Flávia Fernandes Mesquita

Programação da ontogênese renal em um modelo de restrição proteica gestacional: estudos em cultura de metanefro e *in vivo* 

> Campinas 2010

Flávia Fernandes Mesquita

# Programação da ontogênese renal em um modelo de restrição proteica gestacional: estudos em cultura de metanefro e *in vivo*.

Tese apresentada à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração: Medicina Experimental.

Orientador: Patrícia Aline Boer Co-Orientador: José Antonio Rocha Gontijo

> Campinas Unicamp 2010

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

M562p	Mesquita, Flávia Fernandes Programação da ontogênese renal em um modelo de restrição protéica gestacional: estudos em cultura de metanefro e <i>in vivo</i> / Flávia Fernandes Mesquita. Campinas, SP : [s.n.], 2010.
	Orientadores : Patrícia Aline Boer; José Antonio Rocha Gontijo Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	<ol> <li>Desnutrição protéica. 2. Hipertensão arterial. 3. Sistema renina-angiotensina. 4. Testes de função renal. I. Boer, Patrícia Aline. II. Gontijo, José Antonio Rocha. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.</li> </ol>

## Título em inglês : Renal ontogenesis programming by maternal protein restriction:metanephroi culture and *in vivo* studies

Keywords:

- Maternal protein restriction
- Hypertension
- Renin-Angiotensin system
- Renal function

#### Titulação: Doutor em Fisiopatologia Médica Área de concentração: Medicina Experimental

Banca examinadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Aline Boer

Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Emmanuel de Almeida Burdmman

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Wilma de Grava Kempinas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Terezila Machado Coimbra

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Guiomar Nascimento Gomes

Data da defesa: 29-01-2010

## Banca examinadora da tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Patrícia Aline Boer

Membros:	2
1. Profa. Dra. Emanuel de Almeida Burdmann	Therman
2. Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra	Bulga ladado amplu
3. Prof. Dr. Wilma De Grava Kempinas	Willey.
4. Prof. Dr. Guiomar Nascimento Gomes	ALGON (
5. Prof. Dr. Patrícia Aline Boer	a fin sar

Curso de pós graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 29/01/2010

"O desconhecido exerce um fascínio tão sedutor que a sua beleza só pode ser classificada como mágica. Uma paixão ardente onde cada pedaço das vestimentas vai sendo retirado com deleite, revelando aos poucos a intimidade da realidade que se oculta sob um delicado véu de veludo. Um amor profundo que vai se conhecendo aos poucos, e a cada día deseja-se conhecer aínda maís." (Natokun) "A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realízar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável." (Galíleu Galílei)

> Dedico esta tese aos meus país, Fran e Mesquita, por me ensinarem a perseverar, sempre com honestidade, lealdade e amor!

Agradeço:

...a Deus, sempre!,

... aos meus orientadores, Dr. Gontijo e Dra Patrícia, pelo conhecimento, carinho, amizade e confiança no meu trabalho. Pelo estímulo e dedicação com que sempre me incentivaram,

...ao Dr. John Bertram pelo grande carinho que me recebeu na Austrália, e por todo o ensinamento sobre humildade e honestidade,

...a Profa. Dra. Maria José Queiroz de Freitas Alves, primeira orientadora e grande amiga, por ter aberto as portaso do mundo científico para mim,

...ao Dr. Carlos Mandarim-de-Lacerda, Dra Daniela do Santos, Dr. James Armitage, Dra Luise Ewen-McCullen,

... aos colegas do Laboratório de Metabolismo Hidrosalino, pelo apoio em todas as horas,

... aos colegas do Laboratório de Programação Fetal, por me receberem sempre com alegria,

... aos colegas da Monash University, os quais tenho sempre na lembrança,

... a amiga Amanda Roberta de Almeida, pela amizade, conselhos e por auxílio em boa parte deste trabalho,

...aos meu pais e irmãos, pela paciência, carinho e compreensão,

... ao Emanuel, de quem esta tese roubou um pouco a minha presença,

... aos demais colegas, amigos, parentes, aqui não mencionados, mas que foram de muita importância principalmente ao me apoiarem neste caminho.

... a Capes por conceder a bolsa, bem como o estágio sanduíche,

... a Faculdade de Ciências Médicas, por me receber e apoiar a pesquisa.



### Resumo

O desenvolvimento renal é finamente orquestrado por diversos fatores e pequenas modificações neste mecanismo podem resultar no fenótipo de menor número de glomérulos, até agenesia renal. A programação fetal por restrição proteica gestacional está relacionada com a hipertensão arterial manifestada no indivíduo adulto submetido à dieta hipoproteica durante a fase uterina. Estudos descrevem que a "hipertensão programada" pode estar relacionada ao menor número de nefro (30%) encontrado nestes indivíduos. Dados obtidos em animais também confirmam a relação entre dieta materna e número de nefro em animais adultos.

Esta tese tem por objetivo determinar desde qual ponto do desenvolvimento a organogênese renal pode ser influenciada pela restrição proteica gestacional, bem como determinar quais adaptações renais, morfológicas e funcionais, o animal sofre em sua vida adulta, relacionadas ao perfil hipertensivo.

Ratos Wistar fêmea foram submetidas a dieta hipoproteica durante a gestação, e a prole de machos foi estudada nos experimentos seguintes: A cultura de metanefro mostrou que na idade gestacional de 14.25 dias, o metanefro do embrião desnutrido proteicamente já está "programado" a se ramificar menos do que o controle, gerando menor número de pontos de formação de nefros. A quantificação de glomérulos em embriões de 17.5 dias foi compatível com o resultado do estudo "in vitro". Estudo utilizando PCR em tempo real para avaliar o sistema renina-angiotensina durante a nefrogênese revelou que este sistema não está alterado enquanto intra-utero, no entanto, a expressão de mRNA de renina, angiotensinogênio e receptores de angiotensina II após o nascimento é excessiva quando comparado ao animal controle. Experimentos em animais adultos que sofreram restrição proteica intra-utero revelaram que os receptores de angiotensina II estão regulados negativamente nos rins, comparados aos animais controle. Os animais "programados" nasceram com baixo peso e também apresentaram pressão arterial elevada a partir da 12ª semana de vida. A análise da função renal mostrou que a filtração glomerular não está alterada, mesmo com menor número de nefros apresentado neste modelo, sugerindo uma hiperfiltração decorrente da hipertrofia glomerular e podocitária, confirmadas por microscopia eletrônica. Além disso, a fração de excreção de sódio proximal é menor nos animais desnutridos, podendo ser dependente da ação da angiotensina II no transportador Na/K ATPase na membrana basal do túbulo proximal cuja expressão é elevada.

O presente estudo demonstrou que a restrição proteica gestacional durante as primeiras semanas de gestação é suficiente para determinar a redução na nefrogênese, levando os rins a adaptações envolvidas no estabelecimento e/ou manutenção da hipertensão arterial.

RESUMO



### Abstract

xvii

The kidney development is a complex mechanism orchestrated by different factors and any alterations at this stage can change the phenotype from a low nephron number to renal agenesis. The maternal protein restriction is related with adult hypertension after low protein diet *in utero*. Many studies have been demonstrated that "programmed hypertension" can be linked with the low nephron number found in these adults. Animal studies have been found equal relation between maternal diet and nephron number at adult age.

Our objective is to determine from each point of development the renal organogenesis can suffer gestational protein restriction influence. Also we look for understand which morphological and functional renal adaptations rats present on adult age, and if these alteration are linked with hypertension.

The metanephroi culture shows that at gestational age 14.25, the metanephros from undernourished embryo is already programmed to branch less than control animal, leading to low number of nephron formation sites. The stererological study showed the same result that the "in vitro" study, showing less glomeruli at 17.5 gestational days. RT-PCR for renin-angiotensin system shows that this system is not altered in kidneys from programmed group during intra-uterine life, however renin, angiotensinogen and angiotensin II receptors mRNA expression are up-regulated after birth when compared with control animals.

Adult animals from low protein diet *in utero* showed that angiotensin II receptors are down-regulated in kidneys, when compared with animals that received normal food *in utero*. These animals also have an up-regulated expression of angiotensin II receptors in adrenals. The "programmed" animals had low birth weight and high arterial pressure from 12<sup>th</sup> week-age. The renal function study showed that glomerular filtration is not altered, even with low nephron number, what suggests a hyperfiltration, that may be linked with glomerular and podocitary hypertrophy. Indeed, proximal sodium excretion fraction is lower in low birth weight animals, suggesting an angiotensin II action at the basal membrane Na/K ATPase. By western blot, we found that Na/K ATPase protein is up-regulated on kidneys from low protein diet animals.

This study demonstrated that early gestational protein restriction is enough to determine the impaired nephrogenesis, leading to renal adaptations to support the establishment of arterial hypertension.

#### LISTA DE ABRVIATURAS

- 11β HSD1 11-beta-hidroxiesteróide-dehidrogenase tipo 1
- 11β HSD2 11-beta-hidroxiesteróide-dehidrogenase tipo 2
- ADH hormônio anti-diurético
- AT1R receptor AT1
- AT2R receptor AT2
- AT1Ra receptor AT1 tipo a
- AT1Rb receptor AT1 tipo b
- Angio II angiotensina II
- Agtr1 gene do receptor AT1
- CS corticosteróide
- CCr Clearance de creatinina
- ECA enzima conversora da angiotensina
- ECA2 enzima conversora da angiotensina tipo II
- FEK fração de excreção de potássio
- FENa fração de excreção de sódio
- FEPNa fração de excreção proximal de sódio
- FEPPNa fração de excreção pós-proximal de sódio
- GR receptor de glicocorticóide
- GDNF (glial cell derivated nuclear factor) fator nuclear derivado da célula glial
- HPA- eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
- IUGR (intrauterine growth restriction) restrição de crescimento intra-uterino
- JAK2 janus kinase
- MR receptor de mineralcorticoide
- PKC proteína quinase C
- PKA proteína quinase A
- c-Ret receptor tirosina quinase Ret
- SOCS Suppressor of cytokine signalling
- STAT signal transducer and activator of transcription
- SRA sistema renina-angiotensina
- TFG taxa de filtração glomerular

#### Introdução:

Figura 1: Esquema que ilustra a hipótese de dano renal pós eventos intrauterinosp. 34
Figura 2: Desenvolvimento renal nos três estágios: Pronefro, Mesonefro e Metanefrop. 37
Figura 3: Desenvolvimento do nefro a partir do broto uretérico e células mesenquimaisp. 41
Quadro 1: Localização dos componentes do SRA durante o desenvolvimento renalp. 53
Material e Métodos:
Quadro 2: Componentes das dietas normo e hipoproteicap. 63
Resultados:
Figuras e tabelas organizadas conforme capítulos.
Apêndice 1
Figura 4: Microscopia eletrônica de Varredurap. 197

#### SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	. 27
	1.1. Programação fetal e o rim	. 33
	1.2. Desenvolvimento renal	36
	1.2.1. Pronefro	. 39
	1.2.2. Mesonefro	39
	1.2.3. Metanefro	40
	1.2.4. Linhagem celular e indução metanefrica	40
	1.2.5. Brotamento do botão uretérico	. 43
	1.2.6. Nefrogênese	. 44
	1.3. Controle Renal da Pressão Arterial	45
	1.3.1. Sistema Renina-Angiotensina	. 48
	1.3.1.1. Receptores de Angiotensina II	49
	1.3.1.2. Vias de sinalização	50
	1.3.1.3. SRA na embriogênese	50
2.	OBJETIVOS	55
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.	RESULTADOS	75
	4.1 Capítulo 1	77
	4.2 Capítulo 2	109
	4.3 Capítulo 3	135
5.	DISCUSSÃO	167

#### SUMÁRIO

6.	CONCLUSÃO	175
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181
8.	APÊNDICE 1	195



Introdução

O conceito de que a saúde na idade adulta poderia ser influenciada pelos processos de desenvolvimento no início da vida provém da época de Hipocrates, no entanto evidências epidemiológicas mundiais têm mostrado que há uma forte relação entre eventos na fase pré-natal e doenças na vida adulta. Forsdahl (1), em 1977, mostrou como as condições de pobreza influenciam a população humana na idade adulta.

A desnutrição é um problema mundial, não se restringindo somente aos países em desenvolvimento, mas aos países desenvolvidos, onde é gradativo o aumento no consumo de alimentos que não fornecem uma dieta equilibrada, com os níveis protéicos adequados. Dados da Organização Mundial de Saúde indicam que no Brasil 10% das crianças nascem com baixo peso (< 2500 g), e em outras regiões do mundo este nível chega a 31%.

Segundo a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) a barreira de um bilhão de pessoas que sofrem de desnutrição será superada em breve em consequência da crise econômica mundial que ocorreu nos anos de 2008 e 2009. O número de subnutridos no mundo passou de 825 milhões no biênio 1995-1997 a 873 milhões de 2004 a 2006. Em 2008, o número caiu de 963 milhões a 915 milhões devido a uma melhor distribuição dos alimentos, mas a tendência se reverteu com o agravamento da crise econômica e financeira do fim do ano.

Lucas (2) foi o primeiro a definir o conceito de programação fetal como uma resposta permanente do organismo a um estímulo ou insulto durante o período crítico de desenvolvimento. No entanto, ainda no ano de 1964, Rose (3) descreveu que o risco de doença isquêmica do coração era o dobro em indivíduos que possuíam irmãos natimortos ou que haviam morrido na infância.

Barker (4) foi pioneiro ao mostrar em estudo científico, que o baixo peso ao nascer pode estar ligado ao surgimento de diversas doenças. Ele sugeriu que 1 kg na redução do peso ao nascer representaria um aumento de 6 mmHg na pressão arterial aos 60 anos e descreveu a "hipótese de Barker" que sugere que a desnutrição materna promove retardo no crescimento fetal, manifestando baixo peso ao nascimento ou desproporção corporal (apresentam menor circunferência da cabeça em relação ao corpo). Especificamente esta hipótese sugere que uma dieta materna, durante a

gestação, abaixo do nível proteico recomendado induz o feto às adaptações que incluem permanentes alterações no número celular e alterações nos órgãos chaves, com subsequente modulação da expressão genética (5). Este conceito determinou o fenótipo conhecido como "thrifty", segundo o qual, sob condições de pobreza ou nutrição desbalanceada, o feto faz adaptações, incluindo redução no tamanho somático, a fim de sobreviver (6).

Nos últimos anos, um grande e interessante número de dados científicos tem revelado que insultos ambientais que ocorrem durante um período específico do desenvolvimento alteram os caminhos pelos quais o sistema cardiovascular é regulado na fase pós-natal. Este campo de pesquisa tem se expandido da simples demonstração da existência da programação fetal até a elaboração de mecanismos que levam a esta programação (7).

O baixo peso ao nascimento pode ser atribuído a restrição de crescimento intrauterino (*intrauterine growth restriction*, IUGR) ou nascimento prematuro. Quando associado a IUGR, a restrição reflete o estresse intra-uterino no período tardio da gestação, opondo-se ao baixo peso da prematuridade, no qual o peso é apropriado para a duração específica da gestação, mas menor quando comparado a gestação de tempo normal. E é este baixo peso relacionado à IUGR que está altamente associado ao desenvolvimento de doenças na idade adulta (8).

A influência da desnutrição materna durante a gestação tem sido relacionada à hipertensão arterial (9), diabetes não dependente de insulina (10) e doença coronariana (11). Estes estudos têm suportado a hipótese de Barker, sobre a programação fetal.

Além das doenças citadas anteriormente, estudos têm mostrado que a redução do peso em crianças está associada ao aumento de risco de mortalidade entre 39 e 49 anos em homens dinamarqueses (12). Langley-Evans e Sculley confirmaram recentemente que a restrição proteica *in utero* reduz a expectativa de vida em ratos, quando a restrição persiste por toda a gestação (13). O mecanismo para esta programação continua obscuro, entretanto Jennings e colaboradores sugerem que o encurtamento dos telômeros é mais rápido em ratos expostos á dieta hipoproteica *in utero* do que em ratos que receberam dieta normoproteica, no entanto ainda não há estudos

consistentes nesta direção (14) Muitos pesquisadores têm buscado por diferentes caminhos, entender a programação fetal, e com isso têm encontrado um importante papel dos processos moleculares epigenéticos na produção destes efeitos, processos que são alvos de regiões promotoras de genes específicos de tecidos específicos. Isto inclui alterações na metilação de DNA, e também na estrutura de histonas associada com a supressão da transcrição genética (15).

Recentemente, um grupo de pesquisadores determinou em 2003 pacientes de Helsinki, Finlândia, dois diferentes caminhos que levam a hipertensão programada. O primeiro grupo apresentou tamanho corporal reduzido, ao nascimento, e baixo ganho de peso do nascimento até a idade de 2 anos, mas rápido crescimento após esta idade. Na idade de 11 anos, seu tamanho corporal era equivalente a média da população. Quando adulto, eles tendiam a ser obesos e resistentes à insulina. O segundo grupo de pessoas estudado apresentou hipertensão tardia. Eles também eram menores ao nascimento, tiveram pequeno ganho de peso do nascimento até os 2 anos de idade e continuaram pequenos após esta idade. Aos 11 anos, eles eram pequenos e magros e quando adultos, apresentaram tendência a ter perfil lipídico aterogênico (16).

Assim, uma das principais alterações decorrentes da desnutrição materna é a hipertensão arterial na idade adulta, e a ela são sugeridos diversos mecanismos de regulação. Entre estes mecanismos, o que tem despertado muito interesse é a superexposição fetal a glicocorticóides (17-19). Em situação fisiológica, a concentração de glicocorticóides fetais é menor que o nível materno, mantendo-se o feto protegido da exposição a este corticóide por uma enzima placentária, a 11- $\beta$  hidroxiesteroide dehidrogenase tipo 2 (11- $\beta$ HSD-2).

Sabe-se que a enzima 11- $\beta$ HSD-2 atua como barreira bioquímica evitando que os corticóides maternos (CS) acessem o compartimento fetal, convertendo o esteróide bioativo (corticosterona) em seu metabólito inativo, 11-deidrocorticosterona (20,21). A atividade da 11- $\beta$ HSD-2 está relacionada positivamente com o peso fetal em ratos e humanos (22,23), sugerindo importante papel desta enzima na regulação do crescimento fetal. Durante o período final da gestação, a atividade da 11- $\beta$ HSD-2 em ratas submetidas

a restrição proteica é significantemente reduzida quando comparada aos animais do grupo controle (24]) levando ao aumento da transferência de CS de mãe para feto.

Esta alta exposição fetal aos glicocorticóides maternos causa uma superestimulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), associado com o desenvolvimento de alterações renais e hipertensão no adulto, em diversas espécies incluindo o homem (25-28).

Edwards e colaboradores [20] demonstraram que em humanos, baixo peso fetal está associado com o aumento do risco cardiovascular e alto nível de CS no final da gestação, mediados pela inatividade da 11-βHSD-2. Corroborando esta hipótese, a administração de baixa dose de dexametasona, um glicocorticóide sintético que atravessa a barreira placentária, durante a gestação promoveu hipertensão "programada" na prole adulta em ratos (23,29,30). É interessante notar que a exposição à dexametasona durante apenas dois dias da gestação causa efeito semelhante no rim de diferentes espécies (rato, camundongo e ovelha), quando esta janela do desenvolvimento corresponde ao período em que o broto uretérico invade o mesênquima metanefrico e começa a ramificarse, sugerindo que o período inicial do desenvolvimento renal é particularmente suscetível a exposição aos glicocorticóides (31).

A avaliação do sistema renina-angiotensina e seus componentes, em ovelhas expostas a dexametasona ou ao cortisol, produziram efeitos semelhantes, sugerindo que alterações no SRA renal podem ser os mecanismso através do quais a exposição prénatal aos glicocorticóides leva a hipertensão programada (32).

Além disso, tratamento de ratas prenhas com carbenoxolona, inibidor da 11βHSD-2, induziu hipertensão na prole adulta, efeito que foi revertido com adrenalectomia materna (33,34). Outros estudos têm apontado para este achado em humanos (23,35,36), embora alguns não confirmem isto (37,38).

Os receptores glicocorticóides (GR) são expressos na maioria dos tecidos fetais no estágio inicial do desenvolvimento, enquanto os receptores de mineralcorticoides (MR) têm distribuição mais limitada e estão presentes somente no estágio final da gestação. Portanto, os glicocorticóides exercem grande influência na maturação de vários órgãos, como pulmão (39), coração (40-42), sendo a superexposição a estes uma das causas da rápida e imprecisa maturação dos órgãos dos fetos subnutridos.

Os glicocorticóides têm efeito pré-natal em diferentes órgãos, como no cérebro, por exemplo, onde durante o desenvolvimento fetal, o hipocampo e o HPA são particularmente sensíveis aos glicocorticóides endógenos e exógenos. Alterações neste eixo desencadeiam aumento na pressão arterial no adulto (25). Estudos feitos em ratos sugeriram que a exposição a glicocorticóides durante a última semana de gestação foi suficiente para produzir hipertensão permanente na idade adulta (43).

Alterações renais são alvos do maior número de estudos da hipertensão programada, visto que o rim é o principal órgão de controle do metabolismo hidrossalino.

#### 1.1 Programação Fetal e o Rim

Como já citado, uma das principais consequências da programação fetal é a hipertensão programada. Os rins são órgãos que exercem importante papel no controle da pressão arterial e alterações na estrutura destes podem ser responsáveis pela geração da hipertensão. Devido a isso, dentro do estudo da programação fetal pela desnutrição materna, grande número de pesquisadores concentra-se em entender as alterações e adaptações que o rim sofre como causa e consequência dos elevados níveis pressóricos.

Em 1988, Breener e colaboradores (44) foram os primeiros a sugerir a hipótese de que baixo peso ao nascimento poderia estar associado à deficiência congênita no número de nefro, que predisporia à redução na excreção renal de sódio, e consequentemente aumentaria a susceptibilidade a hipertensão essencial. Esta hipótese também foi baseada no conhecimento de que a perda de nefro gera hipertrofia compensatória dos glomérulos remanescentes e hiperfitração (aumento da taxa de filtração glomerular para cada nefro), a fim de sustentar a função renal. Esta adaptação, entretanto, é à custa da hipertensão intraglomerular, que causa danos ao funcionamento do glomérulo e perpetua o ciclo vicioso de perda de nefros (8). A figura abaixo ilustra a hipótese:



Figura 1: Esquema que ilustra a hipótese de dano renal pós eventos intrauterinos.

Dentre as consequências renais da desnutrição materna, a redução do número de nefro é alvo de diversos estudos e até os dias atuais gera questionamentos (45,46). Vehaskari e colaboradores demonstraram que há aproximadamente 30% de redução no número glomerular em ratos submetidos à restrição protéica no período fetal quando comparados àqueles submetidos à dieta normoproteica (47).

O desenvolvimento de nefro em humanos começa na nona semana de gestação. A proliferação dos nefros é particularmente rápida no último trimestre, continuando até a 36<sup>ª</sup> semana, quando cessa (48). Assim, no nascimento prematuro, mesmo com peso apropriado para a idade gestacional, pode haver interrupção da nefrogênese levando a deficiência no número de nefro (49-51). Através do uso do ultrassom, um estudo recente mostrou que crianças com IUGR apresentam não somente rins menores, mas reduzido crescimento renal durante os 18 primeiros meses de vida (52).

Keller e colaboradores (53) examinaram rins de adultos caucasianos que morreram em acidentes revelando que aqueles que possuíam histórico de hipertensão

essencial tiveram significativo menor número de nefros por rim e maior volume glomerular quando comparados com controle normotenso. Em outro estudo, autopsias em crianças que nasceram com baixo peso revelaram número glomerular reduzido associado com o aumento de volume (45).

Os mecanismos moleculares pelos quais o número de nefro pode ser afetado e/ou sua função alterada não são completamente conhecidos, entretanto muitos mecanismos têm sido propostos: modulação pelo Sistema Renina-Angiotensina (SRA), exposição a glicocorticóides, alteração na manipulação renal de sódio, além de apoptose e modificações na expressão de GDNF (8).

GDNF é o fator chave na iniciação do brotamento uretérico, sinalizando através do receptor tirosina quinase Ret (c-RET). Camundongos com deficiência homozigota para GDNF apresentam disgênese renal severa e morrem logo após o nascimento, enquanto camundongos heterozigotos têm rins menores com 30% menos nefros, desenvolvendo hipertensão espontânea e glomerulomegalia com o tempo (54).

A redução do número de nefro também é atribuída ao aumento na taxa de apoptose. Diversos estudos mostram a relação entre a desnutrição gestacional materna e o aumento de apoptose no rim em desenvolvimento. A ingestão de baixa quantidade de proteína durante a gestação em ratos foi associada com aumento de apoptose no metanefro e redução no número de células progenitoras durante a vida embrionária. Tem sido sugerido que o aumento de apoptose pode ser devido a regulação negativa dos fatores antiapoptoticos (Pax-2 ou Bcl-2) e/ou a super-regulação dos fatores pró-apoptóticos (Bax e p53) (55).

Além disso, muitos experimentos têm revelado que manipulação na atividade do SRA durante a nefrogênese leva a alterações renais que podem gerar futura elevação da pressão sanguínea. A administração de antagonista do receptor de angiotensina II, AT1<sub>R</sub> durante períodos críticos do desenvolvimento renal levam a diminuição do número de glomérulos e desenvolvimento da hipertensão (56,57).

É importante notar que a programação renal fetal é mais severa em machos do que em fêmeas. Saez e colaboradores (58) mostraram que o bloqueio de AT1<sub>R</sub> durante a

nefrogênese induz aumento na pressão sanguínea e diminuição no número de glomérulos em ambos os sexos, no entanto, somente machos apresentaram queda na taxa de filtração glomerular, elevação da albuminuria e significante atrofia da papila renal. As causas desta diferença permanecem desconhecidas, porém o autor sugere que a atrofia papilar pode ser atribuída à presença de receptores AT2<sub>R</sub> somente na porção papilar em fêmeas, estando os mesmos ausentes nos machos, visto que AT2<sub>R</sub> são ativados por estrógenos (59).

#### 1.2 Desenvolvimento Renal

A nefrogênese em mamíferos envolve o desenvolvimento de três estágios de órgãos excretores, o pronefro, mesonefro (órgãos transitórios) e metanefro (Figura 2). O metanefro desenvolve subsequentemente em rins permanentes. Todas as estruturas dos órgãos excretores são derivados do mesoderma intermediário, que corre através da parede dorsal do corpo do embrião. Como resultado do dobramento horizontal do embrião, o mesoderma intermediário se move ventralmente perdendo contato com os somitos. O mesoderma forma agora uma ponte, correndo longitudinalmente de cada lado da aorta primitiva, e passa a ser conhecido como cordão urogenital. Como sugere o nome, este cordão dará origem às porções tanto do sistema urinário, quanto genital. O cordão urogenital será dividido futuramente em cordão nefrogênico (originará o sistema urinário) e estria gonadal (originará o sistema genital).



Figura 2: Desenvolvimento renal nos três estágios: Pronefro, Mesonefro e Metanefro. De: Yosypiv e El-Dahr (2005) [60]

Introdução 37

#### 1.2.1 Pronefro

Os pronefros desenvolvem-se no nono dia da embriogênese em camundongos, e aproximadamente entre os dias 20-22 em embriões humanos. Consistem em um grupo de vesículas epiteliais conhecidas como nefrótomos. Estes nefrótomos contêm túbulos pronéfricos, mas não glomérulos e são considerados não-funcionais (61). Estas vesículas são induzidas a alongar-se em ducto néfrico, e desenvolvem-se correndo caudamente a região cervical ao longo do ducto pronéfrico. Os pronefros são órgãos transitórios, ocorrendo degeneração das partes anteriores e desenvolvimento das partes posteriores. Os ductos néfricos remanescentes crescem caudamente e se abrem na cloaca. O ducto néfrico induz a formação dos túbulos no mesênquima mesonéfrico adjacente, e futuramente dará origem a elementos do sistema genital masculino e ao botão uretérico do metanefro.

#### 1.2.2 Mesonefro

Assim que as estruturas pronéfricas regridem (durante a quarta semana gestacional em humanos) elas dão lugar aos mesonefros, que desenvolvem-se entre as regiões torácica e lombar. O ducto néfrico permite a diferenciação do cordão nefrogênico dentro dos túbulos mesonéfricos. Estes túbulos então conectam-se ao ducto néfrico. O mesonefro, com nefro simples, porém completo, é a primeira unidade excretória funcionante. O mesonefro escoa dentro do ducto néfrico (Ducto de Wolffian), que cresce caudamente na parede posterior do sinu urogenital primitivo. As unidades excretórias mesonéfricas são funcionais (a extensão da funcionalidade varia entre espécies) entre 6 e 10 semanas em embriões humanos, produzindo uma pequena quantidade de urina. Conforme os túbulos mais caudais vão desenvolvendo-se, os mais craniais vão degenerando e este processo continua com o futuro desenvolvimento embrionário até restar somente uma parte do ducto néfrico nos embriões do sexo masculino, com completa degeneração nos embriões de fêmeas. Nos machos, os túbulos craniais desenvolvem-se em ductos eferentes, a porção cranial do ducto mesonéfrico torna-se o epidídimo, e o ducto remanescente forma o ducto deferente do sistema genital masculino. Em humanos, o desenvolvimento do mesonefro inicia-se em torno da guarta semana,

estando completo na nona semana e degenerando entre 12-14 semanas. Em camundongos, o mesonefro desenvolve-se entre E9.5-10 e degenera em E11.5-12.5.

#### 1.2.3 Metanefro

O desenvolvimento metanéfrico começa na quarta ou quinta semana em humanos, e em camundongos, próximo ao 11º. dia, no momento em que mesonefros funcionais ainda estão presentes. No camundongo, o desenvolvimento metanéfrico continua por alguns dias após o nascimento até estar completa a formação dos nefros. O crescimento e elongação dos túbulos continuam por algumas semanas após o nascimento até o rim funcional estar formado. Nos humanos, a nefrogênese é completada ao redor da 36ª semana de gestação e não são formados novos nefros após o nascimento (62).

As seções seguintes descrevem em detalhes separadamente os eventos coordenados envolvidos no desenvolvimento metanéfrico.

#### 1.2.4 Linhagem Celular e indução metanefrica

O metanefro desenvolve-se de duas populações celulares, que são o epitélio do ducto uretérico e o blastema metanéfrico (Figura 2). Este desenvolvimento começa quando o broto uretérico do ducto néfrico chega ao final da porção caudal. Um brotamento simples do epitélio cresce e penetra o mesênquima indiferenciado do blastema metanéfrico. Ocorre então uma indução recíproca entre estes dois tecidos, que geram nefros, sistema de ducto coletor e finalmente o rim permanente.

O blastema metanéfrico consiste de células mesenquimais indiferenciadas, que se agregam ao redor da porção terminal do broto uretérico. Células em contato direto com o broto estimulam o epitélio uretérico a proliferar e dicotomizar através de brotamento. Ao final, o ducto uretérico dará origem ao sistema de ductos coletores, incluindo o ureter, pelve renal cálices, e túbulos coletores.



Figura 3: Desenvolvimento do nefro a partir do broto uretérico e células mesenquimais. Boer e Gontijo 2005. [63]

O broto uretérico induz células mesenquimais. O blastema metanéfrico consiste de algumas linhagens celulares embrionárias, que seguem diferentes vias de diferenciação. A indução do mesênquima é agora considerada um processo de dois passos. O primeiro é a indução do mesênquima metanéfrico indiferenciado pela invasão do botão uretérico. Todas as células do mesênquima metanéfrico são induzidas a diferenciarem-se no que é agora conhecido por "células tronco", que correspondem ao aumento da síntese de DNA, diminuição da apoptose e leve condensação (64,65). As células tronco são então induzidas pela invaginação do broto uretérico a diferenciarem-se em nefros, células estromais (presentes no tecido conjuntivo renal) ou células da vasculatura renal.

Células tronco não induzidas, na periferia do rim, induzem o ducto uretérico a um novo brotamento. Esta indução recíproca continua na periferia do rim na chamada zona nefrogênica, até a formação completa dos nefros. Células tronco não diferenciadas sofrem apoptose e são fagocitadas por células ao redor (65,66)

Muitos outros tecidos como cordão espinhal embriônico, cérebro e epitélio submandibular são também capazes de induzir o desenvolvimento de nefros em estudos experimentais. Entretanto, não importa qual é o indutor, o cordão néfrico sempre formará nefros, mas o sinal de indução ainda não foi determinado, porém há um grande número de moléculas candidatas presentes neste estágio crítico.

#### 1.2.5 Brotamento do botão uretérico

A morfogênese do brotamento é o mecanismo chave no desenvolvimento de vários órgãos (rim, pulmão, fígado), e nesta fase há um único e bem estruturado padrão. Clinicamente, este padrão de brotamento no rim é considerado o maior determinante do número total de nefro na idade adulta.

A árvore uretérica pode ser considerada consistente de dois segmentos. O primeiro é a extremidade terminal, ou pontas do brotamento, chamada "ampola", que aparece como bulbos terminais. O segundo segmento é o "caule" do brotamento,

conhecido como túbulo. Esta parte permanece após o crescimento da ampola, avançando para a periferia do metanefro.

As ampolas têm duas opções: 1) pode permanecer única e avançar para a periferia, ou 2) dividir-se produzindo duas novas ampolas, cada uma formando um novo túbulo.

#### 1.2.6 Nefrogênese

Como o ducto uretérico continua a crescer e se ramificar, a ampola de cada ramo induz o mesênquima metanéfrico a iniciar a nefrogênese. O primeiro evento morfológico identificado na nefrogênese envolve a proliferação do mesênquima e a condensação nas pontas da ramificação do ducto uretérico. Durante a agregação celular, células mesenquimais adquirem uma forma epitelial alongada e passam a ter polarização basoapical. O condensado rapidamente prolifera por mitose para formar vesículas epiteliais, que irão diferenciar-se no epitélio do nefro. As células remanescentes sofrem apoptose.

A vesícula epitelial alonga-se e encurva-se gerando a forma conhecida como "vírgula". Um segundo encurvamento gera a forma em "S". Nesta fase, a porção superior desenvolverá em túbulo contorcido distal, a porção central desenvolverá em túbulo proximal, alça de Henle e túbulo distal, e a cauda final desenvolve o corpúsculo renal. O epitélio simples cubóide da porção interna da curva inferior irá se diferenciar em podócitos (epitélio visceral), enquanto a porção externa formará o epitélio parietal da cápsula de Bowman (63).

Glomérulos juxtamedulares são os primeiros a se desenvolver e formam a camada interna do córtex. Em humanos, a nefrogênese está completa na 36ª semana gestacional (62), entretanto em ratos, a nefrogênese continua até 10-12 dias após o nascimento.

#### 1.3 Controle Renal da Pressão Arterial

Simplificadamente, poderíamos dizer que quando o organismo contém líquido extracelular em quantidade excessiva, ocorrem aumento do volume sanguíneo e elevação da pressão arterial, a qual exerce efeito direto sobre os rins, que passam a excretar o excesso de líquido extracelular, com a consequente normalização da pressão (67).

Embora apenas o aumento de alguns milímetros de mercúrio na pressão arterial do ser humano possa duplicar a diurese e a natriurese, o controle da pressão arterial é influenciado por diversos mecanismos, não podendo ser atribuído totalmente a excreção do excesso de líquido pelos rins.

Estudos recentes mostram que mutações genéticas associadas com a hipertensão envolvem proteínas expressas no rim (68). Atribui-se aos rins fatores intrínsecos que afetam a pressão sanguínea, visto que em transplante renal, a pressão sanguínea do receptor é relacionada a pressão sanguínea ou risco de hipertensão do doador, tanto em animais (69) quanto em humanos (70).

Diversos sistemas inter-relacionados regulam o controle da pressão arterial, podendo agir rapidamente (segundos ou minutos), levar minutos ou horas, ou até a longo prazo, levando meses e anos. Como mecanismos de ação rápida, temos o *feedback* dos barorreceptores, mecanismo isquêmico do sistema nervoso central e mecanismo quimiorreceptor. Dentre os mecanismos que atuam depois de vários minutos, temos o mecanismo vasoconstrictor da Renina-Angiotensina (que será amplamente abordado), o relaxamento por estresse da vasculatura e o deslocamento de líquido através das paredes capilares. Os mecanismos de ação a longo prazo são aqueles controlados pelos rins, pela modulação da excreção de sal e água (67).

No ser humano, cada rim é constituído por cerca de 1 milhão de nefros, cada um com capacidade de formar urina, sendo o rim incapaz de gerar novos nefros. Os nefros são responsáveis pela formação da urina que começa com a filtração de grande quantidade de líquido dos capilares glomerulares para a cápsula de Bowman. À medida que deixa a cápsula de Bowman e passa pelos túbulos, o liquido filtrado é modificado pela

reabsorção de água e solutos específicos para o sangue, ou pela secreção de outras substâncias dos capilares tubulares para os túbulos (67).

A primeira etapa da formação da urina, a filtração glomerular é influenciada entre outros, pela ação da angiotensina II na constrição das arteríolas eferentes. O aumento na concentração deste hormônio eleva a pressão hidrostática glomerular, ao mesmo tempo em que reduz o fluxo sanguíneo renal. Por conseguinte, o aumento na concentração de angiotensina II que ocorre durante dieta pobre em sódio ou em caso de depleção do volume ajuda a preservar a filtração glomerular e a manter a excreção normal dos produtos de degradação do metabolismo, ao mesmo tempo em que aumenta a reabsorção de sódio e água, o que ajuda a restaurar o volume sanguíneo e a pressão arterial.

Após a filtração glomerular, a urina em formação irá percorrer os túbulos renais, onde ocorrem importantíssimos mecanismos de reabsorção e secreção que auxiliam no controle do volume extracelular.

A reabsorção tubular inclui vários tipos de transporte, visto que pode ocorrer por via paracelular ou via transcelular. No transporte transcelular há a presença de transportadores ativos que serão abordados posteriormente.

Em condições normais, cerca de 65% da carga filtrada de sódio e água e uma porcentagem menor de cloreto filtrado são reabsorvidos pelo túbulo proximal, antes de o filtrado alcançar a alça de Henle. O aumento ou diminuição desta carga reabsorvida será essencial no controle do volume extracelular e assim da pressão arterial. Na borda em escova encontram-se muitas moléculas transportadoras responsáveis pela reabsorção de Na pelo mecanismo de co-transporte com nutrientes orgânicos (glicose, aminoácidos).

O próximo segmento, alça de Henle, possuí o ramo descendente delgado, o ramo ascendente delgado e o ramo ascendente espesso. O ramo descendente é muito permeável a água e quase 20% da água filtrada é reabsorvida nesta porção, visto que as porções ascendentes são praticamente impermeáveis a água. É na porção ascendente espessa que se localiza um importante transportador, o cotransportador *1 sódio, 2 cloretos e 1 potássio* que transporta estes 3 íons do lúmem tubular para o interior das

células. Este ramo ascendente também tem em sua membrana luminal um mecanismo de contra-transporte de sódio-hidrogênio que medeia a reabsorção de sódio e a secreção de hidrogênio nesse segmento.

O segmento espesso do ramo ascendente da alça de Henle deságua no túbulo distal. A porção inicial deste túbulo faz parte do complexo justaglomerular, que fornece o controle por *feedback* da filtração glomerular e do fluxo sanguíneo nesse mesmo nefro. A segunda metade do túbulo distal tem características semelhantes ao túbulo coletor cortical, e é composta por dois tipos celulares, as células principais e intercaladas. As células principais absorvem sódio e água do lúmen e secretam íons potássio. As células intercaladas reabsorvem potássio e secretam íons hidrogênio para o lúmen tubular.

O local final de processamento da urina, o ducto coletor medular reabsorve menos de 10% da água e do sódio filtrados. A permeabilidade deste à água é controlada pelos níveis de ADH.

A manipulação do sódio na patogênese da hipertensão programada é essencial devido a estes fatores que determinam a regulação fisiológica no balanço de sódio. A importância do túbulo distal na regulação da pressão sanguínea é destacada pela demonstração que a maioria dos exemplos de hipertensão humana resultam de uma simples mutação no gene que envolve o transporte de sódio em um dos segmentos distais do nefro (68).

Não há dados sobre a quantificação dos transportadores de sódio na hipertensão programada por IUGR.

Nos túbulos proximais, tem sido observado que Angio II modula a reabsorção de sódio de maneira dose-dependente e bifásica. Doses fisiológicas de Angio II, entre 10<sup>-12</sup> e 10<sup>-10</sup> M, são estimulatórias, enquanto altas concentrações de Angio II, entre 10<sup>-7</sup> e 10<sup>-5</sup> M, são inibitórias (71). Entretanto esta atuação bifásica no túbulo proximal não é observada na atividade Na<sup>+</sup>ATPase, podendo indicar que a Na<sup>+</sup>ATPase é alvo da Angio II somente na fase estimulatória (72).

Mecanismos moleculares da Angio II envolvidos na estimulação da reabsorção de sais pelos túbulos proximais estão relacionados com o aumento transcelular da

reabsorção de sódio e bicarbonato via ativação do trocador apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, cotransportador basolateral Na<sup>+</sup>-HCO3<sup>-</sup> e basolateral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e via inserção de H<sup>+</sup>-ATPase na membrana apical (73-75).

Diferentes mecanismos têm sido descritos como mediadores dos efeitos da Angio II na reabsorção de sódio pelo túbulo proximal. Houillier e colaboradores propuseram que a estimulação da reabsorção de sódio pela Angio II seja dependente de proteína quinase C (PKC) (76). Recentemente, Rangel e colaboradores mostraram que tanto PKC quanto PKA estão presentes na membrana basolateral e sua ativação estimula a atividade da Na<sup>+</sup>ATPase (77).

Além disso, a infusão de Angio II aumenta a reabsorção de sódio na porção distal do nefro (78). Angio II atua estimulando o trocador  $Na^+/H^+$  na porção inicial e final do segmento distal via ativação de AT1<sub>R</sub>, H<sup>+</sup>-ATPase e canais de Na<sup>+</sup> sensitivos à amilorida nos segmentos distais finais (75,79).

Em 2005 Crowley e colaboradores (80), em um elegante estudo com camundongo, mostraram que a regulação da manipulação de sódio pelo rim, modulada pelo Sistema Renina-Angiotensina, é o maior determinante do nível crônico da pressão sanguínea. Neste estudo, animais foram submetidos à verificação de pressão arterial após transplante cruzado de rins. Camundongos nocaute para o gene do receptor AT1, *Agtr1* nulos, tiveram os rins transplantados em camundongo normal, obtendo 4 grupos: controle (transporte cruzado com gene normal), rim nocaute (recebeu o rim do *Agtr1* nulo), sistêmico nocaute (animal *Agtr1* que recebeu rim normal), e total nocaute. Depois de 1 semana a pressão intra-arterial foi mensurada e detectou-se que os animais do grupo "rim nocaute" apresentaram significante diminuição da pressão arterial quando comparados ao grupo controle, o que prova que a ausência dos receptores AT1 somente nos rins foram suficientes para a redução dos níveis da pressão sanguínea.

#### 1.3.1 Sistema renina-angiotensina

Dentre os mecanismos renais responsáveis pelo controle do volume extracelular, o Sistema Renina-Angiotensina (SRA) é um efetivo controlador. Estimulação aguda com Angio II regula a homeostase hidro-salina e vasoconstricção, modulando a pressão sanguínea, enquanto a estimulação crônica promove hiperplasia e hipertrofia das células da musculatura vascular (67).

Os mecanismos que controlam a formação e a degradação da Angio II são importantes na determinação dos efeitos fisiológicos finais. Renina, uma enzima produzida pelas células justaglomerulares quando a pressão arterial cai para níveis excessivamente baixos, atua sobre o angiotensinogênio, clivando-o em um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina tipo I. A angiotensina tipo I circulante, é atingida então pela enzima conversora da angiotensina (ECA), sendo clivada em um peptídeo de 8 aminoácidos, a Angio II. Este peptídeo é um vasoconstrictor extremamente poderoso, além de exercer outros efeitos que afetam a circulação (67)

Recentemente identificou-se a carboxipeptidase ECA2, que cliva 1 aminoácido tanto da Angio I quanto da Angio II (81), diminuindo os níveis de Angio II e aumentando o metabólito Angio 1-7, que tem importantes propriedades vasodilatadoras. Desta forma, o balanço entre ECA e ECA2 é importante fator controlador dos níveis de Angio II (82).

#### 1.3.1.1 Receptores de Angiotensina II

A Angio II atua com grande afinidade via 2 tipos de receptores, o tipo 1 (AT1<sub>R</sub>) e o tipo 2 (AT2<sub>R</sub>) em humanos e AT1<sub>R</sub>a, AT1<sub>R</sub>b e AT2<sub>R</sub> em roedores. A maioria dos efeitos fisiológicos ocorre via AT1<sub>R</sub>, que são altamente distribuídos em todos os órgãos, incluindo fígado, adrenal, cérebro, pulmões, rins, coração e vasculatura. Composto de 359 aminoácidos, AT1<sub>R</sub> é um receptor transmembrana de 7 passos, pertencente a família dos receptores acoplados a proteína G. Em humanos o gene deste receptor foi mapeado no cromossomo 3, enquanto em ratos, AT1<sub>R</sub>a no cromossomo 17 e AT1<sub>R</sub>b no cromossomo 2. Estudos em roedores mostram que funcionalmente e farmacologicamente estes dois receptores são indistinguíveis, no entanto, experimentos em animais mostram que a isoforma AT1<sub>R</sub>a parece ser mais importante que AT1<sub>R</sub>b na regulação da pressão arterial (83,84).

Apesar da maioria dos efeitos vasoativos ocorrer via  $AT1_R$ ,  $AT2_R$  tem sido reconhecido por exercer ação anti-proliferativa e antiapoptótica. Assim como  $AT1_R$ ,  $AT2_R$  é um receptor transmembrana sete passos, idêntico 34% ao  $AT1_R$ . Consistindo em 363
aminoácidos, AT2<sub>R</sub> é altamente expresso em tecido fetal, incluindo aorta fetal, mesênquima gastrointestinal, tecido conjuntivo, sistema esquelético, cérebro e medula da adrenal. A expressão de AT2<sub>R</sub> diminui após o nascimento e pode ser induzida posteriormente por uma situação patológica (85). Em adultos, este receptor também é expresso no pâncreas, coração, rim, adrenal, miométrio, ovário, cérebro e vasculatura.

# 1.3.1.2 Vias de sinalização

Uma vez que a Angio II liga-se ao receptor AT1<sub>R</sub>, ativa uma série de cascatas de sinalização. A interação com a proteína G ocorre no domínio trasmembrana no NH2 terminal da primeira e terceira volta. Para ativar a via proteína-G dependente, a Angio II tem que fazer "ligações" com uma das diversas tirosinas quinases via AT1<sub>R</sub>, incluindo os receptores tirosina quinase: EGFR (*epidermal growth factor receptor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), receptor de insulina, c-Src, Pyk2 (*p*roline-rich tyrosine kinase 2), FAK (*focal adhesion kinase*) e JAK (*janus kinase*).

Os padrões temporais e espaciais das vias de sinalização são na maioria das vezes determinantes da resposta funcional. Estudos mostram que a ativação de diferentes vias pela Angio II é tempo-dependente, por exemplo, ativação da via dependente de proteína G e geração de IP3 ocorre em segundos, enquanto ativação da MAP quinase (*mitogen-activated protein kinase*) e JAK/STAT (*signal -transducer-and-activator of transcription*) ocorre em minutos a horas depois do sinal inicial de ativação do AT1<sub>R</sub> (85).

# Sinalização Jak/Stat

Uma das vias de sinalização da Angio II é a conhecida via JAK/STAT. Nesta, a Angio II, ao ligar-se ao AT1<sub>R</sub> ativa a JAK-2, uma quinase intracelular comumente ligada a receptores pertencentes à classe I e II da família das citoquinas.

Assim que a Angio II ativa o receptor AT1, induz ativação da JAK2, levando a fosforilação de STAT (86-88). As proteínas JAK são mediadores chave da expressão de mRNA e cujos genes são caracterizados como responsáveis pelo crescimento inicial. JAK fosforila STAT que são translocadas para o núcleo, onde ativam a transcrição destes genes (89). Estudos têm demonstrado a existência de grupo de proteínas conhecidas

como *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) caracterizadas por sua capacidade de controlar a ativação de receptores por agonistas específicos (90-91). A transcrição das proteínas SOCS está sob controle de proteínas membros da família STAT (92). Uma vez induzida à transcrição da SOCS, esta se liga com receptores do complexo receptor/JAK utilizando domínios SH2 e C-terminal (93-94).

Esta via de sinalização é reconhecida como a via pela qual a Angio II modula o crescimento cardíaco e vascular, remodelando-o e reparando-o (95).

# 1.3.1.3 SRA na embriogênese

Além do controle da pressão arterial, o SRA tem outras funções durante o desenvolvimento fetal. Sahajpal e Ashton [96] relatam que um sistema reninaangiotensina intacto é essencial para o desenvolvimento renal perfeito, visto que a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) ou administração do antagonista do receptor AT1 (mas não AT2<sub>R</sub>) durante o desenvolvimento embrionário resulta em persistente e irreversível anomalia histopatológica em rim neonato (97).

O metanefro em desenvolvimento expressa todos os componentes do SRA. A atividade do SRA renal é elevada durante o período fetal e a vida neonatal e diminui durante a maturação pós-natal. A expressão dos receptores AT1 e AT2 aumenta durante a metanefrogênese. Em estágios iniciais do desenvolvimento renal, células expressando renina distribuem-se pelo mesênquima nas regiões de desenvolvimento dos vasos, nos glomérulos em formação, ao redor dos túbulos em desenvolvimento e nas células mesenquimais indiferenciadas (98). Durante a vasculogênese renal, em roedores, células contendo renina localizam-se nas principais ramificações da artéria renal (99). A partir daí estas células distribuem-se progressivamente na maioria dos vasos renais, desde as grandes até as pequenas artérias, até adquirir a localização característica na região justaglomerular na 3ª semana de vida (99). Existe associação direta entre as células contendo renina e a ramificação das arteríolas renais, sugerindo a participação destas células no desenvolvimento vascular (100)

Quanto à expressão de angiotensinogênio as maiores concentrações foram verificadas em camundongos logo no nascimento nos túbulos proximais e nas células

mesangiais e vasculares. A ECA foi localizada nos precursores endoteliais que invadem a fenda inferior do túbulo em forma de "S", nos capilares glomerulares e peritubulares, nos túbulos proximais e nas artérias corticomedulares (99). Tanto os AT1<sub>B</sub> quanto os AT2<sub>B</sub> são expressos durante a ontogênese renal com padrões espaciais e temporais distintos. Quando o broto uretérico começa a ramificar e o rim embrionário avascular ainda não originou nefros, a expressão de AT2<sub>R</sub> é predominantemente localizada no mesênquima, enquanto os AT1<sub>R</sub> são expressos, em menor número, tanto no broto uretérico quanto no mesênquima (101). Quando se inicia a nefrogênese e a vasculogênese os rins apresentam expansão centrifuga de maturação glomerular e arteriolar, de tal forma que os glomérulos e vasos de localizações justamedulares tornam-se maduros antes daqueles do córtex renal externo. Neste momento, os receptores AT1 localizam-se nos glomérulos mais maduros enquanto  $AT2_R$  no condensado mesenquimal e nos nefros em início de formação (99). Após o nascimento, os receptores AT2 continuam presentes nas áreas de diferenciação, porém, quando ocorre completa maturação, a expressão destes receptores é atenuada até desaparecer na segunda semana (99). Por outro lado, a expressão de AT1<sub>R</sub> aumenta nas áreas mais maduras sendo maior na primeira semana de vida. No final do primeiro mês pós-natal a expressão de AT1<sub>R</sub> é a mesma da fase adulta (99).

O quadro abaixo resume a localização temporal dos componentes do SRA em camundongos.

	E14	E15	E16	Referência
Angiotensinogênio		Broto uretérico e		Prieto et al. 2001 (102)
		Estroma		
Renina		Vasculatura renal		Gomez et al. 1989 (103)
ECA			Túbulo proximal, Glomérulo e Ducto coletor	Jung et al. 1993 (104)
AT1R		Broto uretérico, Estroma		Norwood et al. 1997 (105)]
AT2R	Mesênquima metanefrico			Norwood et al. 1997 (105)

Quadro 1: adaptado de Yosypiv e El-Dahr 2005 (60)

Até o presente momento não está claro quais alterações renais são determinantes na gênese da hipertensão após a programação fetal e como estas alterações ocorrem. Devido ao SRA ser um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento renal correto e controle da pressão arterial, ele tem sido alvo de diversos estudos que buscam aí uma resposta para a "hipertensão programada".



Objetivos

Estudar comparativamente ratos cujas mães foram desnutridas proteicamente durante a gestação a ratos cujas mães receberam dieta normal durante o mesmo período, avaliando a possível interferência do sistema renina-angiotensina durante a nefrogênese, bem como durante a vida pós natal, na programação e manutenção da hipertensão arterial.

# OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Verificar a expressão gênica renal, durante a fase fetal, de componentes do SRA, relacionada ao número de nefro e à influência no brotamento uretérico em um modelo de restrição proteica materna.
- Investigar se a desnutrição protéica materna durante a gestação altera a expressão dos receptores AT1 e AT2 e da via JAK-2 e SOCS-3 no rim e adrenal em ratos machos adultos e localizar esta possível alteração.
- Relacionar alterações nos componentes do SRA associadas com a hipertensão arterial e redução da excreção renal de sódio.
- Analisar morfologicamente possíveis alterações adaptativas no nefro dos animais "programados".



Materíal e Métodos

Animais:

Devido aos protocolos seguidos pelos laboratórios onde foram realizados os estudos, houve diferenças em alguns pontos da pesquisa, como linhagem dos ratos, período de alimentação com dieta hipoproteica e percentual de proteína na dieta. Entretanto para uma maior homogeneidade no estudo tentou-se aproximar o máximo possível esta diferença, no entanto algumas delas persistiram, pois tivemos que adaptar o estudo ao lugar onde foi realizada a segunda parte do mesmo (Monash University)

• Estudo no período embrionário/fetal: RT-PCR, Cultura De Metanefro e Estereologia Renal.

Os experimentos foram realizados no laboratório de Desenvolvimento e Regeneração Renal do Departamento de Biologia do Desenvolvimento da Universidade Monash, Melbourne, Austrália. Todo o estudo foi aprovado pelo comitê de Ética Animal da Escola de Ciências Biomédicas desta Universidade (SOBS- 2007/81).

Ratos machos e fêmeas Sprague-Dawley foram obtidos do Australia Animal Research Centre, com idade de 9 semanas e foram realocados no Biotério da Faculdade de Psicologia, da mesma universidade. Por 1 semana os animais receberam ração padrão comercial. Ao atingirem 10 semanas, as ratas passaram a receber rações especiais, conforme cada grupo: **NP** (normal protein) 18% de caseína, ou **LP** (low protein) contendo 9% caseína. Os ratos machos receberam após 10 semanas a mesma dieta normoproteica oferecida às fêmeas. Tanto a dieta quanto a água foram fornecidas *ad libitum*.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em sala com temperatura e umidade controladas, com sistema de luz 12 h/12 h.

Ao atingirem 12 semanas os animais foram acasalados em sistema de harem, por 2 horas, em ambiente escuro, e depois de separados, a presença de espermatozóide no lavado vaginal foi utilizada como indicativo de prenhez. Os animas foram sacrificados na idade gestacional necessária para o estudo, e os embriões foram dissecados, os rins coletados e posteriormente processados para os diferentes tipos de estudo.

Os membros e a cauda foram coletados para identificação sexual por genótipo.

• Estudo em animais adultos: Pressão Arterial, *Clearance* de Creatinina e Lítio, Western Blot, Imunoistoquimica e Micorscopia Eletrônica de Varredura.

Todos os experimentos seguiram as normas do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Campinas. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Hidrosalino do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Universidade de Campinas. Foram utilizados ratos machos e fêmeas Wistar-Hannover, com idade de 12 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP (CEMIB) na idade de 4 semanas. Os animais foram mantidos no biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental até atingirem a idade de 12 semanas. Durante este período foram alimentados com ração comercial (Nuvilab CR-1, Nuvital) *ad libitum* e água *ad libitum*.

Durante todo o experimento os animais foram mantidos em sala com temperatura e umidade controladas, com sistema de luz 12 h/12 h.

Ao atingir 12 semanas de idade os animais machos e fêmeas foram colocados juntos em gaiolas, em sistema de harem (2 ou 3 fêmeas para cada macho), durante toda a noite, e às 8h da manhã seguinte, foram separados e verificado por lavado vaginal a presença de espermatozóides. Quando houve a detecção da presença destes, as ratas foram consideradas prenhas e passaram a receber dieta conforme os respectivos grupos: **NP** (normal protein) receberam dieta normoproteica (17% de caseína) durante toda a gestação e **LP** (low protein) receberam dieta hipoproteica (6% de caseína) durante toda a gestação. Ambos os grupos receberam dieta e água *ad libitum*.

No dia do nascimento, as dietas foram retiradas e retornou-se a dieta comercial inicial. Os filhotes foram amamentados até o fim da terceira semana de idade, quando foram retirados da mesma gaiola da mãe e realocados em novas gaiolas, recebendo todos dieta comercial, normosódica e normoproteica, *ad libitum* e água *ad libitum*.

As dietas normo e hipoproteica foram obtidas no laboratório do Prof Dr. Carlos Boschero, no departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia da Unicamp e possuem os seguintes itens:

Ingredientes	NP- 17%	LP – 6%
Amido de milho	397 g	480 g
Caseína	202 g	71,5 g
Dextrina	130,5 g	159 g
Sacarose	100 g	121 g
Óleo de soja	70 g	70 g
Fibra	50 g	50 g
Mineral mix (AIN 93)	35 g	35 g
Vitamina mix (AIN 93)	10 g	10 g
L-Cystina	1 g	3 g
Colina	2,5 g	2,5 g

Quadro 2: Itens correspondentes para 1 kg de dieta.

Os ratos machos e fêmeas usados para acasalar foram posteriormente sacrificados em câmera de CO<sub>2</sub>.

Técnicas:

1) Cultura de metanefro:

# Coleta de metanefro:

No 14° dia de gestação, embriões foram descolados d a placenta e o excesso de fluido removido antes da verificação do peso corporal. Embriões foram decapitados e posicionados de forma que as costas ficaram em contato com a placa de agarose, e alfinetes foram presos através do pescoço e base da cauda. Metanefros intactos foram assepticamente removidos com auxílio de lupa e imediatamente colocados em poços em uma placa esterilizada de 24 poços contendo soro puro DMEM: meio líquido Ham's F12 (Trace Biosciences, Castle Hill, NSW, Austrália), adicionado com 5µg/mL transferina (Sigma-Aldrich Pty. Ltda, Castle Hill, Austrália) e 12,9 µL/mL L-glutamina (Trace Biosciences, Castle Hill, NSW, Austrália) e penicilina (100 µg/mL), aquecido a 37°C.

Para diminuir a variabilidade de estagio de desenvolvimento do metanefro, os pesos de embrião foram limitante, e somente aqueles entre 0,120 a 0,140 g foram utilizados.

# Cultura de órgão:

Metanefros de cada embrião foram colocados separadamente nos poços, entretanto, ambos os grupos na mesma placa. Manteve-se em meio de cultua por 48 h, a 37°C em incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, e ao final deste período, os metanefros foram fixados com metanol a -20°C por no mínimo 15 minutos.

# Imunofluorescência para cultura de órgãos

Depois de fixados, os metanefros foram lavados brevemente com PBS contendo 1% Tween 20 (PBST) e incubados com o anticorpo primário monoclonal mouse anti-pan citoqueratina (Sigma-Aldrich) na diluicao 1:100 a 27°C por 2 horas. Metanefros foram então lavados em PBST por 30 minutos e posteriormente adicionado o anticorpo secundário, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) na diluição de 1:100 a 37°C por 90 minutos. Metanefros foram então lavados brevemente em PBST antes de serem colocados em lâmina para visualização ao microscópio.

# Quantificação do brotamento ureterico

Após a reação de imunofluorescência, metanefros foram visualizados em microscópio de fluorescência (Olympus). O número de pontos de brotamento e os pontos finais da árvore foram determinados. Ponto de brotamento foi definido como intersecção de três ou mais brotamentos.

A análise estatística foi feita utilizando-se teste T de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando p < 0,05.

2) Estereologia Renal

Ao 17.5º- dia gestacional os rins foram extraídos cuidadosamente, fixados em paraformol 4% por 10 minutos, lavados com PBS e conservados em álcool 70% até o dia da inclusão em parafina. Somente foram utilizados rins de fetos machos.

Os rins foram incluídos em blocos de parafina, de modo que cada bloco continha os dois rins do mesmo animal. Os blocos foram seccionados exaustivamente até o final, em cortes de 20  $\mu$ m, ordenados na lâmina sequencialmente.

Para visualização dos glomérulos formados e em formação, utilizou-se reação histoquímica para PNA (peanut agglutinin), o qual é marcador de podócitos.

Os cortes foram desparafinizados, lavados em PBS por 5 minutos e incubados em solução 2%  $H_2O_2$  em metanol, por 30 minutos. Posteriormente os cortes foram lavados com PBS 5 minutos. Para digerir foi utilizado neuraminidase de Vibrio cholerae por 30 minutos a 37°C.

Lavou-se as lâminas por 5 minutos com PBS e para bloqueio de sítios inespecíficos foi utilizado solução de 2% BSA em PBStriton por 30 minutos.

A incubação com PNA foi feita em solução de íons + PBStriton, por 3 horas em temperatura ambiente. Posteriormente lavou-se as lâminas e aplicou-se

o kit ABC por 1 hora em temperatura ambiente. Então as lâminas foram lavadas novamente com PBS e utilizou-se DAB + amônia sulfato de níquel por 20 a 30 segundos, observando a coloração ao microscópio e parando a reação ao colocar as lâminas em água destilada.

Para efeito de contra coloração, as lâminas foram colocadas em hematoxilina por 30 segundo e posteriormente montadas com lamínula.

## Quantificação:

Para quantificar o número de glomérulos, foram selecionados a cada 5 cortes, pares de cortes, com 1 corte intermediário desprezado. Por exemplo, foram contados os cortes 1 e 3, 5 e 7, 10 e 12, 15 e 17 e assim sucessivamente até o final.

As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus adaptado para projeção da imagem em uma mesa.

A imagem 1 foi desenhada em sulfite, de modo a marcar todos os glomérulos formados e em formação. Mudou-se a localização da lâmina até o corte 3 e ajustou-se para que ele correspondesse exatamente a mesma localização do corte número 1. Nesta imagem de corte posterior, foram anotados todos os glomérulos que apareceram ou desapareceram entre os pares.

O mesmo procedimento foi feito para todos os pares, e a quantidade de glomérulos que apareceram ou desapareceram gerou o Q<sup>-</sup>.

Devido as dificuldades de conseguir todos os cortes de maneira seqüencial, em perfeito estado para q quantificação, optou-se por utilizar os cortes imediatamente anterior ou posterior aquele de ínicio do par, por exemplo, ao invés de utilizar o corte número 5, podia-se utilizar o número 6 (pareado com o número 8) ou o número 4 (pareado com o número 6).

Para que a quantificação fosse mais precisa, a área renal foi determinada por contagem de pontos em um grid sobre a primeira imagem do par. Este valor foi chamado de "ps". Para aqueles pares onde não utilizou-se exatamente o corte múltiplo de 5, foi obtido o "ps" no corte 5 além do valor da área do primeiro corte do par, chamado por "pf".

Com estes valores anotados, utilizou-se a seguinte fórmula

$$N_{glom} = 5 \times \frac{1}{2} \times P_{s}/P_{f} \times Q^{-1}$$

A análise estatística foi feita utilizando-se teste T de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando p < 0.05.

# 3) RT-PCR

Rins inteiros foram coletados em embriões machos nas idades gestacionais E15.5, E17.5, E20.5 e da prole24 horas após nascimento. Após coleta foram congelados e mantidos a -80°C até a ex tração de RNA. RNA total foi extraído usando kit RNeasy (Qiagen). Para as idades de E15.5 e E17.5 utilizou-se o mini kit e posteriormente a quantidade de RNA foi verificada através de Bioanalyzer. Para as demais idades utilizou-se midi kit e a quantidade de RNA foi determinada por espectofotometria.

1 µg de cada amostra de RNA foi transcrita reversamente em 30.75 µL de uma reacao contendo 5 µL de 10x buffer Taqman reverse transcriptase, 11 µL def 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 µL de 100 µM 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, 2.5 µL de 50 mM random hexamers, 1 µL de RNase inhibitor, e 1.25 µL de Multiscribe reverse transcriptae.

A fim de controlar a contaminação do DNA genômico, reações negativas foram preparadas, onde 1.25  $\mu$ l de Multiscribe foram substituídos por água estéril. Reações de transcriptase reversa foram corridas em Bio-Rad i-cycler a 25°C por 10 min, 48°C por 30 min, 95°C por 5 min, e então ma ntida em 4°C. As amostras foram então estocadas a -20°C.

Os níveis da expressão dos diferentes genes foram determinados via PCR em tempo real, usando o aparelho ABI-PRISM 7700. Renina, angiotensinogenio, AT1Ra, AT1Rb e AT2 foram analisados utilizando kit da Applied Biosystems.

O método de ciclo de fluorescência limiar (CL) foi utilizado, tendo como controle interno 18S. AT1Ra, AT1Rb, Renina e Angiotensinogenio primer/probe foram preparados com 18S. AT2R foi preparado em tubo separado de 18S, depois

que experimentos mostraram que a fluorescência (CL) era alterada quando preparados na mesma reação.

# Cálculos da expressão relativa do Gene.

O valor de FL para 18S foi subtraído do valor de FL para o gene de interesse, a fim de determinar um  $\Delta$ CL para cada amostra. O  $\Delta$ CL da calibração (neste caso a media de  $\Delta$ CL do grupo controle) foi então subtraída de cada amostra, gerando um valor  $\Delta\Delta$ CL. Este valor foi então inserido na equação 2 -  $\Delta\Delta$ CL gerando o valor final da expressão relativa ao calibrador (grupo controle).

A análise estatística foi feita utilizando-se teste T de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando p < 0,05.

# 4) Pressão arterial

Ao completarem 6 semanas de vida os ratos machos foram submetidos à aferição de pressão arterial caudal (PAC), pelo método de plestimografia de cauda (Programmed Electr-Sphygmomanometer Pe-300, Narco Bio-Systems USA), descrita previamente por Lovemberg (106).

Cada animal foi colocado em uma caixa, que possui dois compartimentos, um no qual fica uma lâmpada incandescente e outro, onde é colocado o animal para aquecimento por 10 minutos, com o fim de causar uma vasodilatação, possibilitando a verificação da pressão arterial.

Após o tempo de aquecimento, o animal foi colocado em um contentor e em sua cauda, colocou-se um manguito inflável e ao lado um transdutor ligado ao aparelho.

Ao inflar o manguito, havia uma vasoconstricção, e os pulsos ouvidos cessavam, então, lentamente abria-se a válvula para liberação do ar, e ao voltar a escutar o bombeamento, o valor indicado na coluna de mercúrio foi anotado como valor da pressão arterial. Para cada animal, fez-se 3 medidas consecutivas, e caso houvesse diferença, uma média das três foi adotada. Estas medidas foram repetidas quinzenalmente, até a 16ª semana de vida, sempre no período da manhã.

A análise estatística foi feita utilizando-se teste T de Student. A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando p < 0,05.

# 5) Western Blot

Ao completar 16 semanas os animais foram sacrificados por destroncamento cervical e os rins removidos imediatamente. Após desencapsulamento, os rins foram homogenizados em "tampão de extração", à solução obtida foi adicionado "tampão de Laemmli" e posteriormente conservado em freezer a -80°C.

Os reagentes e aparelhos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foram adquiridos da Bio-Rad (Richmond, CA).

# Soluções

- Solução tampão de extração: trisma base 100 mM, EDTA 10 mM, pirofosfato de sódio 10 mM, fluoreto de sódio 100 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM (diluído em álcool etílico), triton X-100 1% e 0,1 mg/mL de aprotinina. A solução foi mantida a 4°C.

- Solução tampão de Laemmli: azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50% e SDS 10%.

-Solução tampão utilizada na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE): contem: trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%. Diluída para uso 1:4.

- Solução tampão para transferência: empregada para a transferência das proteínas separadas no SDS-PAGE para a membrana de nitrocelulose. Contém: trisma base 25 mM, glicina 192 mM Metanol 20% e SDS 0,02% para facilitar a eluição de proteínas de alto peso molecular. Foi estocada a 4°C.

- Solução tampão para SDS-PAGE – gel de resolução (resolving): tampão composto por EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 750 mM, com pH ajustado para 8,9 com ácido clorídrico.

- Solução tampão para SDS-PAGE – gel de fase de empilhamento (stacking) das proteínas. Contem EDTA 4 mM, SDS 2%, trisma base 50 mM, com pH ajustado para 6,7 com ácido fosfórico.

- Solução basal: utilizada para o manuseio da membrana de nitrocelulose após transferência das proteínas. Contem: cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10 mM, *Tween* 20 0,02%.

- Solução bloqueadora: utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose após a transferência. Contém: 5% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02% dissolvido em solução basal.

- Solução para anticorpos: solução contendo anticorpos específicos que ligaramse às proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose. Contem 0,3% de leite em pó desnatado e azida sódica 0,02% diluídos em solução basal. Os anticorpos utilizados foram anti-AT1 (1:1000); anti-AT2 (1:1000); anti-JAK-2 (1:1000) e anti-SOCS3 (1:1000)

- Solução reveladora: Kit Pierce

Quantificação de proteínas:

As proteínas totais foram quantificadas utilizando-se o método de Bradford. O material homogenizado foi tratado com buffer Laemmli contendo 100 mmol/L de dithiothreitol (DTT), aquecido em banho a 100°C por 5 minutos e a quantidade correspondente a 250µg de proteína foram aplicados em gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) o qual foi colocado em aparelho de eletroforese Bio-Rad (Mini-Protean, Bio-Rad). A eletrotransferencia das proteínas no gel de nitrocelulose foi feita a 120 V. Depois da separação eletroforética as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e encubadas com anticorpo específico a 4°C durante a noite.

Os anticorpos utilizados foram: anti-AT1, anti-AT2, anti-JAK2 e anti-SOCS3 (Santa Cruz, CA), diluídos em solução de anticorpo conforme citado.

As bandas imunoreativas foram detectadas utilizando-se solução reveladora. As imagens obtidas foram escaneadas e a intensidade das bandas foram quantificadas por densidade ótica (Scion Image Corporation).

Os valores da densidade obtidos foram utilizados para análise estatística. Foi feito teste T de Student, e considrado significativo quando p < 0,05.

# 6) Imunoistoquimica:

Ao completarem 16 semanas os ratos machos anestesiados foram perfundidos através da carótida com solução salina heparinizada 5% por 20 minutos para total remoção de sangue. Após a perfusão com solução salina, os animais foram perfundidos com solução fixadora de paraformaldeido a 4% por 15 minutos. Os rins fixados foram extraídos e colocados em solução de paraformaldeído a 4% por 1 hora. Ao retirar da solução fixadora o material foi lavado com solução PBS salina e incubado com PBS glicina por 2 horas. Após este processo os rins foram colocados em solução PBS sacarose *overnight* e na manhã seguinte, congelados com Tissuetek em nitrogênio liquido, e mantidos em freezer -80°C até o confecção das lâminas.

Os rins foram cortados a 5  $\mu m$  em criostato Leica, e colocados em lâminas silanizadas.

Para a imunomarcação com anticorpos utilizou-se o seguinte processo: As lâminas foram lavadas com PBS por 10 minutos. O material foi bloqueado com solução bloqueadora (PBS + leite molico 5%) por 45 minutos. Após bloqueio as lâminas foram lavadas com PBS por 10 minutos e encubadas com o respectivo anticorpo durante toda a noite (ver solução de anticorpo). Na manhã seguinte, os cortes foram lavados 3x por 10 minutos e posteriormente incubados com anticorpo secundário (ver solução de anticorpo) por 2 horas. Após 2 horas, as lâminas foram lavadas 3x por 10 minutos e montadas com Vectashield + DAPI.

Os cortes foram analisados em Microscopio Confocal a Laser, LSM510 Zeiss e as imagens obtidas por software do mesmo.

- solução de anticorpo primário: Anticorpo diluído em solução de 1% leite em pó em PBS conforme concentrações: rabbit anti-AT1 1:500, goat anti-AT2 1:300, rabbit anti-JAK2 1:300, goat anti-SOCS-3 1:200 (Santa Cruz CA).

- solução de anticorpo secundário: Anticorpo diluído em solução de 1% leite em pó em PBS conforme concentrações: goat anti-rabbit CY2-labeled antibody (1:600 Jackson ImmunoResearch) ou rabbit anti-goat CY3-labeled antibody (1:1000 Jackson ImmunoResearch).

# 7) Estudo da Função Renal:

Para avaliação da função renal fez-se os *clearances* de creatinina e de lítio, em animais acordados, quinzenalmente, sempre no dia após a verificação da pressão arterial.

Quatorze horas antes do início da coleta de urina, os animais receberam uma dose de cloreto lítio (Synth) por gavagem (introdução de uma sonda gástrica através da cavidade oral), na concentração de 5% do peso corporal. A ração foi retirada e os animais ficaram *overnight* em jejum sólido. Com uma hora e vinte minutos antes do inicio da coleta, foi administrada por gavagem uma sobrecarga hídrica de volume igual a 10% peso corporal. Aos vinte minutos antecedentes do inicio da coleta, a mesma dose de sobrecarga foi novamente administrada por gavagem e os animais foram então colocados em gaiolas metabólicas individuais.

Após um intervalo de 20 minutos, iniciou-se a coleta de urina em tubos graduados de vidro, por um período de 2 horas exatas.

Com o término das horas de coleta, o volume urinário foi anotado, a urina foi homogeneizada, centrifugada, e o sobrenadante foi congelado para posterior dosagem.

Cada animal foi anestesiado por inalação de éter, e colocado em uma cama contentora, onde cortamos a ponta da cauda com bisturi e coletamos sangue em

ependorfes heparinizados (0,02 mL). Os ependorfes com sangue foram identificados, centrifugados e os sobrenadantes congelados para posterior dosagem.

A cauda do animal foi suturada com fio cirúrgico e este foi levado novamente ao biotério.

# Dosagem Bioquímica

As concentrações de sódio, potássio e lítio, no plasma e na urina, foram feitas pelo método de fotometria de chama (B262; Micronal, São Paulo, Brazil), enquanto a concentração de creatinina urinária e plasmática foi mensurada pelo método de picrato alcalino, por espectrofotometria.

# 8) Microscopia Eletrônica de Varredura

Animais com 16 semanas de idade foram anestesiados e posteriormente perfundidos com solução salina 5% heparinizada via artéria renal por 5 minutos. Em seguida, a perfusão foi feita com formalina tamponada por 10 minutos. Os rins foram coletados, extraiu-se uma fatia de 2 mm do córtex e desprezou-se. Da porção restante foi retirado uma fatia de 3 mm de espessura, a qual foi picada em cubos de aproximadamente 1 x 1 mm e conservado em solução de glutaraldeído 10% em formol.

O processamento do material bem como a captação de imagem deu-se no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp.



# Resultados

Capítulo 1

#### NDT Advance Access published September 30, 2009

Nephrol Dial Transplant (2009) 1 of 9 doi: 10.1093/ndt/gfp505

Original Article



# Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure

Flávia Fernandes Mesquita<sup>1</sup>, José Antonio Rocha Gontijo<sup>1</sup> and Patrícia Aline Boer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Disciplina de Medicina Interna, Laboratório de Metabolismo Hidro-salino, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brazil and <sup>2</sup>Laboratório de Programação Fetal, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, Brazil

Correspondence and offprint requests to: Patricia Aline Boer; E-mail: boer@ibb.unesp.br

# EXPRESSION OF RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM SIGNALING COMPOUNDS IN MATERNAL PROTEINS-RESTRICTED RATS: EFFECT ON RENAL SODIUM EXCRETION AND BLOOD PRESSURE

Running Title: Low protein diet and angiotensin signaling proteins

Flávia Fernandes Mesquita, José Antonio Rocha Gontijo & Patrícia Aline Boer

# ABSTRACT

**Background:** Intrauterine growth restriction due to low maternal dietary protein during pregnancy is associated with retardation of fetal growth, renal alterations and adult hypertension. The renin-angiotensin system (RAS) is a coordinated hormonal cascade in the control of cardiovascular, renal, and adrenal function that governs body fluid and electrolyte balance, as well as arterial pressure. In the kidney, all the components of the rennin-angiotensin system including angiotensin II type 1 (AT1) and type 2 (AT2) receptors are expressed locally during nephrogenesis. Hence, we investigated whether low protein diet intake during pregnancy altered kidney and adrenal expression of AT1<sub>R</sub> and AT2<sub>R</sub> receptors, their pathways and if the modified expression of the RAS compounds occurs associated with changes in urinary sodium and in arterial blood pressure in 16 week-old males offspring of the underfed group.

**Methods:** The pregnancy dams were divided in two groups: with normal protein diet [pups named NP] (17% protein) or low protein diet [pups LP] (6% protein) during all pregnancy.

**Results:** The present data confirm a significant enhance in arterial pressure in the LP group. Furthermore, the study showed a significantly decreased expression of RAS pathway protein and Ang II receptors in the kidney and an increased expression in the adrenal of LP rats. The detailed immunohistochemical analysis of RAS signaling proteins in the kidney confirm the immunoblotting results for both groups. The present investigation also showed a pronounced decrease in fractional urinary sodium excretion in maternal protein-restricted offspring, compared with the NP age-matched group. This occurred despite unchanged Creatinine clearance.

**Conclusions:** The current data led us to hypothesize that fetal undernutrition could be associated with decreased kidney expression of  $AT_R$  resulting in the inability of renal tubules to handle the hydro-electrolyte balance, consequently causing arterial hypertension.

**Key Words:** angiotensin receptors, blood pressure, hypertension, low protein diet, renal function, renin-angiotensin system

**Short summary:** The low protein diet "in utero" is responsible for alterations on renninangiotensin system in kidney and adrenal and can result in the inability of renal tubules to handle the hydro-electrolyte balance. The present study support the association between of decreasing natriuresis, reciprocal changes in renal and adrenal AngII receptors and intracellular pathways protein with the higher blood pressure levels found in LP compared with age-match NP rats

## **Correspondence address:**

Patrícia Aline Boer, BSC, PhD, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 18600-000 Botucatu, SP, Brazil Phone: +55 14 3811-6264 R118 , Fax: +55 19 3521-7414 E-mail: alineboer@yahoo.com.br

#### **INTRODUCTION**

The implications of early life events programming disease is of great interest for public health, in both, developed and the underdeveloped countries, and have resulted in a number of experimental studies to elucidate underlying biological mechanisms of programming. The concept of fetal programming suggests that the fetus is programmed in uteri to develop a number of adult diseases, including cardiovascular and metabolic diseases [1]. Intrauterine growth restriction (IUGR) has been associated with maternal low protein intake and, although the specific nature of this insult is unclear, a number of mechanisms have been proposed. The initial point seems to be related with a decreased placental 11-\u03c6 hydroxysteroid dehydrogenase (11-\u03c6HSD) activity, causing overstimuli of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis, associated with altered renal development and adult hypertension in different species including man [2-5]. The role of the renin-angiotensin system (RAS) in the control of blood pressure and hydroelectrolyte homeostasis has been remarkably demonstrated by several studies [6]. Also, all components of the RAS is involved and expressed locally during nephrogenesis [7]. Recently, it has been demonstrated that experimentally induced maternal protein restriction, reduces renal tissue renin and Ang II levels and, AT1<sub>R</sub> and AT2<sub>R</sub> expression in newborn rats [5,8]. Most of the known actions of AngII are exerted through the  $AT1_R$ , a G-protein coupled receptor that induces activation of tyrosine kinases [9,10]. Both nonreceptor-type tyrosine kinases (Src, Fyn, Yes, Pyk2, focal adhesion kinase (FAK), and Janus kinase 2 (JAK2) and receptor-type tyrosine kinases are activated by the AT1 receptor [11,12]. These tyrosine kinases regulate signal transducers and activator of transcription (STATs) [13]. This signaling induces SOCS-3, which interacts and inhibits further activation of the AngII signaling by inhibition of signal transduction through JAK/STAT [14].

Furthermore, the circulating aldosterone is principally secreted in adrenal glomerulosa zone cortex by activation of a series of enzyme steps leading to the conversion of cholesterol to aldosterone. Among the variety of factors that modify aldosterone secretion, the most important is Ang II. The angiotensin and aldosterone classical epithelial effects are, respectively, proximal and post-proximal increased actions on the transport of sodium across the renal tubule cells in exchange for potassium and/or hydrogen ions. Thus, the net effect of these hormones, renal vascular and tubular actions is decreased urinary sodium excretion.

The purpose of the present study was to determine whether maternal protein intake restriction during whole pregnancy alters kidney and adrenal expression of RAS pathway compounds and  $AT1_R$  and  $AT2_R$  in 16 week-old male rat. Since the long-term changes in renal sodium tubule handling may be associated with arterial hypertension development, we also hypothesized that IUGR hypertension may result, at least in part, from decreased urinary sodium excretion in the offspring. To test this hypothesis, we studied the tubular sodium handling, evaluated by lithium clearance, in conscious maternal low protein intake rats compared with and their appropriate normal maternal protein intake controls.

## MATERIALS AND METHODS

Animals - The experiments were conducted on age-matched, female offspring of siblingmated Wistar Hannover rats (0,250-0,300 kg) allowed free access to water and normal rat chow. The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation. Our local colonies originated from a breeding stock supplied by CEMIB/Unicamp, Campinas, SP, Brazil. Immediately after weaning at 3 weeks of age, animals were maintained under controlled temperature (25°C) and lighting conditions (0700h-1900h), with free access to tap water and standard rodent laboratory chow (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil) and followed up to 12 weeks of age. The dams were maintained on isocaloric standard rodent laboratory (with normal protein content [NP], 17% protein) or low protein content [LP] (6% protein) chow *ad libitum* intake throughout the entire pregnancy. The day that sperm were seen in the vaginal smear was designated as day 1 of pregnancy. All groups returned to the NP chow intake after delivery. Food consumption was determined every day (subsequently normalized for body weight), and body weight was recorded once a week. The male pups were weighted, followed and maintained with normal chow until adulthood.

**Blood Pressure Measurement** - The systemic arterial pressure was measured in conscious 6, 8, 10, 12, 14 and 16-week-old rats (LP n=12 and NP n=12) by an indirect tail-cuff method using an electrosphygmomanometer (Narco Bio-Systems, Austin, TX) combined with a pneumatic pulse transducer/amplifier. This indirect approach allowed repeated measurements with a close correlation (correlation coefficient = 0.975) compared to direct intra-arterial recording [15]. The mean of three consecutive readings represented the blood pressure.

**Renal Function Tests** - The renal function tests were performed on the last day at 16 weeks of age in unanesthetized, unrestrained NP (n=12) and LP (n=12) male rats. Creatinine and Lithium Clearance were did like stand methodology [16].

**Calculations and biochemical determinations** - Plasma and urinary sodium, potassium and lithium concentrations were measured by flame photometry (B262; Micronal, São Paulo, Brazil). Creatinine was determined spectrophotometrically (362; Micronal, São Paulo, Brazil) by the alkaline picrate method. The results are reported as means ± SD per 100g body weight. Renal clearance was calculated by a standard formula (C= UV/P) using the plasma creatinine and lithium levels for each period. C<sub>Cr</sub> was used to estimate the glomerular filtration rate and C<sub>Li+</sub> was used to assess proximal tubule output. FE<sub>Na+</sub> and FE<sub>K+</sub> were calculated as C<sub>Na+</sub>/C<sub>Cr</sub> and C<sub>K+</sub>/C<sub>Cr</sub>, respectively. FEP<sub>Na+</sub> (fractional proximal sodium excretion) and FEPP<sub>Na+</sub> (fractional post-proximal sodium excretion) was calculated as CLi<sup>+</sup>/C<sub>Cr</sub> x 100 and C<sub>Na+</sub>/C<sub>Li+</sub> x 100, respectively [16-18].

*Immunofluorescence for AT1* <sub>R</sub>, *AT2* <sub>R</sub>, *JAK-2 and SOCS-3* – Sixteen-week-old male rats from the NP (n=5) and LP (n=5) groups were used. The rats were anesthetized with a mixture of ketamine (75 mg  $kg^{-1}$  body weight, i.p.) and xylasine (10mg $kg^{-1}$  body weight, i.p.) and the level of anesthesia was controlled by monitoring the corneal reflex and perfused by the left carotid artery with saline containing heparin (5%) for 15 min under constant pressure. This was followed by perfusion with 0.1M phosphate buffer (PB; pH 7.4) containing 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.1 mol/L (M) sucrose for 25

min. After the perfusion, left kidneys were immediately removed and placed in the same fixative for 2h, followed by PBS containing 0.1% glycine for 30 min and PBS containing 15% (w/v) sucrose overnight at 4°C. The following day, the tissues were placed in an OCT compound cryoprotector (Tissue-tech), cut on a Leica cryostat and mounted on silane-coated slides. For immunohistochemistry, the sections were incubated sequentially with: (1) phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% milk for 45 min to minimize non-specific reactions, (2) rabbit anti-AT1 antiserum (1:500 dilution; Santa Cruz), rabbit anti-AT2 antiserum (1:300 dilution; Santa Cruz), rabbit anti-JAK2 antiserum (1:300 dilution; Santa Cruz) or goat anti-SOCS-3 antiserum (1:200; Santa Cruz), at 4°C overnight; and (3) goat anti-rabbit CY2-labeled antibody (1:600 dilution; Jackson ImmunoResearch) or rabbit anti-goat CY3-labeled antibody (1:1000 dilution; Jackson ImmunoResearch) for 2 h at room temperature. After incubation, the sections were rinsed in 0.1 M PBS and cover-slipped with Vectashield anti-fading medium containing DAPI (Vector). The sections were examined with a confocal laser scanning microscope (CLSM, LSM510 ZEISS) . No immunoreactivity was seen in control experiments in which one of the primary antibodies was omitted.

*Tissue extracts* – Sixteen-week-old male rats from the NP (n=5) and LP (n=5) groups were used. After killed by dislocation of the neck, the abdominal cavity was opened and kidneys and adrenals were removed, minced coarsely and homogenized immediately in 10 volumes of solubilization buffer (10 ml/L Triton-X 100, 100 mmol/L Tris[hydroxymethyl]amino-methane (Tris) pH 7.4, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 100 mmol/L sodium fluoride, 10 mmol/L ethylendiaminetetracetic acid (EDTA), 10 mmol/L sodium vanadate, 2 mmol phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF) and 0.1 mg/ml aprotinin at 4°C, using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35, Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA) operated at maximum speed for 20 s. The tissue extracts were centrifuged at 11.000 rpm at 4°C for 40 min, and the supernatants used as sample [19].

## Antibodies and chemicals

Protein quantification was performed using the Bradford method [20]. For quantitation, both tissue and total extract samples (250µg protein) were subjected to SDS-PAGE. After electrophoretic separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then blotted with specific antibody. The samples were treated with Laemmli buffer containing 100 mmol/l dithiothreitol (DTT), heated in a boiling water bath for 4 min and subjected to 8% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a Bio-Rad minigel apparatus (Mini-Protean, Bio-Rad). Electrotransfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membranes was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean), as described by Towbin et al., (1979) [21]. The non-specific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2 h at 22°C in blocking buffer (5% non-fat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02% Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated at 4°C overnight with antibodies against AT1, AT2, JAK2 or SOCS-3, all from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) diluted in blocking buffer (3% non-fat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and Tween 20). Immunoreactive bands were detected using the enhanced 0.02% chemiluminescence method (RPN 2108 ECL Western blotting analysis system; Amersham

Biosciences) and were detected by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY) with Cronex Lightning Plus intensifying screen (DuPont, Wilmington, DE) for 10 min. Images of the developed autoradiographs were scanned (Epson Stylus 3500) and band intensities were quantitated by optical densitometry (Scion Image Corporation) of the developed autoradiographs that were used at exposures in the linear range.

**Statistical analysis** - All data are reported as means  $\pm$  SD. Data obtained over time were analyzed using appropriate ANOVA. *Post hoc* comparisons between selected means were done by Bonferroni's contrast test when initial ANOVA indicated statistical differences between experimental groups. Comparisons involving only two means within or between groups were done using a Student't test. A *P* value < 0.05 was considered to indicate significance.

# RESULTS

Table 1 shows the serum sodium, potassium, lithium and creatinine levels, arterial blood pressure, and pups weight to offspring of NP and LP groups. There were no significant differences between serum sodium, potassium, lithium and creatinine levels (Table 1) in NP rats, compared with the LP group. In general, food intake and, therefore, sodium intake were similar, when normalized by body weight, in male offspring of NP and LP groups, during the investigation (Table 1). The LP male pups weight was significantly reduced when compared to NP pups ( $6.15 \pm 0.16 \text{ vs} 6.72 \pm 0.41$ g, respectively. P<0.05).The arterial blood pressure enhances significantly more in LP than in NP rats from 6 to 16 weeks of age. Thus, LP pressure increased from 116.2±6.5 mmHg to 137.9±6.9 mmHg (P< 0.05) as compared with a slower and no significant rise from 114±7.4 mmHg to 128.8±8.7 mmHg in NP. In LP, the significant rise in the arterial pressure appeared after 12 weeks of age (Figure 1).

Western blot analysis of RAS signaling protein expression - Western blot analysis in male offspring of NP and LP rat kidneys and adrenals yielded a single band at the expected weight of corresponding proteins. The expression of all protein studied in the kidney of 16-week-old LP rats was significantly lower when compared to NP rats (Figure 2). For AT1<sub>R</sub>, the reduction was 50.47%; for AT2<sub>R</sub>, 75.75%; for JAK-2, 84.04% and for SOCS-3, 16.4% (P< 0.05). Conversely, the expression of same RAS signaling proteins in adrenals of 16-wk-old LP animals enhances significantly when compared with NP group (Figure 2).

*Immunohistochemical analysis of RAS signaling proteins localization* - Immunoreactivity assays of  $AT1_R$  in NP rat kidneys showed that they were located in the cortex and present in all segments and cells of tubule profiles. The intercalated cells of cortical collecting ducts presented intense immunoreactivity for  $AT1_R$ . In the LP rat kidneys, the localization of these receptors was preferentially in the intercalated cells with a marked reduction of this receptor in the other cells (Figure 3). The alterations in glomerular localization of  $AT1_R$  was not observed.

The pattern of  $AT2_R$  and SOCS-3 distribution comprises the capillary loops of glomeruli, proximal and distal tubules and cortical collecting duct. In contrast to NP, the

LP glomeruli did not present  $AT2_R$  and SOCS-3 localization. Additionally, in the NP collecting ducts both principal and intercalated cells are positive for localization of  $AT2_R$  and SOCS-3 and in the LP, furthermore  $AT1_R$ , the  $AT2_R$ , and SOCS-3 expression appears more intense in the intercalated cells (Figure 4 and Figure 5).

The NP rat renal distribution of JAK-2 immunoreactivity was localized in cytosolic and nuclear sites of all tubule and glomeruli cells. On the other hand, the LP rat kidneys present significantly reduced immunoreactivity and this protein was preferentially located in the nuclei of cells. The intercalated cells also present more of this protein when compared with other cell types (Figure 6).

**Renal Function Data** - The data for renal function in the 16-wk-old offspring of both (NP and LP) groups are summarized in Figure. The urinary flow rates (data not included) and the glomerular filtration rate, estimated by  $C_{Cr}$ , did not significantly differ among the groups during the renal tubule sodium handling studies (Figure 7). Fractional urinary sodium excretion (FE<sub>Na</sub>) was significantly lower in low maternal protein intake rats when compared with the normal maternal protein intake age-matched group, as follows: LP:  $0.96 \pm 0.036$  % *versus* NP:  $1.44 \pm 0.26$  % (P<0.05). The decreased FE<sub>Na</sub> in low maternal protein intake rats was accompanied by a significant decrease in proximal sodium excretion (FEP<sub>Na</sub>) and fractional potassium excretion (FE<sub>K</sub>) compared with the normal maternal protein intake age-paired control group (P<0.05). This decreased FE<sub>Na</sub> and FE<sub>K</sub> occurred despite unchanged  $C_{Cr}$  and a significant enhance in FEPP<sub>Na</sub> in the control group LP:  $1.32 \pm 0.15$  % *vs* NP:  $0.63 \pm 0.09$  %, P < 0.05) (Figure 7). This consistent fall in FE<sub>Na</sub>, FEP<sub>Na</sub> and enhance in FEPP<sub>Na</sub>, produced by protein intake restriction during pregnancy, was followed by unaffected kaliuresis at the entire experimental group of the present investigation.

#### DISCUSSION

Recent studies have shown that the kidney, during period of development, can be influenced by alterations in the intrauterine environment [22,23]. This organizational phenomenon is termed 'early-life programming'. Here, in maternal protein-deprived offspring model, we focus on adult hypertension, kidney and RAS dysfunctions as an outcome and suggest that kidney is an organ in which there are permanent changes that underlie the developing hypertension. The present study confirms that 16-wk-old LP male rats' weight was significantly reduced when compared to NP offspring. This effect was associated with a significant enhance in arterial blood pressure in the LP group. Furthermore, the immunoblotting and immunohistochemical analysis in current study showed a significantly decreased expression of AngII receptors and signaling protein expression in the whole kidney of LP rats than observed in NP offspring. Conversely, the expression of same AngII receptors and signaling proteins in of 16-wk-old LP adrenals enhances significantly when compared with NP age-matched group (Figure 2). The present investigation also confirmed a pronounced decrease in fractional urinary sodium excretion in maternal protein-restricted offspring. The decreased  $FE_{Na}$  and  $FE_K$  was accompanied by a fall in FEP<sub>Na</sub> and occurred despite unchanged C<sub>Cr</sub> and an enhanced FEPP<sub>Na</sub>. The precise mechanism of these phenomenons remains unknown.

Two remarkable questions emerged from the present investigation: 1) why does maternal low protein diet treatment promote a decreased natriuresis and arterial hypertension in adult normotensive lineage rats? And 2) simultaneously, why do the kidneys of LP progeny showed a lower expression of AT1, AT2 receptors and SOCS-3 protein and, JAK-2/STAT pathway activity? The adult kidney comprises several filtering units; in some species, total numbers of nephron are determined before birth [22,23]. In rodents, the permanent metanephric kidney is very immature at birth and, in the rat, about 20% of the total nephron number is present at birth [23]. There is evidence that any insult (including maternal undernutrion) that alters the total number of nephron also causes late-onset hypertension [24-26]. It is well established that the RAS plays an important role in the normal morphological development of the kidney [27]. When pre- or neonatal rats were given high doses of the AT1<sub>R</sub> antagonist, and studied at 22 weeks, they were hypertensive, and showed an expressive reduction in the nephron number [28]. Previous immunoblotting studies have shown a decrease in AT1<sub>R</sub> at LP one-day-old rats [29], but an increase of that at 4 weeks of age, when they are normotensive yet [30]. However, the current studies, at 16-wk-old rats, demonstrate a decreased AT1<sub>R</sub> expression in all nephron segments, by Western blotting and immunohistochemical (minus 50.47%), except in the intercalated cell (Fig. 3) in LP offspring group. The second major isoform of the angiotensin receptor,  $AT2_R$ , is normally expressed at high levels in fetal tissues, and decreases rapidly after birth [7]. These receptors may antagonize, under physiological conditions, AT1-mediated effects by inhibiting cell growth, and by inducing apoptosis and vasodilatation [8,31]. In current study the renal expression of  $AT2_R$  had a striking decrease (about 77%), which is consistent with previous report showing reduced renal AT2 mRNA in LP rats [30] and a reduced protein AT2<sub>R</sub> in LP, both in rats beyond 4 weeks of age. At least two different intracellular pathways participate in the transduction of the AngII signal in target cells. First, by the activation of Gq protein [9,32,33] and, secondly, activation of JAK-2 [34] which rapidly direct the signal towards the nucleus through the STAT proteins [35,36]. Additionally, SOCS proteins are under the transcriptional control of members of the STAT family [37]. The translated SOCS-3 then migrates to the cytoplasm, where it interacts with Tyr759, therefore participating in the inhibition of further activation of the JAK-2/STAT signaling pathway in different tissues [38,39]. Since, as shown in the previous studies, that protein restriction during pregnancy can lead to premature maturation of the kidney and reduced number of nephron due to overactivity of AngII activity in fetal life, we decided to investigate the participation of renal SOCS-3 in the control of kidney and adrenal AngII pathway activity in both groups. It is, therefore, possible that observed decrease in the renal AngII receptors transduction in the LP progeny may be simply an adaptive downregulation response that limits the fetal renal growth and post-natal sodium transport. In spite of the efforts to characterize a link between desensitization of AngII signaling in the kidney, we could not clearly demonstrate the mechanisms that seem to cause changes in renal tubule sodium handling and hypertension development in progeny of maternal protein-restricted rats. Thus, the kidney functional change seems to be the result of different mechanisms that participate in the modulation of the response to AngII, beyond the participation of intracellular AngII pathways. We cannot rule out other

mechanisms that could participate in AngII signaling pathway desensitization, associated with AngII receptor downregulation. Thus, recycling of the receptor [50], AngII-induced internalization of receptors [51], PKC-induced serine phosphorylation of AT1R and AT2R [53] and, finally, the induction of the early inducible genes, *c-fos* and *c-jun* ultimately mediate the desensitization to the AngII signal [54].

In the present study, however, do not seems merely that a reduced nephron number and, consequently decreased glomerular filtration rate is responsible for the increasing blood pressure, since we did not observe any significant difference between LP and NP glomerular filtration rate, estimated by C<sub>Cr</sub>. We may suppose that compensatory maladaptive nephron functional changes may occur intrarenally when nephrogenesis is compromised. This is consistent with the fact that uninephrectomy in the adult rats does not necessarily cause hypertension, and no compensatory nephrogenesis can occur [45]. Studies have shown that, exogenous administration of AngII elicits decreases in renal blood flow and glomerular filtration rate [46] and increases the filtration fraction support the notion that AngII predominantly constricts the postglomerular arterioles [47,48]. But, how do we could explain our data? Because both AT1 and AT2 receptors are expressed in arteriolar and glomerular cells [47], these may influence the glomerular filtration rate. The exact mechanism by which AngII regulates the glomerular filtration coefficient remains to be clarified. Modulation is an important capability of cells for the "fine-tuning" of a broad spectrum of actions, which - in case of the  $AT2_R$  – seems to span the regulation of natriuresis, blood-pressure, embryonic development, cell differentiation and antiproliferative, tissue repair and programmed cell death. Munzenmaier and Greene [48] reported opposing effects of AT1<sub>R</sub> and AT2<sub>R</sub> on vascular growth in the rat muscle. In the present study, the higher ratio of AT1/AT2 receptors of AngII expression was found in LP offspring compared with NP kidneys. This finding suggest that major downregulation of AT2<sub>R</sub> associated with higher AT1/AT2<sub>R</sub> ratio may be involved in the unchanged C<sub>Cr</sub> in LP offspring by presumable decreased vasodilatation response of the AT2<sub>R</sub>, including in postglomerular kidney vessels. Taking in account the current and previous studies, we suggest that the most direct way to explain the decreased FE<sub>Na+</sub> and unchanged C<sub>Cr</sub> may be by combined increases in postglomerular arteriolar resistance associated with decreased renal blood flow.

The novelty of the present study shows that decreased natriuresis is, at least transiently, associated with an unchanged glomerular filtration rate and incompletely compensated by more distal nephron segments. These findings are accompanied by decreased renal expression of AngII receptors and consequently fall in the intracellular pathways proteins expression in maternal LP diet group; and, conversely by striking enhanced of AngII receptors and intracellular pathways protein in adrenal. The direct intrarenally actions of AngII contribute to increased tubular reabsorption including constriction of glomerular arterioles, which alter peritubular capillary dynamics and renal medularly blood flow, and direct actions on tubular epithelial cell transport [49]. AngII molecular mechanisms involved in the stimulation of salt reabsorption within the proximal tubule is related with activation of apical Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, basolateral Na<sup>+</sup>-HCO3<sup>-</sup> cotransport, and basolateral Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and via insertion of H<sup>+</sup>-ATPase into

the apical membrane [50-52]. Also, the AngII infusion increased distal fractional sodium reabsorption. AngII acts to stimulate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in both early and late distal segments via activation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase and amiloride-sensitive channels in late distal segments [53,54]. Surprisingly, in the current study the expression of AngII receptors and signaling compounds in maternal protein-restricted rats was dramatically down-regulated suggesting other mechanisms to antinatriuresis in these animals. In fact, we did not rule out a possible indirect mechanism underlying the decrease renal sodium excretion includes physical. Selkurt et al. (1965) and other researchers [55] proposed that decreased peritubular pressure might stimulates sodium reabsorption by decreased modularly blood flow. Additionally, Cowley (1997) has confirmed that a decrease in interstitial volume and/or pressure across the peritubular capillaries could enhance tubular sodium reabsorption [56]. Speculatively, in the present study, hemodynamic glomerular changes causing an increased fractional filtration rate and/or decreased renal blood flow may be responsible by enhanced sodium reabsorption in proximal segments of the nephron in LP rats. The FENa<sup>+</sup> responses observed in the present study may result from the interactions of a variety of mechanisms, such as angiotensin-induced renal arteriolar postglomerular vasoconstriction, overexcitability of the sympathetic nervous system and by direct tubule effects in LP offspring and, consequently associated with arterial hypertension. As analyzed above, we may also suppose that antinatriuretic and hypertensive effects observed in the present study in LP group may also result from either a significant downregulation of renal AT2<sub>R</sub> (and relative higher expression of AT1<sub>R</sub>) and/or from the higher ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin expression found in maternal protein restriction offspring compared with NP group.

Hjaiej et al., (1998) show that corticoadrenal activation characterized by an increase in blood and adrenal aldosterone levels and adrenal hypertrophy was observed in maternal undernourished offspring [57]. Study has demonstrated that the serumglucocorticoid-regulated kinase 1 (Sgk1) is induced by aldosterone in the aldosteronesensitive distal nephron and that polymorphisms of the kinase is associate with hypertension developing [58]. Recently, study has shown that maternal signals mediated by Sgk1 may play a decisive role in fetal programming of hypertension induced by prenatal protein restriction [59]. In the current study, the huge enhance of adrenal AngII receptors and intracellular pathways protein permit us to hypothesized the possibility that adrenal overestimuli with increased secretion of aldosterone, primarily through the mineralocorticoid receptors in the cortical segments of the collecting tubule contributing to decreased FENa<sup>+</sup> in LP rats. Aldosterone stimulates ionic transport in the principal cells by increasing the number of open sodium and potassium channels in the luminal membrane and the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase pump in the basolateral membrane. It further stimulates H<sup>+</sup> secretion in the intercalated cells of the cortex and tubular cells in the outer medulla [60]. That possibility could also explain the intense  $AT1_R$ , the  $AT2_R$ , and SOCS-3 immunoreactivity in the intercalated cells observed in the present data . Although the reason for some discrepancy between our study and those previous remains unknown, taking into account the present data, we may suppose that 'early-life programming' effects on blood pressure are also sensitive to animal species, prenatal protein restriction duration or intensity.

In summary, we may hypothesized that under protein restriction conditions, the fetus responds, in the short-term, by making suitable adaptations to accommodate the disturbance in intrauterine substrate supply. After birth, under normal protein diet intake, the long-term outcome of these adaptations is represented as an absolute and relative small urinary sodium excretion capacity associated with increased blood pressure and a relative propensity toward a diseased state in adult life. The present study might indicate that, also in kidney and adrenal, protein underfeeding exerts a modulator effect on AngII receptor expression. Although, the precise mechanism responsible for the subsequent enhanced sodium retention response in LP offspring rats is still unclear, the current data suggest that changes in renal and/or adrenal functions are conducive to excess hydroelectrolyte tubule reabsorption, and this way might play a role which potentiates the appearing of programming of adult hypertension. In fact, it is plausible to suppose that the present study support the association between of decreasing natriuresis, reciprocal changes in renal and adrenal AngII receptors and intracellular pathways protein with the higher blood pressure levels found in LP compared with agematch NP rats.

# ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mrs Amanda Roberta de Almeida and Miss Elizabeth Cambucci for technical assistance. Grants from CNPq (No.500868/91-3), PRONEX (0134/97), CAPES and FAPESP (05/543624) supported this work.

## REFERENCES

- 1. Ashton N. Perinatal development and adult blood pressure. Brazilian J Med Biol Res. 2000; 33:731-740.
- 2. Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. J Hypertens. 2000; 18(7):815-831.
- 3. Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. Life Sci. 1999; 64(11):965-74.
- 4. Bassan H, Trejo LL, Kariv N, et al. Experimental intrauterine growth retardation alters renal development. Pediatr Nephrol. 2000; 15(3-4):192-195.
- 5. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. Pediatr Res. 2001; 49(4):460-467.
- 6. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. Endocr Rev. 2003; 24(3):261-271.

- 7. Gomez RA, Norwood VF. Developmental consequences of the renin-angiotensin system. Am J Kidney Dis. 1995; 26(3):409-431.
- 8. Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D, Manning J. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. Am J Physiol Renal Physiol. 2004; 287(2):F262-267.
- 9. Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S. Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca(2+)-dependent signaling. Circ Research 1995; **76:** 1–15.
- 10. Sayeski PP, Ali MS, Semeniuk DJ, Doan TN, Bernstein KE. Angiotensin II signals transduction pathways. Regul Pept. 1998; 78(1-3):19-29.
- 11. Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, Ishida T, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin II activates pp60c-src in vascular smooth muscle cells. Circ Res. 1995; 77(6):1053-1059.
- 12. Heeneman S, Haendeler J, Saito Y, Ishida M, Berk BC. Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor beta receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. J Biol Chem. 2000; 275(21):15926-15932.
- 13. Venema RC, Venema VJ, Eaton DC, Marrero MB. Angiotensin II-induced tyrosine phosphorylation of signal transducers and activators of transcription 1 is regulated by Janus-activated kinase 2 and Fyn kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *J Biol Chem.* 1998; 273(46):30795-30800.
- 14. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. Stem Cells 2001; 19: 378–387.
- 15. Lovenberg W. Techniques for measurements of blood pressure. Hypertension. 1987; 9: 15-16.
- 16. Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA. Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): Role of renal nerves. Life Sciences 2005; 76: 1805-1815.
- 17. Xavier F, Magalhães AMF, Gontijo JAR. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on blood pressure and renal sodium handling in renal denervated rats. Brazilian J Med Biol Res. 2000; 33: 347-354.
- 18. Furlan FC, Marshal PS, Macedo RF, Carvalheira JB, Michelotto JB, Gontijo JAR. Acute intracerebroventricular insulin microinjection after nitric oxide synthase inhibition of renal sodium handling in rats. *Life Sci.* 2003; 72:2561-2569.
- 19. Bento LM, Carvalheira JB, Menegon LF, Saad MJ, Gontijo JA. Effects of NH4Cl intake on renal growth in rats: role of MAPK signalling pathway. Nephrol Dial Transplant. 2005; 20: 2654-2660.
- 20. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72:248-254.
- 21. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci. 1979; 76(9):4350-4354.

- 22. Moritz KM, Wintour EM. Functional development of the meso- and metanephros. Pediatr Nephrol. 1999; 13(2):171-178.
- 23. Lelievre-Pegorier M, Merlet-Benichou C. The number of nephrons in the mammalian kidney: environmental influences play a determining role. Exp Nephrol. 2000; 8(2):63-65.
- 24. Langley-Evans S. Fetal growth markers may show nutritionally mediated effect. BMJ. 2001; 323(7303):52.
- 25. Celsi G, Kistner A, Aizman R, et al. Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. Pediatr Res. 1998; 44(3):317-322.
- 26. Ortiz A, Lorz C, Justo P, Catalan MP, Egido J. Contribution of apoptotic cell death to renal injury. J Cell Mol Med. 2001; 5(1):18-32.
- 27. Guron G, Friberg P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens*. 2000; 18(2):123-137.
- 28. Ingelfinger JR, Woods LL. Perinatal programming, renal development, and adult renal function. Am J Hypertens. 2002; 15(2 Pt 2):46S-49S.
- 29. Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D, Manning J. Kidney angiotensina and angiotensina receptor expression in prenatally programmed hypertension. Am J Physiol Renal Physiol. 2004; 287: F262-F267.
- 30. Sahajpal V, Ashton N. Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. J Physiol. 2005; 563.1: 193-201.
- 31. 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 A Physiol*. 1995; 110:223-228.
- 32. Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA Jr, Rittenhouse SE. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. Hypertension 1985; 7:447–451.
- 33. Walsh MP, Kargacin GJ, Kendrick-Jones J, Lincoln TM 1995 Intracellular mechanisms involved in the regulation of vascular smooth muscle tone. Canadian J Physiol Pharmacol 1995; 73:565–573.
- 34. Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, et al. Direct stimulation of JAK/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. Nature 1995; 375: 247–250.
- 35. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994; 264:1415–1421.
- 36. Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. Annu Rev Biochemistry 1995; 64: 621–651.
- 37. Schmitz J, Weissenbach M, Hass S, Heirinch PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp 130. J Biol Chem 2000; 275 12848-12856.
- 38. Torsoni MA, Carvalheira JB, Calegari VC, et al. Angiotensin II (AngII) induces the expression of suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 in rat hypothalamus
- a mechanism for desensitization of AngII signaling. J Endocrinol. 2004; 181(1):117-128.

- 39. Boulay G, Chretien L, Richard DE, Guillemette G. Short-term desensitization of the angiotensin II receptor of bovine adrenal glomerulosa cells corresponds to a shift from a high to a low affinity state. Endocrinology. 1994; 135(5):2130-2136.
- 40. Tang SS, Jung F, Diamant D, Ingelfinger J. Immortalized rat proximal tubule cell lines expressing components of the renin-angiotensin system. Exp Nephrol. 1994; 2(2):127.
- 41. Balmforth AJ, Shepherd FH, Warburton P, Ball SG. Evidence of an important and direct role for protein kinase C in agonist-induced phosphorylation leading to desensitization of the angiotensin AT1A receptor. Br J Pharmacol. 1997; 122(7):1469-1477.
- 42. Moellenhoff E, Blume A, Culman J, et al. Effect of repetitive icv injections of AngII on c-fos and AT(1)-receptor expression in the brain. Am J Physiol 2001; 280: R1095-1104.
- 43. Navar LG, Nishiyama A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? Curr Opin Nephrol Hypertens 2004;13:107–115.
- 44. Mitchell KD, Braam B, Navar LG. Hypertensinogenic mechanisms mediated by renal actions of renin-angiotensin system. Hypertension 1992;19:I18–I27.
- 45. Schor N, Ichikawa I, Brenner BM. Glomerular adaptations to chronic dietary salt restriction or excess. Am J Physiol 1980;238:F428–F436.
- 46. Alberola AM, Salazar FJ, Nakamura T, Granger JP. Interaction between angiotensin II and nitric oxide in control of renal hemodynamics in conscious dogs. Am J Physiol 1994;267:R1472–R1478.
- 47. Sharma M, Sharma R, Greene AS, McCarthy ET, Savin VJ. Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. Am J Physiol 1998; 274: F623-627.
- Munzenmaier DH, Greene AS. Opposing actions of angiotensin II on microvascular growth and arterial blood pressure. Hypertension. 1996; 27:760-765.
- 49. Yamamoto T, Hayashi K, Matsuda H, et al. In vivo visualization of angiotensin II-and tubuloglomerular feedback-mediated renal vasoconstriction. Kidney Int 2001;60:364–369.
- 50. Eiam-Ong S, Hilden SA, Johns CA, Madias NE. Stimulation of basolateral Na+-HCO3– cotransporter by angiotensin II in rabbit renal cortex. Am J Physiol 1993;265:F195–F203.
- 51. Wang T, Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. Am J Physiol 1996;271:F143–F149.
- 52. Barreto-Chaves ML, Mello-Aires M. Effect of luminal angiotensin II and ANP on early and late cortical distal tubule HCO3– reabsorption. Am J Physiol 1996;271:F977–F984.
- 53. Olsen ME, Hall JE, Montani JP, Cornell JE. Protection of preglomerular vessels from angiotensin II vasoconstriction by renal prostaglandins. J Hypertens Suppl. 1985; 3:S255-258.

- 54. Granger JP, Alexander BT, Llinas M. Mechanisms of pressure natriuresis. Current Hypertension Reports 2002; 4: 152-159.
- 55. Selkurt EE, Womack I, Dailey WN. Mechanism of natriuresis and diuresis during elevated renal arterial pressure. American Journal of Physiology 1965; 209: 95-99.
- 56. Cowley AW Jr. Role of the renal medulla in volume and arterial pressure regulation. American Journal of Physiology 1997; 273: R1-15.
- 57. Hjaiej L, el Feki A, el Fazaa S, Gharbi N, Kamoun A. Adrenal cortex activity in the malnourished newborn rat. Arch Physiol Biochem. 1998;105:342-346.
- 58. Vallon V, Wulff P, Huang DY, et al. Role of Sgk1 in salt and potassium homeostasis. Am J Physiol. 2005; 288: R4-10.
- 59. Rexhepaj R, Boini KM, Huang DY, et al. Role of maternal glucocorticoid inducible kinase SGK1 in fetal programming of blood pressure in response to prenatal diet. Am J Physiol. 2008; 294: R2008-2013.
- 60. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. Physiol Rev 2006;86:747–803.

**Table 1**–Serum sodium, potassium, lithium and creatinine levels, body weight at birth, and arterial blood pressure in NP and LP rats fed respectively with a normal diet and a low protein diet. The data are reported as the means  $\pm$  SD. \* P $\leq$  0.05 *vs* LP (Student's *t* test).

Groups	Na <sup>+</sup> (mM)	K <sup>+</sup> (mM)	Li <sup>+</sup> (µM)	Cr (mg/dL)	Body weight (g) Birth weight	Blood Pressure 16wks
NP (n=10)	$140 \pm 4.9$	$3.60 \pm 0.4$	$1.38 \pm 0.04$	$0.47\pm0.02$	$6.72\pm0.16$	$128.8 \pm 8.7$
LP (n=11)	$138\pm2.9$	$3.36\pm0.2$	$1.33 \pm 0.05$	$0.50\pm0.02$	$6.15 \pm 0.41*$	137.9 ± 6.9*

**Figure 1** - Effects of age on arterial pressure in male offspring of protein-restricted and basal diet mothers during gestation. The data are reported as the means  $\pm$  SEM. \* P $\leq$  0.05 *vs* Control (Student's test). See Results for statistical analysis details.

**Figure 2** - Effects of maternal protein restriction on expression of kidney and adrenal RAS associated proteins. This figure shows the results obtained in whole-tissue extracts that were immunoblotted for  $AT1_R$ ,  $AT2_R$ , JAK-2 and SOCS-3, for these proteins content verification in the NP and LP kidneys and adrenals. The results of scanning densitometry were expressed as relative to NP, assigning a value of 100% to the control rats. Columns and bars represent the mean  $\pm$  SEM \*P<0.05, NP vs. LP.

**Figure 3** - CLSM showing the immunolocalization of AT1<sub>R</sub> (in red) in the kidney of NP (A, B and C) and LP (D, E, and F) rats. In NP rats kidneys  $AT1_R$  may be located in all tubular cortical segments but was observed strongly associated with intercalated cells (arrows) of distal end collecting segments. We not verified alteration in glomerular (g) localization of this receptor. In distal and collecting segments of LP kidney  $AT1_R$  is preferentially associated with intercalated cells and not with principal cells.

**Figure 4** - CLSM showing the immunolocalization of  $AT2_R$  (in green) in the kidney of NP (A and B) and LP (C and D) rats. In NP rats kidneys  $AT2_R$  may be located in all tubular cortical segments and also associated with intercalated cells (arrows) of distal end collecting segments. The linear immunolocalization pattern of glomerular (g) capillaries may be observed in NP rat kidneys (B). In LP rats kidneys there was reduction in general reactivity and total absence of this receptor (D) in glomeruli (g). In this group,  $AT2_R$  also were localized preferentially associated with intercalated cells and not with principal cells.

**Figure 5** - CLSM showing the immunolocalization of SOCS-3 (in green) in the kidney of NP (A and C) and LP (B and D) rats. The linear immunolocalization pattern may be observed in glomerular (g) capillaries in NP rat kidneys (A) and is not present in LP rats kidneys (C). In LP group this protein was localized preferentially associated with intercalated cells (arrows) and not with principal cells (D).

**Figure 6** - CLSM showing the immunolocalization of JAK-2 (in red) in the kidney of NP (A and B) and LP (C, D and E) rats. Poor immunorectivity was observed in LP group when compared to that localized in NP both in tubules and glomeruli. We also may repair that this downstream protein of the angiotensin II signaling cascade was localized preferentially in the nuclei in the LP rat kidneys. The intercalated cells immunoreactivity was also found here (arrows).

**Figure 7** - Creatinine clearance ( $C_{Cr}$ ), fractional sodium excretion ( $FE_{Na}$ ), proximal ( $FEP_{Na}$ ) and post-proximal ( $FEPP_{Na}$ ) fractional sodium excretion and fractional potassium excretion ( $FE_K$ ) in control (NP) and maternal protein-restricted in 16-wk-old offspring. The data are reported as the means  $\pm$  SEM. \* P $\leq$  0.05 *vs* Control (Student'*t* test). See Results for statistical analysis details.



Figure 1





Figure 3



Figure 4



Figure 5



Figure 6







# Early alterations on kidney development that lead to hypertension: the role of maternal protein restriction

(submetido)

Flávia F. Mesquita, Debbie Arena, Luise Ewen-McCullen, José A. R. Gontijo, John Bertram, Patrícia A. Boer, James Armitage

#### Introduction

Epidemiological studies indicate that risk of disease in later life is related to factors that impair fetal growth. A body of evidences shows that environmental factors in perinatal period can cause permanent changes in the physiology and structure of the body, indicated for "programming" the individual predisposition to disease in later life (1-5). This hypothesis is strongly supported by many studies whose have shown that embryos exposed to low protein diet during gestation have consequently a decrease in nephron number (3, 6-8), altered adult renin-angiotensin system (RAS) and elevated arterial pressure at adult age (9,10).

Nephrogenesis begins when nephric duct gives rise to ureteric bud (UB) and these events are regulated by numerous transcription factors and signaling molecules. Signals induce UB to branch in a process called branching morphogenesis generating ureter and collecting system initially and subsequent generations of UB branches will differentiate into collecting ducts (11). Each UB tips is capable to form nephrons (12) and we believe that the low nephron number characterized by *in uteru* undernutrition rats begin to be determined by the disrupted branching morphogenesis.

The renin-angiotensin system is extremely important in vasculogenesis, branching morphogenesis and development of hypertension in adult as a result of a reduction in nephron number during nephrogenesis (13-15). RAS is also important for regulation of arterial pressure in adult life. All the components of the RAS are highly expressed in the developing kidney (16). The kidney exhibits both spatial and temporal development regulation of angiotensin receptors (17). Angiotensin II (Ang II) is a peptide extensive known for action via its two major receptors, angiotensin type 1 receptor  $(AT1_B)$ and angiotensin type 2 receptor (AT2<sub>R</sub>). These receptors belong to the large family of G protein-coupled receptors with seven transmembrane domains and work differently during kidney development (18,19). Signaling of Ang II via AT1<sub>B</sub> has an effect proliferative, proliferation. extracellular controlling cell matrix production, morphogenesis, nephrovascular development and induction of other growth factors. During prenatal nephrogenesis, signaling of Ang II via AT2<sub>R</sub> up-regulates the paired homeobox 2 gene (Pax-2), mediating mesenchymal to epithelial transformation as well as apoptosis to

eliminate unwanted cells. (20) A lack of AT1<sub>R</sub> or AT2<sub>R</sub> stimulation could interfere with the proliferation/apoptosis balance through different pathways.

The strongest evidence for the involvement of the RAS in hypertension programmed by maternal protein restriction is the normalization of blood pressure in the hypertensive offspring by angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition (21) and angiotensin type 1 (AT1<sub>R</sub>) receptor antagonism (22). McMullen and Langley-Evans show that at 4 weeks of life, rats exposed to maternal proteic undernutrition present altered AT2<sub>R</sub> mRNA expression, and at birth, although not reaching statistical significance, they noted the same pattern of AT2<sub>R</sub> mRNA expression. Also, this study shows that the regulation o RAS is sex-specific (23). However, how this system is modulated during embryonic life is unclear.

Our hypothesis is that a suboptimal maternal environment, induced by maternal low protein diet, can modify RAS yet *in utero*, and this up or down-regulation, at this critical time, may account for impaired renal development, reducing ureteric branching in the first stages of nephrogenesis, leading to reduced nephron number consequently, misleading renal water and salt handling and increasing arterial pressure.

# Methods and Materials

#### Animals and diets

Experiments were approved by the Animal Ethics Committee of School of Biomedical Science from Monash University, Australia (SOBS-2007/81). Female Sprague-Dawley rats were fed a normal-protein (NP- 20% casein) or an isocaloric low-protein (LP-8% casein) diet from 2 weeks before mating and during all the gestation. Males Sprague-Dawley rats were fed a normal-protein diet during all experiment.

On the time-mated, 1 male rat was put in a cage with 2 female rats for a period of 2h. In the end of 2 hours, when a vaginal smear with sperm was visualized, was designed E0. Embryos were removed from uterus, cleaned and weighted prior to decapitation. Kidney or metanephroi were isolated in accordance with different experiments.

#### Sex determination

In the collection day, embryos limbs and tail were collected and DNA extracted using Promega Kit. Genotyping for SRY gene determined embryo sex. In these experiments we only studied male embryos.

# Whole metanephric organ culture

Sprague-Dawley female rats were time-mated from 8am to 10am where presence of sperm in vaginal smear indicated time of mating. This time of mating was designed as E0. Whole metanephroi were isolated from E14.25 Sprague –Dawley males embryos within a weight range of 0.120-0.140 g and placed on 3.0  $\mu$ m pore polycarbonate transfilter membranes (Transwell, Corning Star, MA) in 24-well tissue culture plates with wells containing 350  $\mu$ l of serum-free culture medium at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The culture medium consisted of Dullbecco's modified Eagle's medium (DNEM):Ham`s F12 liquid medium (Trace Bioscience, Castle Hill, New South Wales, Australia) supplemented with 5  $\mu$ g/ml transferin (Sigma, Castle Hill, Australia), 12.9  $\mu$ l/ml L-glutamine (Trace Biosciences) and penicillin (100  $\mu$ g/ml). Metanephroi of both groups were cultured in the same plate for 48h. At the conclusion of the culture period, metanephroi were fixed with cold methanol for examination with whole mount immunofluorescence microscopy.

# Immunofluorescence Staining

To visualize ureteric branching morphogenesis, metanephroi were whole mount immunostained with a monoclonal anti-pan cytokeratin mixture (Sigma-Aldrich). At the conclusion of the culture period, metanephoi were fixed whole in methanol as -20°C for a minimum of 24h. After fixation, metanephroi were washed briefly in PBS containing 1% Tween 20 (PBST) and incubated with the primary antibody; monoclonal mouse anti-pan cytokeratin (Sigma-Aldrich) at a dilution of 1:100 at 27°C for 2h. Metanephroi were then washed in PBST before addition of the secondary antibody, Alexa 488 goat antimouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR) at a dilution of 1:100 at 37°C for 1h30min. Metanephroi were then washed briefly in PBST before mounting in PBS/glycerol mounting media (Sigma-Aldrich).

#### Quantification of Ureteric Branching Morphogenesis

Following immunostaining, metanephroi were visualized under an epifluorescent microscope (Olympus). The whole metanephros was visualized and the ureteric "tree" was attached as a skeletonized image. The number of branch points and terminal tips was determined. Branch points were defined as the intersection of the three branches.

# Estimating Nephron number

Whole kidneys were dissected from E17.5 males embryos and embedded in paraffin. Then they were exhaustively sectioned at  $20\mu$ m, and every 5<sup>th</sup> and the second follower section was collected and stained with anti-peanut agglutinin and hematoxilin. The sections pairs were projected with a microscope modified for projection. The first kidney of the pair was draw and glomeruli were detected and the second section of the pair was compared with the first one. Glomeruli that were not present in the second section of the pair but was present in the first section, or that appeared in the second section was counted. This process was repeated for each complete pair of sections. Total nephron number (N<sub>glom</sub>) was then estimated using the following equation:

$$N_{glom} = 5 x \frac{1}{2} x P_s / P_f x Q^2$$

Where 5 was the reciprocal of the section sampling fraction,  $P_s$  the number of points overlying all kidneys sections,  $P_f$  the number of points overlying counted kidneys sections,  $\frac{1}{2}$  indicates paired counting and  $Q^2$  the actual number of glomeruli counted.

# Gene expression

Whole kidneys were dissected from E15.5, E17.5, E20.5 males embryos and from 24hours after birth of males pups (P1) and frozen for later extraction of RNA. Total RNA was extracted using RNeasy extraction kits (Qiagen). One microgram of each RNA sample was reverse transcribed in a 30.75  $\mu$ l reaction containing 5  $\mu$ l of 10x Taqman reverse transcriptase buffer, 11  $\mu$ l of 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 10  $\mu$ l of 100  $\mu$ M 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate, 2.5  $\mu$ l of 50 mM random hexamers, 1  $\mu$ l of RNase inhibitor, and 1.25  $\mu$ l of Multiscribe reverse transcriptae. To control for genomic DNA contamination, negative

reactions were prepared, where the 1.25  $\mu$ l of Multiscribe was replaced with sterile water. Reverse transcription reaction were run in a Bio-Rad i-cycler at 25°C for 10 min, 48°C for 30 min, 95°C for 5 min, and then held at 4°C. These samples were stored at -20°C.

Gene expression levels were determined via real-time PCR using an ABI-PRISM 7700 real-time machine. Renin, Angiotensinogen,  $AT1_Ra$ ,  $AT1_Rb$  and AT2cwere analyzed using an Assay-on-Demand from Applied Biosystems.

A comparative cycle of threshold fluorescence ( $C_T$ ) method was used with 18S as an endogenous control. AT1<sub>R</sub>a, AT1<sub>R</sub>b, Renin and Angiotensinogen primer/probe sets were multiplexed with 18S. AT2<sub>R</sub> was run in a separate tube to 18S after optimization experiments revealed the  $C_T$  was altered if run in a multiplex reaction.

# Calculation of Relative Gene Expression

The  $C_T$  value for 18S was subtracted from the  $C_T$  value for the gene of interest to give a  $\Delta C_T$  for each sample. The  $\Delta C_T$  of the calibrator (in this case the mean  $\Delta C_T$  of NP group) was then subtracted from each sample to give a  $\Delta \Delta C_T$  value. This was then inserted into the equation  $2 \cdot \Delta \Delta C_T$  to give a final relative expression relative to the calibrator.

#### Statistics

Values represent means  $\pm$  SEM. Branching morphogenesis and gene expression data were analyzed using unpaired two-tailed Student's *t*-tests. Significance was accepted at  $p \le 0.05$ .

#### Results

# Effect of maternal low protein diet on embryo and fetal weight

Male embryos weight was not different in the early stages (E14.25, E15.5, F17.5 and F20.5), but at post-natal age, NP male pups weight were higher than LP pups.

Although we cannot see significant difference during embryo period, we can observe a gradual increase in the difference of weights between groups (Figure 1).

# Effect of maternal low protein diet on Ureteric Branching Morphogenesis

Using a number of 3 litters per group, metanephroi cultured for 48h appeared smaller in LP group than in NP group. As showed at Figure 2, this observation was confirmed in the quantitative analysis which showed that metanephroi from LP embryos had significantly less ureteric branch points (23% less) and terminal tips (25% less) when compared with metanephroi from NP rats.

# Nephron number estimation

Male embryos form LP group presented less glomeruli than NP group at age of 17.5 (LP 178.2 +/- 5.83 vs NP 232.58 +/- 10.94 p<0.0026) (Figure 3).

# Expression of Angiotesinogen, Renin, $AT1_Ra$ , $AT1_Rb$ and $AT2_R$

Expression of renin, angiotensinogen, and AT1<sub>R</sub>a mRNA was similar in control and LP offspring at E15.5 and E17.5. At F20.5 renin expression was augmented in LP offspring (2.38 ± 0.42 vs. control 1.06 ± 0.16 p<0.01) and is returns to be similar at PN1. Angiotensinogen expression was augmented in LP offspring (3.43 ± 0.64 vs. control 1.20 ± 0.54, p <0.05) at PN1. AT1<sub>R</sub>a was similar during embryo stage but was up-regulated at PN1 (3.06 ± 0.79 vs. control 1.04 ± 0.14, p< 0.05). In LP rats AT1<sub>R</sub>b mRNA was downregulated at F17.5 (0.63 ± 0.1 vs. control 1.08 ±0.15, p<0.05) but augmented after birth. AT2<sub>R</sub> expression was similar between groups, although the LP expression at PN1 is higher, but not significantly. (Figure 4)

# Discussion

The first interesting finding of the current work is that the embryo weight is similar in the first half of gestation (Figure 1); however the pattern of weight increase is different between groups. Although the weights are not statistically different during this gestation period, the LP male pups weight increases slowly than NP pups. By this time, the altered body development pattern observed may explain a disturbed maturation of the organs in this experimental model.

Kidney development is orchestrated by different genes that are important to determine the ureteric bud (UB) invasion of metanephric mesenchyme, the bud branch, the condensation of the mesenchyme cells and many others events that origin this organ. The pattern and the extent of UB branching and elongation are essential for development of a normal kidney and alterations can result in different phenotypes, from renal agenesis to reduced nephron number (24,25). Numerous growth factors have been implicated in the control of this process (26,27,28) as well as several transcription factors and signalling molecules are expressed in specific spatial and temporal patterns (29). RAS plays a critical role in kidney development. The activity of the RAS is high during fetal and neonatal life and declines during postnatal maturation AT1<sub>R</sub> and AT2<sub>R</sub> are abundantly expressed in the nephrogenic area, however their expression in the metanephros differs. While  $AT2_R$  is expressed earlier than  $AT1_R$ , the first one rapidly declines after birth (30,31) and AT1<sub>B</sub> increases during fetal life and declines slowly postnatal (31). AT1<sub>B</sub> can be found in glomeruli, distal and proximal tubules. Angll acting via AT1<sub>R</sub> inhibits Sry1 expression and thereby relieves inhibition if signalling via the GDNF/c-Ret/Wnt11 pathway. AT2<sub>R</sub> is expressed in mesenchymal cells adjacent to the ureteric bud. AT2<sub>R</sub> acts to restrict GDNF expression interiorly and specify correct site of UB outgrowth from the nephric duct. Angiotensinogen and AngII regulate UB morphogenesis acting via the AT2<sub>R</sub>, AngII upregulates Pax2 that stimulates UB branching (11).

Yosipiv (2008) demonstrated that AngII stimulates cell process formation and branching cord extension in UB cells *in vitro* via activation of the AT1<sub>R</sub>. He also showed that exogenous AngII increased the number of UB tips and branch points (11). One mechanism whereby AngII may activate UB branching is the balance between AT1<sub>R</sub> and AT2<sub>R</sub> and with the formation of AT1<sub>R</sub>/AT2<sub>R</sub> heterodimers, AT2<sub>R</sub> directly inhibits AT1<sub>R</sub> (32).

The current study shows clearly that maternal low protein diet during gestational age is enough to reduce de branching points of the "ureteric tree" as to reduce the "tree

end points" (Figure 2). Also our results confirm that nephron number is lower in kidneys from embryos from LP group than control group (Figure 3), what is similar to known low nephron number in this model. As showed at Figure 4, the real-time-PCR results could indicate that RAS do not have any contribution on this way, however we believe that *intra-uteri* factors may act inhibiting RAS compounds mRNA expression during embryo period. The suppressive expression of these supposes factors might be responsible for the up regulation of  $AT1_Ra$ ,  $AT1_Rb$ , Renin and Angiotensinogen mRNA on the first day post-natal. The precise mechanism to explain these phenomenons remains unknown.

Renal cell line had been shown previously to respond to glucocorticoids both morphologically and functionally (33) but in which the metabolic response to these hormones had not yet been investigated. The tissue-specific RAS receptors expression is highly regulated by hormonal mediators. Glucocorticoids (GC) may be responsible for RAS receptors up-regulation. GC plays an important role during intrauterine life and is most likely responsible for intrauterine programming (34). Moritz show that a short period of intrauterine GC increase during early gestation led to increased mRNA levels of angiotensinogen, AT1 and AT2 receptors in the kidneys of near-term fetal sheep (35).

Many remarkable speculations emerged from the present investigation. Firstly we may hypothesize that decreased  $AT1_R/AT2_R$  rate as an early compensatory mechanism to fetal GC high levels down-regulating the AngII Pax2 stimulated response of UB branching. The present study may not rule out the  $AT2_R$  pro-apoptotic action on metanephric mesenchyme causing a low branching points pattern in LP embryos. Previously, Welham et al. (2002) (36) have been showed that low protein embryos were associated with increased apoptosis in E13.0 metanephric mesenchyme. Later, these authors showed that genes associated with apoptosis (pro and anti-apoptotic) are up-regulated at E13.0, however the proportional increase was greater for pro-apoptotic gene Bax *versus* the anti-apoptotic gene Bcl-2, suggesting that low protein diet shifts the balance of expression to the death of metanephric precursor cells (37).

Welham (2005), in stereological study, found similar kidney morphological repercussion in maternal protein undernutrition offspring from day 0 to day 13 of gestation and those submitted to low protein diet during all gestation.

Studies have been shown (38) that offspring of dexamethasone-treated mothers, similarly with fetal GC high levels environment observed in maternal undernutrion model, raised proinflammatory cytokines such as tumor-necrosis factor and interleukin (IL)-1 $\beta$  and these increasing are consistently associated with suppression of 11 $\beta$ -HSD2 expression by these proinflammatory cytokines expression in several sites, including kidney epithelial cells and placenta (39,40). Postnatal pups have presented the programmed increases in renal Na/KATPase- $\alpha$ 1 and ACE mRNA expression, likely to be downstream effects of the restored 11 $\beta$ -HSD2 and an associated fall in local corticosterone. Also, increased cytokines each result in feedback inhibition of renin gene expression by increased cellular reactive oxygen species productions which in turn, act negatively regulating renin gene expression via an NF<sub>48</sub>B-independent mechanism involving the renin enhancer and inhibiting cAMP response element–mediated transcription (38).

The results of the present study may be also related with reduced RAS expression via activation of the peroxisome proliferator activated receptors (PPARs), transcription factors known to influence renal regulation of blood pressure (41). Indeed, isome-proliferator activated receptors  $\alpha$  and g agonists were shown recently to suppress vascular mRNA and protein expression in stretozotocin-induced diabetic rats (42). Additionally, study has been demonstrated that cellular PPARa gene expression was stimulated rapidly and strongly by dexamethasone. This is consistent with a direct effect of glucocorticoids on PPARa gene expression, as previously demonstrated in hepatocytes in which these hormones were shown to act on the PPARa gene at the transcriptional level (43). This suggests strongly that maternal undernutrition or dexamethasone models are able to induce PPARa mRNA receptor expression in the developing kidney during embryo/fetal period.

Our data support the hypothesis that programmed hypertension is mediated, in part, by significant changes in intrarenal renin-angiotensin system components. Disturbances in the renin-angiotensin system (RAS) may also underlie hypertension programmed during fetal life by both nutritional insult and glucocorticoid excess. The current study demonstrated an earlier embryo/fetal renin, angiotensinogen and renal expression of angiotensin II receptors mRNA downregulation, speculatively, as

compensatory mechanism to fetal GC high levels observed in maternal undernutrition model. The novelty of current study corroborates with this findings, once factors that lead to low nephron number, are determined in the early organogenesis, causing the low nephron number before nephrogenesis finishes. The human implication is that the variation in glomerular number that occur between and in healthy and hypertensive populations can be consequence of maternal diet ingested between conceptions at 5-to-6-wk gestation. Further studies are necessary to establish the precise mechanism associated with these biological phenomena.

#### References:

- Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. BMJ 1989, 298: 564–567.
- 2. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. BMJ 1990, 301: 1111.
- Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. Kidney Int Suppl. 2005 (97):S68-77.
- Hoy WE, Rees M, Kile E, Mathews JD, Wang Z. A new dimension to the Barker hypothesis: low birthweight and susceptibility to renal disease. Kidney Int. 1999 Sep;56(3):1072-7.
- McMillen IC, MacLaughlin SM, Muhlhausler BS, Gentili S, Duffield JL, Morrison JL. Developmental origins of adult health and disease: the role of periconceptional and foetal nutrition. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008 Feb;102(2):82-9.
- Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. Life sci. 1999. 64, 965-974

- 7. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal Protein restriction suppresses the newborn Renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. 2001 Pediatr Res 49: 460-467.
- Sahajpal V, Ashton N. Renal function and angiotensin AT1 receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. Clin Sci (Lond). 2003 ;104(6):607-14.
- 9. Zeman FJ. Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young os rats. J. of Nutrition 1968, 94,111-116.
- 10. 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. 2009 (in press)
- 11. Yosypiv IV. A new role for the Renin-angiotensin System in the Development of the Ureteric Bud and Renal Collecting System. Keio J Med 2008, 57(4): 184-189
- 12. Ekblom P. Developmentally regulated conversion of mesenchyme to epithelium. Faseb J., 1989, 3(10): 2141-50.
- 13. Chen Y, Lasaitiene D, Friberg P. The renin-angiotensin system in kidney development. Acta Physiol Scand. 2004 Aug;181(4):529-35
- 14. Schreuder M, van de Waal HD, van Wijk A. Conseuqences of Intrauterine Growth Restriction for the Kidney. Kidney Blood Pressure Research. 2006, 29: 108-125.
- Yosypiv IV, El-Dahr SS. Role of the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. Pediatr Nephrol . 2005 Sep;20(9):1219-29
- Hilgers KF, Norwood VF, Gomez RA. Angiotensin's role in renal development. Semin Nephrol, 1997, 17, 492-501
- Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. Am J Physiol Regul Integr Com Physiol 272: R662-R668, 1997
- 18. Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis, Am J Physiol. 1997, 272- R662-R668

- Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptors antagonists . Pharmacol Rev, 1993, 45 – 205-251
- 20. Lasaitiene D, Chen Y, Adams M, Friberg P. Further insights into the role of angiotensin II in kidney development. Clin Physiol Funct Imaging 2006, 26, 197-204
- Langley-Evans SC, Jackson AA. Captopril normalizes systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diet. Comp. Biochem Physiol A Physiol 1995,110, 223-8
- Sherman RC, Langley-Evans SC. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat . Clin Sci 2000, 98, 269-275
- 23. McMullen S, Langley-Evans SC. Maternal low-protein diet in rat pregnancy programs blood pressure through sex-specific mechanisms. Am j Physiol. 2005. 288. R85-R90
- 24. Shakya R, Watanabe T, Costantini F. The Role of GDNF/Ret Signaling in Ureteric Bud Cell Fate and Branching Morphogenesis. Develop Cell 2005, 8: 65-74
- 25. Cullen-McEwen LA, Drago J, Bertram JF. Nephron endowment glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) heterozygous mice. Kidney Int 2001. 60(1): 31-6
- 26. Vainio S, Lin Y. Coordinating early kidney development: lessons from gene targeting. Nat Rev Genet 2002, 3(7): 533-43
- 27. Shah MM, Sampogna RV, Sakurai H, Bush KT, Nigam SK. Branching morphogenesis and kidney disease. Development 2004. 131(7) 1449-62.
- 28. Davies JA. Morphogenesis of the metanephric kidney. Scientific World Journal 2002. Jun 28:2: 1937-50.
- 29. Constantini F. Renal branching morphogenesis: concepts, questions, and recent advances. Differentiation 2006, 74(7) 402-21
- Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BL, Fogo A, Inagami T, et al. Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. Kidney Int 1995, 47: 140-147.
- Garcia-Villalba P, Denkers ND, Wittwer CT, Hoff C, Nelson RD, Mauch TJ. Real-time PCR quantification of AT1 and AT2 angiotensin receptor mRNA expression in the developing rat kidney. Exp Nephrol 2003: 94(4), 154-159

- 32. Yosypiv IV. Renin-angiotensin system-growth factor cross-talk: a novel mechanism for ureteric bud morphogenesis. Pediatr Nephrol 2009: 24(6), 1113-20.
- Djouuadi F, Bastin J. PPARa Gene expression in the developing rat kidney: role of glucocorticoids. J Am Soc Nephrol 12: 1197–1203, 2001
- 34. Fowden AL, Forhead AJ. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. Reproduction. 2004 May;127(5):515-26.
- 35. Moritz KM, Johnson K, Douglas-Denton R, Wintour EM, Dodic M. Maternal glucocorticoid treatment programs alterations in the renin-angiotensin system of the ovine fetal kidney. Endocrinology. 2002 Nov;143(11):4455-63.
- Welham SJ, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. Kidney Int. 2002 61(4):1231-42
- 37. Welham SJ, Riley PR, Wade A, Hubank M, Woolf AS. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. Physiol Genomics 2005, 22(1): 48-56
- Wyrwoll CS, Mark PJ, Waddell BJ. Developmental programming of renal glucocorticoid sensitivity and the renin-angiotensin system. Hypertension. 2007 Sep;50(3):579-84. Epub 2007 Jul 30.
- 39. Heiniger CD, Rochat MK, Frey FJ, Frey BM.TNF-alpha enhances intracellular glucocorticoid availability. FEBS Lett. 2001 Nov 2;507(3):351-6.
- 40. Chisaka H, Johnstone JF, Premyslova M, Manduch Z, Challis JR. Effect of proinflammatory cytokines on expression and activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cultured human term placental trophoblast and human choriocarcinoma JEG-3 cells. J Soc Gynecol Investig. 2005 Jul;12(5):303-9.
- 41. Dobrian AD The complex role of PPARgamma in renal dysfunction in obesity: managing a Janus-faced receptor. Vascul Pharmacol. 2006 Jul;45(1):36-45. Epub 2006 May 22. Review.

- 42. Toba H, Miki S, Shimizu T, Yoshimura A, Inoue R, Sawai N, et al. The direct antioxidative and anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptors ligands are associated with the inhibition of angiotensin converting enzyme expression in streptozotocin-induced diabetic rat aorta. Eur J Pharmacol. 2006 Nov 7;549(1-3):124-32. Epub 2006 Aug 30.
- Lemberger T, Staels B, Saladin R, Desvergne B, Auwerx J, Wahli W. Regulation of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene by glucocorticoids. J Biol Chem. 1994 Oct 7;269(40):24527-30.



Figure 1: Figure shows litter mean weight at E14.25, E15.5, E17.5, E20.5 and P1.



Figure 2: A: images from metanephroi cultured for 48h. B: Branching number. C:

Terminal tips. Symbols mean each metanephroi.



Figure 3: Number of glomeruli per kidney (mean  $\pm$  SEM) \* p<0.05.



Figure 4: RT-PCR results from each age. X axes indicate kidney age. Full bars indicate NP group and white bars indicate LP group. Bars show mean ± SEM. \*P< 0.05

# Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life

Flávia F. Mesquita, José A. R. Gontijo and Patrícia A. Boer.

(submetido)

# Acknowledgment

The authors are grateful to Fapesp (Process 05/54362-4), Capes and CNPq

**Key Words:** Glucocorticoids exposure, renin angiotensin system (RAS), fetal programming, maternal low protein diet, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, nephron number

#### ABSTRACT

Maternal dietary protein restriction during pregnancy is associated with fetal low birth weight and is recognized to lead to renal morphological and physiological alterations. Several studies have suggested different mechanisms that can contribute to this phenotype: Fetal glucocorticoids exposure, alterations on renin angiotensin system (RAS) compounds, apoptosis and DNA methylation. Low protein diet during gestation decreases the activity of placental 11B-HSD (11B-hydroxysteroid dehydrogenase), exposing the fetus to glucocorticoids, resetting the hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in the offspring. Angiotensin II (AngII) participates in renal development and the abnormal function/expression of type 1(AT1<sub>R</sub>) or type 2 (AT2<sub>R</sub>) AnglI receptors and their pathway in any period of life may be consequence or cause of renal adaptation. AT1<sub>B</sub> is up-regulated, when compared with control, in the first day after birth of offspring born from maternal low protein diet, but this protein appeared down-regulated at 12 day-old and after. In this offspring, the AT2<sub>R</sub> expression is different from control at 1-day-old, but is also downregulated after this age. This offspring presents low nephron number in all ages, since the fetal period, in the end of nephron formation and in the adult age, however in the adult age, glomerular filtration rate is not altered due to glomeruli and podocyte hypertrophy. Kidney tubules transporters are regulated by physiological mechanisms. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase is inhibited by AngII II and in this model, the down-regulated AngII II receptors fail to inhibit Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase leading to an increased Na<sup>+</sup> reabsorption, contributing to hypertensive status. We also considered the modulation of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors during nephrogenesis in this model, once the organogenesis depends of a tiny balance of proliferation, differentiation and cell death.

#### INTRODUCTION

The role of the kidney in the pathogenesis of hypertension has long been established, although recent studies challenge renal hegemony and suggest an important role for vascular cells as well (1,2). In recent years, the formulation has expanded and now includes the concept that chronic hypertension and kidney dysfunction are also related to events that occur during the prenatal period. This relation between fetal programming of disease and kidney shows several mechanisms through an impaired nephrogenesis can predispose to hypertension on adulthood. A recent overview considered the role of fetal programming in the development of adult kidney disease and hypertension (3). The purpose of this review is to describe some of these mechanisms that can affect the kidney with a special focus on renin-angiotensin system. The kidney is an organ centrally related to the development of hypertension, through its function of renal sodium handling and intravascular fluid volume homeostasis. The fact is that in cross transplants, if the donor is hypertensive, the recipient becomes hypertensive too, once factors intrinsic to the kidney itself affect blood pressure (4, 5). In 1968, Zeman first reported that rat offspring of mothers that were severely protein-restricted (6% casein-diet) throughout pregnancy had kidneys that contained fewer glomeruli than offspring of mothers on a normal diet (24% casein) (6). Nephrogenesis requires a fine balance of many factors that can be disturbed by intrauterine growth restriction, leading to a low nephron endowment (7).

The aim of this review is also to present further evidence to support an association between maternal low-protein ingestion and the increased prevalence of hypertension as well as progression toward kidney dysfunction in adult life. Various potential mechanisms for this association are discussed, specifically the low nephron number hypothesis and related cellular and molecular mechanisms that have been proposed. Some factors involved in nephrogenesis like glucocorticoids exposure, regulation of renin angiotensin system (RAS) compounds, apoptosis and, p53 gene methylation have been investigated in different low birth weight models, and they will be explain in this review.

#### MATERNAL-FETAL ENVIRONMENT AND ADULT DISEASE

The size that the fetus can attain depends on the maternal-fetal nutrient supply and the space that the maternal environment can provide (8). Low maternal socioeconomic and poor maternal nutritional status will reduce nutrient supply to the developing fetus. Similarly, factors that frustrate the passage of nutrients through the placenta, such as smoking and hypertension, are associated with increased risk for development of the fetal origins of adult diseases. Nearly two decades ago, Barker (1990) presented a theory of the maternal environment inducing adult diseases based on observed epidemiologic associations between low birth weight (LBW) and increased risk for ischemic heart disease (9), type 2 diabetes, and hypertension (10,11). The first associations found were between LBW and later life hypertension and cardiovascular disease (10, 12, 13). High blood pressure (BP) was found to occur at a higher incidence in children and adults who were of LBW (13). A systematic review of 80 studies that described the relationship of BP with birth weight reported that systolic BP was lower by approximately 2 mmHg for every 1-kg increase in birth weight (14). Among Pima Indians, patients who had diabetes and a history of maternal undernutrition also displayed an increased risk for developing diabetic nephropathy (15). Moreover, poor maternal nutrition was associated with more rapid progression of other kidney diseases, such as IgA nephropathy, membranous nephropathy, and minimal-change disease, suggesting that the kidneys of these infants are more vulnerable to future insults (16,17). Nevertheless, the strength of association between maternal-fetal environment and subsequent hypertension remains widely debated. Moreover, others claim that the suggested association is the result of inappropriate adjustments for confounding factors (18,19). For example, Huxley et al. (2002) found a trend toward a weaker association between low birth weight and hypertension in larger compared with smaller studies (18). However, it seems that although the relation is not invariant, the totality of evidence does suggest an important direct or indirect interaction between birth weight and subsequent hypertension (20). These observations have led to the formulation of an important conceptual construct that pertains to the fetal origins of adult disease. This theory states that during development, body organs pass through a period of plasticity and sensitivity to the environment, which leaves a durable imprint that, affects sub sequent health. Suboptimal intrauterine conditions may result in impaired fetal growth and the production of phenotypes that are
better matched to the inadequate intrauterine environment. These adaptive processes are aimed to increase the likelihood of survival *in utero* and after birth, with expected continuation of borderline or inadequate environmental conditions. However, this response may result in adverse long-term consequences later in life, especially when the postnatal environment affords more favorable growth conditions to those that were experienced *in utero*. One of the most studied aspects with regard to Barker's theory has been the fetal origins of adult diabetes. Numerous reports have demonstrated an association between poor maternal nutritional status and subsequent development of pancreatic endocrine insufficiency and diabetes in experimental animals and humans (21-24). However, a detailed consideration of the relationship between maternal low protein ingestion and diabetes is beyond the scope of this review.

#### GLUCOCORTICOIDS EXPOSURE IN UTERU

In 1993, Benediktsson showed that rats exposed to excess glucocorticoid in utero developed adult hypertension (25). Since that, the early exposure of the fetus to glucocorticoid has been used like a model of fetal programming in different species (26-28). Fetal protection of maternal glucocorticoid is normally effected by placental 11B-hydroxysteroid dehydrogenates type 2 (11B-HSD2), which converts cortisol and corticosterone to inactive products (cortisone, 11-dehydrocorticosterone). The activity of 11B-HSD2 correlates positively with birth weight and negatively with placental weight in rats (25), suggesting an important role for this enzyme in regulating fetal growth and development.

Glucocorticoids are widely used in the management of women at risk of preterm delivery to accelerate pulmonary maturation. Antenatal glucocorticoids are associated with a reduction in birth weight in human studies (29). Preterm children treated postnatally with glucocorticoid display elevated blood pressure at an early age (30).

Dexamethasone (DEX) is a synthetic glucocorticoid non-metabolized by 11B-HSD2 that readily crosses the placental barrier and has been used to study the effects of the fetal glucocorticoid exposure. Other model that mimics the effects of maternal low protein diet is the treatment during the pregnancy with carbenoxolone, an 11B-HSD2 inhibitor (31).

Feeding a maternal low protein diet to pregnant rat dams reduces the activity of placental 11B-HSD2 by 33%, programming hypertension in the adult offspring (32). A major

consequence of maternal protein restriction appears to be a resetting of hypothalamicpituitary-adrenal axis function in the offspring (27). Gestational low-protein exposed rats exhibit increased sensitivity to low-normal concentrations of corticosterone and have increased numbers of glucocorticoids receptors in adrenals. In an elegant study with adrenalectomized rats, Gardner demonstrated that in a model of maternal low protein diet, the adrenalectomy reduces the high blood pressure when compared with control animals. Corticosterone replacement restores the high blood pressure of these rats, an indicative of a glucocorticoid dependent phenomenon (33). When cortisol was administrated in pregnant sheep, the offspring show similar changes in expression of the AT1R from controls, what suggested that alterations in the renal RAS may be a mechanism by which early prenatal glucocorticoid exposure causes fetal programming (34).

The hypertension programmed by glucocorticoid is linked with pathological changes in kidneys such as increased sodium transport, alterations in renin-angiotensin system and low nephron number.

Studies with DEX revealed that the severity of these phenotypes is dependent on the timing and duration of glucocorticoid exposure (35). The critical "window" of development that kidneys are more susceptible to DEX exposure is the very early stage of renal development, when the ureteric bud invade the metanephric mesenchyme and begin to branch (36). Singh et al. demonstrated that rat metanephric DEX exposure in vitro for 2 days, in the early nephrogenesis, inhibits ureteric branching morphogenesis and nephrogenesis, suggesting that a reduction in ureteric branching morphogenesis may be a key mechanism through which DEX reduces nephron endowment (35).

Another study shows that prenatal DEX is associated with an increase in Na+/H+ exchanger activity in proximal tubules as well as brush-border membrane NHE3 protein (37). Furthermore, a recent study demonstrated that in offspring exposed in uteri to DEX, renal denervation at 6 wks of age resulted in a decrease in NHE3, NKCC2 and NCC protein abundance to the level in vehicle-treated sham rats (38).

## **RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM**

The role of the renin-angiotensin system in the control of blood pressure and homeostasis balance is well recognized. Few years ago it was accepted its role in kidney development, it is, its role in vasculogenesis, branching morphogenesis and development of hypertension in the adult as a result of a reduction in nephron number during nephrogenesis (7,39,40). The kidney exhibits both spatial and temporal developmental regulation of angiotensin receptors (41).

All the components of the RAS are expressed in the embryonic kidney and in rats the expression can be detected from 12 to 17 days of gestation, being higher in fetuses and newborn rats than in adult rats (39,42).

Findings have shown that pharmacological or genetic alterations in the RAS on kidney development induce gross abnormalities such as hypoplastic papilla. Treatment of rats during active nephrogenesis with AT1 antagonist or angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor leads to decreased nephron number (43), delayed nephron maturation and an altered renal water handling (44,45). Findings in human fetal kidneys from mothers that received AT1 antagonist during gestation show poorly developed tubules, reduced number of proximal tubules, poorly developed *vasa recta* and hyperplasic juxtaglomerular apparatus (46).

Many studies have shown that perturbed maternal nutritional status alters renal renin protein and mRNA levels, as well as the renal angiotensin II concentration (47) and changes renal expression of AngII receptors and MAPK in the pups (48) that result in higher blood pressure and structural changes in the kidney of adult offspring. RAS conflicting results among the groups are explained by different levels of protein in the diet, different period of treatment during the gestation, different rat strain and mainly by the different methods adopted, like, whole kidney western blot, cortex western blot, whole kidney RT-PCR.

Specific studies with maternal protein restriction during gestation have shown different modulations of RAS components. Sahajpal & Ashton, 2003, showed that offspring of mothers that received low protein diet during all gestational period presented at 4 weeks of age, fewer glomeruli per g kidney weight and the  $AT1_R$  protein level was 24% greater in low protein pups when compared with normal protein (49). In another study, the same group showed that  $AT1_R$  and  $AT2_R$  was greater in cortex (62% and 35% respectively) in low protein pups at 4 weeks of age and renal renin activity and tissue AngII II concentrations were not lower in these animals (50). Vehaskari et al. 2004 compared the levels of RAS protein and mRNA at 1 day and 28 days of age and found that at 1 day,  $AT1_R$  and  $AT2_R$  proteins are decreased, but  $AT2_R$  mRNA is increased. The same variation

found by Sahajpal & Ashton was verified at 28 days, when  $AT1_R$  and  $AT2_R$  proteins are increased, but  $AT1_R$ b and  $AT2_R$  mRNA are not different suggesting that the ontogeny of the intrarenal RAS is altered throughout the perinatal and early postnatal period (51).

Our group found recently that AT2<sub>R</sub> protein is down regulated in kidneys of 16 wks old rats born from female that received low protein diet (9%) during all gestation. These animals have total absence of AT2<sub>R</sub> in glomeruli and this receptor was localized preferentially associated with intercalated cells of distal and collecting segments. AT1<sub>R</sub> and its JAK-2/ SOCS3 pathway proteins are also down regulated in these experimental animals at western blot and immunohistochemistry. (52). We also found that podocytes appear bigger and crushed in LP rats (Figure 1) suggesting that changes in renal functions are conducive to excess hydro electrolyte kidney re-absorption, and this way might play a role which potentiates the appearing of programming of adult hypertension. These morphological changes could be attributed to an adaptation for reduced nephron number and, consequently glomerular hyper filtration and overflow in LP offspring, and could account for the breakdown of optimal glomerular filtration barrier functioning.

In another study, we found that 12 days-old animals whole kidneys were prepared for western blot and revealed that  $AT1_R$  and  $AT2_R$  are down regulated in gestational low protein exposure animals (Figure 2) and the same offspring presents a low nephron number when compared with offspring of mums that received normal diet during gestation (Table 1). The findings of fewer glomeruli are a confirmation of other groups that have been noted this in different ages and models (53-56).

In figure 3 we can have an overview of our results about kidney offspring status during fetal period, post-natal and adult life after a maternal protein restriction during gestation, taking in account the RAS, nephron number and renal function. The draft shows results from different experiments where dams were fed with 6% casein diet and compared with dams fed with 17% casein diet (normoproteic). We can see that in spite a reduced nephron number since the fetal period, the LP offspring in adult age has a glomerular filtration rate (GFR) similar to that observed in NP, what can be explained by the bigger filtration area and bigger glomerular tuft volume in parallel to a podocyte hypertrophy. Another factor that can contribute to the similar GFR is that AT2<sub>R</sub> is down regulated in efferent arteriole what leads to a vasoconstriction, making higher the interglomerular pressure.

The hypothesis that fetal kidney is programmed to inappropriately retain Na in later life has been corroborated by different studies (57,58). Alwasel et al, 2009 studied renal function and Na transporters in 4-weeks-old males rats born from maternal low protein diet and found, confirming our study that GFR is unaltered, suggesting that SNGFR (single nephron GFR) should be increased. Also they show that Na transporters protein is unaltered, however Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase  $\alpha$ 1 subunit is absent in kidney of LP rats (59). Interestingly, in a Western blot study we found that at the end of nephrogenesis, the subunit  $\beta 1$  of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase protein is also down-regulated in males LP rats, but at 16 weeks-old the protein is increased in these animals when compared with normal group (Figure 4). AnglI  $AT2_{B}$  is an effective inhibitor of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase (60) and a down-regulated RAS found in LP 16weeks-old males (52) might lead to a lack of inhibition of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, explain results found by Western Blot, and the low sodium excretion rate once Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase participates on Na reabsorption in basolateral membrane (Figure 4). The RAS balance is disrupted in LP kidneys during different ages, and angiotensin II receptors are expressed in all segments of nephron, contributing to the higher sodium re-absorption on proximal tubules that is mainly in the final sodium excretion rate.

Our low urinary sodium excretion data also may be explained by previous findings showing that fetal glucocorticoid excess such as observed in maternal undernutrion status programs reduced expression of placental, central nervous system and renal 11B-HSD2 (see section above). As discussed above, the renal 11B-HSD2 normally serves to prevent illicit access of glucocorticoids to the renal mineralocorticoid receptors (MR), thereby maintaining MR specificity for aldosterone, and, accordingly, humans with a deficiency in 11B-HSD2 exhibit hypertension (61). A programmed reduction in renal 11B-HSD2 would be expected to increase the ability of glucocorticoids to activate, in wide spread tissues, both glucocorticoid receptors (GR) and MR, resulting in increased transcription of both and a consequent increase in blood pressure. This increase in glucocorticoid sensitivity may be exacerbated by overactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, because several previous studies show that prenatal glucocorticoids elevate adult plasma corticosterone (63), apparently driven by increased hypothalamic corticotrophin releasing hormone expression (64). Consistent with the proposal that increased renal glucocorticoid sensitivity underlies programmed hypertension, expression of the renal glucocorticoid-responsive genes Na/K ATPase- $\alpha$ 1, or as showed in the present and others studies Na/K ATPase- $\beta$ 1

subunit, ACE, and renin were all elevated in 16-wk-old offspring of low-protein-treated mothers. These programmed changes would be expected to increase renal sodium retention and thereby elevate plasma volume and, thus, blood pressure. A similar mechanism seems to underlie hypertension in a rat maternal low-protein programming model in which adult offspring have higher renal expression of both Na/K ATPase-  $\beta$  1 and/or also - $\alpha$ 1 (58), results did not confirmed by our present data at 16-wk-old offspring.

We may not rule out other possible mechanisms involve the inappropriate retention of sodium. The maternal protein restriction model for IUGR in rats resulted in upregulation of two critical Na transporters. The Na-K-2CI and the Na-CI co-transporters but neither the Na/H nor the Na channel was significantly increased in the rats with IUGR (57). These alterations lead to a lower rate of urinary sodium excretion with attendant sodium retention and hypertension.

# APOPTOSIS

Nephrogenesis is a complex process that integrates cell integration, cell growth and apoptosis. The rapid remodeling of structures requires massive apoptosis. Bcl-2 is an anti-apoptosis protein that attenuates the effect of cytochrome *c* release from the mitochondria and counters the effects of the pro-apoptosis protein Bax. Bcl-2 and Bax contribute to the signaling pathways that activate caspase-3 (casp-3), which is necessary for the chromatin condensation and DNA fragmentation that characterize apoptosis. (65)

Bax and Bcl-2 are known to be expressed in normal kidney development, and their expression is known to be deregulated in certain conditions associated with perturbed nephrogenesis and apoptosis. (66,67).

Using real-time PCR of E13.0 metanephroi, Welham et al, 2005 observed a step-wise increase in the expression of both genes in low protein group. The proportional increase was greater for the pro-apoptotic gene Bax versus the anti-apoptotic gene Bcl-2, perhaps suggesting that low protein diet shifts the balance of expression to up regulate the death of metanephric precursor cells (68). In a prior study, the same group showed that low protein diets reduce final numbers of glomeruli in association with increased deletion of precursors

at the start of metanephric development and presented a significant increase in the numbers of apoptotic nuclei per unit area at E13, almost totally restricted to renal mesenchyme (66).

In a model of uteroplacental insufficiency and the subsequent intrauterine growth retardation (IUGR), a study observed renal p53 hypomethylation in association with increased p53 and Bax mRNA, as well as decreased Bcl-2 mRNA, which leads to increased casp-3 activity (65).

Alterations in DNA methylation and histone acetylation in IUGR rats (69) suggest a molecular mechanism through which low protein diet and IUGR induces fetal renal apoptosis and a resultant permanent loss in glomeruli. It would be interesting to know how maternal environment alters methylation status and transcriptional rate of genes such Bcl-2 and Bax.

Our group recent findings showed that metanephoi extracted from undernourished rats and grown in culture for 48h has fewer ureteric branches when compared with normal metanephric development in culture (*data not published*).

## PERSPECTIVES AND CONCLUSION

In conclusion, there is an increasing amount of evidence from human and experimental animal models that demonstrates that perturbations of the intrauterine environment is one of the main causes of the morphological and physiological changes that occur in the different organs, after under nutrition in uteru. In this brief review we have concentrated on one organ, the kidney, and shown that adult hypertension programmed by maternal low-protein diet treatment is linked to marked changes in renal expression of the GR, 11B-HSD2, and components of the RAS. The kidney function depends of hormonal cascade, physiological mechanisms and morphological patterns working synchronized and any attempt of adaptations can cost a disease developing in the adult life. We also describe that renal development, particularly nephron number, can be influenced by a number of environmental factors, and especially by an exposure to low diet protein during critical periods, which are shown to be surprisingly early. It is suggested, but remains to be

proven, that whenever nephron number is suboptimal, there are maladaptive adjustments to gene expression and kidney function long-term that may lead to the development of cardiovascular disease. It is unlikely that renal malfunction alone is responsible for the development of hypertension. We suggest that central (brain) regulation of blood pressure may also be altered. This is an important area for future investigation.

# REFERENCES

- 1. Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ et al. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin angiotensin system. J Clin Invest 2005, 115: 1092–1099.
- 2. Mendelsohn ME. In hypertension, the kidney is not always the heart of the matter. J Clin Invest 2005, 115: 840–844.
- 3. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: The role of fetal programming. Hypertension 2006, 47: 502–508.
- 4. Rettig R, Folberth C, Stauss H, Kopf D, Waldherr R, Unger T. Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. Am J Physiol, 1990, 258: F606-F611.
- 5. Guidi E, Menghetti D, Milani S, Montangnino G, Palazzi P, Bianchi G, Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidneys coming from donors with or without hypertension in their families. J Am Soc Nephrol, 1996, 7: 1131-1138.
- 6. Zeman FJ. Effects of maternal protein restriction on the kidney of the newborn young os rats. J. of Nutrition 1968, 94,111-116.
- 7. Schreuder M, van de Waal HD, van Wijk A. Conseuqences of Intrauterine Growth Restriction for the Kidney. Kidney Blood Pressure Research. 2006, 29: 108-125.
- 8. McCance RA. Food, growth, and time. Lancet 1962, 2: 671–676.
- 9. Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. BMJ 1990, 301: 1111.
- 10. Barker DJ, Osmond C. Low birth weight and hypertension. BMJ 1988, 297: 134-135.

- 11. Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet 1989 2: 577–580.
- Wadsworth ME, Cripps HA, Midwinter RE, Colley JR. Blood pressure in a national birth cohort at the age of 36 related to social and familial factors, smoking, and body mass. BMJ (Clin Res Ed) 1985, 291: 1534–1538.
- Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. BMJ 1989, 298: 564–567.
- Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: A systematic review of the literature. J Hypertens 2000, 18: 815–831.
- 15. Nelson RG, Morgenstern H, Bennett PH. Birth weight and renal disease in Pima Indians with type 2 diabetes mellitus. Am J Epidemiol 1998, 148: 650–656.
- 16. Zidar N, Avgustin Cavic M, Kenda RB, Ferluga D. Unfavorable course of minimal change nephrotic syndrome in children with intrauterine growth retardation. Kidney Int 1998, 54: 1320–1323.
- 17. Zidar N, Cavic MA, Kenda RB, Koselj M, Ferluga D.Effect of intrauterine growth retardation on the clinical course and prognosis of IgA glomerulonephritis in children. Nephron 1998, 79: 28–32.
- Huxley R, Neil A, Collins R. Unravelling the fetal origins hypothesis: Is there really an inverse association between birthweight and subsequent blood pressure? Lancet 2002, 360: 659–665.
- 19. Tu YK, West R, Ellison GT, Gilthorpe MS. Why evidence for the fetal origins of adult disease might be a statistical artifact: The "reversal paradox" for the relation between birth weight and blood pressure in later life. Am J Epidemiol 2005, 161: 27–32.
- 20. Barker DJ, Bagby SP. Developmental antecedents of cardiovascular disease: A historical perspective. J Am Soc Nephrol 2005, 16: 2537–2544.

- 21. Curhan GC, Willett WC, Rimm EB, Spiegelman D, Ascherio AL, Stampfer MJ. Birth weight and adult hypertension, diabetes mellitus, and obesity in US men. Circulation 1996, 94:3246–3250.
- 22. Dahri S, Reusens B, Remacle C, Hoet JJ. Nutritional influences on pancreatic development and potential links with non-insulin-dependent diabetes. Proc Nutr Soc 1995, 54: 345–356.
- Lithell HO, McKeigue PM, Berglund L, Mohsen R, Lithell UB, Leon DA. Relation of size at birth to non-insulin dependent diabetes and insulin concentrations in men aged 50–60 years. BMJ 1996, 312: 406–410.
- 24. Whincup PH, Cook DG, Adshead F, Taylor SJ, Walker M, Papacosta O, et al. Childhood size is more strongly related than size at birth to glucose and insulin levels in 10–11-year-old children. Diabetologia 1997, 40: 319–326.
- 25. Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: a new model for adult hypertension. Lancet 1993, 341: 339-341.
- 26. Dodic M, May CN, Wintour EM, Coghlan JP. An early prenatal exposure to excess glucocorticoid leads to hypertensive offspring in sheep. Clin Sci 1998, 94: 149-155.
- 27. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. Endocrinol, 2001, 142:1692-1702.
- Holmes MC, Abrahamsen CT, French KL, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR. The mother or the fetus? 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticois. J Neurosci, 2006, 26(14): 3840-3844.
- 29. Bloom SL, Sheffield JS, McIntire DD, Leveno KJ. Antenatal dexamethasone and decreased birth weight. Obstetrics and Gynecology 2001, 97: 485-490.
- 30. Kari MA, Hallman M, Eronen M, Teramo K, Virtanen M, Koivisto M ET al.. Prenatal dexamethasone treatment in conjunction with rescue therapy of human surfactant: a randomized placebo-controlled multicenter study. Pediatrics. 1994, 93: 730-736.

- Lindsay RS, Lindsay RM, Edwards CR and Seckl JR. Inhibition of 11B-hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rats abd the programming of blood pressure in offspring. Hypert 1996, 27: 1200-1204.
- 32. Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, et al.. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. Placenta 1996, 17: 169-172.
- Gardner DS, Jackson AA, Langley-Evans SC. Maintence of maternal diet-enduced hypertension in the rat is dependent on glucocorticoids. Hypertension 1997, 30: 1525-1530.
- 34. Moritz KM, Johnson K, Douglas-Denton R, Wintour EM, Dodic M. Maternal glucocorticoid treatment programs alterations in the rennin-angiotensin system of the ovine fetal kidney. Endocrinol 2005, 143(11): 4455-4463.
- 35. Singh RR, Moritz KM, Bertram JF, Cullen-McEwen L. Effects of dexamethasone exposure on rat metanephric development: in vitro abd in vivo studies. Am J Physil Renal Physiol 2007, 293: F548-F554.
- Wintour EM, Alcorn D, Butkus A, Congiu M, Earnest L, Pompolo S et al. Ontogeny of normal and excretory function of the meso- and metanephros in the ovine fetus. Kidney Int. 1996, 50:1624-1633.
- Dagan A, Gattineni J, Cook V, Baum M. Prenatal programming of rat proximal tubule Na+/H+ exchanger by dexamethasone. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007 292(3):R1230-5.
- Dagan A, Kwon HM, Dwarakanath V, Baum M. Effect of renal denervation on prenatal programming of hypertension and renal tubular transporter abundance. Am J Physiol Renal Physiol. 2008 295(1):F29-34.
- Yosypiv IV, El-Dahr SS. Role of the renin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. Pediatr Nephrol . 2005 Sep;20(9):1219-29
- 40. Chen Y, Lasaitiene D, Friberg P. The renin-angiotensin system in kidney development. Acta Physiol Scand. 2004 Aug;181(4):529-35

- Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. Am J Physiol Regul Integr Com Physiol 1997, 272: R662-R668
- 42. Gomez RA, Norwood VF. Developmental consequences of the renin-angiotensin system. Am J Kidney Dis. 1995 26(3):409-31.
- 43. Woods II, Rasch R. perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number and renal function in rats. Am J Physiol 1998 275:R1593-R1599
- Akil I, Inan S, Gurcu B, Nazikoglu A, Ozbilgin K, Muftuoglu S Histopathological and ultrastructural effects of Losartan on embryonic rat kidney. Acta Histochem. 2005, 107(4):291-300.
- 45. Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, Bobik A, Nilsson H, Wickman A et al. Reninangiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. Kidney Int. 1994, 45(2): 485-92.
- Daïkha-Dahmane F, Levy-Beff E, Jugie M, Lenclen R. Foetal kidney maldevelopment in maternal use of angiotensin II type I receptor antagonists. Pediatr Nephrol. 2006 21(5):729-32.
- 47. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch Maternal Protein restriction suppresses the newborn Renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. Pediatr Res 2001, 49: 460-467.
- 48. Balbi AP, Francescato HD, Marin EC, Costa RS, Coimbra TM. Roles of mitogenactivated protein kinases and angiotensin II in renal development. Braz J Med Biol Res. 2009;42(1):38-43.
- Sahajpal V, Ashton N. Renal function and angiotensin AT1 receptor expression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. Clin Sci (Lond). 2003;104(6):607-14.
- 50. Sahajpal V, Ashton N. Increased glomerular angiotensin II binding in rats exposed to a maternal low protein diet in utero. J Physiol. 2005 15;563(Pt 1):193-201

- Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D, Soyez C, Seth D, Manning J. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. Am J Physiol Renal Physiol. 2004 287(2):F262-7.
- 52. 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. 2009 (in press)
- 53. Hoppe CC, Evans RG, Bertram JF, Moritz KM. Effects of dietary protein restriction on nephron number in the mouse. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007 292(5):R1768-74.
- 54. Kriz W, LeHir M. Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. Kidney Int. 2005 67(2):404-19.
- 55. Rostand SG. Oligonephronia, primary hypertension and renal disease: 'is the child father to the man?' Nephrol Dial Transplant. 2003 18(8):1434-8.
- 56. Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. Kidney Int Suppl. 2005 (97):S68-77.
- 57. Manning J, Beutler K, Knepper MA, Vehaskari VM. Upregulation of renal BSC1 and TSC in prenatally programmed hypertension. Am J Physiol Renal Physiol 2002, 283: F202–F206,
- Bertram C, Trowern AR, Copin N, Jackson AA, Whorwood CB. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11B-hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. Endocrinology. 2001;142:2841–2853.
- 59. Alwasel SH, Ashton N. Prenatal programming of renal sodium handling in the rat. Clin Sci (Lond). 2009 15;117(2):75-84.
- De Souza AM, Lopes AG, Pizzino CP, Fossari RN, Miguel NC, Cardozo FP ET AL. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) inhibit the inner córtex Na<sup>+</sup> ATPase activity through AT2 receptor. Regul Pept. 2004, 120(1-3): 167-75.

- 61. Draper N, Stewart PM. 11\_-hydroxysteroid dehydrogenase and the prereceptor regulation of corticosteroid hormone action. J Endocrinol. 2005; 186:251–271.
- 62. Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. 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.
- O'Regan D, Kenyon CJ, Seckl JR, Holmes MC. Glucocorticoid exposure in late gestation in the rat permanently programs gender-specific differences in adult cardiovascular and metabolic physiology. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2004;287:E863–E870.
- 64. Shoener JA, Baig R, Page KC. Prenatal exposure to dexamethasone alters hippocampal drive on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in adult male rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2006;290: R1366–R1373.
- 65. Pham TD, MacLennan NK, Chiu CT, Laksana GS, Hsu JL, Lane RH. Uteroplacental insufficiency increases apoptosis and alters p53 gene methylation in the full-term IUGR rat kidney. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003, 285(5), 962-970.
- 66. Welham SJ, Wade A, Woolf AS. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. Kidney Int. 2002 61(4):1231-42
- 67. Liapis H, Yu H, Steinhardt GF. Cell proliferation, apoptosis, Bcl-2 and Bax expression in obstructed opossum early metanephroi. J Urol. 2000, 164(2) 511-517.
- 68. Welham SJ, Riley PR, Wade A, Hubank M, Woolf AS. Maternal diet programs embryonic kidney gene expression. Physiol Genomics 2005, 22(1): 48-56
- 69. MacLennan NK, James SJ, Melnyk S, Piroozi A, Jernigan S, Hsu JL, et al. Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-caborn metabolism, and histone acetylation in IUGR rats. Physiol Genomics 2004, 18(1): 43-50.



Fig 1: A: Glomeruli from NP rat. B: glomeruli from LP rat. Arrowhead shows podocyte. See the size



Figure 2 . Effects of maternal protein restriction on expression of kidney RAS associated proteins at 12 days old age. This figure shows the results obtained in whole-tissue extracts that were immunoblotted for AT1<sub>R</sub> and AT2<sub>R</sub>, for these proteins content verification in the NP and LP kidneys. The results of scanning densitometry were expressed as relative to NP, assigning a value of 100% to the control rats. Columns and bars represent the mean  $\pm$  SEM \*P<0.05, NP vs. LP.

Table 1: Rat weight, number of glomeruli, cortical volume and mean glomerular volume in NP and LP offspring at 12 days of age which mums were fed respectively with a normal diet and a low protein diet. The data are reported as the means. \*  $P \le 0.05 \ vs.$  LP (Student's *t* test).

	Rat weight (g)	No. of Glomeruli	Cortical Volume (μm <sup>3</sup> )	Mean Glomerular Volume (µm³)
NP mean	26.96	9382	25.628.656	160.68
SEM	(0.7824176)	(1171.674)	(637857.9)	(16.66182)
LP mean	25.80	4980	31.456.523	414.71
(SEM)	(0.8752729)	(880.1385)	(2606606)	(34.91641)
P (Student t test)	NS	0.03	NS	0.004



Figure 3: Schematic figure shows an overview of the interaction of RAS and kidney from fetal period until adult life. Ages are specified over the line.



Figure 4: Effects of maternal protein restriction on expression of kidney at 12 days old age (a) and 16-weeks-age (b). This figure shows the results obtained in whole-tissue extracts that were immunoblotted for  $Na^+/K^+$  ATPase, for this protein content verification in the NP and LP kidneys. The results of scanning densitometry were expressed as arbitarrian units. Columns and bars represent the mean ± SEM \*P<0.05, NP vs. LP.



Díscussão

# CONTRIBUIÇÕES DOS RESULTADOS DO PRESENTE ESTUDO PARA O ENTENDIMENTO DO DESENVOLVIMENTO HIPERTENSIVO E DO ENVOLVIMENTO RENAL EM UM MODELO DE RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA

Embora as características fenotípicas sejam determinadas pela herança genética e estabelecidas pela combinação gênica paterna e materna, tem sido cada vez mais reconhecida à implicação de componentes externos na expressão, ativação, deleção e combinação genotípica da prole. Este estudo procura entender, pelo menos em parte, a contribuição de modificações dietéticas sobre a ontogênese e repercussão futura destas modificações sobre a função e a morfologia renal no adulto.

A organogênese em diferentes espécies é controlada por diversos fatores que podem alterar o processo de desenvolvimento dos órgãos e sistemas gerando consequências sobre a saúde do indivíduo adulto. A hipótese original concebendo esta idéia é conhecida como "hipótese de Barker", e mais recentemente tem ganhado maior visibilidade pela expressão inglesa DOHaD (Developmental Origins of Health and Adult Disease). Esta pressupõe que alterações impostas pelo ambiente durante a ontogênese de órgãos ou sistemas biológicos, podem ter efeitos deletérios ou adaptativos permanentes, que em situações específicas aumentam o risco etiológico de doenças cardiovasculares e metabólicas (107,108).

Nesta tese, buscou-se avaliar algumas repercussões morfofuncionais dos rins de ratos machos supostamente causadas pela restrição a ingestão proteica materna tanto durante o desenvolvimento fetal quanto em diferentes períodos pós-natal, em fases correspondentes ao início da nefrogênese à idade adulta. Os resultados do presente estudo inicialmente confirmaram que no animal adulto "programado" ocorre elevação da pressão arterial a partir da décima semana de vida. Esta elevação pressórica foi associada a significativa redução da excreção urinária de sódio nestes animais. De forma inédita o presente trabalho foi o primeiro a demonstrar que na prole de animais tratados com ração hipoproteica (LP) a redução da natriurese ocorre por um aumento da reabsorção de sódio nos segmentos tubulares contorcidos proximais. Esta redução da excreção de sódio ocorre a despeito de uma elevada rejeição a reabsorção deste íon nos

segmentos pós-proximais do nefro, como demonstrado pela elevação da fração de excreção pós-proximal de sódio. Este aumento da excreção pós-proximal, entretanto, não foi capaz de reverter a significativa retenção deste cátion ocorrida nos segmentos proximais, tendo como resultado efetivo final uma queda da fração de excreção de sódio.

Os experimentos também demonstraram, na prole de animais submetidos a LP, uma pronunciada redução do número de glomérulos mensurados o que presumivelmente poderia sugerir a ocorrência de redução da taxa de filtração glomerular, em parte responsável pela retenção hidroeletrolítica e consequentemente pela elevação da pressão arterial. Entretanto, o estudo não demonstrou qualquer diferença significativa na filtração glomerular estimada pelo *clearance* de creatinina quando comparada ao grupo controle (ingerindo ração normoproteica, NP). Estudos têm mostrado uma diminuição pós-natal do número de nefro em aproximadamente 30% nos animais LP, o que, em nosso estudo, não modificou expressivamente a taxa de filtração glomerular global. Estas observações sugerem que modificações hemodinâmicas e do coeficiente de ultra-filtração, promovendo uma elevação compensatória da taxa de filtração glomerular por nefro tenha ocorrido nos animais adultos até a 16<sup>a</sup> semana de idade.

Estudos morfológicos destes glomérulos em particular dos podócitos, apresentado no Apêndice 1, indicam a possibilidade de hiperfluxo e/ou hiperfiltração glomerular nos animais adultos LP comparados a NP. A figura 4 mostra através de microscopia eletrônica, um aumento de volume acompanhado de hipertrofia glomerular, associado a um alargamento dos pedicelos e de simplificação dos processos primários e secundários. Estes achados denotam uma redução da barreira efetiva de filtração acompanhada de uma ampliação da área de filtração, o que possibilitaria a redução da reserva não-filtrante e elevação da filtração glomerular por nefro. Estes resultados são confirmados no artigo de revisão (Capítulo 3), onde estudo por microscopia de luz demonstra uma hipertrofia dos podócitos associada à simplificação de pedicelos.

Conhecendo *a priori* a participação do sistema renina-angiotensina na diferenciação/desenvolvimento embriológico renal e sobre o controle hemodinâmico glomerular renal, o presente estudo investigou em glomérulos de animais adultos (16 semanas de idade) cujas mães foram submetidas à restrição proteica, a expressão de receptores AT1<sub>R</sub> e AT2<sub>R</sub>. Estas observações mostraram uma elevação da razão

AT1<sub>R</sub>/AT2<sub>R</sub> (embora haja diminuição nos dois receptores) em animais LP associado principalmente a diminuição de AT2<sub>R</sub>. Esta elevação da razão AT1<sub>R</sub>/AT2<sub>R</sub>, em particular a redução da expressão de AT2<sub>R</sub> pode estar também envolvida na manutenção da TFG como consequência de uma menor dilação da arteríola eferente e elevação da pressão de ultrafiltração.

Tendo em conta as modificações acima observadas nos animais adultos e o conhecimento prévio sobre as implicações da manipulação dietética sobre a programação fetal, o presente estudo procurou estudar se tais alterações poderiam ser definidas precocemente, já durante a ontogênese. Assim, o capítulo 2 apresenta os resultados obtidos sobre a prole durante o período pré-natal (embriológico/fetal) em um modelo de restrição dietética proteica materna comparada a um grupo controle. Este estudo inédito mostra pela primeira vez as implicações desta manipulação da dieta, passo a passo, sobre a ontogênese renal desde os seus primórdios. Os resultados mostram conclusivamente que a exposição materna a dieta hipoproteica, desde o início da gestação, foi capaz de modificar a nefrogênese reduzindo de maneira expressiva o número de ramificações do broto ureteral e consequentemente, o número de nefros em aproximadamente 30%. Estas observações, pela primeira vez, estabelecem que um número menor de nefros já é determinado neste modelo, nos primeiros estágios da ontogênese renal..

O sistema renina-angiotensina exerce papel chave no processo de diferenciação mesonéfrica e no desenvolvimento renal. Nesta função, tem sido observado que receptores AT1<sub>R</sub> e AT2<sub>R</sub> são detectados precocemente no mesênquima e em estruturas vasculares primordiais que darão origem ao rim. Tem sido também definida uma expressão quantitativa diferenciada e uma ação antagônica entre estes receptores, uma vez que enquanto AT1<sub>R</sub> favorece a proliferação celular e a tubulogênese durante o processo de brotamento uretérico, em contrapartida os receptores AT2<sub>R</sub> atuam de maneira anti-proliferativa nas células intersticiais reno-medulares. Os receptores da angiotensina são sensivelmente modulados por diferentes peptídeos e hormônios. É possível que os elevados níveis de glicocorticóides fetais observados em decorrência de uma expressiva redução placentária de 11□-HSD já demonstrada no presente modelo

experimental, sejam responsáveis pela elevada expressão de receptores da AngioII e pelos componentes da via pós-receptora da AngioII logo após o nascimento.

Embora os resultados de RT-PCR durante o desenvolvimento embrionário não estejam alterados significativamente, a diminuição na razão AT1<sub>R</sub>/AT2<sub>R</sub> devido a mecanismo compensatório por ação dos GC, pode diminuir a estimulação de Pax2 por ação da AngioII e também diminuir o brotamento uretérico e conseqüentemente o número de nefros. Os resultados observados, tendo em conta uma presumível elevação dos níveis séricos de GS, podem estar relacionados à expressão dos componentes do SRA via ativação de PPAR, fator de transcrição conhecido por estar também associado à regulação da função renal e sua implicação sobre os níveis da pressão arterial sistêmica.

O capítulo 3 traz uma visão geral da influência da programação fetal no desenvolvimento renal e suas adaptações. Os resultados apresentados nesta revisão salientam a importância do SRA no estabelecimento da hipertensão arterial e o envolvimento renal no processo etiopatológico desta elevação pressórica. Esta revisão apresenta também alguns resultados originais como a demonstração de que a expressão da subunidade β1 da Na/K ATPase renal está diminuida ao fim da nefrogênese e entretanto apresenta-se elevada durante toda a fase adulta nos animais cujas mães ingeriram dieta hipoproteíca. Esta elevação na expressão renal desta proteína pode também contribuir durante o processo adaptativo intra-renal influenciado pela AngioII, para a hipertensão arterial observada neste modelo experimental.

É importante entender a programação fetal como algo dinâmico, que ocorre progressivamente durante a organogênese, mas que estende suas consequências ao longo de toda vida. Deve se enfatizar no entanto que a programação fetal permite também que os indivíduos adaptem-se morfológica e funcionalmente a situações adversas imposta durante a organogênese. Embora parte destas adaptações permita a preservação do individuo/espécie infortunadamente, algumas são deletérias e se manifestam durante a fase adulta como disfunções metabólicas, comportamentais e cardiovasculares.

O estudo em tela confirma e detalha a participação do sistema reninaangiotensina desde o princípio do desenvolvimento renal, possivelmente de modo compensatório, na tentativa de contrabalançar através da elevação pressórica e de mecanismos hemodinâmicos que favoreçam a manutenção da filtração glomerular a despeito de uma redução significativa do número de unidades filtrantes. Estes mecanismos, entretanto, embora se mostrem parcialmente eficientes, determinam a progressiva elevação da pressão arterial e de todas as complicações inerentes ao desenvolvimento hipertensivo neste modelo experimental.

O presente estudo enfocando diretamente os efeitos da programação sobre o rim demonstra que esta se inicia precocemente, ainda na nefrogênese, e de maneira perene estende suas consequências no animal adulto manifestando-se com uma redução expressiva do número de nefros e como disfunção tubular renal no manuseio de sódio, o que poderia contribuir para a elevação da pressão arterial observada neste modelo de programação induzido pela restrição protéica materna.



# Conclusão

Os principais resultados do presente estudo mostram:

- Redução no número de brotamentos uretéricos em cultura de metanefro de embriões cujas mães foram submetidas à restrição proteica;
- Redução no número de glomérulos de fetos machos, submetidos à restrição proteica *in utero*, ainda no período fetal;
- Sutíl redução na expressão de mRNA dos componentes do SRA durante a embriogênese, e elevada expressão destes imediatamente após o nascimento em prole de ratos machos do grupo LP;
- Redução expressiva na massa ponderal da prole de ratos machos de mães submetidas à restrição dietética proteica;
- Redução na expressão proteica da subunidade β1 da Na/K ATPase ao final da nefrogênese em ratos machos "programados" intra-utero;
- Diminuída expressão proteica dos receptores da AngioII ao término da nefrogênese em prole de ratos machos de mães desnutridas proteicamente;
- Redução no número glomerular ao término da nefrogênese, seguido do aumento do volume glomerular nos ratos machos da prole LP;
- Elevação da pressão arterial sistêmica em animais machos originários de mães submetidas a LP;
- Redução da natriurese na 16ª semana de vida de ratos machos provenientes de mães do grupo LP, com diminuição da FEPNa seguida de sutil aumento da FEPPNa;
- Manutenção da TFG em ratos machos adultos de mães desnutridas proteicamente;

- Hipertrofia glomerular, alargamento dos pedicelos e simplificação dos processos primários e secundários em rins de ratos machos submetidos a restrição proteica *in utero;*
- Aumento na expressão proteica da subunidade β1 da Na/K ATPase em machos adultos da prole LP;
- Reduzida expressão dos receptores de Angio II e sua via de sinalização JAK2/STAT3 em todas as regiões tubulares e no glomérulo de ratos machos da prole LP;
- Elevada expressão proteica dos receptores de Angio II e sua via de sinalização JAK2/STAT3 na adrenal de ratos machos adultos de mães submetidas à dieta hipoproteica.

Os resultados aqui apresentados, quando analisados em conjunto permitem sugerir que a programação fetal por restrição proteica gestacional é um bom modelo para estudo das repercussões deste fator sobre a nefrogênese, permitindo avaliar as alterações renais precoces, suas implicações com sistemas humorais e sua progressão durante a vida adulta.

Os resultados acima contribuem para confirmar observações de muitos autores que têm mostrado as consequências de uma dieta pobre em proteínas durante a fase de desenvolvimento embrionário sobre diversos órgãos e sistemas, parecendo haver uma estreita relação entre a desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a maturação de diferentes órgãos. A elevada exposição fetal a glicocorticóides maternos parece estar associada às alterações encontradas na idade adulta. Adicionalmente, o estudo sugere que o sistema renina-angiotensina atua desde o princípio de modo compensatório, na tentativa de recuperar o mecanismo preciso de regulação da pressão arterial, que não está eficiente neste modelo.

A angiotensina II tem papel importante na homeostase hidroeletrolítica e é fundamental no desenvolvimento e na manutenção da pressão arterial. As alterações em receptores da AngioII e nas proteínas da via intracelular de sinalização deste hormônio

aqui encontradas, têm estendida importância nas alterações encontradas sobre a morfogênese renal.

## PERSPECTIVAS

As observações do presente estudo sobre a repercussão renal da programação fetal, bem como aquelas advindas da extensa literatura recente sobre as implicações em diferentes tecidos e órgãos, sustentam a necessidade de se entender melhor as implicações ambientais relativas a diversos modos de agressão externa que afetam o desenvolvimento feto-embrionário. Embora desenvolvida na sua grande parte em modelos experimentais, estudos epidemiológicos em populações restritas, já têm identificado repercussões graves manifestadas pela elevada incidência de doenças crônico-degenerativas, que repercutem em longo prazo sobre a sobrevida do individuo e sua qualidade de vida. Assim, por analogia, as preocupações com a etiopatogenia de doenças e o estudo destas devem retroagir, em muitas situações, ao período pré-natal e políticas públicas direcionadas ao atendimento e entendimento destas patologias devem também acompanhar todas as fases precoces destas afecções para que sejam efetivamente relevantes.

Os estudos empreendidos até o momento são apenas grãos de areia num imenso deserto de desconhecimento, que terá que ser progressivamente desbravado, tendo em conta a importância deste entendimento para o conhecimento epigenético, epidemiológico, fisiopatológico e clínico em beneficio de populações futuras.



Referências Bibliográficas

- 1. Forsdahl A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic disease? Br J Prev Med. 1977 31: 91-95.
- 2. Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: Langley-Evans SC. Fetal nutrition and adult Disease. Frontiers in nutritional science, n02, 2004, p01-16.
- Rose G. Familial patterns in ischaemic heart disease. Br J Prev Soc Med. 1964 18:75-80.
- Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. Mol Med Today 1995 1(9);
  418-423.
- Langley-Evans S. Fetal growth markers may show nutritionally mediated effect. BMJ. 2001 323(7303):52.
- Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. Br Med Bull. 2001 60:20.
- Schwartz J, Thornburg KL. The influence of various physiological challenges on permanent changes to the cardiovascular system. Arch Physiol Biochem. 2003 111(1): 3-7.
- 8. Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and Kidney Disease: the role of fetal programming. Hypertension 2006, 77(part2):502-508.
- Law CM, de Swiet M, Osmond C, Favers PM, Barker DJ, Cruddas AM et al. Initiation of hypertension in utero and its amplification throughout life. BMJ 1993 2: 306 24-7.
- 10. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia. 1992 35(7): 595-601.
- 11. Fall CH, Viiayakumar M, Barker DJ, Osmond C, Duggleby S. Weight in infancy and prevalence of coronary heart disease in adult life. BMJ. 1995 7: 310: 17-9.

- 12. Andersen AM, Osler M. Birth dimensions, parental mortality, and mortality in early adult age: a cohort study of Danish men born in 1953. Int J Epidemiol. 2004 92-9
- 13. Langley-Evans SC, Sculley DV .The association between birthweight and longevity in the rat is complex and modulated by maternal protein intake during fetal life. FEBS Lett. 2006 580(17); 4150-3.
- Jennings BJ, Ozanne SE, Dorling MW, Hales CN. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. FEBS Lett. 1999 448(1): 4-8.
- 15. Hanson MA, Gluckman PD. Developmental origins of health and disease: new insights. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008 102(2): 90-3.
- 16. Eriksson JG, Kajantie E, Forsen TJ, Osmond C, Barker DJP. Childhood growth and hypertension in later life. Hypertension. 2007 49: 1415-1421.
- Dodic M, Hantzis V, Duncan J, Rees S, Koukoulas I, Johnson K, Wintour E, Moritz K. Programming effects of short prenatal exposure to cortisol. FASEB J. 2002 16: 1017-102.
- Seckl JR. Glucocorticoids, feto-placental 11 ß-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. Steroids. 1997 62: 89-94.
- 19. Seckl JR. Glucocorticoid programming of the fetus; adult phenotypes and molecular mechanisms. Mol Cell Endocrinol. 2001 185: 61-71.
- Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? Lancet. 1993 341(8841):355-357.
- 21. Seckl JR, Brown RW. 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase: on several roads to hypertension. J Hypertens. 1994 12(2):105-112.
- 22. Benediktsson R, Edwards CR. Apparent mineralocorticoid excess. J Hum Hypertension. 1994 8(5):371-375.

- Stewart PM, Whorwood CB, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995 55(5-6):465-471.
- Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR. protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. Placenta 1996 17: 169-172.
- 25. Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. J Hypertens. 2000 18(7):815-831.
- Langley-Evans SC, Welham SJ, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promotes hypertension in the rat. Life Sci. 1999 64(11):965-74.
- Bassan H, Trejo LL, Kariv N, Bassan M, Berger E, Fattal A, Gozes I, Harel S. Experimental intrauterine growth retardation alters renal development. Pediatr Nephrol. 2000 15(3-4):192-195.
- 28. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. Pediatr Res. 2001 49(4):460-467.
- 29. Benediktsson R, Walker BR, Edwards CR. Cellular selectivity of aldosterone action: role of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. Curr Opin Nephrol Hypertension. 1995 4(1):41-46.
- 30. Seckl JR, Vleasby M, Nyrendra MJ. Glucocorticoids, 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and fetal programming. Kidney Int. 2000 57: 1412-1417.
- Singh RR, Moritz KM, Bertram JF, Cullen-McEwen LA. Effects of dexamethasone exposure on rat metanephric development: in vitro and in vivo studies. Am J Physiol Ranl Physiol. 2007 293: F548-F554.

- 32. Moritz KM, Johnson K, Douglas-Denton R, Wintour EM, Dodic M. maternal glucocorticoid treatment programs alteration in the rennin-angiotensin system of the ovie fetal kidney. Endocrinol. 2005 143(11); 4455-4463.
- Langley-Evans SC. Maternal carbenoxolone treatment lowers birthweight and induces hypertension in the offspring of rats fed a protein-replete diet. Clin Sci (Lond). 1997; 93(5):423-429.
- 34. Langley-Evans SC. Hypertension induced by foetal exposure to a maternal lowprotein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. J Hypertens. 1997; 15(5):537-544.
- 35. Shams M, Kilby MD, Somerset DA, Howie AJ, Gupta A, Wood PJ, et al. 11Betahydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human pregnancy and reduced expression in intrauterine growth restriction. Hum Reprod. 1998 Apr;13(4):799-804.
- McTernan CL, Draper N, Nicholson H, Chalder SM, Driver P, Hewison M, Kilby MD, Stewart PM. Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms. J Clin Endocrinol Metab 2001 86(10): 1979-83.
- 37. Stewart PM, Rogerson FM, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal adrenal steroidogenesis. J Clin Endocrinol Metab. 1995 Mar;80(3):885-90.
- Rogerson FM, Kayes KM, White PC. Variation in placental type 2 11betahydroxysteroid dehydrogenase activity is not related to birth weight or placental weight. Mol Cell Endocrinol 1997 128(1-2): 103-9.
- 39. Ward RM. Pharmacologic enhancement of fetal lung maturation. Clin Perinatol 1994 Sep:21(3): 523-42.

- 40. Bian X, Briggs MM, Schachat FH, Seidler FJ, Slotkin TA. Glucocorticoids accelerate the ontogenetic transition of cardiac ventricular myosin heavy-chain isoform expression in the rat: promotion by prenatal exposure to a low dose of dexamethasone. J Dev Physiol 1991 18(1): 35-42.
- Bian X, Seidler FJ, Olsen C, Raymond JR, Slotkin TA. Effects of fetal dexamethasone exposure on postnatal control of cardiac adenylate cyclase: beta-adrenergic receptor coupling to Gs regulatory protein. Teratology 1993 48(2): 169-77.
- 42. Celsi G, Kistner A, Aizman R, Eklöf AC, Ceccatelli S, de Santiago A, Jacobson SH. Prenatal dexamethasone causes oligonephronia, sodium retention, and higher blood pressure in the offspring. Pediatric Res 1998 44(3): 317-22.
- 43. Levitt NS, Lindsay RS, Holmes MC, Seckl JR. 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(6): 412-8.
- 44. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? Am J Hypertens. 1998 1: 335-347.
- 45. Hinchliffe SA, Lynch MRJ, Sargent PH, Howard CV, Van Velzen D. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. Br J Obstet Gynaecol. 1992 99:296-301.
- 46. Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. Kidney Int. 2000 58:770-773.
- 47. Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. Kidney Int 2001 59(1): 138-145.

- Hoy WE, Hugson MD, Bertram JF, Douglas-Denton, Amann K. Nephron number, Hypertension, Renal Disease and Renal Failure. J Am Soc Nephrol 2005 16:2557-2564.
- 49. Hughson m, Farris AB 3rd, Douglas-Denton R, Hoy WE, Bertram JF. Glomerular number and size in autopsy kidneys: the relationship to birth weight. Kidney Int. 2003 63(6): 2113-22.
- Rodríguez MM, Gómez AH, Abitbol CL, Chandar JJ, Duara S, Zilleruelo GE.
  Histomorphometric analysis of postnatal glomerulogenesis in extremely preterm infants. Pediatr Dev Pathol. 2004 7(1): 17-25.
- Rodriguez MM, Gomez A, Abitbol C, Chandar J, Montané B, Zilleruelo G.
  Comparative renal histomorphometry: a case study of oligonephropathy of prematurity. Pediatr Nephrol. 2005 20(7): 945-9.
- 52. Schmidt IM, Chellakooty M, Boisen KA, Damgaard IN, Mau Kai C, Olgaard K, et al. Impaired kidney growth in low-birth-weight children: distinct effects of maturity and weight for gestational age. Kidney Int. 2005 Aug;68(2):731-40.
- 53. Keller G, Zimmer G, Mall G, Ritz E, Amann K. Nephron number in patients with primary hypertension. N Engl J Med. 2003 348: 101-108.
- 54. Cullen-McEwen LA, Kett MM, Dowling J, Anderson WP, Bertram JF. Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice. Hypertension 2003 41: 335-340.
- 55. Welham SJ, Wade A, Woolf As. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the star of rat metanephrogenesis. Kidney Int. 2002 61: 1231-1242.
- 56. Woods II, Rasch R. perinatal ANG II programs adult blood pressure, glomerular number and renal function in rats. Am J Physiol 1998 275:R1593-R1599
- 57. Guron G, Friberg P.An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. J Hypertens. 2000; 18(2):123-137.
- 58. Saez F, Castells MT, Zuasti A, Salazar F, Reverte V, Loria A, Salazar FJ. Sex differences in the renal changes elicited by angiotensin II blockade during the nephrogenic period. Hypertension 2007 49(6) 1429-35.
- 59. Baiardi G, Macova M, Armando I, Ando H, Tyurmin D, Saavedra JM. Estrogen upregulates renal angiotensin II AT1 and AT2 receptors in the rat. Regul Pept. 2005 124:7-17.
- 60. Yosypiv IV, El-Dahr SS. Role of the rennin-angiotensin system in the development of the ureteric bud and renal collecting system. Pediatric Nephrol 2005 Sep;20(9):1219-29.
- 61. Vize PD, Seufert DW, Carroll TJ, Wallingford JB. Model systems for the study of kidney development: use of the pronephros in the analysis of organ induction and patterning. Dev Biol. 1997 Aug 15;188(2):189-204.
- 62. Hinchliffe SA, Sargent PH, Howard CV, Chan YF, van Velzen D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the disector method and Cavalieri principle. Lab Invest. 1991 64(6): 777-84.
- 63. Boer PA e Gontijo JAR. Células Epiteliais Tubulares Renais. In: Carvalho HF e Collares-Buzato CB. Células: Uma abordagem multidisciplinar. Campinas. Editora Manole; 2005, 192-225.
- 64. Bard JB, McConnell JE, Davies JA. Towards a genetic basis for kidney development. Mach Dev. 1994 48(1): 3-11.
- 65. Koseki C, Herzlinger D, al-Awqati Q. Apoptosis in metanephric development. J Cell Biol. 1992 119: 1327-33.
- Coles HS, Burne JF, Raff MC. Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. Development. 1993 118(3): 777-84.
- 67. Guyton AC e Hall JE. Tratado de Fisiologia Médica. 11ª. Edição. Editora Elsevier;
  2006.

- 68. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS Molecular mechanisms of human hypertension. Cell. 2001 104(4): 545-56.
- 69. Rettig R, Folberth C, Stauss H, Kopf D, Waldherr R, Unger T, Role of the kidney in primary hypertension: a renal transplantation study in rats. Am J Physiol. 1990 258: F606-F611.
- 70. Guidi E, Menghetti D, Milani S, Montangnino G, Palazzi P, Bianchi G, Hypertension may be transplanted with the kidney in humans: a long-term historical prospective follow-up of recipients grafted with kidneys coming from donors with or without hypertension in their families. J Am Soc Nephrol. 1996, 7: 1131-1138.
- 71. Harris PJ e Young JA. Dose-dependent stimulation and inhibition of proximal tubular sodium reabsorption by angiotensin II in the rat kidney. Pflugers Arch 1977 367: 295-7.
- Rangel LB, Caruso-Neves C, Lara LS, Lopes AG. Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na(+)-ATPase activity through the activation of protein kinase C. Biochim Biophys Acta. 2002 31: 1564(2): 310-6.
- 73. Mitchell KD, Braam B, Navar LG. Hypertensinogenic mechanisms mediated by renal actions of renin-angiotensin system. Hypertension. 1992;19:I18–I27.
- Fiam-Ong S, Hilden SA, Johns CA, Madias NE. Stimulation of basolateral Na(+) HCO3- cotransporter by angiotensin II in rabbit renal cortex. Am J Physiol. 1993
   F195-203.
- 75. Wang T, Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. Am J Physiol. 1996 271: F143-9.
- 76. Houillier P, Chambrey R, Achard JM, Froissart M, Poggioli J, Paillard M. Signaling pathways in the biphasic effect of angiotensin II on apical Na/H antiport activity in proximal tubule. Kidney Int. 1996 50(5): 1496-505.

- 77. Rangel LB, Malaquias AT, Lara LS, Silva IV, De Souza AM, Lopes AG et al. Protein kinase C-induced phosphorylation modulates the Na(+)-ATPase activity from proximal tubules. Biochim Biophys Acta. 2001 1512(1): 90-7.
- Olsen ME, Hall JE, Montani JP, Guyton AC, Langford HG, Cornell JE.
   Mechanisms of angiotensin II natriuresis and antinatriuresis. Am J Physiol. 1985 249: F299-307.
- Barreto-Chaves ML, Mello-Aires M. Effect of luminal angiotensin II and ANP on early and late cortical distal tubule HCO3- reabsorption. Am J Physiol. 1996 271:F977-84.
- Crowley SD, Gurley SB, Oliverio MI, Pazmino AK, Griffiths R, Flannery PJ et al. Distinct roles for the kidney and systemic tissues in blood pressure regulation by the renin-angiotensin system. J Clin Invest. 2005 115(4): 11092-9.
- Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, Yagil C, Kozieradzki I, Scanga SE et al.. Angiotensin converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. Nature. 2002 417:822-828.
- 82. Danilczyk U, Penninger JM. Angiotensin converting enzyme II in the heart and the kidney. Circ. Res. 2006 98: 463-471.
- 83. Gasc JM, Shanmugam S, Sibony M, Corvol P. Tissue specific expression of type
  1 angiotensin II receptor subtypes. An in situ hybridization study. Hypertension.
  1994 24: 531-537.
- Chen X, Li W, Yoshida H, Tsuchida S, Nishimura H, Takemoto F et al. Targeting delection of angiotensina type 1B receptor gene in the mouse. Am J Physiol Renal Physiol. 1997 272: F299-F304.
- Mehta PK, Griendling KK. Angiotensina II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. Am J Physiol Cell Physiol. 2007 292: C82-C97.

- Barnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. JAK-STA pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science. 1994 264: 1415-1421.
- Marrero MB, Schiefer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P et al. Direct stimulation of JAK/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. Nature. 1995 375: 247-250.
- 88. Schindler C, Darnell JE Jr. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. Annu Rev Biochem. 1995 64: 621-651.
- Marrero MB, Venema VJ, Ju H, Eaton DC, Venema RC. Regulation of angiotensin II-induced JAK2 tyrosine phosphorylation: roles of SHP-1 and SHP-2. Am J Physiol. 1998 275: C1216-23.
- Hilton DJ, Richardson RT, Alexander WS, Viney EM, Willson TA, Sprigg NS et al. Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. PNAS. 1998 95: 114-119.
- 91. Yasukawa H, Sasaki A, Yoshimura A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. Annu Rev Immuno. 2000 18: 143-164.
- 92. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. Stem Cells. 2001 19: 378-387.
- Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K et al. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. Nature. 1997 387: 921-924.
- 94. Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Wilson TA, Zugaro LM, Simpson RJ et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. PNAS. 1999 96: 2071-2076.
- 95. Touyz RM, Berry C. Recent advances in angiotensina II signaling. Braz J Med Biol Res. 2002 35: 1001-1015.

- 96. Sahajpal V, Ashton N. Renal function and angiotensina AT1 receptor exepression in young rats following intrauterine exposure to a maternal low-protein diet. Clin Sci. 2003 104: 607-614.
- 97. Friberg P, Sundelin B, Bohman SO, Bobik A, Nilsson H, Wickman A et al. Reninangiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensina II antagonism. Kidney Int. 1994 45: 485-492.
- Sequeira-Lopes ML, Gomez RA. The role of angiotensina II in kidney embryogenesis and kidney abnormalities. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2004 13: 117-122.
- 99. Gomez RA. Role of angiotensina in renal vascular development. Kidney Int Suppl.1998 67: S12-S16.
- 100. Rohrwasser A, Morgan T, Dillon HF. Elements of a paracrine tubular renninangiotensin system along the entire nephron. Hypertension. 1999 34: 1265-1274.
- 101. Iosipiv IV, Schroeder M. A role for angiotensin II AT1 receptors in ureteric bud cell branching.Am J Physiol Renal Physiol. 2003 285(2) F199-207.
- 102. Prieto M, Dipp S, Meleg-Smith S, El-Dahr SS. Ureteric bud derivates express angiotensinogen and AT1 receptors. Physiol Genomics. 2001 6: 29-37.
- Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM et al. Distribution of rennin mRNA and its protein in the developing kidney. Am J Physiol. 1989 257: F850-F858.
- Jung FF, Bouyounes B, Barrio R, Tang SS, Diamant D, Ingelfinger JR.
   Angiotensina converting enzyme in renal ontogeny: hypothesis for multiple roles.
   Pediatr Nephrol. 1993 7: 834-840.
- Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensina II receptors during early renal morphogenesis. Am J Physiol. 1997 272: R662-R668.

- 106. Lovenberg W. Techniques for measurements of blood pressure. Hypertension. 1987 9: 15-16.
- 107. Barker DJ e Bagby SP. Developmental antecedents of cardiovascular disease: a historical perspective. J Am Soc Nephrol. 2005 16:2437-2544.
- 108. Gluckman PD e Hanson MA. The developmental origins of health and disease: an overview. In: Gluckman PD and Hanson MA. Developmental origins of health and disease. Cambridge University Press, Cambridge, pp 1-5, 2006.



Apêndice 1

*Apêndice 1* 195

## **APÊNDICE 1**



Figura 1: Microscopia Eletrônica de Varredura: **A**: Organização tridimensional da superfície externa dos podócitos (p) ao redor dos capilares no rato NP. **a**: Detalhe de um podócito mostrando processo primário (1) e secundário (2) e pedicelos (seta) entre os quais podemos ver as fendas de filtração. **B**: glomérulo de rato HP mostrando arranjo alterado devido ao achatamento dos podócitos indicativo de simplificação podocitária. **b**: note a superfície irregular do corpo celular com processos alargados, e formação de pseudocistos (\*) e número reduzido de fendas de filtração.