamento com nome comercial de RAPAMUNE do laboratório Wyeth contendo 2mg do princípio ativo SIROLIMO. A droga foi macerada e diluída em DMSO 5% e em seguida a solução obtida foi filtrada para uso. A concentração da solução do medicamento foi de 20%. A administração da droga ou veículo foi realizada via intraperitoneal. A dose de rapamicina utilizada foi de 1mg/kg de peso animal (INOKI et al. 2011), aplicado

três vezes por semana, sempre às segundas, quartas e sextas-feiras ao final do ciclo claro.



Figura 1. A rapamicina em comprimidos foi macerada com o auxílio de almofariz e pistilo e diluída em DMSO 5% e em seguida filtrada para uso.

Aferição da Pressão Arterial Sistólica

A pressão arterial da prole foi aferida nas idades 8, 12 e 16 semanas de vida, pela técnica indireta de plestimografia de cauda. Os animais foram previamente colocados em uma caixa aquecida ($\sim 37^{\circ}\text{C}$) por 10 minutos para que houvesse vasodilatação na artéria caudal. Assim que retirado da caixa de aquecimento, o animal era colocado dentro de um contentor de acrílico para contenção. Um *manguito acoplado a um transdutor de pressão foi inserido na porção proximal da cauda*. O transdutor e o manguito estavam conectados a uma coluna de mercúrio para aferição da pressão de compressão da cauda. A técnica permitiu a verificação da pressão arterial sistólica que foi amplificada registrada e gravada através de software específico (IITC Life Science – BpMonWin Monitor Version 1.33.).

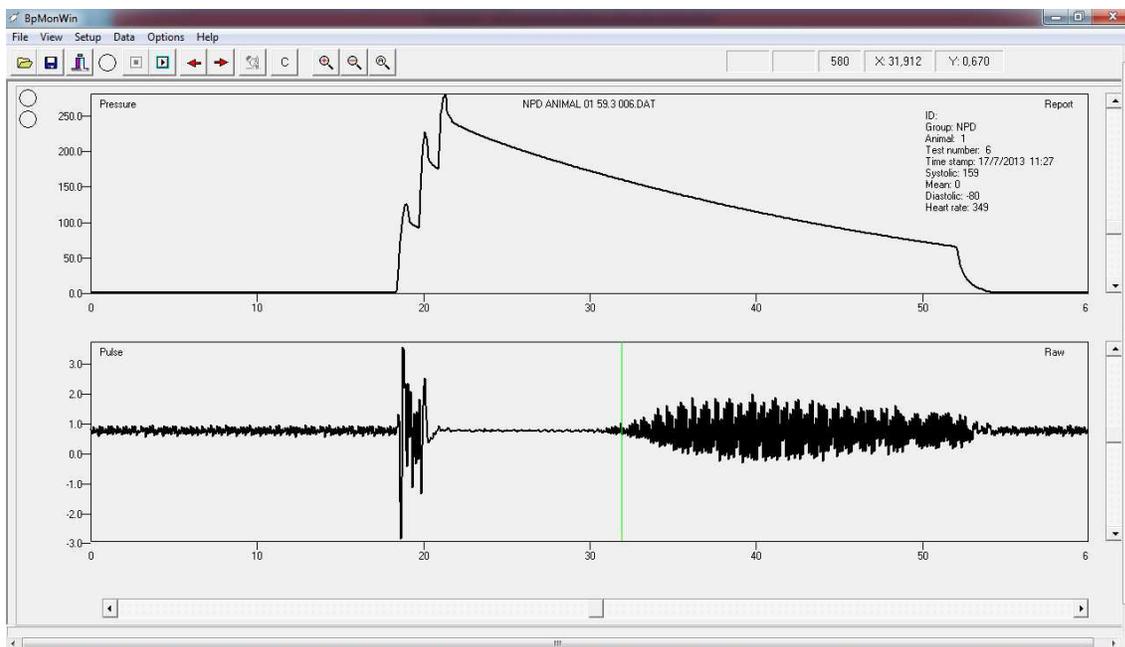


Figura 2. Figura representativa da aferição da pressão sistólica registradas e analisadas. A linha verde indica o reestabelecimento do fluxo sanguíneo e a pressão arterial sistólica necessária representada na curva acima.

Para que os animais não ficassem estressados ao procedimento e ao ambiente, eles passaram por uma adaptação com 5 semanas de vida. Assim, quando atingiram a idade de 6 semanas, foram submetidos a aferição da pressão arterial e os dados foram gravados para posterior análise. Se a determinação de uma frequência cardíaca fosse superior a 410 batimentos por minutos durante a aferição da pressão arterial, este era desconsiderado, pressupondo que o animal encontrava-se em alto estado de estresse.

Avaliação da Função Renal através do Clearance de Creatinina e Lítio

O clearance urinário para avaliação da função renal foi realizado nas semanas 8, 12 e 16 de vida, sempre nos dias subsequentes as aferições da pressão arterial. Os animais receberam por gavagem uma solução de cloreto de lítio na concentração de 0.06 mEq/100 g de peso corporal. Após a gavagem de cloreto de lítio os animais permaneceram em suas gaiolas em jejum de ração mas com livre e com acesso à água, *ad libitum*. 15 horas após a gavagem inicial de

Lítio, os animais foram submetidos a duas sobrecargas hídricas por gavagem de 5% do peso corporal a intervalos de 60 minutos. Vinte minutos após a segunda sobrecarga hídrica os animais foram alocados em gaiolas metabólicas para individuais e procedeu-se a coleta de urina por 120 minutos em tubos cônicos graduados com divisões de 0,2mL. Após o término da coleta de urina, os animais foram submetidos à coleta de sangue caudal. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3500 RPM por 10 minutos e o plasma aliqotado e, juntamente com as amostras de urina armazenados a -20°C para dosagens posteriores.

Determinações Bioquímicas

As concentrações plasmáticas e urinárias de sódio, lítio e potássio, foi determinado por fotometria de chama (Micronal, B462, São Paulo, Brasil), A creatinina plasmática e urinária foi determinada por método colorimétrico utilizando o kit da Bioclin K016 e a absorbância determinada por aparelho de ELISA.

A proteinúria também foi determinada por método colorimétrico através do kit da Labtest com nome comercial de SENSIPROT. A absorbância foi determinada por aparelho de ELISA.

Cálculos para estimação da filtração glomerular e da função tubular

➤ Clearance de Creatinina (CCr).

A filtração glomerular foi estimada pela depuração plasmática da creatinina por unidade de tempo pela totalidade dos glomérulos renais funcionantes e calculada pela fórmula ($U \times V / P$), sendo U a concentração urinária de creatinina, V 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.

➤ Fração de Excreção de Sódio (FENa+):

A fração de excreção de sódio foi calculada pela fórmula ($C_{\text{Na}} / C_{\text{Cr}} \times 100$), sendo C_{Na} o *clearance* de sódio e o C_{Cr} , a depuração de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

➤ Fração de excreção de Potássio (FEK):

A fração de excreção de potássio foi calculada pela fórmula $(CK/CCr \times 100)$, sendo CK o *clearance* de potássio e o CCr, a depuração de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

➤ Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa+):

A fração de excreção proximal de sódio foi calculada pela fórmula $(CLi/CCr \times 100)$, sendo CLi o *clearance* de Lítio e o CCr, a depuração de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

➤ Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa+):

A fração de excreção pós-proximal de sódio foi calculada utilizando-se a fórmula $(CNa/CLi \times 100)$, sendo CNa o *clearance* de sódio e o CLi, o *clearance* de lítio. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Procedimento Cirúrgico

Quando os animais atingiram a idade de 12 e 16 semanas, os animais foram sacrificados para coleta dos rins e posterior análise da estrutura glomerular, avaliando a expressão e localização de proteínas de interesse por *western blotting* e imunoistoquímica.

Para a coleta dos rins os animais foram anestesiados com ketamina (75mg/ml) e xilasina (5mg/ml) na proporção de 1:3 via intraperitoneal e o nível de anestesia foi controlado pelo monitoramento do reflexo córneo-palpebral. Os animais foram colocados em decúbito dorsal e procedeu-se uma incisão mediana abdominal para a retirada dos órgãos. O rim direito foi seccionado longitudinalmente, congelado em nitrogênio líquido e posteriormente armazenado à 80°C negativos. Em sequência, o rim remanescente foi perfundido por punção cardíaca com solução fisiológica heparinizada 5% durante 15 minutos e em seguida com paraformaldeído 4% (0.1M, pH 7.4) durante 30 minutos, para fixação dos tecidos, ambas as soluções com o auxílio de bomba peristáltica.

O rim direito foi fixado por imersão na mesma solução durante duas horas para completa fixação. Durante o processamento o órgão foi lavado com salina e os radicais aldeídicos bloqueados com solução de glicina em PBS, por trinta minutos permanecendo em solução crio-protetora de sacarose *overnight*. Após 24 horas, os órgãos fixados foram incluídos em *tissue-tek*, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a 80°C negativos para posterior processamento para imunistoquímica.

Imunistoquímica

Os rins incluídos foram seccionados em micrótomo rotativo em espécies com espessura de 7µm, colocados em lâminas tratadas com silano e submetido à técnica de imunistoquímica para localização de nefrina e podocina.

As ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro DKY diluída em PBS a 5% e incubadas por 45 minutos. Após o bloqueio, os cortes foram cuidadosamente lavados com PBS por 3 vezes. Os anticorpos primários utilizados foram específicos para Nefrina (gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Kawachi de origem mouse policlonal) e Podocina (AbCam #50339 rabbit policlonal) O anticorpo primário foi diluído em solução de albumina a 1% em PBS e, incubado *overnight* à 4°C. No dia seguinte, lâminas foram novamente lavadas cuidadosamente com PBS por 3 vezes e incubadas com anticorpo secundário, diluído conforme teste de curva de concentração realizado previamente. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS por 3 vezes e então seladas com *VectaShield* e cobertas com lamínula. Os cortes foram visualizados e analisados por microscopia de fluorescência e confocal a laser. As imagens foram analisadas utilizando software ImageJ.

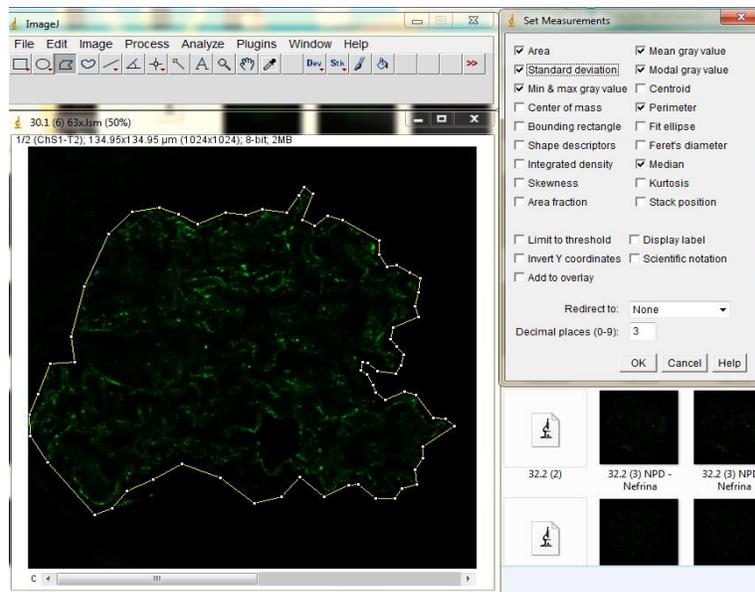


Figura 3. Figura representativa do software Image J e de como as imagens foram analisadas para se obter a área do tufo glomerular e a intensidade de pixels.

Western Blotting para análise quantitativa de proteínas de interesse

Os rins congelados à menos 80°C^o foram colocados em solução tampão de extração (10 mM de EDTA, 100 mM de Tris base, 10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanato de sódio, 2mM de Persulfato de amônio, 0,1mg/mL de aprotinina), descongelados e homogeneizados em Polytron (modelo PT 10/35, Brinkmann Instruments). Finda a extração, foi acrescentado Triton 10% a cada amostra (10 % do volume total) por 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 40 minutos à 12000 RPM a 4°C. A quantificação proteica foi realizada através da reação por biureto, adicionando-se 3µl do extrato de cada amostra em 200 µl de biureto e analisadas por espectrofotometria no aparelho de ELISA. Em seguida 400 µl do sobrenadante foi coletado e adicionado 100 µl do tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10% e 0,015mg de DTT). As amostras foram fervidas por 5 minutos e armazenadas novamente em freezer - 80°C.

A expressão de nefrina foi analisada por *western blotting*. Extrato total de proteínas renais foram submetidas à eletroforese no sistema SDS-PAGE em gel de poliacrilamida com concentração de acordo com o peso molecular da proteína de interesse. Em seguida foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose Hybond ECL (Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5%, diluído em solução basal por 2 horas e então incubadas overnight à 4° C com o anticorpo primário de interesse (Nefrina Novus NBP1-03147 rabbit policlonal; Podocina AbCam #50339 rabbit policlonal) diluído em tampão de bloqueio. As membranas foram encubadas então com peroxidase anti-animal específico para cada anticorpo por 2 horas em temperatura ambiente. Após a lavagem com solução basal foi adicionado solução quimioluminescente (Pierce) por 1 minuto e então, expostas à filme Kodak XAR e reveladas em sala escura. As bandas foram quantificadas por análise dos pixels pelo programa UniScan-it. Para controle endógeno da quantidade de proteínas aplicadas em cada gel, as membranas foram incubadas com α -tubulina. As bandas também foram quantificadas e depois realizado cálculo de normalização para cada amostra respectivamente.

Análise Estatística

Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão ou mediana e intervalos interquartis quando apropriado. Quando avaliadas duas variáveis com frequência de distribuição paramétrica, foi utilizado teste t de Student. Por outro lado, sendo analisadas duas ou mais variáveis, a análise utilizou análise de variância para uma via (ANOVA-one way) com post-hoc pelo teste de Bonferroni ou Kruskal-Wallis quando as distribuições de frequências dos dados obtidos não apresentavam distribuição gaussiana. O nível crítico definido foi de 5% ($p < 0,05$). Pontos outliers foram identificados pelo ϕ -test (zeta test). Os dados analisados e plotados utilizando GraphPad Prism v5.00.

3 *RESULTADOS*



3.1 Dados ao nascimento

3.1.1 Massa corporal do nascimento à lactação

O **gráfico 1** representa a massa corporal dos filhotes machos ao nascer cujas mães foram submetidas à restrição proteica gestacional (LP) comparado à prole das mães alimentadas com ração padrão para roedores (NP). Observa-se que as diferenças entre as massas corporais (em gramas) permaneceram diferentes até a primeira semana pós-natal, sendo similar, no entanto, a partir da 2ª semana de vida.

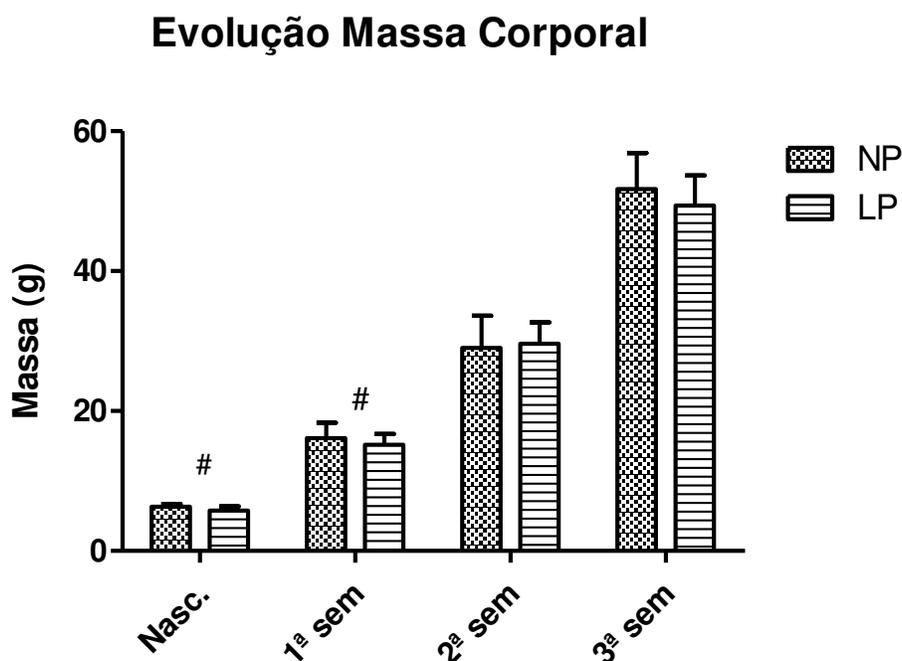


Gráfico 1. Evolução do ganho de massa corporal do nascimento até o final do período de lactação. O Gráfico está expresso em média \pm desvio padrão da média. (#) = $p < 0,0001$. (n) Nasc. NP n=60, LP n=65; 1ª sem NP n=60 LP n=43; 2ª sem NP n=51 LP n=38; 3ª sem NP n=37 LP n=16.

3.1.2 Ganho ponderal do início da administração de Rapamicina ao final do tratamento

O acompanhamento do ganho ponderal dos animais de ambos os grupos foi realizado três vezes por semana. O **gráfico 2** ilustra a evolução ponderal para

ambos os grupos durante todo o período de tratamento com rapamicina; observa-se clara redução do ganho de massa corporal nos animais submetidos ao tratamento com Rapamicina comparados aos controle LP e NP.

Evolução Massa Corporal Tratamento

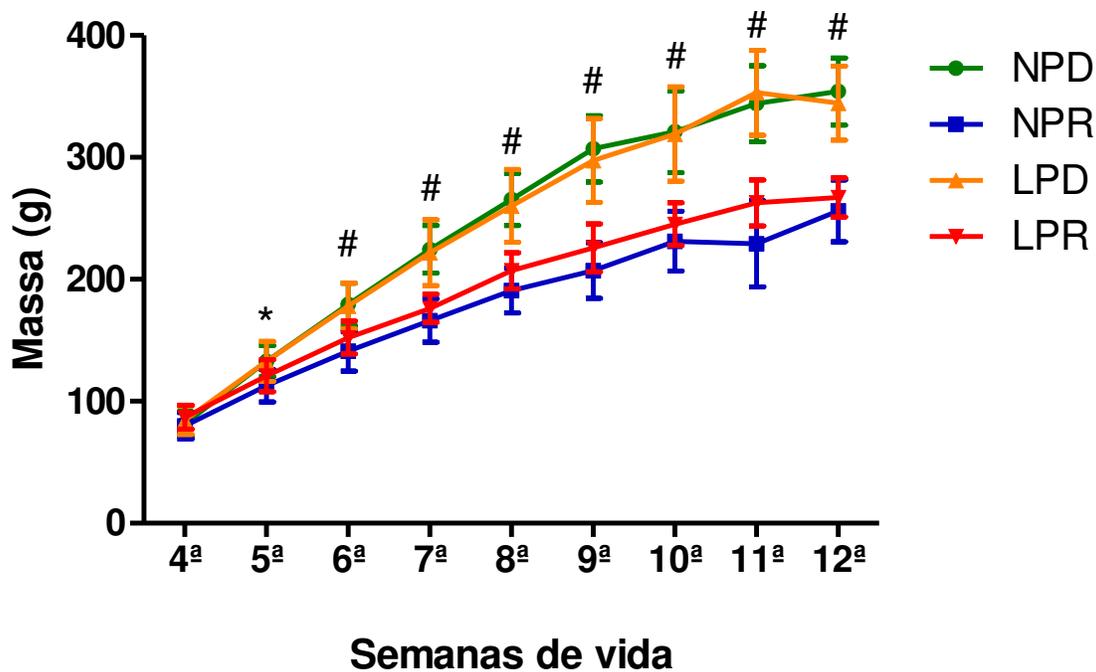


Gráfico 2. Massa corporal dos animais submetidos ao tratamento. Pontos representam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,05$ entre os animais sem rapamicina (NPD e LPD) comparados com os que receberam (NPR e LPR). (#)= $p < 0,0001$ entre os animais sem rapamicina (NPD e LPD) comparados com os que receberam (NPR e LPR).

O **gráfico 3**, mostra a diferença em gramas no ganho de massa para cada grupo estudado.

Ganho de massa durante o tratamento

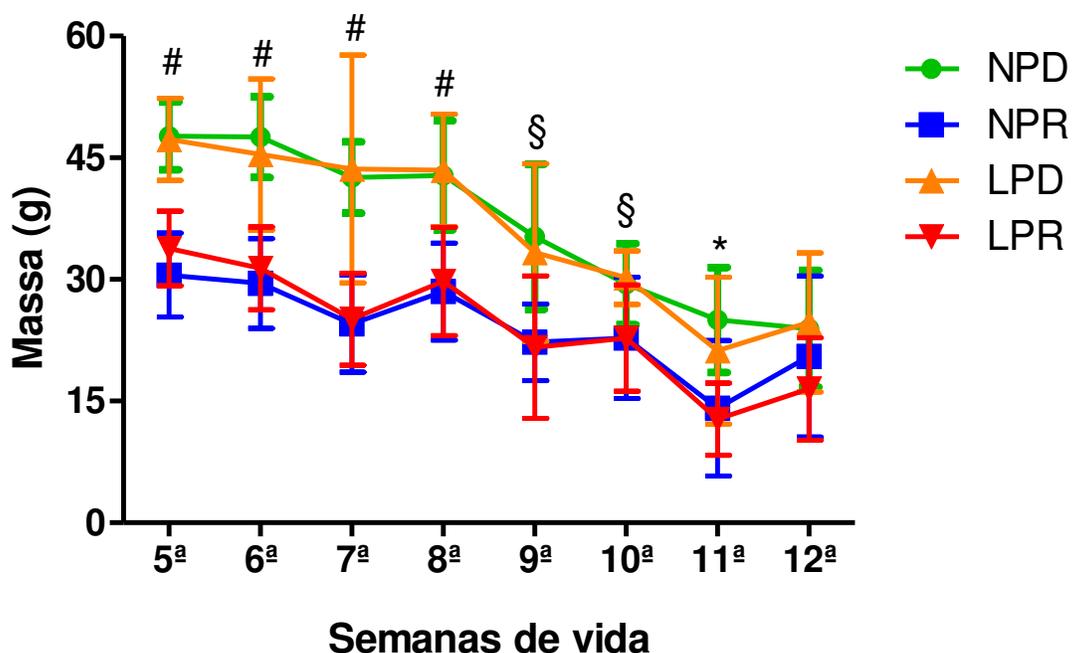


Gráfico 3. Ganho da massa corporal ao longo do tratamento entre os grupos. Pontos representam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (#)= $p < 0,0001$ entre os animais sem rapamicina (NPD e LPD) comparados com os que receberam rapamicina (NPR e LPR). (§)= $p < 0,001$ entre os animais sem rapamicina (NPD e LPD) comparados com os que receberam rapamicina (NPR e LPR). (*)= $p < 0,005$ entre os animais sem rapamicina (NPD e LPD) comparados com os que receberam rapamicina (NPR e LPR).

3.2 Evolução da Pressão Arterial nos diferentes grupos estudados

Na **tabela 1** (nos anexos deste trabalho) é possível analisar todos os dados obtidos através da plestimografia como, pressão arterial sistólica média, frequência cardíaca e os desvios nas idades analisadas. Os **gráficos 4, 5 e 6**, apresentam a evolução das medidas da pressão arterial em suas respectivas idades. Observa-se que a Rapamicina elevou consideravelmente a pressão arterial sistólica dos animais tratados já a partir da 8ª. semana. Após a 12ª. semana, a despeito da suspensão da Rapamicina, os animais do grupo

programado LPR, permanecem com os níveis pressóricos significativamente maiores que os demais grupos estudados.

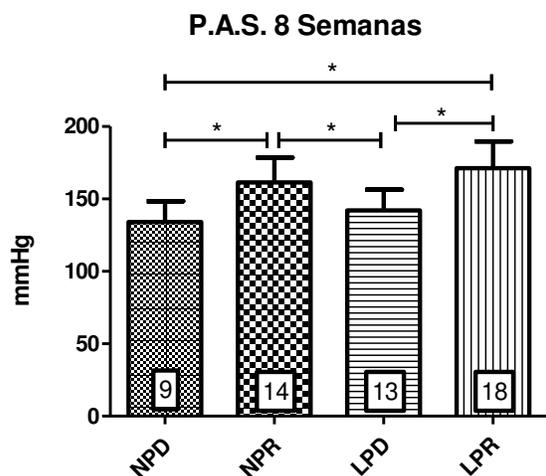


Gráfico 4. Pressão Arterial Sistólica. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

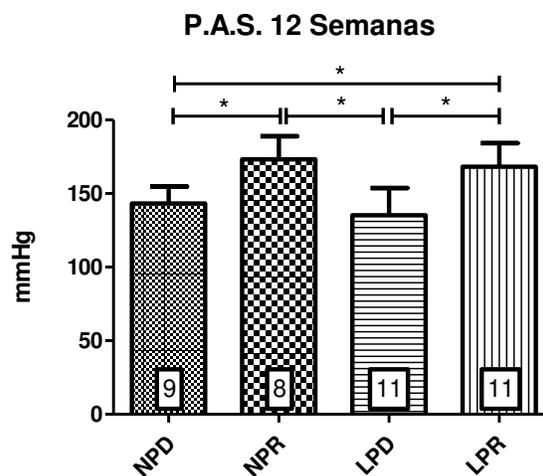


Gráfico 5. Pressão Arterial Sistólica. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

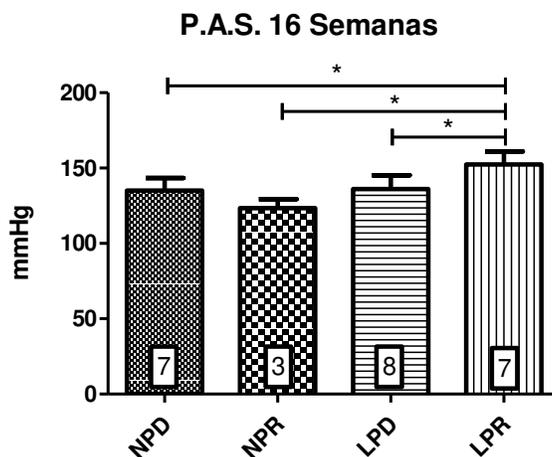


Gráfico 6. Pressão Arterial Sistólica. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

O **gráfico 7** apresenta e sintetiza todos os grupos experimentais, tratados ou não com Rapamicina. nos diferentes tempos de aferição pressórica ao longo do experimento. Observa-se discreta queda da pressão arterial sistólica no grupo

LPR na 16ª semana de vida, no entanto, esta persiste menos após a interrupção do tratamento.

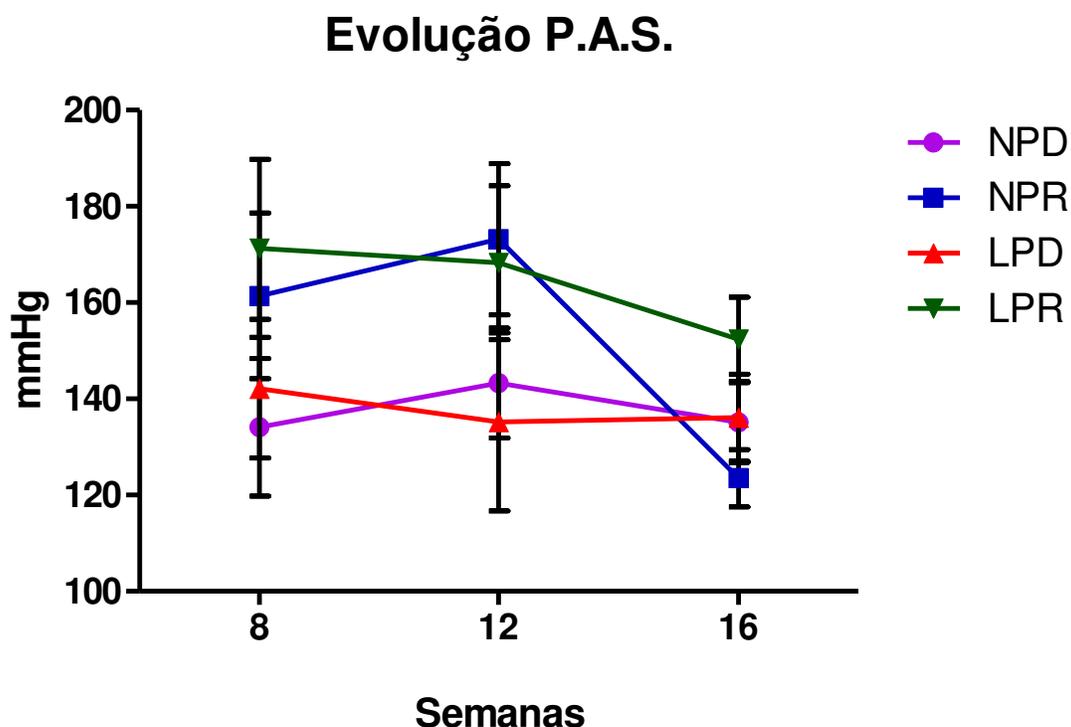


Gráfico 7. Demonstração da evolução da pressão arterial ao longo das semanas de tratamento.

3.3 Resultados da Função Renal

3.3.1 Estudo da Função Renal nos animais com 8 semanas

O gráfico 8 mostra a taxa de filtração glomerular estimada pelo *clearance* de creatinina. Não se observa qualquer diferença significativa entre os grupos estudados. Os gráficos 9 e 10 representam as frações proximais e pós-proximais de excreção de Na^+ . Estas não apresentam também qualquer diferença significativa entre os grupos, contudo, o gráfico 10 mostra que a fração de excreção de Na^+ total foi significativamente maior no grupo NPR em relação aos demais estudados. Este achado possivelmente esteja relacionado à maior excreção pós-proximal de Na^+ neste grupo quando comparado aos grupos NPD e

LPD. O **gráfico 12** uma fração de excreção de potássio similar entre os grupos com 8 semanas de idade.

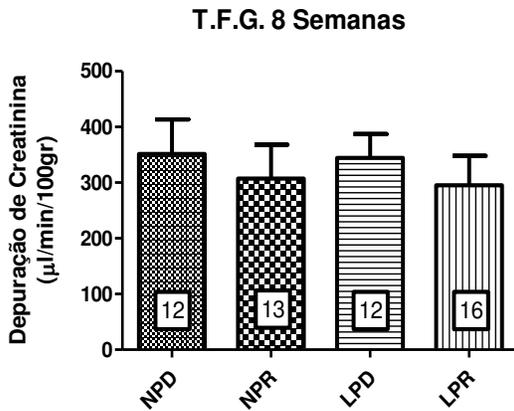


Gráfico 8. Taxa de Filtração Glomerular pelo clearance de Creatinina. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

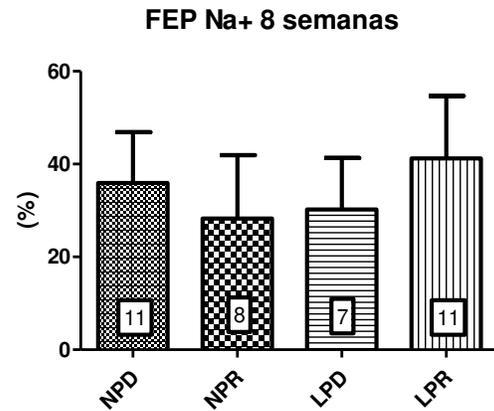


Gráfico 9. Fração de Excreção Proximal de Na+. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

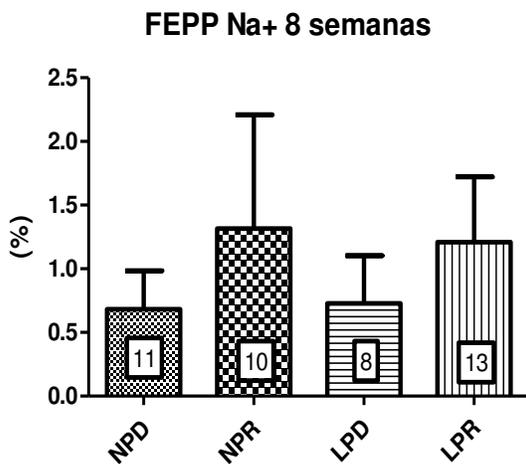


Gráfico 10. Fração de Excreção Pós-Proximal de Na+. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

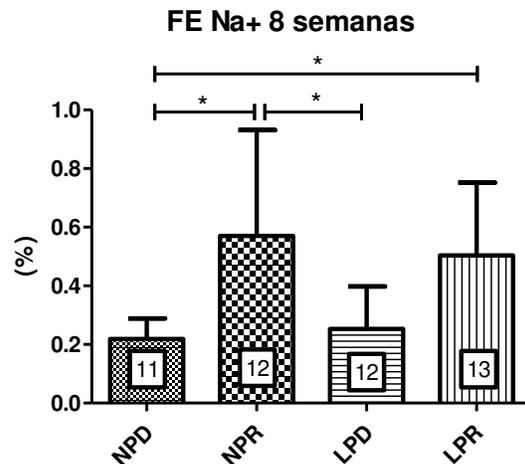


Gráfico 11. Fração de Excreção de Na+. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

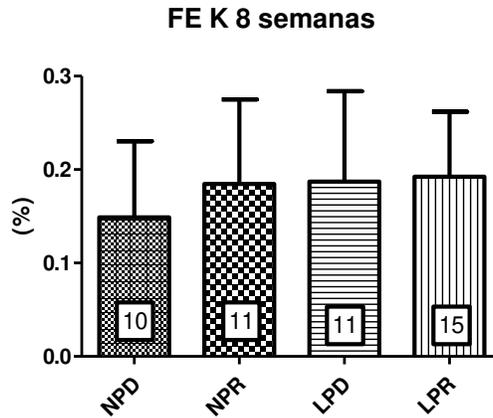


Gráfico 12. Fração de Excreção de Potássio. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

3.3.2 Estudo da Função Renal nos animais com 12 semanas

O **gráfico 13** mostra os resultados para o *clearance* de creatinina, na idade de 12 semanas. Os resultados não apresentam diferenças significativas comparando os diferentes grupos. Os dados apresentados nos **gráficos 14, 15 e 16** mostram que o grupo NPR apresenta uma maior excreção pós-proximal de sódio, em relação à NPD e LPD. Entretanto, a $FENa^+$ foi estatisticamente diferente somente em relação ao grupo LPD. Quanto à Fração de Excreção de Potássio não houve diferença entre os grupos, conforme mostrado pelo **gráfico 17**.

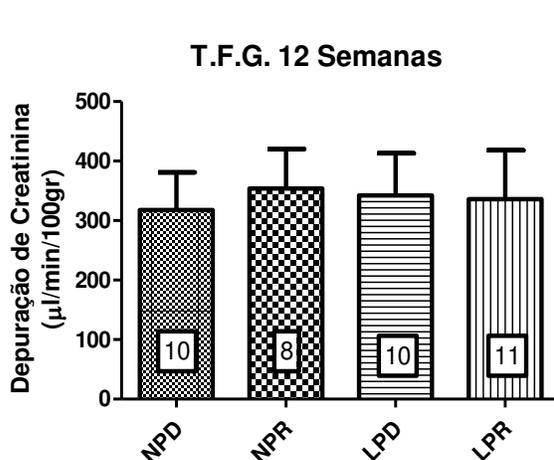


Gráfico 13. Taxa de Filtração Glomerular pelo clearance de Creatinina. Barras indicam média \pm

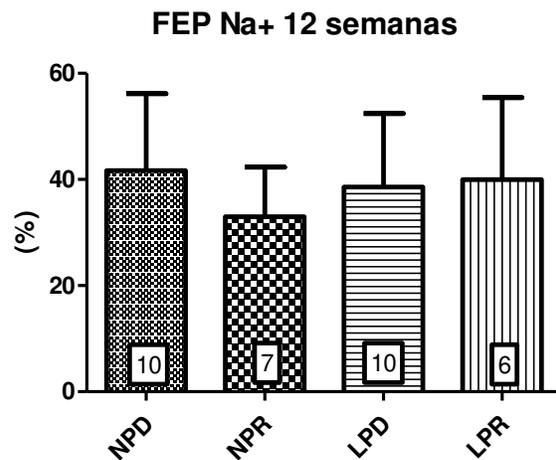


Gráfico 14. Fração de Excreção Proximal de Na^+ . Barras indicam média \pm desvio padrão da

desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

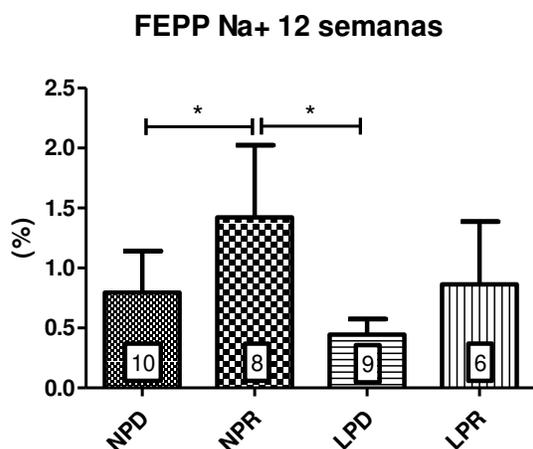


Gráfico 15. Fração de Excreção Pós-Proximal de Na+. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

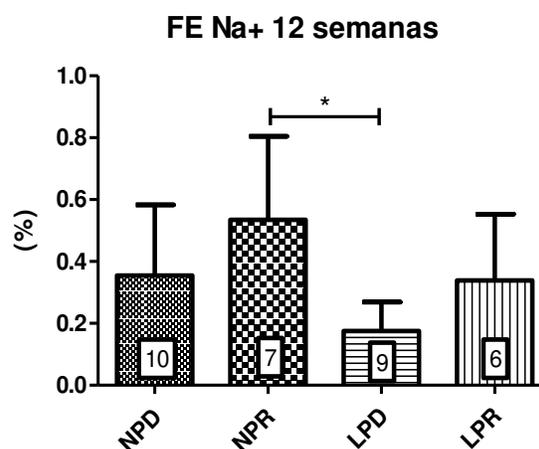


Gráfico 16. Fração de Excreção de Na+. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

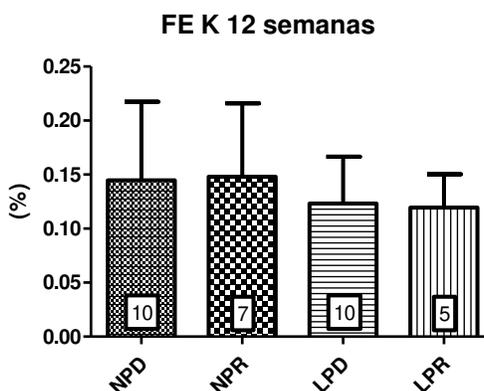


Gráfico 17. Fração de Excreção de Potássio. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

3.3.3. Estudo da Função Renal nos animais de 16 semanas

O **gráfico 18** mostra que o *clearance* de creatinina foi semelhante em todos os grupos experimentais na 16^a. de vida. Entretanto, observa-se uma significativa elevação na excreção fracional de sódio à custa de uma menor

reabsorção pós-proximal nos animais que receberam há 4 semanas Rapamicina. Esta maior excreção pós-proximal, no entanto, foi significativa apenas para o grupo LPR (**gráficos 19 e 20**). O **gráfico 22**, demonstra que não houve diferença na excreção de potássio quando todos os grupos são avaliados.

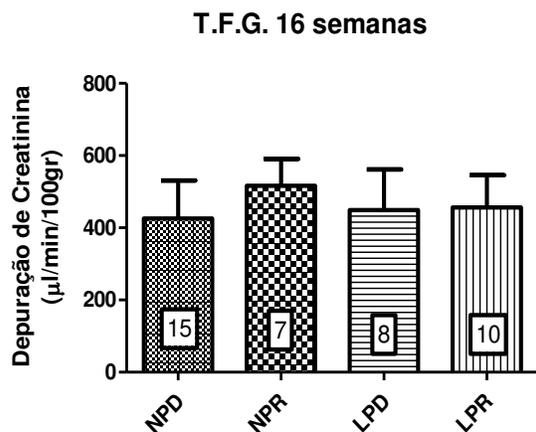


Gráfico 18. Taxa de Filtração Glomerular pelo clearance de Creatinina. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

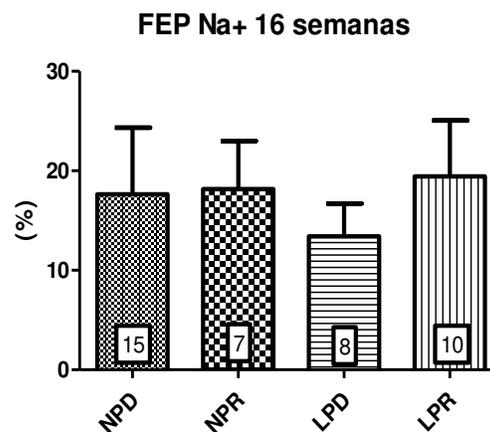


Gráfico 19. Fração de Excreção Proximal de Na+. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

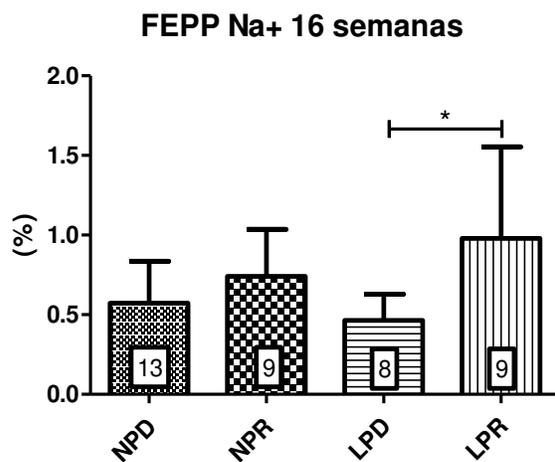


Gráfico 20. Fração de Excreção Pós-Proximal de Na+. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

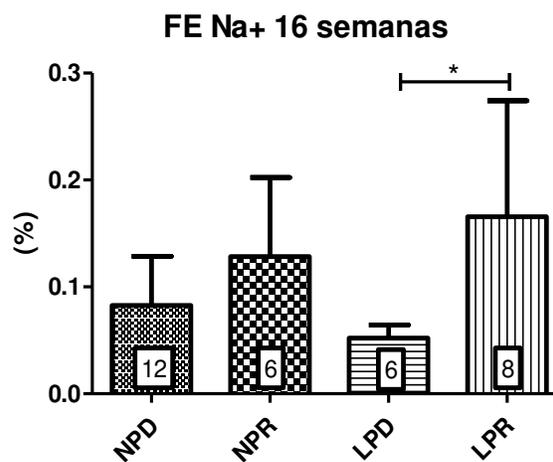


Gráfico 21. Fração de Excreção de Na+. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

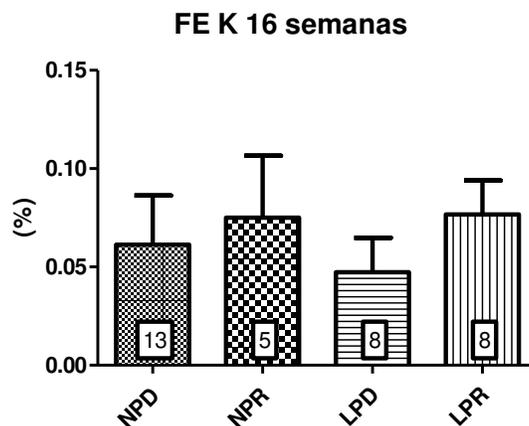


Gráfico 22. Fração de Excreção de Potássio. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (*)= $p < 0,005$.

3.4 Resultados da Proteinúria

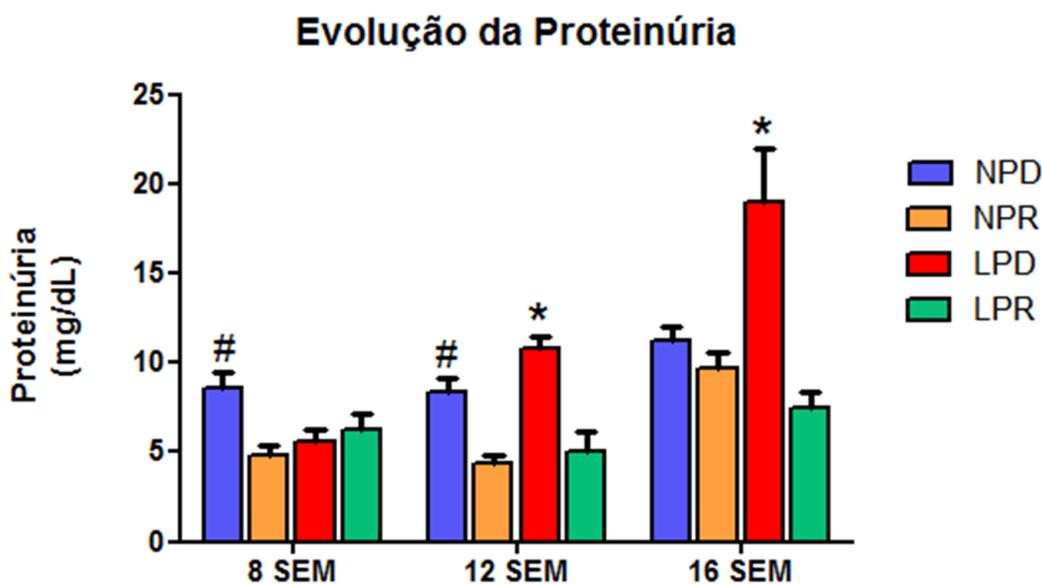


Gráfico 23. Evolução da Proteinúria. Pontos indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (§)=NPD com $p < 0.05$ em relação aos grupos NPR, LPD e LPR. (#)=NPD com $p < 0.05$ em relação aos grupos NPR e LPR. (*)=LPD com $p < 0.05$ em relação aos grupos NPD, NPR e LPR.

Os resultados mostram que houve um progressivo e significativo aumento da proteinúria no grupo LPD até a 16ª. semana de vida. Esta elevação foi significativamente atenuada pelo tratamento com Rapamicina.

3.5 Estudo da Expressão Renal de Nefrina

3.5.1 Expressão de Nefrina por western blotting

O **gráfico 24** mostra a expressão de Nefrina em rim total nos diferentes grupos experimentais nas idades de 12 e 16 semanas de vida. O estudo não mostrou qualquer diferença significativa na expressão renal desta proteína.

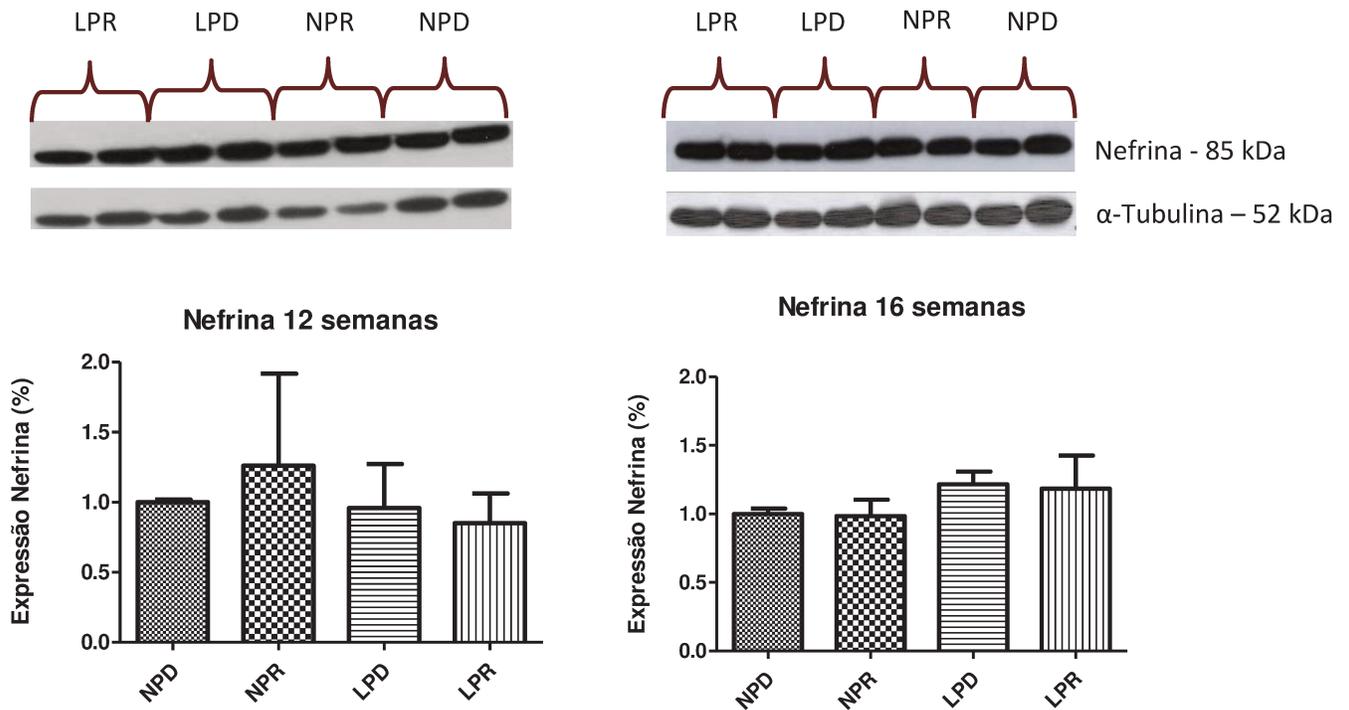


Gráfico 24. Expressão de Nefrina no extrato total de rim nos animais de 12 e 16 semanas. Valores normalizados pela α -Tubulina. Barras indicam média \pm desvio padrão da média. ANOVA com post-hoc de Bonferroni. (n) = 4 por grupo.

3.6 Análise da estrutura glomerular

3.6.1 Área glomerular

O **gráfico 25** mostra que não houve diferença na área glomerular nos animais com 16 semanas entre os grupos analisados.

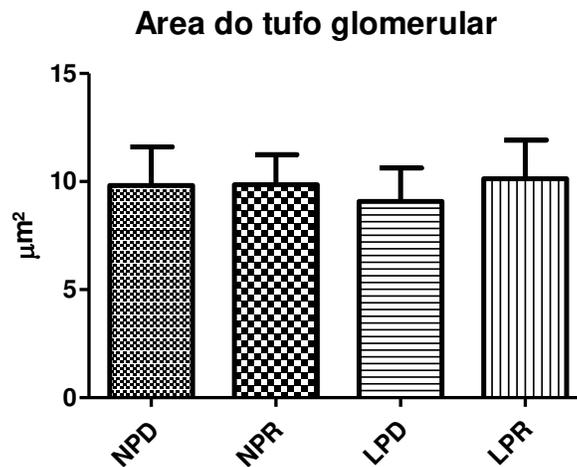


Gráfico 25. Área do tufo glomerular em μm^2 . Barras indicam média \pm desvio padrão da média. (n) = 4 por grupo.

3.6.2 Intensidade de pixels pela imunomarcacão

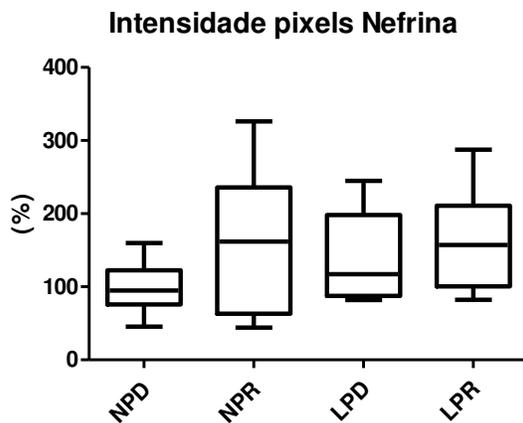


Gráfico 26. Box plot para a intensidade de pixels da nefrina. Teste de Kruskal-Wallis . (*)= $p < 0,05$

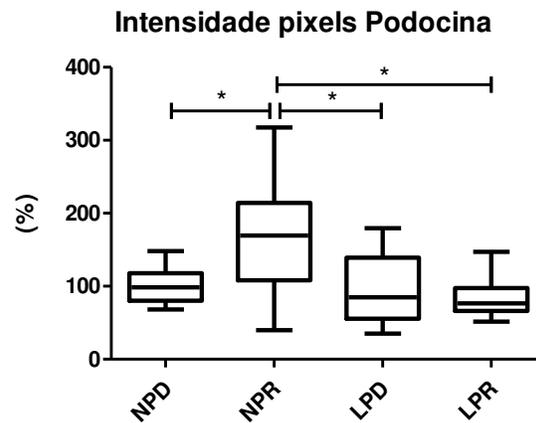


Gráfico 27. Box plot para a intensidade pixels da podocina. Teste de Kruskal-Wallis. (*)= $p < 0,05$

3.6.3 Imunolocalização de nefrina

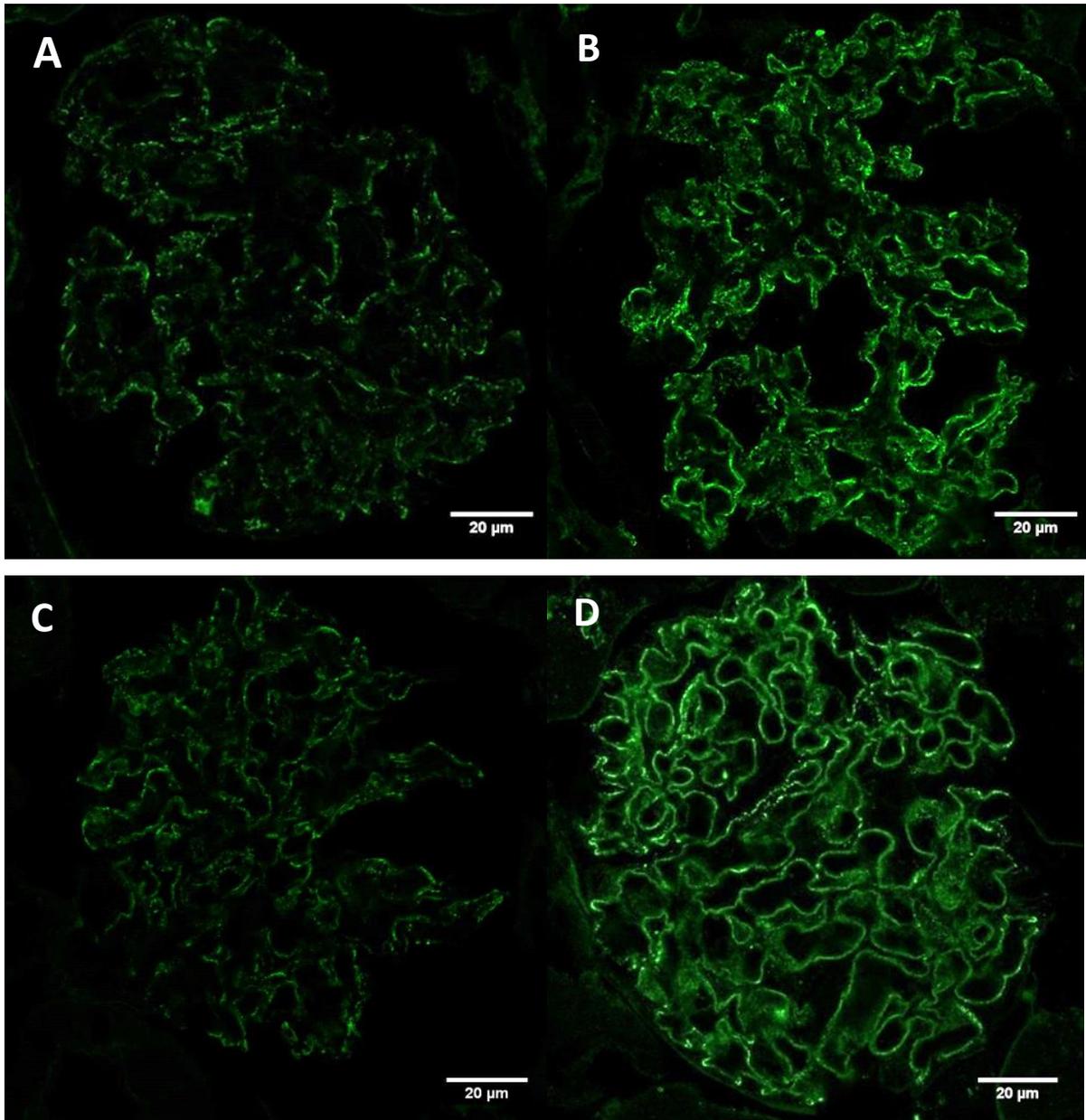


Figura 4. Imunolocalização da Nefrina nos glomérulos de animais com 16 semanas. Objetiva de 63X. (A)= Grupo NPD. (B)= Grupo NPR. (C)= Grupo LPD. (D)= Grupo LPR. Imagens representam a intensidade de pixels encontrada através do teste estatístico. (n) = 4 por grupo.

3.6.4 Imunolocalização de Podocina

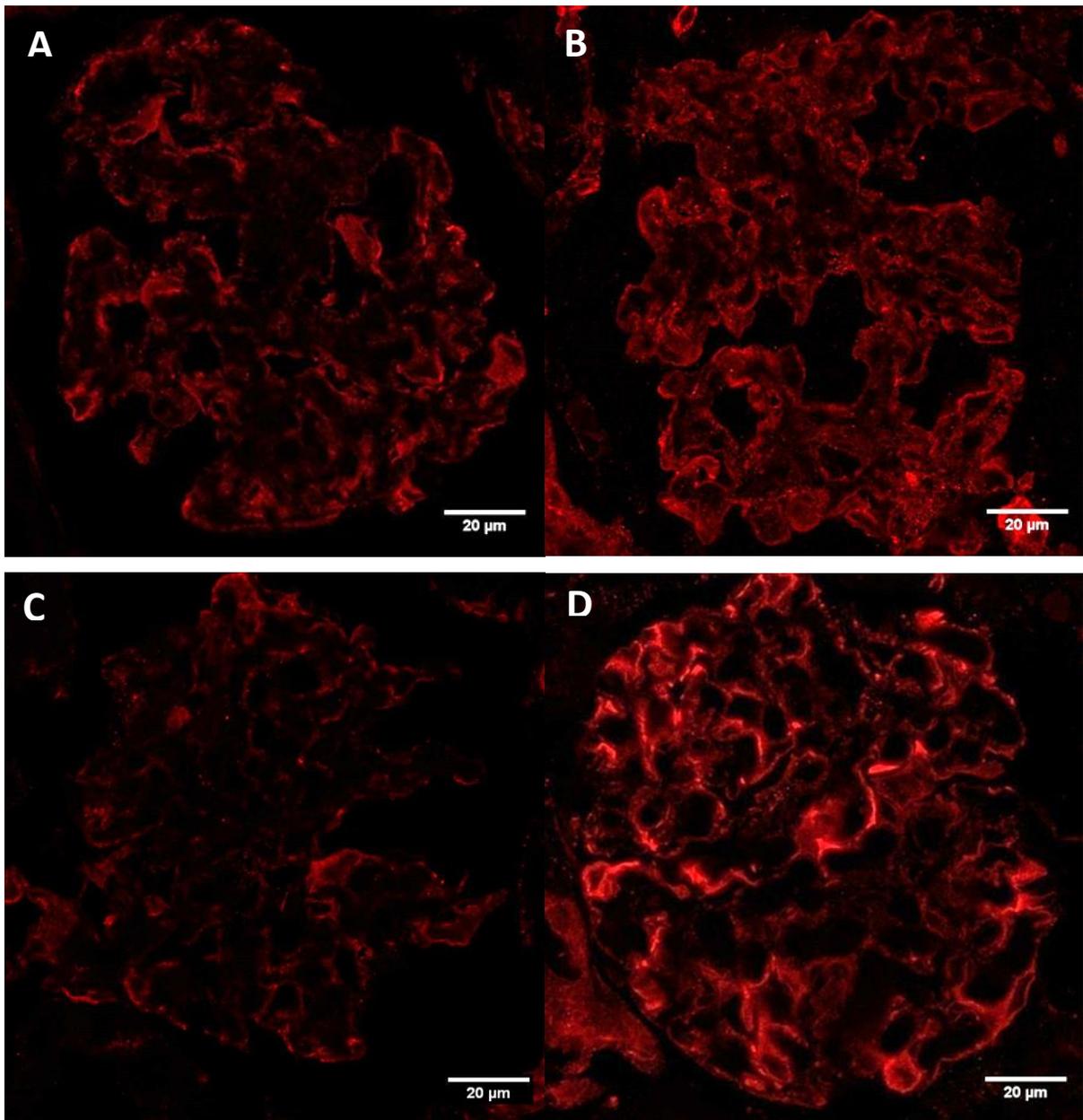


Figura 5. Imunolocalização de Podocina nos glomérulos de animais com 16 semanas. Objetiva de 63X. (A)= Grupo NPD. (B)= Grupo NPR. (C)= Grupo LPD. (D)= Grupo LPR. Imagens representam a intensidade de pixels encontrada através do teste estatístico. (n) = 4 por grupo.

3.6.5 Merge das marcações para nefrina e podocina

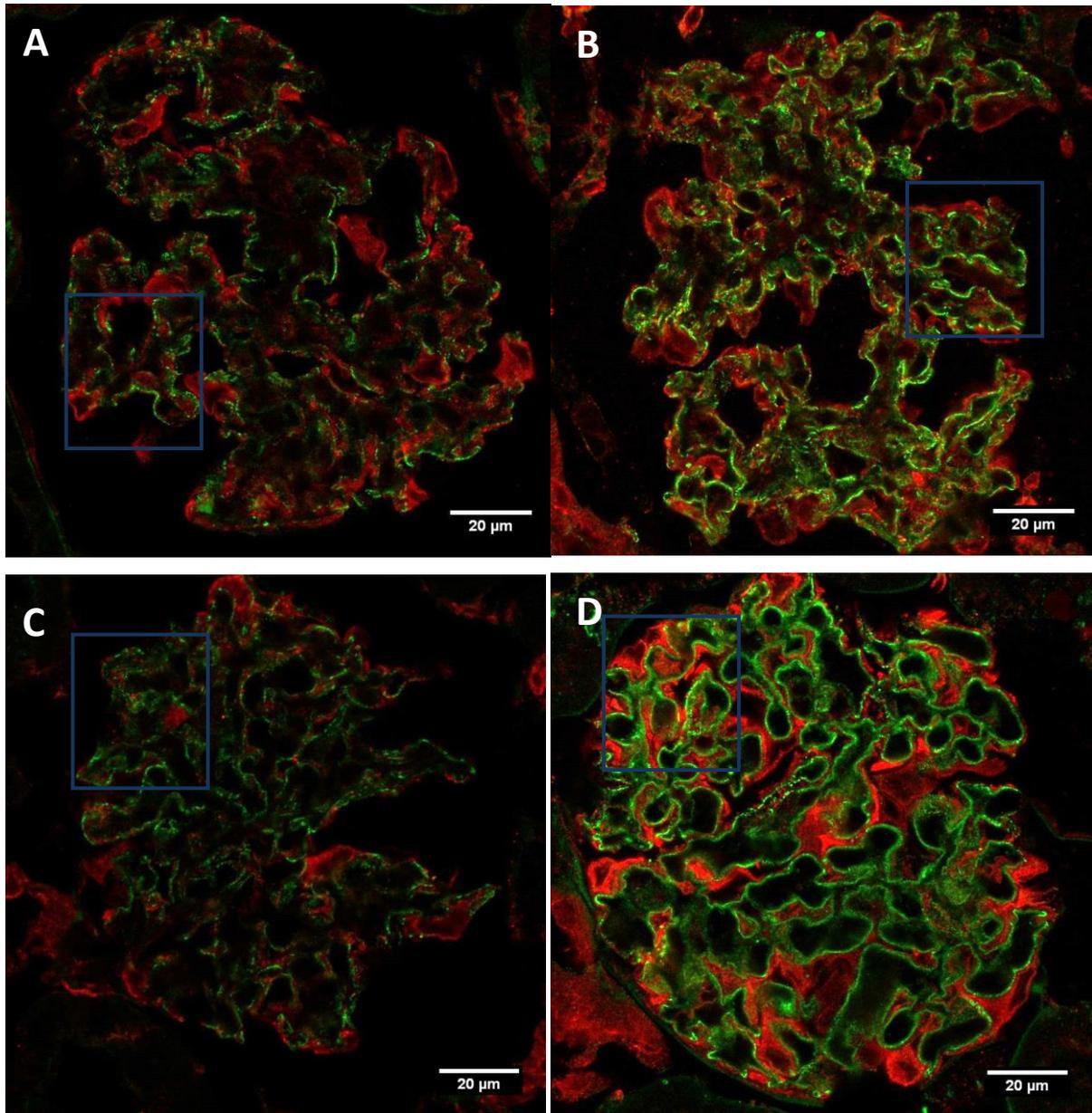


Figura 6. Imunolocalização de Nefrina (verde), Podocina (vermelho) e DAPI nos animais com 16 semanas. Objetiva de 63X. (A)= Grupo NPD. (B)= Grupo NPR. (C)= Grupo LPD. (D)= Grupo LPR. Caixas em azul identificam áreas onde a seguir as imagens foram ampliadas para análise mais detalhada.

3.6.6 Análise ampliada das imagens

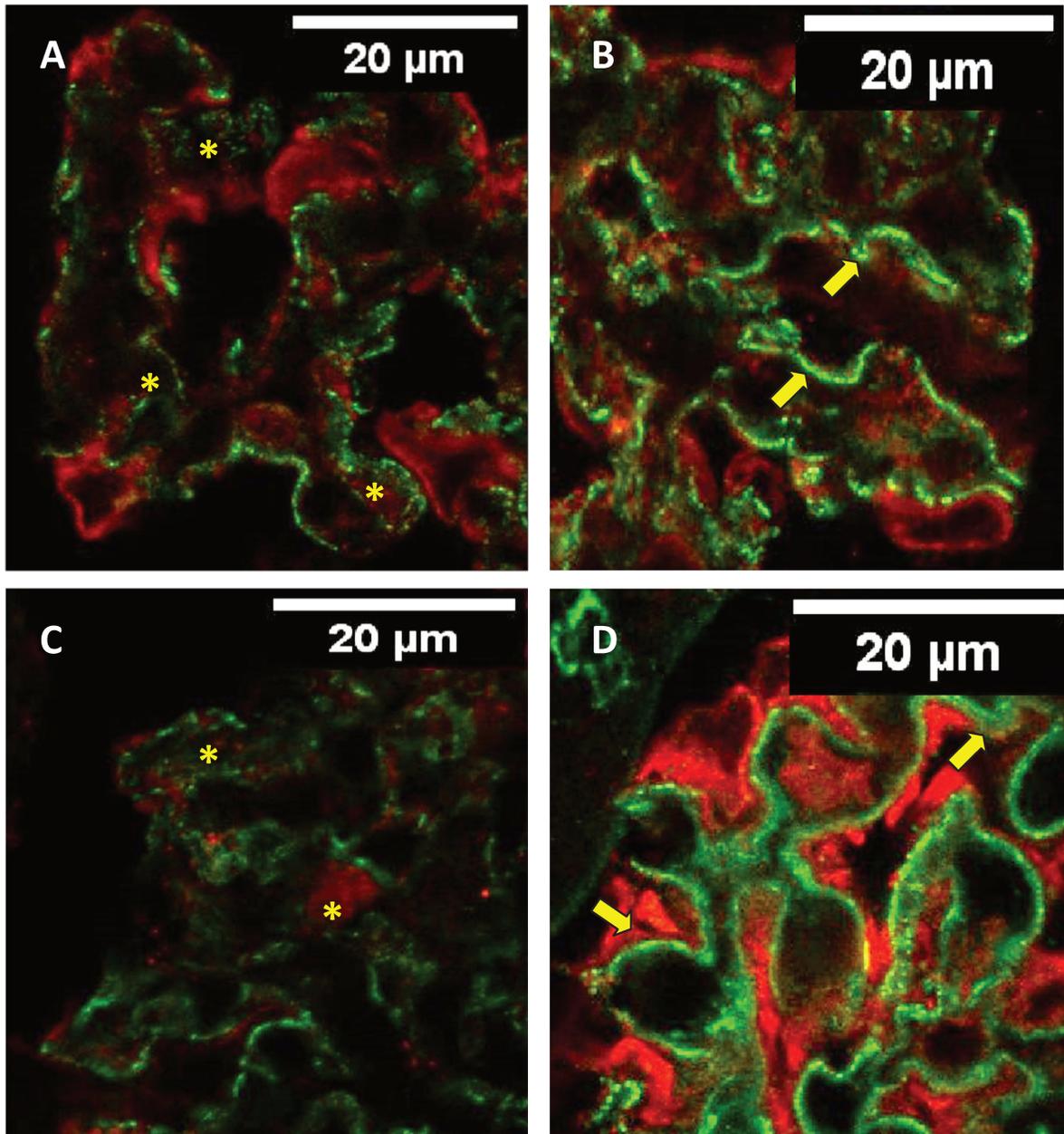


Figura 7. Ampliação das imagens do Merge para nefrina e podocina. Observa-se a nítida diferença na distribuição da nefrina nos processos podocitários, aonde nos animais tratados ela se comporta de forma linear, provavelmente sendo expressa na membrana plasmática aonde exerce sua função de adesão junto aos pedicelos (seta figuras B e D). Nos animais sem o tratamento com rapamicina, observa-se que esta forma linear da nefrina é irregular e em algumas regiões parece haver deposição citoplasmática, indicando alterações na barreira de fenestração (asterisco figuras A e C). (A)= Grupo NPD. (B)= Grupo NPR. (C)= Grupo LPD. (D)= Grupo LPR.

4 *DISCUSSÃO*



4.1 Sobre os efeitos da programação fetal no peso corporal da prole de machos ao nascimento

Conforme descrito na literatura confirmada pelos achados em nosso laboratório, a desnutrição proteica durante o período gestacional acarreta em redução no peso corporal ao nascimento. Em nosso estudo, os animais nasceram com menor peso em relação ao grupo controle e esta diferença persistiu até a 1ª semana de vida, caracterizando a programação fetal (MESQUITA et al. 2010; SENE et al. 2013; SCHEREUDER et al. 2006; BERTRAM & HANSON 2001; VEHASKARI et al. 2001; SECKL 2004). Nota-se que a partir da segunda semana de vida essa diferença na massa corporal deixa de existir, caracterizando o efeito *catch-up*, sendo que durante a lactação, o crescimento dos animais programados é acelerado em relação aos animais controle. Segundo Desai et al. (1996) a privação materna a proteína não só afeta o crescimento corporal dos filhotes, mas também promove uma mudança na estrutura de seu meio interno, afetando a função de órgãos de maneira seletiva. Além disto, a recuperação pós-natal no tamanho destes órgãos não significa necessariamente uma recuperação em termos de estrutura e função.

Recentemente, pesquisadores têm relatado que no modelo de IUGR os níveis de insulina, IGFR-1 e Leptina, importantes fatores de crescimento, estão com sua atividade reduzida, acarretando numa deficiência no transporte de aminoácidos pela barreira placentária. Além disso, trabalhos relatam que a atividade da mTORC estava reduzida no período final gestacional deste modelo, contribuindo para uma deficiência nos transportadores de aminoácidos da mãe para o feto e o baixo ganho de massa ao nascer (ROSARIO et al. 2011, ROOS et al. 2009, JANSSON et al. 2006).

4.2 Sobre o efeito da rapamicina: no peso corporal da prole durante o tratamento

O complexo proteico mTOR1 tem um papel bem estabelecido na regulação da síntese proteica em células hipertróficas ou que estejam na fase S1 da mitose. De forma geral, a rapamicina não causa uma supressão generalizada sobre a tradução de RNAm em concentrações que inibam totalmente a fosforilação dos dois principais substratos do complexo, 4E-BP1 e S6 kinases (S6Ks). Preferencialmente, a rapamicina exerce um efeito seletivo na síntese proteica, afetando a maioria dos alvos de tradução (por exemplo Myc e a ciclina D1) que codificam proteínas associadas ao crescimento celular e proliferação (ABRAHAM et al. 2010).

Além disso, estudos que investigam o possível papel terapêutico da inibição da mTORC em linhagens de células tumorais, identificaram que a supressão da atividade da mTORC acaba por induzir aumento na atividade da sinalização da via IRS-1, ativando a cascata IGF-IR/IRS-1/PI3K culminando na sinalização do AKT, permitindo assim, que a proliferação celular não seja completamente inibida (O'REILLY et al. 2012).

4.3 Sobre a pressão arterial sistólica

Quando avaliamos o perfil pressórico dos animais durante o período de tratamento, curiosamente observamos que a rapamicina elevou consideravelmente, a pressão arterial sistólica nos animais de ambos os grupos NPR e LPR. Estudos experimentais em camundongos, têm relatado que a administração sistêmica de rapamicina previne a hipertrofia ventricular em modelos experimentais de hipertensão arterial (GAO et al. 2006; McMULLEN et al. 2004), possuindo assim, efeito cardioprotetor inclusive com metodologia semelhante à utilizada no presente trabalho (DAS et al. 2014; DAS et al. 2012). Esta ação, a despeito de controversa, tem sido considerada como benéfica sobre a função cardiovascular. Até o momento, no entanto, não tem sido relatado em modelos experimentais, influência da rapamicina na pressão arterial, o que pode ser considerado um achado novo do presente estudo.

Observamos também, que o grupo LPD que não recebeu rapamicina, a pressão arterial sistólica não se elevou conforme ocorre nos animais programados já demonstrado pelo nosso laboratório (LIMA et al. 2013; SCABORA et al. 2013; MESQUITA et al. 2010) e também já bem aceito e estabelecido na literatura (CHONG e YOSYPIV 2012; BAUM 2009; LANGLEY-EVANS 2009; VEHASKARI et al. 2001). Diante tal resultado, aventamos a hipótese que: (1) a utilização de DMSO, como solvente orgânico e utilizado como veículo no presente estudo, possui atividades farmacológicas e fisiológicas próprias, tais como: anti-inflamatória, antissepsia, inibidora da agregação plaquetária, cardio e renoprotetora (JACOB e TORRE 2009; COLUCCI et al. 2008; JACOB e HERSCHELER 1986) contudo, vasta lista estabelece a existência de feitos colaterais, tais como: náusea, diarreia, hemólise, hipertensão arterial em humanos, edema pulmonar e bradicardia (SANTOS et al. 2003). Na literatura, todas estas observações ainda são controversas e motivo de estudo e, são dependentes consideravelmente, da concentração utilizada, via de administração e modelo experimental (SANTOS et al. 2003). (2) Por outro lado, podemos aventar uma segunda possibilidade, não podemos afastar a possibilidade que a elevação pressórica tenha decorrido pelo manuseio excessivo do animal, as constantes aplicações intraperitoneais de rapamicina e, o longo período de adaptação à aferição da pressão arterial por pletismografia de cauda, embora cabe ressaltar que todos os procedimentos de manuseio dos animais foram cuidadosa e rigorosamente controlados, sempre visando o bem estar do animal segundo os padrões estabelecidos pelo COBEA na utilização de animais para experimentação.

Curiosamente, quando o tratamento foi interrompido e a pressão arterial sistólica foi aferida novamente após 4 semanas, os animais do grupo LPR permaneceram com a pressão arterial sistólica elevada com relação aos outros grupos, enquanto que o grupo NPR apresentou uma redução da pressão arterial sistólica. Este achado sugere no grupo LPR, os efeitos da programação associados ao uso por 9 semanas de rapamicina mantiveram elevadas a pressão arterial sistólica e, que a rapamicina embora tenha efeitos sobre a função e a

morfologia renal, como veremos a seguir, não previne ou atenua os efeitos cardiovasculares da programação fetal.

Os mecanismos pelo qual a rapamicina elevou a pressão arterial e pelo qual o grupo LPR não foi capaz de reduzi-la após o tratamento permanece desconhecidos e necessita uma investigação mais apurada.

4.4 Sobre o efeito da rapamicina na função renal

O presente estudo não mostrou qualquer diferença significativa no clearance de creatinina como estimativa da taxa de filtração glomerular, para qualquer idade ou grupo experimental avaliado. Estas observações, somadas ao número reduzido de nefros, já bem estabelecido neste modelo de animais LP, indica um processo de adaptação da função renal, como decorrência de hiperfluxo e hiperfiltração, permitindo que a taxa de filtração glomerular global permaneça similar nos animais do grupo controle NP e LP. Com relação à excreção de sódio e suas frações, observa-se que esta foi significativamente elevada no grupos tratados com rapamicina, o que pode sugerir pelo menos parcialmente que esta elevação na excreção urinária de sódio decorra da elevação pressórica nestes animais, portanto pode-se tratar de natriurese pressórica. Este efeito ocorreu, predominantemente, nos estudos na 8^a. e 12^a. semanas, período em que a rapamicina estava sendo administrada e a elevação pressórica foi determinante. Com relação ao grupo LPR, que também apresentou elevação na pressão arterial sistólica, a resposta natriurética foi significativamente elevada na oitava semana de estudo, quando comparada ao grupo NPD. Na 12^a semana de idade, a excreção de sódio foi similar à excreção do grupo NPD, sugerindo que nestes animais os efeitos já conhecidos da programação fetal sobre a antinatriurese tenha atenuado os efeitos pressóricos decorrentes do tratamento com rapamicina. Em todos estes estudos, a elevação da excreção tubular de sódio ocorreu nos segmentos distais do nefro.

É importante salientar que, apesar de não termos encontrado uma diferença estatística significativa, o grupo dos animais programados não tratados

com rapamicina (LPD), na idade de 12 semanas, passou a ter uma carga excretada de sódio reduzida pela metade em relação ao grupo NPD, sustentando a afirmação acima de que efeitos da programação sobre a redução na excreção de sódio podem ter atuado nestes casos. Assim, esta observação pode ser tomada como mais uma evidencia de que os animais LP foram programados. Conforme estudos de Brenner (1992) e Hostetter (2001), na tentativa de adaptar a função renal frente a um reduzido número de unidades funcionais, como tem sido comprovado neste modelo de restrição proteica gestacional, ocorre um processo de hiperfiltração nos nefros remanescentes com elevação da fração de filtração e redução relativo do fluxo peritubular, o que por mecanismos hemodinâmicos promoveria um aumento na reabsorção tubular de sódio na porção proximal do túbulo (BRENNER et al. 1992; MESQUITA et al. 2010; LIMA et al. 2013; SCABORA et al. 2013; HOSTETTER et al 2001). Contudo, neste trabalho observamos que o aumento na reabsorção de sódio em ambos os grupos, ocorreu nas porções distais do túbulo, indicando que os mecanismos hemodinâmicos não são os responsáveis por esta reabsorção, como evidenciado pelos modelos de programação fetal, possivelmente por um efeito secundário do DMSO. Tendo em conta achados prévios em nosso laboratório demonstrando uma elevação da expressão de constituintes do sistema renina-angiotensina no parênquima renal neste modelo, não podemos afastar também a ação de fatores humorais neste processo de manipulação tubular renal de sódio (VACCARI et al. 2013).

Quando foi avaliada a função renal com 16 semanas, observamos que a manutenção de uma elevada pressão arterial sistólica contribuiu para que a natriurese dos animais do grupo LPR, permanecesse elevada neste grupo em relação aos demais.

4.5 Sobre o efeito da rapamicina na proteinúria

Nosso laboratório já havia identificado que os animais programados pela dieta hipoproteica apresentam proteinúria a partir da 16^a. semana de vida, o que foi confirmado no presente estudo. Aqui, observamos a evolução desta proteinúria

indicando a presença de desordens e lesões glomerulares sobre a membrana semipermeável de filtração (SENE et al 2013). O grupo de animais programados LPD, apresentou maior excreção urinária de proteínas nas idades de 12 e 16 semanas. De forma interessante e inédita, o tratamento por nove semanas com rapamicina, tanto controle como programado, apresentassem uma expressiva redução nos níveis de proteinúria sendo significativamente reduzidos nos grupos LPR em relação ao grupo controle NPD, indicando assim, que o tratamento com esta droga preserva ou recupera a integridade da estrutura permseletiva do diafragma fenestrado glomerular.

As alterações da membrana semipermeável glomerular podem ter diversas origens e sabe-se que a hipertensão arterial sistêmica, promovendo uma elevação da pressão de ultrafiltração, é um dos fatores determinantes para que as alterações glomerulares ocorram, em longo prazo (SHANKLAND 2006). Os podócitos expressam receptores com funções vasoativas, tais como receptores para acetilcolina e angiotensina II (MORTON et al. 2004) e já foi demonstrado pelo estudo de micropunção glomerular, em diversos modelos experimentais dentre os quais o modelo de hipertensão DOCA-SALT, que a hipertensão arterial pode induzir a esclerose glomerular focal e segmentar, expansão mesangial, proteinúria e evoluir para esclerose glomerular e fibrose renal com falência renal crônica (DWORKIN et al. 1984; KRETZLER et al. 1994).

É interessante e importante ressaltar que os dados encontrados, de forma extensa na literatura, a respeito dos benefícios da inibição da mTORC sobre a estrutura glomerular nos modelos experimentais, são ainda controversos quando comparados a achados clínicos, principalmente nos pacientes transplantados renais que utilizam a rapamicina como imunossupressor. De forma geral, os inibidores da mTORC são menos nefrotóxicos em relação aos inibidores da calcineurina contudo, em grande numero dos relatos, quando da administração de rapamicina ocorre uma elevação dos níveis de proteinúria ao longo do tratamento, o que pode comprometer a sobrevida do enxerto e conseqüentemente de vida dos pacientes transplantados (MÜLLER-KREBS et al. 2013; HUBER et al. 2011; VOLLENBRÖKER et al. 2009; LIEBERTHAL et al. 2001).

Acreditamos que a inibição da mTORC seja capaz de prevenir o desenvolvimento de glomerulopatias mesmo frente a hipertensão arterial e em indivíduos portadores de diabetes mellitus, embora, não seja eficaz na recuperação dos danos glomerulares quando estes já estão estabelecidos. Muitas investigações ainda são necessárias para compreender melhor as discrepâncias entre os achados experimentais e clínicos.

4.6 Discussão sobre a expressão de Nefrina

A nefrina é uma importante proteína estrutural do diafragma fenestrado glomerular, tendo como principal função o ancoramento dos pedicelos ao citoesqueleto de actina através de uma cadeia de proteínas associadas. Possui uma extensa porção extracelular e um domínio citoplasmático com oito locais de fosforilação de tirosina. A deficiência na codificação do gene *NPHS1*, que codifica a nefrina, está associada ao aparecimento de síndrome nefrótica com massiva proteinúria. Sabe-se que a nefrina interage com uma série de outras proteínas intracelulares na manutenção da estrutura do citoesqueleto de actina e na morfologia celular (WELSH e SALEEM 2012).

Em nosso estudo, a quantificação de nefrina por *western blotting*, não foi capaz de estabelecer diferenças significativas entre os grupos estudados seja quando avaliados na 12^a. ou 16^a. semanas de vida. Aventamos a possibilidade que estes achados são decorrentes de: (1) As amostras para western blotting são analisadas utilizando extrato total renal e não de glomérulos isolados. Diferenças na expressão de nefrina utilizando esta técnica, podem ter sido minimizadas uma vez que nefrina é expressa predominantemente, no tufo glomerular embora esteja também está presente em outras estruturas renais, ou (2) levando-se em consideração os achados de INOKI e colaboradores (2011), em modelo de nefropatia diabética, identificaram que a expressão de nefrina encontrava-se normal, mesmo diante de um quadro de proteinúria. No entanto, quando os glomérulos foram avaliados por imunistoquímica, a localização da expressão de nefrina passou a ser observada intracelularmente com menor expressão desta nas

membranas de filtração glomerular, indicando que, apesar de quantitativamente similar, a localização desta proteína poderia torná-la inadequada funcionalmente.

4.7 Sobre a estrutura glomerular

A podocina pertence à família das estomatinas e essa proteína é codificada pelo gene NPHS2. A Podocina é exclusivamente expressa pelos podócitos durante a fase de desenvolvimento e também esta presente nos glomérulos maduros. Acredita-se que sua função seja atuar como uma plataforma para o recrutamento de complexos multiproteicos que possuem essencialmente funções regulatórias. A podocina possui uma estrutura em forma de grampo, com ambas as sua porções N-terminal e C-terminal, voltadas para a porção citosólica do diafragma fenestrado. Ela se localiza em micro domínios lipídicos do diafragma fenestrado onde recruta a expressão da nefrina que acaba por aumentar sua atividade de sinalização. Além disto, a podocina agrupa e regula o canal iônico TRPC6 que permite ao diafragma fenestrado atuar como sensor de estiramento, propiciando ao citoesqueleto remodelar e contrair os processos podocitários em resposta ao estímulo mecânico (WELSH e SALEEM 2012). O presente estudo demonstra uma maior imunomarcagem de podocina no grupo NPR em relação aos demais grupos sendo esta de localização predominantemente, intracelular.

Quanto à nefrina, assim como na análise pelo *western blotting*, não apresentou diferença de intensidade entre os grupos na idade estudada, contudo, nota-se evidentemente que a localização da nefrina foi modificada, deixando de estar presente na membrana plasmática, aonde exerce sua função de ancoramento entre os pedicelos, indicando assim, que pode estar ocorrendo à simplificação podocitária, já descrita neste modelo e em modelos de glomerulopatias diabéticas (SENE et al. 2013; INOKI et al. 2011).

5 CONCLUSÃO



Concluimos através do presente estudo que a inibição da mTORC através da administração de rapamicina:

1. O tratamento com rapamicina eleva a pressão arterial sistólica e a excreção urinária de sódio; No grupo controle, esta elevação pressórica e natriurética são atenuadas pela interrupção do tratamento;
2. O estudo confirma que animais programados apresentam uma redução progressiva na excreção urinária de sódio, fenômeno atenuado pelo tratamento com rapamicina;
3. Na prole de animais submetidas à restrição proteica gestacional e tratados com rapamicina, a pressão arterial sistólica e natriurese permanecem elevadas mesmo após a interrupção do tratamento;
4. O presente estudo demonstrou, por imunistoquímica, que os animais LP apresentam uma expressão glomerular citoplasmática pontilhada de nefrina. A inibição da mTORC modifica a expressão de nefrina (linear com localização na membrana celular) e podocina nos glomérulos destes animais, recuperando a integridade funcional das membranas de filtração glomerular.
5. A proteinúria, possível resultado das alterações estruturais da membrana de filtração glomerular, já demonstrada na prole de ratos LP, foi significativamente atenuada pelo tratamento destes animais com rapamicina mesmo após a interrupção do tratamento;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Abraham RT, Gibbons JJ, Graziani EI. Chemistry and Pharmacology of Rapamycin and its Derivatives. In. Hall MN, Tamanoi F (ed.). THE ENZYMES. USA. **Elsevier** 2010.

Armitage JA, KHAN IY, TAYLOR PD, NATHANIELSZ PW, POSTON L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? **J Physiol**, 1;561(Pt 2):355-77,2004.

Barker DJP, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **The Lancet**, Volume 341, Issue 8850, 1993, Pages 938–941

Barker DJP. Maternal Nutrition, Fetal Nutrition, and Disease in Later Life. **Nutrition** Vol. 13, No. 9, 1997.

Barker DJP, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition and ischaemic heart disease in England and Wales. **The Lancet**, Volume 327, Issue 8489, Pages 1077 – 1081. 1986.

Barker DJP, Osmond C, Winter PD, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **The Lancet**, Volume 334, Issue 8663, Pages 577 – 580. 1989.

Barker DJP. The fetal and infant origins of disease. **European Journal of Clinical Investigation** (1995) 25,451-463.

Baum M. Role of the kidney in the prenatal and early postnatal programming of hypertension. **Am J Physiol Renal Physiol** 298: F235–F247, 2010.

Bertram CE, Hanson MA. Animal models and programming of the metabolic syndrome. **Br Med Bull.**, 60:103-21, 2001.

Bertuccio CA. Relevance of VEGF and Nephrin Expression in Glomerular Diseases. **Journal of Signal Transduction** Volume 2011, Article ID 718609.

Bispham J, Gopalakrishnan GS, Dandrea J, Wilson V, Budge H, Symonds ME, et al. Maternal Endocrine Adaptation throughout Pregnancy to Nutritional Manipulation: Consequences for Maternal Plasma Leptin and Cortisol and the Programming of Fetal Adipose Tissue Development. **Endocrinology** 144(8):3575–3585.

Brenner BM, Anderson S. The interrelationships among filtration surface area, blood pressure, and chronic renal disease. **J Cardiovasc Pharmacol. Vol. 19 (suppl. 6). 1992.**

Chong E, Yosypiv I. Developmental Programming of Hypertension and Kidney Disease. **International Journal of Nephrology** Volume 2012, Article ID 760580.

Colucci M, Maione F, Bonito MC, Piscopo A, Giannuario AD, Pieretti S. New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. **Pharmacological Research** 57 (2008) 419–425.

Das A, Durrant D, Koka S, Salloum FN, Xi L, Kukreja R. Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Inhibition with Rapamycin Improves Cardiac Function in Type 2 Diabetic Mice. **Journal of Biological Chemistry.** 2014, Volume 289, Number 7.

Das A, Salloum FN, Durrant D, Ockaili R, Kukreja R. Rapamycin Protects against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury through JAK2-STAT3 Signaling Pathway. **J Mol Cell Cardiol.** 2012 December ; 53(6): 858–869.

Dworking LD, Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. Hemodynamic Basis for Glomerular Injury in Rats with Desoxycorticosterone-Salt Hypertension. **J. Clin. Invest.** Volume 73, May 1984, 1448-1461.

Fowden AL, Forhead AJ, Coan PM, Burton GJ. The placenta and intrauterine programming. **J Neuroendocrinol.** 2008 Apr;20(4):439-50.

Fowden AL, Forhead AJ. Hormones as epigenetic signals in developmental programming. **Exp Physiol** 2009. 94.6 pp 607–625.

Friedrich C, Endlich N, Kriz W, Endlich K. Podocytes are sensitive to fluid shear stress in vitro. **Am J Physiol Renal Physiol** 291: F856–F865, 2006.

Fuchshofer R, Ullmann S, Zeilbeck LF, Baumann M, Junglas B, Tamm ER. Connective tissue growth factor modulates podocyte actin cytoskeleton and extracellular matrix synthesis and is induced in podocytes upon injury. **Histochem Cell Biol** (2011) 136:301–319.

Gao X, Wong G, Wang B, Kiriazis H, Moore X, Du X, et al. Inhibition of mTOR reduces chronic pressure-overload cardiac hypertrophy and fibrosis. **Journal of Hypertension** 2006, 24:1663–1670.

Gulati P, Thomas G. Amino Acid Regulation of hVps34 and mTORC1 Signaling. In: Hall MN, Tamanoi F (ed.). THE ENZYMES. USA. **Elsevier** 2010.

Guzman C, Cabrera R, Cárdenas M, Larrea F, Nathanielsz PW, Zambrano E. Protein restriction during fetal and neonatal development in the rat alters reproductive function and accelerates reproductive ageing in female progeny. **J Physiol** 572.1 (2006) pp 97–108.

Hales CN, Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **International Journal of Epidemiology** 2013;42:1215–1222.

Hoet JJ, HANSON MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. **J Physiol**, 1;514 (Pt 3):617-27, 1999.

Hostetter TH, Olson JL, Rennke HG, Venkatachalam MA, Brenner BM. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. **J Am Soc Nephrol** 12: 1315–1325, 2001.

Huber TB, Walz G, Kuehn EW. mTOR and rapamycin in the kidney: signaling and therapeutic implications beyond immunosuppression. **Kidney International** (2011) 79, 502–511.

Inoki K, Mori H, Wang J, Suzuki T, Hong S, Yoshida S et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice. **The Journal of Clinical Investigation**. Volume 121 Number 6 June 2011.

Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. **Cryobiology** 23, 14-27 (1986).

Jacob SW, Torre JC. Pharmacology of dimethyl sulfoxide in cardiac and CNS damage. **Pharmacological Reports** 2009, 61, 225-235.

Jansson N, Pettersson J, Haafiz A, Ericsson A, Palmberg I, Tranberg M, Ganapathy V, Powell TL, Jansson T. Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet. **J Physiol** 576.3 (2006) pp 935–946.

Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picorssirius staining plus polarization microscopy, specific method of collagen detection in tissue sections. **J. Histochem.** 1979; 11:447-445.

Lammig DW, Sabatini DM. Regulation of TOR Signaling in Mammals. In. Hall MN, Tamanoi F (ed.). THE ENZYMES. USA. **Elsevier** 2010.

Langley-Evans SC, Jackson AA. Captopril normalizes systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low-protein diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 110A, 223±228 (1995).

Langley-Evans SC. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. **J. Anat.** 2009. 215, pp36–51.

Levitt N.S, Lindsay R.S, Holmes M.C, Seckl J.R. Dexamethasone in the Last Week of Pregnancy Attenuates Hippocampal Glucocorticoid Receptor Gene Expression and Elevates Blood Pressure in the Adult Offspring in the Rat. **Neuroendocrinology** 1996;64:412–418.

Lieberthal W, Fuhro R, Andry CC, Rennke H, Abernathy VE, Levine J; et al. Rapamycin impairs recovery from acute renal failure: role of cell-cycle arrest and apoptosis of tubular cells. **Am J Physiol Renal Physiol** 281: F693–F706, 2001.

Li L, Guan KL. Rag GTPases in TORC1 Activation and Nutrient Signaling. In. Hall MN, Tamanoi F (ed.). THE ENZYMES. USA. **Elsevier** 2010.

Lima MC, Scabora JE, Lopes A, Mesquita FF, Torres D, Boer PA, Gontijo JAR. Early changes of hypothalamic angiotensin II receptors expression in gestational protein-restricted offspring: effect on water intake, blood pressure and renal sodium handling. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System** 2013 14: 271.

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 May;31(3):151-6.

Mark PJ, Augustus S, Lewis JL, Hewitt DP, Wadell BJ. Changes in the placental glucocorticoid barrier during rat pregnancy: Impact on placental corticosterona levels and regulation by progesterone. **Biology of Reproduction** 80, 1209-1215 (2009).

Menzel S, Moeller MJ. Role of the podocyte in proteinuria. **Pediatr Nephrol** (2011) 26:1775–1780.

Mesquita FF, Gontijo JAR, 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: 380–388.

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

McMullen JR, Sherwood MC, Tarnavski O, Zhang L, Dorfman AL, Izumo S, et al. Inhibition of mTOR Signaling With Rapamycin Regresses Established Cardiac Hypertrophy Induced by Pressure Overload. **Circulation**. 2004;109:3050-3055.

McMullen S, Gardner DS, Langley-Evans SC. Prenatal Programming of Angiotensin II Type 2 Receptor Expression in the Rat. **Br J Nutr**. 2004 January ; 91(1): 133–140.

Mori H, Inoki K, Masutani K, Wakabayashi Y, Komai K, Yoshimura A, et al. The mTOR pathway is highly activated in diabetic nephropathy and rapamycin has a

strong therapeutic potential. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 384 (2009) 471–475.

Morton MJ, Hutchinson K, Mathieson PW, Witherden IR, Saleem MA, Hunter M. Human Podocytes Possess a Stretch-Sensitive, Ca²⁺-Activated K Channel: Potential Implications for the Control of Glomerular Filtration. **J Am Soc Nephrol** 15: 2981–2987, 2004.

Müller-Krebs S, Weber L, Tsobaneli J, Kihm LP, Reiser J, Schwenger V, et al. Cellular Effects of Everolimus and Sirolimus on Podocytes. **PLoS ONE** 8(11) (2013).

Östreicher I, Almeida JR, Campean V, Rauh M, Plank C, Amann K, Dötsch J. Changes in 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in a low-protein rat model of intrauterine growth restriction. **Nephrol Dial Transplant** (2010) 25: 3195–3203.

Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: An overview. **Reproductive Toxicology** 20 (2005) 345–352.

Puddu M, Fanos V, Poda F, Zaffanello M. The Kidney from Prenatal to Adult Life: Perinatal Programming and Reduction of Number of Nephrons during Development. **Am J Nephrol** 2009;30:162–170.

Quaggin SE, Kreidberg JE. Development of the renal glomerulus: good neighbors and good fences. **Development** 135, 609-620 (2008).

Rae MT, Palassio S, Kyle CE, Brooks AN, Lea RG, Miller DW, Rhind SM. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. **Reproduction** (2001) 122, 915–922.

Rhind SM, Rae MT, Brooks AN. Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. **Reproduction** (2001) 122, 205–214.

Roos S, Powell TL, Jansson T. Placental mTOR links maternal nutrient availability to fetal growth. **Biochem. Soc. Trans.** (2009) 37, 295–298.

Rosario FJ, Jansson N, Kanai Y, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. Maternal Protein Restriction in the Rat Inhibits Placental Insulin, mTOR, and STAT3 Signaling and Down-Regulates Placental Amino Acid Transporters. **Endocrinology**, March 2011, 152(3):1119 –1129.

Roseboom T, Rooij S, Painter R. The Dutch famine and its long-term consequences for adult health. **Early Human Development** (2006) 82, 485—491.

Roseboom TJ, van der Meulen JHP, Ravelli ACJ, Osmond C, Barker DJP, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Molecular and Cellular Endocrinology** 185 (2001) 93–98.

Ruotsalainen V, Ljungberg P, Wartiovaara J, Lenkkeri U, Kestila M, Jalanko H et al. Nephrin is specially located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. Vol. 96, pp. 7962–7967, July 1999 **Cell Biology**.

Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology** 65 (2003) 1035-1041.

Scabora JE, Lima MC, Lopes A, Lima IP, Mesquita FF, Torres DB, Boer PA, Gontijo JAR. Impact of taurine supplementation on blood pressure in gestational proteinrestricted offspring: Effect on the medial solitary tract nucleus cell numbers,

angiotensin receptors, and renal sodium handling. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System** 0(0) 1–12 2013.

Schreuder M, Waal HD, Wijk A. Consequences of Intrauterine Growth Restriction for the Kidney. **Kidney Blood Press Res** 2006;29:108–125.

Sene LB, Mesquita FF, 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. **PlosOne** August 2013 | Volume 8 | Issue 8 | e71310.

Shankland SJ. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis. **Kidney International** (2006) 69, 2131–2147.

Shen Q, Xu H, Wei LM, Chen J, Liu HM, Guo W. A comparative proteomic study of nephrogenesis in intrauterine growth restriction. **Pediatr Nephrol** (2010) 25:1063–1072.

Suter MA, Anders AM, Aagaard KM. Maternal smoking as a model for environmental epigenetic changes affecting birth weight and fetal programming. **Molecular Human Reproduction**, Vol.19, No.1 pp. 1–6, 2013.

Tamashiro KLK, Moran TH. Perinatal environment and its influences on metabolic programming of offspring. **Physiology & Behavior** 100 (2010) 560–566.

Teodoro GFR, Vianna D, Torres-Leal FL, Pantaleão LC, Mattos-Neto EM, Tirapegui J, et al. Leucine is essential for attenuating fetal growth restriction caused by a protein-restricted diet in rats. **J. Nutr.** 142: 924–930, 2012.

Thomal JT, Palma BD, Ponzio BF, Franco MCP, Zaladek-Gil F, Gomes GN, et al. Sleep Restriction during Pregnancy: Hypertension and Renal Abnormalities in Young Offspring Rats. **SLEEP**, Vol. 33, No. 10, 2010.

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.

Vehaskari VM, Diego HA, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. **Kidney International**, Vol. 59 (2001), pp. 238–245.

Vollenbröcker B, George B, Wolfgart M, Saleem MA, Pavenstädt H, Weide T. mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes. **Am J Physiol Renal Physiol** 296: F418–F426, 2009.

Watanabe R, Wei L, Huang J. mTOR Signaling, Function, Novel Inhibitors, and Therapeutic Targets. **J Nucl Med** 2011; 52:497–500.

Welberg LAM, Thirivikraman KV, Plotsky PM. Chronic maternal stress inhibits the capacity to up-regulate placental 11-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. **Journal of Endocrinology** (2005) 186, R7–R12.

Welsh GI, Saleem MA. The podocyte cytoskeleton—key to a functioning glomerulus in health and disease. **Nat. Rev. Nephrol.** 8, 14–21 (2012).

Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR Signaling in Growth and Metabolism. **Cell** 124, February 10, 2006.

Zinzalla V, Sturgill TW, Hall MN. TOR Complexes: Composition, Structure, and Phosphorylation. In. Hall MN, Tamanoi F (ed.). **THE ENZYMES. USA. Elsevier** 2010.

7 ANEXOS



Tabela 1. Dados gerais da massa corporal ao nascer até o desmame. Em vermelho, os valores outliers.

Peso ao nascer		1 semana		2 semanas		3 semanas	
NP	LP	NP	LP	NP	LP	NP	LP
7,65	5,41	16,31	13,86	34,06	31,41	49	48
7,72	6	19,19	14,5	34,83	30,25	51	51
6,04	5,94	17,47	14,37	31,78	29,37	54	47
6,24	6,01	16,4	13,98	35,34	30,91	52	54
5,46	5,8	15,79	14,68	33,85	30,16	49	49
6,85	5,93	18,22	14,01	34,47	30,14	48	46
6,05	5,4	18,42	14,16	33,22	31,65	46	43
6,46	5,11	17,92	16,97	33,25	29,27	46	51
6,43	5,4	17,11	16,78	30,58	30,66	50	51
6,19	5,9	17,4	16,06	34,16	32,98	49	52
6,47	5,25	18,07	15,02	31,19	32,02	49	46
5,71	5,99	15,23	14,88	32,52	29,78	52	54
5,94	6,31	15,39	15,33	33,72	31,13	48	52
6,22	5,82	16,15	13,59	27,95	27,46	52	54
6,25	5,72	16,5	17,05	31,14	27,85	57	50
6,46	5,57	17,33	14,9	29,72	29,78	52	44
6,86	5,82	16,96	16,6	29,62	34,82	54	39
6,74	5,72	16,75	18,07	29,47	34,83	52	
7,1	5,57	19	17,34	27,57	31,99	54	
7,14	5,21	18,85	17,98	29,78	34,27	55	
6,31	5,19	16,48	18,23	35,29	33,49	60	
6,1	5,38	16,35	16,72	35,27	36,2	59	
6,39	6,13	16,77	16,2	20,09	32,87	45	
5,92	6,91	17,19	15,73	29,54	26,05	61	
6,53	6,51	17,48	12,41	31,38	29,88	47	
5,61	7,46	17,15	16,55	30,92	25,21	59	
6,03	7,51	15,63	15,19	29,38	29,65	61	
6,44	6,28	17,84	14,58	30,88	31,08	63	
6,29	6,23	17,44	16,16	29,48	28,48	60	
6,17	5,94	17,35	13,98	30,86	27,97	46	
4,01	6,12	18,24	14,15	31,93	25,74	44	
6,15	6,22	17,12	15,37	31,69	27,22	50	
6,1	6,18	17,39	14,52	24,59	26,86	49	
6,22	6,25	17,79	16,36	31,76	25,89	46	
5,84	5,2	11,62	16,96	32,06	25,02	49	
6,28	4,91	17,65	15,9	25,83	25,49	49	
5,96	5,38	16,39	14,18	31,9	26,87	47	
6,26	6,05	14,68	13,28	32,49	26,41	46	
6,53	6,55	15,73	12,78	21,43	23,89		
5,79	6,41	16,38	14,27	22,09			
6,08	6,07	11,39	14,46	22,06			
6,3	6,04	12,85	14,31	22			
6,31	5,33	13,47	13,26	21,6			
5,87	5,48	13	12,14	21,81			
6,25	5,52	12,98		24,45			
6,26	5,7	12,69		26,56			
6,06	6,08	19,71		24,51			
6,48	5,31	17,6		26,68			
6,64	5,85	17,76		21,02			
6,45	5,81	18,25		28,38			
6,72	5,82	16,61		24,38			
6,37	6,07	17,12		19,9			
6,42	5,98	19,02					
6,41	6,49	16,97					
6,13	6,47	16,81					
6,05	5,56	11,86					
5,98	6,41	13,55					
5,93	5,6	12,58					
6,29	5,48	12,67					
6,35	5,44	14,04					
5,96	5,97	11,2					
6,33	5,34	13,53					
6,17	4,72	11,23					
6,1	5,13						
6,45	4,98						
6,38	5						
	4,43						
	5,21						

