PRISCILA SERAVALLI CALMON NOGUEIRA

**Sobrecarga e restrição de cloreto de sódio
durante a gestação: repercussão sobre a
estrutura cardíaca e renal no neonato**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

Programa de Nefrologia da Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nogueira, Priscila Seravalli Calmon

Sobrecarga e restrição de cloreto de sódio durante a gestação : repercussão sobre a estrutura cardíaca e renal no neonato / Priscila Seravalli Calmon Nogueira. -- São Paulo, 2016.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.

Orientador: Joel Claudio Heimann.

Descritores: 1.Sistema renina-angiotensina 2.Recém-nascido 3.Cloreto de sódio
4.Desenvolvimento fetal 5.Coração 6.Rim 7.Gravidez 8.Nutrição materna
9.Fenômenos fisiológicos da nutrição materna 10.Modelos animais 11.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-007/16

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de fisiopatologia renal-LIM 16 – Departamento de Clínica Médica da FMUSP. Recebeu apoio financeiro da Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) auxílio regular (2013/00458-7), tendo sido concedida bolsa de mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

À minha filha amada Mariana,

Filha eu sei que tudo mudou depois que comecei este projeto, acredito que estes dias longos de trabalho árduo seja reflexo de um futuro melhor para nós. Eu entendo que hoje você ainda não consegue compreender a importância deste projeto na minha vida. Mas no futuro, tenho certeza que você irá se orgulhar da mamãe. Te amo mais que tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que iluminou o meu caminho durante este projeto e também agradeço a Nossa Senhora de Aparecida pela intercessão das graças recebidas.

À minha família que nesta trajetória foi essencial pelo apoio incondicional e sacrifício imposto pela distância.

Ao meu esposo Rodrigo, muito obrigada pelo carinho, pela paciência e por sua capacidade de me trazer a paz na correria diária. Você é uma pessoa incrível.

À minha mãe Edite, um grande exemplo de mulher que superou as dificuldades da saúde para continuar me dando forças. Uma figura importantíssima na minha vida, uma mulher que sozinha buscou o melhor para suas filhas. Tenho muito orgulho de ser sua filha.

À minha irmã querida, pelo apoio e carinho.

À minha prima Carolina Rivas, pela força, pelo companheirismo de todos os dias durante esses três anos.

Em especial, quero agradecer meu orientador Dr. **Joel Claudio Heimann**, um grande profissional ético e dedicado no seu trabalho árduo e contínuo. Tenho uma imensa gratidão por ter me recebido no seu grupo de pesquisa e ter acreditado em mim. Muito obrigada por estar sempre comigo nesta trajetória, seja no choro ou no riso, pelos ouvidos sempre disponíveis, pela cumplicidade e principalmente pela paciência. Por dizer-me não somente o que quero ouvir, mas principalmente o que preciso. Serei eternamente grata!

Também tenho imenso prazer de agradecer a você Dra. Mariana Matera Veras, por toda dedicação a esta pesquisa, pelos ensinamentos e por estar sempre disponível. A Estereologia nos uniu e formou uma grande amizade e parceria. Você foi sensacional!

E o que dizer a você Ivone Braga de Oliveira? Que pessoa maravilhosa que tive o prazer de conhecer, muito obrigada pela colaboração, pela paciência, pelo incentivo, pela força e principalmente pelo carinho. Tenho certeza que não tenho uma amiga só no trabalho, ganhei uma amiga para vida toda!

À Dra. Luzia Furukawa pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Agradeço a todos amigos e funcionários que sempre estiveram ao meu lado, nos bons e maus momentos. Ao meu grupo da Hipertensão experimental, meus amigos, Carolina Romão, Rafael Canavel Pereira, Breno Calazans Zago, Maria Angélica Peres e Ellen Dopona. Aos demais alunos que passaram por este laboratório Juliana Mello, Carina Guimarães, Sônia Soto, Karen, Isis Akemi Katayama Rangel e Guilherme pelo apoio e amizade.

A todos os meus amigos do grupo Osteodistrofia Renal, à querida Dra. Vanda Jorgetti, Dra. Luciene dos Reis, Dra. Rosa Affonso Moysés, Fabiana Jorgetti Gracioli, Tatiana M. Aniteli, Flavia R. Siqueira, Rackel Mota, Roxana Albuquerque e Verônica Gouveia.

Em especial ao meu amigo Wagner Domingues pelos ensinamentos de informática, disponibilidade e paciência durante esta trajetória.

Ao grupo de Doença Renal Crônica os meus amigos, Simone Da Costa Alarcon Arias, Orestes Neto, Victor Ávila, Gizely Moreira, Lisienny Rampel, Camilla Fanelli, Fernanda Zambom e Karin Oliveira.

As secretarias Solange e Denise.

Aos técnicos e auxiliares, Janice, Claudia, Meire e Newton.

À coordenação de pós-graduação.

À FAPESP e a CAPES pelo apoio financeiro.

Obrigada meus amigos nunca esquecerei a força que me deram para seguir em frente, cada um com seu jeitinho!

No início, foi bastante confuso e incomum, várias pessoas estranhas fazendo parte da minha rotina diária. Com o passar do tempo, fui percebendo quão especiais vocês são. Conquistei grandes amigos. Aqui passei muitos dos melhores momentos da minha vida e com vocês que compartilho tamanha alegria.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta dissertação está redigida de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
Objetivo geral	10
Objetivos específicos:	10
3 MÉTODOS	11
3.1 Animais	12
3.2 Protocolo experimental do grupo materno	12
3.3 Evolução Ponderal	13
3.4 Protocolos experimentais da prole	14
3.5 Grupos experimentais da prole	14
3.6 Avaliação histológica do coração e dos rins.....	14
3.7 Estereologia renal	14
3.8 Volume do Rim e seus compartimentos.....	15
3.9 Densidade numérica e número total de glomérulos	19
3.10 Estereologia cardíaca.....	20
3.11 Volume do coração e dos compartimentos cardíacos.....	20
3.12 Diâmetro transverso do núcleo do cardiomiócito.....	22
3.13 Expressão proteica por ELISA indireto.....	23
3.14 Expressão gênica dos componentes do SRA	25
3.15 Extração de RNA total dos rins e do coração.....	25
3.16 Síntese de cDNA reação de transcriptase reversa (RT)	26
3.17 Expressão gênica- reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)	27
3.18 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Evolução ponderal do grupo materno	30

4.2 Tamanho da prole	31
4.3 Peso ao nascimento da prole	32
4.4 Massa cardíaca e massa renal ao nascimento	33
4.5 Números de glomérulos	34
4.6 Diâmetro transverso do núcleo do cardiomiócito dos ventrículos esquerdo e direito de neonatos machos da prole	35
4.7 Diâmetro transverso dos núcleos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e direito de neonatos fêmeas da prole	36
4.8 Expressão proteica do receptor AT1 de angiotensina II no rim de neonatos machos e fêmeas	37
4.9 Expressão proteica dos receptores AT2 de angiotensina II no rim de neonatos machos e fêmeas	38
4.10 Expressão proteica dos receptores AT1 de angiotensina II no coração de neonatos machos e fêmeas	39
4.11 Expressão proteica dos receptor AT2 de angiotensina II no coração de neonatos machos e fêmeas	40
4.12 Expressão gênica dos componentes do SRA no rim de neonatos machos e fêmeas da prole	41
4.13 Expressão gênica dos componentes do SRA no coração dos neonatos machos e fêmeas	42
4.14 Volume renal	43
4.15 Volume cardíaco	44
5 DISCUSSÃO	46
6 CONCLUSÃO.....	51
7 REFERÊNCIAS.....	53
8 APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Área
AGTO	Angiotensinogênio
ANG I	Angiotensina I
Ang II	Angiotensina II
AS	<i>Antisense</i>
AT1	Receptor tipo 1 de angiotensina II
AT2	Receptor tipo 2 de angiotensina II
BU	Broto uretérico
Cvd	Cavidade do ventrículo direito
Cve	Cavidade do ventrículo esquerdo
DC	Ducto coletor
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EM	Estroma mesenquimal
G	Glomérulos
HC	Hipertrofia cardíaca
HO	Dieta hipossódica
HR	Dieta hipersódica
HS	<i>High salt diet</i>
LS	<i>Low salt diet</i>

M	Medula
N^{par}	Número de pares de campos analisados
Na Cl	Cloreto de sódio
NR	Dieta normossódica
NS	<i>Normal diet</i>
NT_{GI}	Número total de glomérulos
NV	Densidade numérica
NV_{GI}	Densidade numérica de glomérulos
n_{par}	Número de pares por campo analisado
P	Ponto
PA	Pressão arterial
PAS	Ácido periódico de <i>Schiff</i>
Q-	Número de cardiomiócitos
S	<i>Sense</i>
SEP	Septo interventricular
SRA	Sistema renina angiotensina
T	Distância entre os cortes
TC	Túbulo cortical
TP	Túbulo proximal
V	Volume
V_{compartimento}	Volume por compartimento
V_{córtex}	Volume do córtex

VA	Vasos arteriolares
Vdis	Volume dos <i>disectors</i>
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo
V_R	Volume absoluto
V_{ref}	Volume de referência
Σ	Somatória
Σn_{GI}	Somatória do número de glomérulos
Σ^{Pts}	Somatória de pontos
Σ^{q-}	Número total de cardiomiócitos contados
$\Sigma \text{ pts COMP}$	Somatória de pontos do compartimento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo experimental do grupo materno.....	13
Figura 2 -	Corte vertical do rim de rato neonato.....	15
Figura 3 -	Representação esquemática do protocolo de amostragem sistemática, randômica e uniforme do rim	16
Figura 4 -	Fotomicrografias de cortes longitudinais seriados de rim de ratos recém-natos.....	17
Figura 5 -	Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos para estimativa das densidades de volume dos compartimentos renais utilizando o software ImageJ	18
Figura 6 -	Corte transversal do coração de rato neonato.....	20
Figura 7 -	Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos para estimativa do volume dos compartimentos cardíacos utilizando o programa ImageJ.....	21
Figura 8 -	Exemplo da aplicação do campo do corte da estrutura cardíaca pelo software Pannoramic Viewer, com grid de pontos para estimativa do diâmetro do núcleo dos cardiomiócitos e representação das medidas perpendiculares do núcleo do cardiomiócitos.....	23
Figura 9 -	Evolução ponderal durante a gestação	30
Figura 10 -	Número de glomérulos neonatos machos e fêmeas	34
Figura 11 -	Diâmetro transversal do cardiomiócito do ventrículo esquerdo e direito de neonatos machos.....	35
Figura 12 -	Diâmetro transversal do núcleo cardiomiócito do ventrículo esquerdo e direito de neonatos fêmeas.....	36
Figura 13 -	Expressão proteica do receptor AT1 do SRA no rim neonatos machos e fêmeas.....	37
Figura 14 -	Expressão proteica do receptor AT2 do SRA no rim neonatos machos e fêmeas	38
Figura 15 -	Expressão proteica do receptor AT1 do SRA no coração neonatos machos e fêmeas.....	39
Figura 16 -	Expressão proteica do receptor AT2 do SRA no coração neonatos machos e fêmeas.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Expressão dos componentes do SRA durante a nefrogênese de ratos	7
Tabela 2 -	Sequências dos primers utilizados para real-time qPCR	27
Tabela 3 -	Tamanho total da prole e número de machos e fêmeas	31
Tabela 4 -	Peso corpóreo da prole ao nascimento de neonatos machos e fêmeas.....	32
Tabela 5 -	Massa cardíaca e massa renal ao nascimento	33
Tabela 6 -	Expressão gênica dos componentes do SRA no rim de neonatos machos e fêmeas da prole	41
Tabela 7 -	Expressão gênica dos componentes do SRA no coração de neonatos machos e fêmeas da prole	42
Tabela 8 -	Volume total renal e de seus compartimentos de neonatos machos e fêmeas de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR)	43
Tabela 9 -	Volume total cardíaco e dos compartimentos cardíacos de neonatos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR)	44
Tabela 10 -	Volume total cardíaco e dos compartimentos cardíacos de neonatos fêmeas da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR)	45

RESUMO

Nogueira PSC. *Sobrecarga ou restrição de cloreto de sódio durante a gestação: repercussão sobre a estrutura cardíaca e renal no neonato* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

Introdução: Diversos estudos indicaram consequências de alterações na nutrição materna durante a gestação sobre a saúde da prole adulta, tais como: hipertensão, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, diabetes melito e doença renal. No entanto, a literatura é pobre em avaliações decorrentes de modificações nutricionais maternas sobre a prole logo após o nascimento.

Métodos: Ratas Wistar durante o período gestacional foram alimentadas com dieta hipossódica (HO - 0,15% de NaCl), normossódica (NR - 1,3% de NaCl) ou hipersódica (HR - 8% de NaCl). Após o nascimento, nas primeiras vinte e quatro horas foram coletados rins e coração dos neonatos machos e fêmeas (n=6-8/grupo) para verificar as possíveis alterações na estrutura cardíaca e renal pelo método de estereologia. Também foi avaliada a expressão proteica e gênica dos componentes do sistema renina-angiotensina (SRA) no coração e rins através do método ELISA indireto e RT-qPCR. **Resultados:** O peso ao nascimento foi menor em machos e fêmeas da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação quando comparado NR e HR. Não houve diferença no volume renal, volume de seus compartimentos (córtex, medula e pelve) e número de glomérulos entre os grupos experimentais (HO, NR e HR). No entanto, o número de glomérulos foi maior em fêmeas comparado aos machos nos três grupos experimentais. O diâmetro transverso do núcleo dos cardiomiócitos no ventrículo esquerdo e no ventrículo direito de machos da prole HR foi maior do que na prole NR. A expressão proteica do receptor AT1 no rim de machos da prole foi menor no grupo HO do que no grupo NR e HR. A expressão proteica do receptor AT2 também foi menor em machos do grupo HO do que no grupo NR. Não houve diferença entre os grupos na expressão proteica dos receptores AT1 e AT2 no rim das fêmeas. **Conclusão:** O presente estudo detectou alterações na estrutura cardíaca de neonatos machos, mas não em neonatos fêmeas decorrentes de sobrecarga de sal durante a gravidez. As alterações observadas na expressão dos receptores AT1 e AT2 no rim de neonatos machos podem ser responsáveis por alterações na função renal.

Descritores: sistema renina-angiotensina; recém-nascido; cloreto de sódio; desenvolvimento fetal; coração; rim; gravidez; nutrição materna; fenômenos fisiológicos da nutrição materna; modelos animais; ratos; Wistar.

ABSTRACT

Nogueira PSC. *Sodium chloride overload or restriction of during pregnancy: impact on heart and kidney structure in the neonate* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

Introduction: Several studies have shown several consequences on adult offspring due to alterations in maternal nutrition during pregnancy, such as: hypertension, heart diseases, insulin resistance, diabetes mellitus and kidney diseases. Nevertheless, few studies evaluated maternal nutritional alterations in neonates. **Methods:** Female Wistar rats were fed from day one of pregnancy until delivery with low- (LS - 0.15% NaCl), normal- (NS - 1.3% NaCl) or high- (HS - 8%NaCl) salt diet. During the first twenty-four hours after birth, newborn's (n=6-8/group) kidneys and heart were collected to evaluate possible changes of their structure by stereology. The protein and the gene expression of the renin angiotensin system components were evaluated by indirect ELISA and by RT-qPCR, respectively. **Results:** Birth weight was lower in male and female offspring of dams fed LS during pregnancy. No differences between groups (LS, NS and HS) were observed in total renal volume and its compartments (cortex, medulla and pelvis) and number of glomeruli. The number of glomeruli was higher in female when compared to male newborns in the three experimental groups. The transverse diameter of the nuclei of the cardiomyocytes was higher in HS in both left and right ventricle vs. NS. The AT1 receptor protein expression was lower in kidneys of LS than in NS and HS male newborns. AT2 receptor protein expression was also lower in male LS than in NS. No differences in AT1 and AT2 receptors protein expression in female newborn's kidneys were found. **Conclusion:** The present study shows changes in cardiac structure male but not of female neonates induced salt overload during pregnancy. The alterations observed in AT1 and AT2 expression in kidneys of neonates may be responsible for alteration in renal function.

Descriptors: renin-angiotensin system; newborn; sodium chloride; fetal development; heart; kidney; pregnancy; maternal nutrition; maternal nutritional physiological phenomena; infant; models, animal; rats Wistar.

1 INTRODUÇÃO

Estudos vem demonstrando que a população excede o consumo de sal recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Um estudo mostrou que os homens consomem mais sal do que as mulheres. (Powles e Fahimi et al., 2013). O excessivo consumo de sal é preocupante porque está associado a um aumento da prevalência de hipertensão (Pearson e Wolzak, 1982).

A pressão arterial (PA) elevada não é a única consequência de consumo elevado de sal (Ahn et al., 2004). O sal tem uma ação na estrutura cardíaca (Fröhlich et al., 1993) e que 9,5% da mortalidade da população mundial por doenças cardiovasculares é decorrente do excesso do consumo de sal (Mozaffarian et al., 2014).

Em nosso laboratório estudos vêm demonstrando que a dieta hipersódica está associada a alterações na estrutura de células cardíacas, resultando em uma hipertrofia cardíaca tanto no ventrículo esquerdo (VE) como também no ventrículo direito (VD) independente da pressão arterial (Ferreira et al., 2010; Katayama et al., 2014).

A hipertrofia cardíaca é um conjunto de variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas que podem ser manifestadas com mudanças de tamanho, massa, geometria e função do coração.

Além de consequências cardiovasculares, a excessiva ingestão de sal também pode induzir lesões renais. Em seres humanos existem boas evidências que a sobrecarga de sódio aumenta a resistência vascular renal e a pressão glomerular o que induz aumento da fração de filtração glomerular (Ritz et al., 2009).

Em contrapartida, diversos estudos observaram que a restrição de consumo de sal na dieta causa danos diferentes, podendo induzir uma menor captação periférica de glicose em seres humanos (Egan et al., 1991; Fliser et al., 1993). Outros estudos demonstraram que a restrição de sódio pode aumentar os níveis de peptídeo – C e insulina sem alteração no nível da glicose sérica, o que sugere uma resistência à insulina na captação periférica de glicose (Lind et al., 1992; Fliser et al., 1993).

Prada et al., (2000) observaram que ratos Wistar com 12 semanas de idade alimentados com dieta hipossódica apresentam menor sensibilidade à

insulina, além de maior peso corpóreo e maior massa dos tecidos adiposos, ou seja, estes animais desenvolveram obesidade.

No entanto, estudos também vem demonstrando os efeitos da sobrecarga e restrição de sal na dieta materna e a influência no desenvolvimento fetal e a predisposição a doenças na prole adulta, conforme a hipótese de programação fetal proposta por Barker e colaboradores em seu primeiro estudo (1989), onde eles observaram que mulheres desnutridas durante a gestação geraram indivíduos com baixo peso ao nascimento e com predisposição a doenças cardiovasculares associadas à maior mortalidade na idade adulta.

Diante desta hipótese de programação fetal proposta por Barker, uma sequência de estudos epidemiológicos e também em modelos animais vem reconhecendo que, perturbações intrauterinas podem estabelecer a necessidade de uma reprogramação fetal em resposta a um ambiente hostil. Portanto, foram elaborados diversos estudos, que manipularam conteúdos dietéticos em animais durante a gestação para observarem as repercussões na saúde da prole na idade adulta. Entre as manipulações estudadas podemos citar a restrição proteica, a restrição global de nutrientes e o consumo elevado e reduzido de sal durante o período perinatal (Barker et al., 1989; Yang e Huffman, 2013; Vidonho et al., 2004).

Vidonho e colaboradores (2004) em um estudo realizado em nosso laboratório avaliou os efeitos do baixo consumo de sal durante o período perinatal e mostrou que o grupo materno teve maior glicemia durante a gestação e a prole apresentou baixo peso ao nascimento. Quando foi avaliada a prole na idade adulta, apenas os machos da prole desenvolveram resistência à insulina.

Um outro estudo, também realizado em nosso laboratório avaliou o consumo de dietas hipossódica, hipersódica e normossódica durante a gestação. Durante o período de lactação os grupos maternos receberam dieta normossódica e apenas os machos da prole após o desmame até a vigésima semana de idade também receberam dieta normossódica. Para avaliar a resposta cardíaca ao consumo de sal na prole adulta, as proles de mães que receberam as respectivas dietas foram submetidas a uma sobrecarga de sal na dieta à partir da vigésima primeira semana até a trigésima sexta semana de idade. Dessa maneira, apenas os animais que receberam dieta hipersódica

durante a gestação e expostos a uma sobrecarga de sal na idade adulta desenvolveram hipertrofia ventricular esquerda quando comparados com machos da prole de mães alimentadas com dieta normossódica durante a gestação (Alves-Rodrigues et al., 2013).

A ingestão de sal modula a atividade do sistema renina angiotensina (SRA) que é responsável pelo balanço eletrolítico e regulação da pressão arterial (PA). A renina é produzida pelo rim, sendo seu substrato, o angiotensinogênio (AGTO), produzido no fígado. A ação da renina sobre o seu substrato gera um peptídeo de dez aminoácidos denominado angiotensina I. A enzima conversora da angiotensina I (ECA), produzida nos pulmões, transforma a angiotensina I em angiotensina II (Ang II), um peptídeo de oito aminoácidos, um efector do SRA, que quando ligado ao receptor 1 de angiotensina II (AT1) promove vasoconstrição, aumento da pressão arterial e crescimento celular. Quando a Ang II se liga ao seu outro receptor (AT2) ocorre vasodilatação, inibição do crescimento e diminuição da pressão arterial. O efeito da Ang II sobre o receptor AT2 também tem um papel importante no desenvolvimento de diversos órgãos durante a embriogênese, incluindo o rim e o coração (Coimbra et al., 2012; Eriksson et al., 2007; Ding et al., 2010).

Há evidências da existência de um SRA local em órgãos, tecidos e células (Kumar et al., 2007; Re, 2004). O SRA tecidual desempenha ações diferentes conforme os órgãos em que atua, tais como, proliferação e síntese proteica (Paul et al., 2006).

Os efeitos na idade adulta causados pela variação da ingestão de sal durante a gestação, possivelmente derivam de adaptações fetais durante a vida intrauterina que ainda não foram totalmente elucidados. No entanto, diversos estudos já evidenciaram que mudanças permanentes na estrutura e morfologia de diversos órgãos fetais, como, por exemplo, coração e rim, podem estar relacionadas com as complicações encontradas na vida pós-natal (Law et al., 1996; Bauer et al., 2002), podendo ser consequentes a perturbações do sistema renina-angiotensina (Zohdi et al., 2007).

Ding e colaboradores em um estudo publicado em 2010, demonstraram que a sobrecarga de sal durante o período perinatal pode afetar o desenvolvimento do coração. Nesse estudo, foi avaliada a prole no vigésimo-

primeiro dia da gestação de ratas Sprague-Dawley. Portanto, a prole de mães alimentadas com dieta hipersódica apresentou maior massa cardíaca quando comparada com os fetos de mães alimentadas com dieta normossódica. Os autores associaram este resultado com a maior expressão proteica do receptor AT1 de angiotensina II, sugerindo que esta alteração pode ser devida à ativação do SRA fetal local, culminando em alterações celulares cardíacas. E que tais mudanças, podem ser reflexos da modificação da programação fetal induzida pela alimentação materna.

Por outro lado, a restrição de sal durante o período perinatal está associada ao baixo peso ao nascer, o que indica que a dieta materna pode afetar o crescimento do feto (Vidinho et al., 2004). A restrição do crescimento é uma adaptação fetal associada à desnutrição da mãe, que por sua vez, pode estar associada ou ser causada por alterações no metabolismo de insulina e glicose, encontradas na baixa ingestão de sódio (Forsen et al., 2000). Estudo desenvolvido em nosso laboratório demonstrou que há uma associação da atividade do SRA com a baixa captação de glicose causada pela dieta hipossódica em ratos adultos, onde foi observado que o uso de captopril (inibidor da enzima de conversão da angiotensina I) aumentou a captação de glicose enquanto o losartan (inibidor do receptor AT1 da angiotensina II) não influenciou a captação de glicose pelos tecidos (Prada et al., 2000).

Além de possíveis consequências cardiovasculares, há evidências de que a excessiva ingestão de sal durante o período gestacional e lactação pode provocar distúrbios no desenvolvimento renal da prole, tais como diminuição da filtração glomerular e proteinúria (Cardoso et al., 2009). Indícios em modelos animais e estudos em humanos mostram que o número final reduzido de néfrons por alterações decorrentes da programação fetal, predispõe o indivíduo a doença renal e a hipertensão na vida adulta (Moritz et al., 2003; Brenner et al., 1988).

Koleganova e seus colaboradores (2011) investigaram as consequências da sobrecarga e restrição da ingestão de sal no período perinatal sobre a prole com uma semana de idade e mostraram que ambos os grupos de dieta comparado ao grupo de dieta intermediária, tiveram menor número de glomérulos predispondo a uma PA elevada na idade adulta.

O número de néfrons no rim durante a nefrogênese é um parâmetro importante e crítico, uma vez que terminada a nefrogênese não se formam novos néfrons (Bertram et al., 2014). Em mamíferos, a nefrogênese é dividida em três fases: pronefro, mesonefro e metanefro (Hebel e Stromberg, 1986). Ambos pronefros e mesonefros envolvem por apoptose dentro de 2 a 4 dias depois de seu surgimento. O ducto nefrítico continua a se alargar via caudal formando o metanefro que será o rim permanente. Em humanos o número final de néfrons já está estabelecido antes do nascimento, no entanto, em ratos a organogênese renal inicia-se entre 13º-14º dia embrionário (Saxen e Sariola, 1987) e após o nascimento o rim continua a se desenvolver por mais duas semanas, sendo que os glomérulos ao nascimento ainda se encontram imaturos (Nigam et al., 1996).

Durante o desenvolvimento embrionário e fetal, alterações durante a nefrogênese podem prejudicar o desenvolvimento do rim. Embora essas alterações possam ser decorrentes de ambiente adverso durante períodos críticos de desenvolvimento podendo envolver fatores de crescimento e alterações da atividade do SRA que tem um papel importante na nefrogênese (Coimbra et al., 2012), tais como os seus componentes expressos na fase metanefro no rim embrionário, conforme mostra a tabela 1, podendo comprometer o número de néfrons (Bagby et al., 2007; Woods et al., 2004).

Tabela 1 - Expressão dos componentes do SRA durante a fase metanefro (Yosypiv e El-Dahr, 2005)

Embriogênese (DIA)	AGTO	Renina	ECA	AT ₁	AT ₂
E14					BU, EM, M, TC
E15	BU, EM, TP	VA		G, BU, EM	BU, EM, M, TC
E16	BU, EM, TP	VA	TP, G, DC	EM	
E17	BU, EM, TP				
E19	TP	VA		G, PT, DC	
Referências	Prieto et al., 2001;	Gomez et al., 1989	Jung et al., 1993	Norwood et al., 1997; Kakuchi et al., 1995 Iosipiv e Schroeder M., 2003	Kakuchi et al., 1995; García-Villalba et al., 2003

AGTO: angiotensinogênio, **ECA:** enzima conversora de angiotensina, **AT₁/AT₂:** receptores de angiotensina II, **BU:** broto uretérico, **EM:** estroma mesenquimal, **TP:** túbulo proximal, **VA:** vasos arteriolares, **DC:** ducto coletor, **M:** medula, **TC:** túbulo cortical, **G:** glomérulos.

Os componentes do SRA são expressos durante a vida embrionária em diversos órgãos, incluindo o rim e coração (Schutz et al., 1996).

A Ang II tem como atividade a estimulação do crescimento de vários tecidos, incluindo o tecido renal e o tecido cardíaco. Também já é conhecido que a ativação dos seus receptores AT₁ e AT₂ desempenha um papel importante no desenvolvimento cardiovascular e renal (Wolf, 1995; McEwan et al., 1998). O bloqueio do receptor AT₁ de angiotensina II durante o desenvolvimento fetal retarda o crescimento e provoca anormalidades no desenvolvimento do rim (Pryde et al., 1993; Tufro et al., 1995) e também inibe o crescimento dos cardiomiócitos em ratos neonatos (Sadoshima e Izumo, 1993), interferindo no crescimento do coração (Beinlich et al., 1991). O receptor AT₂ nos rins é altamente expresso durante a nefrogênese (Ozono et al., 1997; Grishko et al., 2003) e após o nascimento ocorre a redução na expressão deste receptor (Ozono et al., 1997). A expressão alterada destes receptores pode modificar a

com possíveis riscos para desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais (Mao et al., 2014) na vida pós-natal.

A deficiência no número de glomérulos predispõe o indivíduo a hipertensão no decorrer da vida. Esses distúrbios podem estar relacionados em parte a modificações na atividade do SRA (Coimbra et al., 2012).

Com base no exposto, este trabalho tem como objetivo investigar os efeitos do consumo de sal durante a gestação sobre alterações da estrutura cardíaca e renal em neonatos de proles de ratas Wistar.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo avaliar uma possível influência das dietas hipersódica e hipossódica durante a gestação sobre a estrutura cardíaca e renal e sobre a expressão dos componentes do sistema renina-angiotensina tecidual em neonatos de ratas Wistar.

Objetivos específicos:

1. Quantificar o volume dos compartimentos cardíacos e o diâmetro dos núcleos dos cardiomiócitos.
2. Quantificar o volume dos compartimentos renais e o número de glomérulos.
3. Avaliar a expressão proteica dos receptores AT1 e AT2 da angiotensina II no tecido renal e cardíaco.
4. Avaliar a expressão gênica da renina, do angiotensinogênio, da ECA e dos receptores AT1 e AT2 da angiotensina II.

3 MÉTODOS

Os experimentos propostos neste projeto de pesquisa identificado pelo número 044/14, foram avaliados e aprovados no dia 08 de maio de 2014 pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

3.1 Animais

Ratas Wistar com 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo da FMUSP, foram acondicionadas em gaiolas de plástico, em ambiente mantido a 25 °C, com períodos intercalados claro e escuro fixos de 12 horas, ração e água ad libitum. As ratas foram alimentadas com dieta normossódica (1,3% de cloreto de sódio) (Nuvilab CR1-Colombo, PR-Brasil) até completarem 12 semanas de idade, quando foram acasaladas.

3.2 Protocolo experimental do grupo materno

Para o acasalamento uma fêmea e um macho permaneceram na mesma gaiola de plástico até ocorrer a cópula que foi confirmada através de lavado vaginal, realizado todas as manhãs, através da infusão de 50 µl de soro fisiológico intravaginal com auxílio de uma pipeta automática e ponteira específica cuja ponta era posicionada no introito vaginal. Depois de infundido o soro foi imediatamente aspirado com a mesma pipeta e o lavado colocado em lâmina e corado com Leishman. Foi constatada a cópula no dia em que foram visualizados espermatozoides no esfregaço, este foi considerado como primeiro dia de gestação. A partir deste momento as ratas foram divididas em três grupos e alimentadas com diferentes concentrações de sódio na dieta (Harlan Teklad, Madison, WI - EUA) até o final da prenhez de acordo o protocolo apresentado na figura 1 (Alves-Rodrigues et al. 2013).

Dieta hipossódica (HO): 0,15% de cloreto de sódio + 25% de proteínas

Dieta normossódica (NR): 1,3% de cloreto de sódio + 25% de proteínas

Dieta hipersódica (HR): 8% de cloreto de sódio + 25% de proteínas

Figura1. Protocolo experimental do grupo materno. Fotomicrografia do lavado vaginal, as setas indicam a presença de espermatozoides.

3.3 Evolução Ponderal

As ratas foram pesadas semanalmente durante a gestação até o dia do parto. A medida do peso corpóreo foi realizada por meio de balança digital específica para pesagem de animais (modelo AS5500, Marte, São Paulo, Brasil).

3.4 Protocolos experimentais da prole

Após o nascimento, os recém-nascidos foram pesados, separados por gênero (machos e fêmeas) e sacrificados por decapitação nas primeiras 24 horas. Os rins e o coração foram coletados, pesados para estudo da estrutura cardíaca e renal. Uma parte dos órgãos foi acondicionado em *freezer* -80 °C.

3.5 Grupos experimentais da prole

NR: prole de mães alimentadas no período gestacional com dieta normossódica.

HO: prole de mães alimentadas no período gestacional com dieta hipossódica.

HR: prole de mães alimentadas no período gestacional com dieta hipersódica.

3.6 Avaliação histológica do coração e dos rins

Estereologia é uma técnica que nos permite analisar estruturas em três dimensões (3D) a partir de imagens bidimensionais produzidas a partir destas estruturas. Desta forma obtemos medidas reais, precisas e confiáveis das estruturas analisadas quanto a volume, área, comprimento e número.

3.7 Estereologia renal

Os rins foram pesados e processados rotineiramente para inclusão em parafina de maneira que cortes verticais fossem obtidos (Figura 2). Neste estudo optamos por utilizar cortes verticais, pois há a necessidade de reconhecimento da arquitetura do rim. Assim, o plano de referência horizontal foi definido como o eixo longo do rim e os cortes verticais referem-se a secções perpendiculares a ele (Baddeley et al., 1986).

Figura 2. Corte vertical do rim de rato neonato, a seta indica o eixo horizontal

3.8 Volume do Rim e seus compartimentos

O volume dos rins foi estimado pelo princípio de Cavalieri utilizando-se um sistema teste de pontos (Papadopoulos et al., 2007). Por este método é possível estimar o volume de um objeto de forma arbitrária, seccionando-o em fatias paralelas equidistante e multiplicando-se a distância entre os cortes pela somatória das áreas das faces de corte. As áreas das faces de corte ou transectos pode ser obtida facilmente pelo método de contagem de pontos. Para tanto os blocos contendo os rins foram exaustivamente seccionados de maneira sistemática, randômica e uniforme com auxílio de um micrótomo rotativo em cortes de 5 μm e a cada 60 cortes (ou 300 μm) 3 cortes consecutivos foram montados em lâminas (Figura 3). Para as fêmeas utilizamos 40 cortes de 5 μm totalizando 200 μm de distância entre os cortes.

O primeiro corte foi obtido por sorteio utilizando-se uma tabela de números randômicos no intervalo de 1 a 40 (número de cortes).

Figura 3. Representação esquemática do protocolo de amostragem sistemática, randômica e uniforme do rim. Um corte a cada 40 cortes foi obtido dois cortes consecutivos a este também foram montados em lâminas para contagem do número de glomérulos

Na Figura 3 está apresentada uma série de cortes histológicos que representam o esquema utilizado neste estudo para avaliação do volume renal e de seus compartimentos. Os cortes obtidos para avaliação do volume das estruturas renais foram corados com hematoxilina-eosina.

Para se estimar os volumes absolutos do rim (V_R) e seus compartimentos, a saber, córtex, medula e pelve, um sistema teste de pontos (área associada ao ponto = $500 \mu m^2$) foi sobreposto às secções (sempre o 1º corte da série de três cortes) e estas observadas com uma objetiva de 2,5 X, de maneira que a secção completa do rim possa ser visualizada (Figura 4).

Figura 4. Fotomicrografias de cortes longitudinais seriados de rim de ratos neonatos. Objetiva 2,5 X

O programa ImageJ [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>] (Papadopoulos et al., 2007) foi utilizado para gerar e sobrepor os sistemas teste e realizar as contagens (Figura 5).

Figura 5. Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos para estimativa do volume dos compartimentos renais utilizando o programa ImageJ

Os pontos incidentes sobre a estrutura de interesse (córtex, medula, pelve) foram contados e o princípio de Cavalieri aplicado de acordo com a seguinte fórmula:

$$V_{\text{compartimento}} = T \times a(p) \times \sum P_{\text{ts}}(\text{COMP})$$

onde “T” é a distância entre os cortes (200 µm), a (p) = é a área associada ao ponto e $\sum P_{\text{ts}}$ é a somatória de pontos incidentes no compartimento.

O volume total do rim foi obtido da mesma forma, sendo que neste caso a somatória de pontos sobre a estrutura de interesse refere-se à somatória de pontos totais incidentes sobre o córtex, medula e pelve renal, ou seja, sobre o rim como um todo.

$$V = \sum P_{\text{ts}}(\text{rim}) \times a(p)^*$$

3.9 Densidade numérica e número total de glomérulos

A densidade numérica (N_{GI}) dos glomérulos foi estimada utilizando o princípio do *Physical Disector* (Sterio, 1984).

Para esta análise é necessário que o mesmo campo visual seja fotografado (400 x) em cortes consecutivos com 15 μ m de distância entre si (1º e 3º corte da série *disector pair*). As imagens são analisadas ao mesmo tempo e os glomérulos foram contados (n_{GI}) quando os mesmos aparecem em um corte (*reference section*) mas não no corte consecutivo (*look up section*). Para aumentar a eficiência da contagem os cortes foram contados em ambos os sentidos. As bordas da imagem foram consideradas como a *frame* de contagem, considerando-se as margens superior e direita as linhas de inclusão e as margens inferior e esquerda as linhas de exclusão (Bruehl et al., 2005; Nyengaard, 1999).

Assim a densidade numérica de glomérulos foi calculada pela fórmula:

$$N_{GI} = \sum n_{GI} / V_{dis}$$

Onde o $\sum n_{GI}$ é a somatória do número de glomérulos contados e V_{dis} é o volume dos *disectors* avaliados.

O volume dos *disector* foi calculado segundo a fórmula:

$$V_{disector} = n_{par} \times a_{(imagem)} \times T$$

Onde n_{par} é o número de pares de campos analisados, $a_{(imagem)}$ é a área da imagem e “T” é a distância entre os cortes (neste caso 15 μ m).

O número total de glomérulos no rim foi obtido pela seguinte fórmula na qual a densidade numérica de glomérulos é multiplicada pelo volume total do córtex renal obtido pelo princípio de Cavalieri.

$$NT_{GI} = (N_{GI} \times V_{Cortex})$$

3.10 Estereologia cardíaca

Após a fixação do tecido cardíaco em formol tamponado, os tecidos foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e emblocados de forma que os cortes perpendiculares ao maior eixo pudessem ser obtidos. O processo de amostragem para análise morfológica dos ventrículos foi uniforme aleatória sistemática (SUR), (Gundersen, 2002). O coração foi seccionado seriadamente no sentido ápice-base em fatias de 350 µm de espessura e os cortes foram recolhidos em lâminas de vidro e coradas utilizando o método hematoxilina-eosina (Figura 6).

Figura 6. Corte transversal do coração de rato neonato

3.11 Volume do coração e dos compartimentos cardíacos

O volume total do coração e seus compartimentos foi obtido pelo método do princípio de Cavalieri descrito por Muhlfield et al.2010.

As lâminas foram digitalizadas e fotomicrografias (20x) dos cortes transversais e seriados do coração de ratos neonatos. Esta baixa ampliação foi utilizada para estimar o volume dos compartimentos e as imagens obtidas foram analisadas novamente utilizando usando o software ImageJ. (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

Para avaliar o volume (V) do tecido cardíaco uma grade de teste ponto foi sobreposta nas microfotografias de ampliação e foram contados os pontos incidentes nos seguintes compartimentos de interesse: ventrículo direito (VD), ventrículo esquerdo (VE), septo interventricular (SEP), cavidade do ventrículo direito (C_{VD}) e a cavidade do ventrículo esquerdo (C_{VE}) conforme mostra a figura 7.

Figura 7. Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos para estimativa do volume dos compartimentos cardíacos utilizando o programa ImageJ

O volume (V) do tecido cardíaco foi calculado pela seguinte fórmula:

$$V = \sum^{pts} (CORAÇÃO) \times a(p) \times T$$

Onde “T” é a distância entre os cortes (0,35 mm), a (p) é a área associada ao ponto projetada no tecido do coração (0,02 mm).

O volume de cada compartimento foi calculado pela seguinte fórmula:

$$V_V = \sum^{pts} COMP / \sum^{pt} Total$$

Onde $\sum^{pt} COMP$ é a soma dos pontos sobre o compartimento de interesse (VD, VE, SEP, C_{VE} e C_{VD}) contados em toda a seção e dividido $\sum^{pts} Total$ (soma dos pontos sobre todos os compartimentos).

3.12 Diâmetro transverso do núcleo do cardiomiócito

Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina. As lâminas foram digitalizadas no equipamento Pannoramic 250 3D - *Histech* (Budapest, Konkoly-Thege Miklós, Hungria). Para análise de imagem e quantificação do diâmetro transverso do núcleo do cardiomiócito foi utilizado o *software Pannoramic™ Viewer*, versão 1.15 (3DHISTECH Ltda; Budapeste, Hungria), em aumento de 40x. Para que uma análise e seleção dos núcleos a serem mensurados pudessem ser conduzidas de forma randômica aleatória, um sistema teste de pontos foi sobreposto no monitor do computador e somente foram medidos os núcleos sobrepostos por ponto. Foram feitas duas medidas perpendiculares entre si e foi calculada a média das medidas em micrômetros (μm) conforme exemplo na Figura 8. Foi considerada para análise estatística a média aritmética de 100 núcleos de cardiomiócitos por coração.

Figura 8. Exemplo da aplicação do campo do corte da estrutura cardíaca pelo software *Pannoramic Viewer*, com grid de pontos para medida do diâmetro do núcleo dos cardiomiócitos e representação das medidas perpendiculares do núcleo do cardiomiócitos

3.13 Expressão proteica por ELISA indireto

Esta técnica é comumente usada em laboratórios biomédicos, por meio de um ensaio imunoenzimático para a detecção e quantificação de uma determinada proteína em amostras de tecidos, soro ou plasma.

Para quantificação proteica dos receptores AT1 e AT2 de angiotensina II foram utilizados os seguintes anticorpos e diluições: anti-receptor tipo 1 de angiotensina II (1:30), produzido em coelho (Santa Cruz, sc 1173, Dallas, Texas, USA), anti-receptor tipo 2 de angiotensina II (1:30) produzido em coelho (Santa Cruz, sc-9040, Dallas, Texas, EUA), anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Fosfatase Alcalina produzido em cabra SIGMA-ALDRICH (Saint Louis, Missouri, EUA, A3687).

Os tecidos foram colocados em tubos de ensaio de plástico estéreis e em seguida foi acrescentado 500 µl de tampão (50 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA + 10% de sucrose, pH 7,4) e 5 µl de coquetel inibidor de protease (SIGMA Saint Louis,

Missouri, USA) e fluoreto de sódio 100 mM para cada tecido. Os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de um aparelho (IKA T10 *basic* ULTRA-TURRAX - Wilmington, North Carolina, USA).

Os homogenatos foram transferidos para tubos *Eppendorff* e centrifugados a 15000 x g por 10 minutos.

Após centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados por inversão do tubo e no pellet formado, foi adicionado 1000 µl tampão (50 mM Tris-Cl pH 7,4; 1 mM EDTA), com auxílio de uma pipeta o pellet foi ressuspensionado e novamente centrifugado a 15000 x g por 40 minutos. Mais uma vez, os sobrenadantes foram descartados e adicionado 500 µl de tampão (50 mM Tris-Cl, pH 7,4) sobre o pellet e homogeneizado com auxílio de uma pipeta até diluir por completo.

Para montagem da placa, foi feita a quantificação de proteína total do tecido e a concentração de proteína foi determinada usando kit *BCA protein assay* (*Pierce Protein Research* - Rockford, USA).

Quantidades iguais de proteína (1 µg) foram misturadas ao tampão Tris pH 7,4 a fim de completar um volume de 100 µL para cada poço em placas de poliestireno para *ELISA* (Costar 3590 – 96 well – flat bottom without lid, high binding).

A placa com as amostras foi deixada em ambiente limpo em temperatura ambiente, por 24 horas, até a secagem por evaporação.

Após este processo, a placa foi bloqueada em tampão de bloqueio (BSA 1%, sacarose 5%, ázida sódica 0,05%, PBS) por 180 minutos e incubadas com anticorpo primário e armazenadas a 4 °C *overnight* em agitação.

No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes durante cinco minutos em agitação leve com tampão PBS (200 µl por poço) e incubada com 100 µl de anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, por duas horas em agitação leve. Em seguida, foram feitas quatro lavagens com tampão PBS de cinco minutos. Após as lavagens, foi adicionado 100 µl substrato enzimático (tris-base 100 mM, substrato fosfatase Sigma 104) e realizada leitura em leitor de *ELISA* a um comprimento de onda entre 400-420 nm.

3.14 Expressão gênica dos componentes do SRA

3.15 Extração de RNA total dos rins e do coração

A extração do RNA total dos tecidos renal e cardíaco foi realizado através do método do Trizol. Para cada 50 mg de tecido, foi acrescentado 1,5 mL de Trizol® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) para cada tecido e homogeneizado em aparelho *Ultra-Turrax* (IKA T10 basic-Wilmington, North Carolina, USA).

Os homogenatos foram transferidos para tubos de 2 mL, livres de RNase e DNase, incubados por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Os homogenatos foram centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Em seguida, para a separação da fase orgânica e inorgânica os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos, onde foi adicionado 200 µL de clorofórmio. Após agitação vigorosa e incubação à temperatura ambiente por 2 minutos, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 4 °C e 12.000 x g. A fase incolor das amostras foi transferida para outro tubo, ao qual, foram acrescentados 500 µL de álcool isopropílico. As soluções foram homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e logo após centrifugadas por 10 minutos a 4 °C e 12.000 x g. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados por inversão do tubo e o *pellet* foi lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. Novamente, o material foi centrifugado (7.500 x g, 5 minutos, 4 °C) e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspensionado com 100 µL de água Milli-Q e esta solução foi incubada em banho seco a 65 °C por 10 minutos.

A quantificação do RNA total foi realizada com 1 µL de cada amostra através do espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific NanoDrop 2000 *spectrophotometer* - Rockford, USA). As leituras de absorbância foram realizadas nos comprimentos de onda 260 e 280 nm e o resultado apresentado em ng/µl. A relação A260/A280 deve apresentar valores entre 1,8 e 2,2 que representa bom grau de pureza.

3.16 Síntese de cDNA reação de transcriptase reversa (RT)

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada através da reação de transcriptase reversa utilizando-se a enzima transcriptase reversa (Improm-II Reverse Transcriptase, Promega Corporation, Madison, USA) no termociclador (DNA Engine, MJ Research, Massachusetts, USA). O protocolo para a síntese de cDNA foi dividido em três fases; sendo a primeira a fase de desnaturação, onde 1 µg de RNA total foi colocado em tubo livre de RNase e DNase e adicionado 1 µL de oligo deoxirribonucleotídeo T (dT) 150 ng/µL. Em seguida, foi completado o volume para 5 µL com água Milli-Q, logo após, os tubos foram colocados em termociclador (PTC-200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., USA), incubados a 70 °C por 5 minutos e rapidamente resfriados a 4 °C.

Para a segunda fase, chamada fase de anelamento, foi preparado uma solução (“mix”) com a seguinte proporção dos componentes: 4 µL de tampão de reação 5 X, 1 µL dNTP mix (10 mM), 2,4 µL de MgCl₂ (25 mM), 6,6 µL água Milli-Q e 1 µL ImProm II e adicionados a primeira fase. Em seguida, as amostras foram levadas ao termociclador utilizando uma programação de 25 °C por 5 minutos e depois 60 minutos a 42 °C. Na última fase ocorreu a inativação da transcriptase reversa por aquecimento a 70 °C por 15 minutos no termociclador. As amostras foram armazenadas em *freezer* a -20 °C.

3.17 Expressão gênica - reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)

A expressão gênica dos componentes do SRA tais como: renina, angiotensinogênio, ECA, receptor AT1 e receptor AT2 de angiotensina II no tecido renal e cardíaco foi analisada através da qPCR utilizando o Kit (Rotor-Gene™ SYBR® Green – QIAGEN, Hilden, Alemanha). As reações foram feitas em duplicatas, utilizando os reagentes e ciclos determinado pelo kit. As sequências dos *primers* dos genes analisados estão representadas na tabela 2. As análises das reações foram realizadas pelo programa Rotor Gene Q (QIAGEN, Hilden, Alemanha).

Tabela 2 - Sequências dos *primers* utilizados para qPCR

<i>Rattus norvegicus primers</i>	
GAPDH	S: 5'- GCA AGG ATA CTG AGA GCA AGA G - 3' AS: 5'- GGA TGG AAT TGT GAG GGA GAT G - 3'
Angiotensinogênio	S: 5'- CAC GGA CAG CAC CCT ATT T - 3' AS: 5'- GTT GTC CAC CCA GAA CTC AT - 3'
Renina	S: 5'- GGA CAC TGG CAC ATC CTA TAT C - 3' AS: 5'- ACC TGG CTA CAG TTC ACA AC - 3'
ECA	S: 5'- AGA CTT GCC TGT GAC CTT TC - 3' AS: 5'- CTG TGT AGA TGC TTG GGT GTA G - 3'
AT1	S: 5'- TGT CAT GAT CCC TAC CCT CTA C - 3' AS: 5'- GCC ACA GTC TTC AGC TTC AT - 3'
AT2	S: 5'- GCT GTG TTA ATC CCT TCC TGT A - 3' AS: 5'- TAG TCT CTC TCT TGC CTT GGA - 3'

Foi determinado o *cycle threshold* que representa o número de ciclos necessários para atingir o *threshold*. Para cada amostra de cDNA foi registrado o *cycle threshold* e comparado com o controle endógeno (gene normalizador) que deve ser definido para cada tipo de amostra, e neste caso foi utilizado GAPDH.

Para cálculo da expressão gênica foi utilizada a seguinte fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, no qual, $\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ do controle endógeno}$, considerando a eficiência do ensaio (90 a 110%) (Livak e Schmitgen, 2001).

3.18 Análise estatística

Para análise dos resultados deste estudo foi utilizado análise de variância de um ou dois fatores (*One-way ou two-way ANOVA*), quando pertinente, seguido do teste *ad-hoc* de *Tukey*, *Bonferroni* ou *Fisher*. Os cálculos foram efetuados através do software *GraphPad Prism*® versão 4.0 (GraphPad Software, Inc, Califórnia, EUA) ou *IBM*® *SPSS* versão 19.0 (Armonk, New York, EUA). Foi adotado como nível de significância estatística $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Evolução ponderal do grupo materno

O peso materno foi medido semanalmente durante a gestação. Não houve diferença entre os grupos HO e HR quando comparado ao grupo NR nas duas primeiras semanas de gestação. Na terceira semana de gestação o peso corpóreo foi maior no grupo HR comparado ao grupo HO (Figura 9).

Figura 9. Evolução ponderal durante a gestação (n=7-8/grupo) de ratas alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Bonferroni* HO vs HR * $p < 0,05$

4.2 Tamanho da prole

Não houve diferença no tamanho da prole e na proporção de machos e fêmeas da prole de mães que foram alimentadas com dietas hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica (HR) durante a gestação, conforme mostra Tabela 3.

Tabela 3 - Tamanho total da prole e número de machos e fêmeas

	HO	NR	HR
Tamanho da prole (número total de neonatos)	13,6±0,8 (8)	14±0,6 (7)	14±0,5 (9)
Número de machos	6,9±1,0 (8)	7,6±0,8 (7)	6,7±0,8 (9)
Número de fêmeas	6,7±0,6 (8)	6,4±0,7 (7)	7,4± 0,8 (9)

Os valores entre parênteses indicam o número de mães. Os resultados obtidos por média ± erro padrão da média. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* seguido de pós-teste de *Tukey*.

4.3 Peso ao nascimento da prole

O peso ao nascimento na Tabela 4 da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica foi menor do que o peso ao nascimento das proles de mães alimentadas com dieta normossódica e hipersódica, mantendo-se este mesmo resultado quando separamos a prole entre machos e fêmeas.

Tabela 4 - Peso corpóreo da prole ao nascimento de neonatos machos e fêmeas de mães que foram alimentadas com dietas hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica (HR) durante a gestação

	HO	NR	HR
Machos e fêmeas (g)	5,2±0,06 (108)* #	6,3±0,06 (98)	6,2±0,06 (127)
Machos (g)	5,4± 0,09 (55)* #	6,4±0,07 (53)	6,4±0,08 (60)
Fêmeas (g)	5,1± 0,07 (53)* #	6,0±0,09 (45)	6,0±0,08 (67)

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* seguido de pós-teste de *Tukey* *p <0,05 HO vs NR e #p<0,05 HO vs HR.

4.4 Massa cardíaca e massa renal ao nascimento

A massa cardíaca e renal ao nascimento de machos e fêmeas da prole não foi diferente entre os grupos, conforme mostra a Tabela 5.

Tabela 5 - Massa cardíaca e renal de neonatos machos e fêmeas de mães que foram alimentadas com dietas hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação

	HO	NR	HR
Massa cardíaca /peso corpóreo (g/10g)			
Machos	0,059±0,002 (23)	0,063±0,002 (28)	0,060±0,002 (26)
Fêmeas	0,061±0,002 (25)	0,062±0,001 (24)	0,059±0,002 (32)
Massa renal/ peso corpóreo (g/10g)			
Machos	0,094±0,003 (23)	0,099±0,002 (28)	0,092±0,004 (26)
Fêmeas	0,102±0,003 (25)	0,100±0,002 (24)	0,097±0,002 (32)

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* seguido de pós-teste de *Tukey*.

4.5 Números de glomérulos

O número de glomérulos de machos e fêmeas da prole não foi diferente entre os grupos (Figura 10 A e B). No entanto, o número de glomérulos foi maior em fêmeas do que em machos nos três grupos experimentais (Figura 10).

Figura 10. (A) Número de glomérulos por rim em neonatos machos (n= 4 a 6 por grupo). (B) Número de glomérulos por rim em neonatos fêmeas (n=6 por grupo). (C) Número de glomérulos por rim de neonatos machos e fêmeas da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* seguido de pós-teste de *Tukey* *p<0,05

4.6 Diâmetro transverso do núcleo do cardiomiócito dos ventrículos esquerdo e direito de neonatos machos da prole

Os diâmetros transversos dos núcleos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo (VE) e do ventrículo direito (VD) de machos da prole foi maior na prole que recebeu dieta hipersódica quando comparado com a prole que recebeu dieta normossódica (Figura 11).

Figura 11. (A) Diâmetro dos núcleos de cardiomiócitos (μm) do ventrículo esquerdo (VE). (B) Diâmetro do núcleo de cardiomiócitos (μm) do ventrículo direito (VD). (C) Cortes da estrutura cardíaca, corados com HE em baixa (20 X) e alta (400 X) ampliações, de neonatos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação (n= 5 a 6 por grupo). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* seguido de pós-teste de *Tukey* HR vs NR * $p < 0,05$

4.7 Diâmetro transverso dos núcleos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e direito de neonatos fêmeas da prole

A sobrecarga e restrição de sódio durante a gestação não afetou o diâmetro transverso dos núcleos dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo (VE) e do ventrículo direito (VD) de fêmeas da prole (Figura 12).

Figura 12. (A) Diâmetro dos núcleos de cardiomiócitos (μm) do ventrículo esquerdo (VE), (B) Diâmetro do núcleo de cardiomiócitos (μm) do ventrículo direito (VD), de neonatos fêmeas da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação (n= 5 a 6 por grupo). Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média

4.8 Expressão proteica do receptor AT1 de angiotensina II no rim de neonatos machos e fêmeas

A expressão proteica do receptor AT1 no rim de neonatos machos do grupo HO foi menor quando comparado ao grupo NR e HR. Nas fêmeas, a expressão proteica do receptor AT1 no rim não foi diferente entre os grupos experimentais. No entanto, a expressão proteica do receptor AT1 no rim foi maior em machos comparado às fêmeas conforme mostra a Figura 13.

Figura 13. Expressão proteica do receptor AT1 no rim de neonatos machos (A) e fêmeas (B) da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação (n=7 a 8 por grupo). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Fisher* * $p < 0,05$ vs NR, # $p < 0,05$ vs HR, ≠ $p < 0,05$ machos vs fêmeas

4.9 Expressão proteica dos receptores AT2 de angiotensina II no rim de neonatos machos e fêmeas

A expressão proteica do receptor AT2 foi menor no rim de machos e fêmeas da prole no grupo HO comparado ao grupo NR (Figura 14).

Figura 14. Expressão proteica do receptor AT2 no rim de machos (A) e fêmeas (B) de neonatos da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação (n=7 a 8 por grupo). Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Fisher* * $p < 0,05$

4.10 Expressão proteica dos receptores AT1 de angiotensina II no coração de neonatos machos e fêmeas

No coração de machos a expressão do receptor AT1 foi menor no grupo HO quando comparado aos grupos NR e HR. Não houve diferença entre os grupos em fêmeas da prole (Figura 15).

Figura 15. Expressão proteica do receptor AT1 no coração (A) machos, HO (n=8); NR (n=4); HR (n=7); (B) fêmeas, HO (n=8); (NR=7); HR (n=4) de neonatos da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Fisher* * $p < 0,05$ vs NR, # $p < 0,05$ vs HR, $\neq$ $p < 0,05$ machos vs fêmeas HO

4.11 Expressão proteica do receptor AT2 de angiotensina II no coração de neonatos machos e fêmeas

Não houve diferença entre os grupos experimentais e entre gêneros na expressão proteica do receptor AT2 no coração de machos e fêmeas, conforme mostra a Figura 16.

Figura 16. Expressão proteica do receptor AT2 no coração de neonatos (A) machos e (B) fêmeas da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica HO (n= 6 a 8 por grupo), normossódica NR (n= 7 a 8 por grupo) ou hipersódica HR (n= 7 a 8 por grupo) durante a gestação. Os valores estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Fisher* $*p<0,05$

4.12 Expressão gênica dos componentes do SRA no rim de neonatos machos e fêmeas da prole

A expressão da renina no rim de fêmeas da prole HO foi maior quando comparados aos grupos NR e HR. A ECA no rim de fêmeas foi menor no grupo HR quando comparado ao grupo NR e maior no grupo HO quando comparado ao grupo HR. No entanto, em machos esta diferença não alcançou significância estatística (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão gênica dos componentes do SRA (gene alvo/GAPDH) no rim de neonatos machos e fêmeas da prole de mães alimentadas com dietas hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica (HR) durante a gestação

Variáveis	Gênero	HO	NR	HR
Renina	Machos	1,88±0,34	1,06±0,17	1,62±0,16
	Fêmeas	1,86±0,58* #	0,89±0,22	0,83±0,28
AGTO	Machos	0,09±0,05	0,80±0,47	0,14±0,08
	Fêmeas	1,29±0,79	0,94±0,49	0,38±0,19
ECA	Machos	1,01±0,08	1,17±0,07	0,88±0,07
	Fêmeas	1,14±0,16 [#]	1,2±0,17	0,55±0,12*
AT1	Machos	0,89±0,09	1,11±0,10	2,09±1,26
	Fêmeas	0,86±0,12	0,87±0,13	0,60±0,09
AT2	Machos	0,76±0,05	1,04±0,06	1,44±0,68
	Fêmeas	0,82±0,06	0,89±0,08	0,93±0,08

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média de neonatos machos e fêmeas (n=8). Análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Fisher* * p<0,05 vs NR e #p<0,05 vs HR.

4.13 Expressão gênica dos componentes do SRA no coração dos neonatos machos e fêmeas

Não houve diferença entre os grupos experimentais na expressão gênica do angiotensinogênio, ECA e do receptor AT2 no coração de neonatos machos e fêmeas. A expressão do receptor AT1 no coração de fêmeas não foi diferente entre os grupos. No entanto, não foi detectado expressão gênica do receptor AT1 no coração de machos. Quando comparada expressão dos componentes do SRA entre os gêneros, a expressão da ECA no coração de fêmeas do grupo HO foi maior comparado aos machos do mesmo grupo (Tabela 7).

Tabela 7 - Expressão gênica dos componentes do SRA (gene alvo/GAPDH) no coração de neonatos machos e fêmeas da prole de mães alimentadas com dietas hipossódica (HO), normossódica (NR) ou hipersódica (HR) durante a gestação

Variáveis	Gênero	HO	NR	HR
AGTO	Machos	0,67±0,17	1,03±0,23	0,73±0,14
	Fêmeas	0,72±0,21	0,98±0,19	1,49±0,36
ECA	Machos	0,57±0,17 [#]	0,89±0,16	0,54±0,04
	Fêmeas	1,11±0,32	1,05±0,06	0,88±0,10
AT1	Machos	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
	Fêmeas	0,84±0,17	0,91±0,18	0,96±0,21
AT2	Machos	0,57±0,38	0,99±0,40	0,57±0,28
	Fêmeas	1,24±0,40	1,05±0,34	3,33±1,73

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média de neonatos machos e fêmeas (n=8). Análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Fisher* [#]*p*<0,05 machos vs fêmeas.

4.14 Volume renal

O volume renal total e de seus compartimentos (córtex, medula e pelve) não foi diferente entre os grupos (tabela 8).

Tabela 8 - Volume total renal e de seus compartimentos de neonatos machos e fêmeas de mães alimentadas durante a gestação com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica (HR)

	Gênero	HO	NR	HR
Rim total (mm ³)	Machos	7,04±0,47	7,44±0,22	8,20±0,46
	Fêmeas	6,73±0,61	5,84±0,44	7,25±0,98
Córtex (mm ³)	Machos	4,97±0,34	5,40±0,16	5,86±0,27
	Fêmeas	4,74±0,48	4,19±0,28	4,99±0,61
Medula (mm ³)	Machos	1,89±0,16	1,87±0,07	2,16±0,16
	Fêmeas	1,76±0,15	1,51±0,16	2,08±0,36
Pelve (mm ³)	Machos	0,18±0,04	0,17±0,02	0,18±0,06
	Fêmeas	0,22 ±0,03	0,14±0,04	0,18±0,04
Fração de volume do córtex (%)	Machos	0,71±0,01	0,73±0,004	0,72±0,01
	Fêmeas	0,70±0,01	0,72±0,02	0,70±0,01
Fração de volume da medula (%)	Machos	0,27±0,01	0,25±0,01	0,26±0,01
	Fêmeas	0,26±0,01	0,26±0,02	0,28±0,01
Fração de volume da pelve (%)	Machos	0,03±0,01	0,02±0,002	0,02±0,01
	Fêmeas	0,04±0,01	0,02±0,005	0,03±0,01

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média (n=6).

4.15 Volume cardíaco

O volume cardíaco total foi menor em machos da prole HO quando comparado ao grupo NR, não houve diferença no volume dos compartimentos (ventrículo direito, cavidade ventricular direita, septo interventricular, ventrículo esquerdo e cavidade ventricular esquerda), representados na tabela 9. O volume cardíaco total não foi diferente entre os grupos de fêmeas da prole. A fração de volume da cavidade do VE esquerdo foi menor no grupo HO do que no grupo HR e a fração de volume do septo interventricular foi maior no grupo HO do que no grupo HR conforme mostra na tabela 10.

Tabela 9 - Volume dos compartimentos cardíacos de neonatos machos da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica (HR)

	HO	NR	HR
Coração total (mm ³)	2,57±0,14*	3,09±0,12	3,09±0,20
Ventrículo direito (mm ³)	0,68±0,04	0,76±0,05	0,74±0,10
Cavidade ventricular direita (mm ³)	0,19±0,02	0,25±0,02	0,27±0,04
Septo (mm ³)	0,30±0,05	0,34±0,02	0,40±0,03
Ventrículo esquerdo (mm ³)	0,80±0,08	0,91±0,09	0,88±0,06
Cavidade ventricular esquerda (mm ³)	0,18±0,03	0,30±0,05	0,26±0,04
Fração de volume do ventrículo direito (%)	0,27±0,02	0,25±0,02	0,24±0,02
Fração de volume cavidade ventricular direita (%)	0,08±0,01	0,08±0,01	0,09±0,01
Fração de volume do septo (%)	0,12±0,01	0,11±0,01	0,13±0,003
Fração de volume ventrículo esquerdo (%)	0,31±0,02	0,29±0,02	0,29±0,02
Fração de volume cavidade ventricular esquerda (%)	0,07±0,01	0,10±0,01	0,08±0,01

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média (n= 5-6). Análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* seguido de pós-teste de *Bonferroni* *p<0,05 vs NR.

Tabela 10 - Volume dos compartimentos cardíacos de neonatos fêmeas da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica (HO), normossódica (NR) e hipersódica (HR)

	HO	NR	HR
Coração total (mm ³)	2,36±0,10	2,97±0,37	2,81±0,21
Ventrículo direito (mm ³)	0,71±0,08	1,01±0,13	0,84±0,07
Cavidade ventricular direita (mm ³)	0,22±0,01	0,38±0,09	0,30±0,03
Septo (mm ³)	0,21±0,03	0,15±0,02	0,18±0,03
Ventrículo esquerdo (mm ³)	0,65±0,05	0,72±0,08	0,78±0,08
Cavidade ventricular esquerda (mm ³)	0,21±0,02	0,31±0,04	0,29±0,03
Fração de volume do ventrículo direito (%)	0,30±0,03	0,34±0,02	0,30±0,01
Fração de volume cavidade ventricular direita (%)	0,09±0,002	0,12±0,02	0,11±0,01
Fração de volume do septo (%)	0,09±0,01*	0,05±0,00	0,06±0,01
Fração de volume ventrículo esquerdo (%)	0,27±0,01	0,25±0,02	0,28±0,01
Fração de volume cavidade ventricular esquerda (%)	0,09±0,01 [#]	0,10±0,01	0,10±0,004

Os valores obtidos estão expressos em média ± erro padrão da média (n= 5-6 por grupo). Análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* seguido de pós-teste *Bonferroni* * p<0,05 vs NR, [#]p <0,05 vs HR

5 DISCUSSÃO

O presente estudo foi planejado para avaliar os efeitos da restrição e da sobrecarga de sal na dieta durante a gestação sobre a estrutura e o sistema renina-angiotensina renal e cardíaco de ratos Wistar neonatos machos e fêmeas.

Uma importante constatação na avaliação do coração dos neonatos foi a evidência da existência de hipertrofia dos cardiomiócitos nos machos, mas não nas fêmeas da prole de mães expostas a uma sobrecarga de sal na dieta durante a gestação. Esta observação é baseada no maior diâmetro dos núcleos dos cardiomiócitos deste grupo. Optamos por avaliar o diâmetro do núcleo dos cardiomiócitos devido a sua imaturidade em neonatos o que dificulta a delimitação do diâmetro das células. Este método de avaliação de hipertrofia já foi validado em estudo anterior na literatura (Chahine et al., 2015). A hipertrofia dos cardiomiócitos foi constatada tanto no ventrículo esquerdo quanto no ventrículo direito o que indica, muito provavelmente, que o mecanismo responsável pelo achado não é decorrente de alterações hemodinâmicas, uma vez que a câmara direita é de baixa e a esquerda é de alta pressão. Um achado que merece comentários é a ausência de diferenças na massa cardíaca o que indica que esta variável não é a melhor maneira de avaliar hipertrofia cardíaca. O mecanismo responsável pela hipertrofia miocárdica em neonatos de mães expostas à sobrecarga de sal talvez seja semelhante ao constatado em animais adultos que consumiram dieta com elevado conteúdo de sal (Ferreira et al., 2010; Katayama et al., 2014). Uma outra observação relevante encontrada no presente estudo foi o menor volume cardíaco observado em machos, mas não em fêmeas da prole de mães alimentadas com dieta hipossódica.

Na tentativa de esclarecer melhor os mecanismos responsáveis pelas alterações estruturais cardíacas descritas na prole ao nascimento em resposta à variação no consumo de sal pelas mães, foram avaliados a expressão proteica e gênica de componentes do SRA no miocárdio. Não foi detectada expressão gênica do receptor AT1 em machos dos três grupos experimentais e também não foi detectada expressão proteica do receptor AT1 em machos do grupo HO. É conhecido que a ligação da angiotensina II ao receptor AT1 estimula a proliferação celular bem como o crescimento cardíaco (Gray et al., 1998). Com base neste conhecimento, a ausência de expressão proteica do receptor AT1 no coração de machos da prole de mães HO pode ser uma explicação para o menor

volume cardíaco observado neste grupo. Uma constatação do presente estudo que dá suporte a esta hipótese é a presença de expressão proteica de AT1 no coração de fêmeas da prole de mães HO sem redução do volume cardíaco neste grupo. Estudos adicionais serão necessários para melhor compreensão deste fenômeno.

Há que se mencionar a existência de estudo de outro grupo de pesquisa que foi capaz de medir a expressão gênica de receptor AT1 em fetos de ratos Sprague-Dawley com idade gestacional de 21 dias cujas mães foram alimentadas com dieta hipersódica (Ding et al., 2010). As diferenças entre as observações do mencionado grupo de pesquisa e as do presente estudo podem ser decorrentes de diferenças no protocolo experimental e na linhagem de animais. Ding et al., estudaram fetos de ratos Sprague-Dawley e no presente estudo foram avaliados recém-nascidos e ratos Wistar. Pode-se afirmar com razoável grau de certeza que tais achados não são fruto de erros nos métodos utilizados, uma vez foram realizadas numerosas repetições e tentativas de mudanças nos ensaios.

A influência da restrição de sal na dieta materna alterou a expressão proteica dos receptores AT1 e AT2 nos rins dos neonatos. O receptor AT1 foi menor na prole de mães expostas à restrição de sal durante a gestação no rim de machos, mas não de fêmeas. A expressão proteica do receptor AT2 nos rins também foi menor no mesmo grupo tanto em machos quanto em fêmeas. É conhecida a importância do sistema renina-angiotensina na nefrogênese (Guron e Friberg, 2000; Yosypiv IV e EL-Dahr, 2005; Woods et al., 2001; Moritz et al., 2003). Desta forma, o efeito do conteúdo reduzido de sal na dieta materna sobre a expressão proteica dos receptores de AngII pode resultar em alterações morfofuncionais renais na vida extrauterina. Porém, não foram observadas diferenças estruturais renais no primeiro dia de vida da prole. Isto, no entanto, não exclui a possibilidade de alterações acontecerem em momentos posteriores, como já observado no estudo Koleganova e colaboradores (2011).

Na avaliação da expressão gênica, o angiotensinogênio e os receptores AT1 e AT2 nos rins não foram influenciados pela variação no conteúdo de sal na dieta materna. No entanto, a expressão gênica da renina renal foi maior nas fêmeas da prole de mães expostas à restrição de sal e a expressão da ECA foi

menor na prole de mães expostas à sobrecarga de sal. Até o presente momento, a importância destes achados é ainda uma incógnita. Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão destes achados

A massa renal da prole ao nascimento não foi diferente entre os grupos, resultado semelhante foi descrito previamente por Koleganova et al., (2011). Da mesma forma que a massa renal ao nascimento, também não foi observado diferença no volume renal e de seus compartimentos (córtex, medula e pelve) e no número de glomérulos da prole ao nascimento entre os grupos experimentais. Há que se salientar que somente foram quantificados glomérulos maduros. É conhecido que a nefrogênese em roedores termina, cerca de duas semanas após o nascimento (Saxen e Sariola, 1987). Com base neste conhecimento, é possível que diferenças no número de glomérulos entre os grupos experimentais poderiam ter sido observadas se fossem contados todos os glomérulos, maduros e imaturos. Esta possibilidade encontra suporte no estudo de Koleganova et al. (2011), que observaram menor número de glomérulos na prole com uma semana de idade e essa alteração persistiu até a idade adulta, tanto na prole de mães alimentadas com dieta hipossódica quanto de dieta hipersódica durante o período gestacional como durante a lactação. Koleganova e colaboradores não esclareceram se a redução do número de néfrons em ratos foi decorrente da dieta materna durante a vida intrauterina ou durante o período de lactação. O conjunto de observações verificadas no presente estudo e no estudo de Koleganova et al., é sugestivo de que o menor número de glomérulos observados por estes últimos autores na prole de mães alimentadas com dieta hipossódica seja um fenômeno que ocorreu durante a lactação.

Uma observação interessante do atual estudo foi a constatação da existência de um dimorfismo de gênero no número de glomérulos. Fêmeas têm um número de glomérulos maior do que machos nos três grupos experimentais. Este dimorfismo persiste até a idade adulta como observado em estudo prévio do nosso laboratório (Da Silva et al., 2003).

Chama a atenção o dimorfismo de gênero observado em neonatos decorrente da variação no conteúdo de sal na dieta materna. Muito possivelmente, o mecanismo responsável por este dimorfismo não é um mecanismo que envolve hormônios sexuais (Pardo et al., 2004). As

consequências fisiológicas e os mecanismos envolvidos na ontogenia sexo-específicas das variáveis estudadas que apresentaram diferenças no presente estudo merecem mais observações. Futuras investigações são necessárias para contribuição do estudo entre gêneros para retardar progressão de doenças renais e cardíacas podem nos ajudar no desenvolvimento de estratégias para retardar o processo patológico antes da idade adulta.

O ganho de peso materno na terceira semana de gestação e o peso da prole ao nascimento foi menor no grupo de ratas alimentadas com dieta hipossódica. Isto confirma resultados de estudos anteriores realizados em nosso laboratório (Vidinho et al., 2004; Alves-Rodrigues et al., 2013 e Siqueira et al., 2015). Alves-Rodrigues et al. (2013) observaram que o consumo alimentar na terceira semana de gestação em ratas alimentadas com dieta hipossódica é menor o que pode explicar o menor ganho de peso corpóreo neste grupo, bem como o menor peso da prole ao nascimento. Há evidências de que o baixo peso ao nascimento está associado a um número menor de néfrons e a uma progressão acelerada de doença renal, resultado já observado em humanos (Hallan et al., 2008), além, de risco aumentado para doenças cardiovasculares e renais na idade adulta (Barker et al., 1989; Hoy et al., 1999). Os resultados deste estudo indicam alterações na prole ao nascimento.

Há que se mencionar a existência de escassos estudos de consequências decorrentes de alterações induzidas durante a gestação sobre a prole no primeiro dia de vida pós-natal. Esta informação dá suporte a originalidade do presente estudo.

Em resumo, a sobrecarga e a restrição de sal durante a gestação estão vinculadas a alterações na estrutura cardíaca da prole ao nascimento e de alterações no SRA tecidual tanto nos rins quanto no coração.

6 CONCLUSÃO

As observações deste estudo permitem afirmar que tanto excesso quanto restrição de sal durante a vida intrauterina estão associadas a alterações na prole já detectáveis no primeiro dia de vida extrauterina. É conhecido que o consumo de sal é elevado em todas as populações inclusive durante a gestação e que restrição de sal é uma ferramenta terapêutica na doença hipertensiva da gestação e na pré-eclâmpsia. Com base nestes conhecimentos, as constatações do presente estudo têm importância translacional e sugerem a necessidade de estudos adicionais em seres humanos.

7 REFERÊNCIAS

Alves-Rodrigues EN, Veras MM, Rosa KT, De Castro I, Furukawa LN, Oliveira IB, Souza RM, Heimann JC. Salt intake during pregnancy alters offspring's myocardial structure. *Nutr Metab Cardiovasc Metab*. 2013; 23: 481-86.

Ahn J, Varagic J, Slama M, Susic D, Frohlich ED. Cardiac structural and functional responses to salt loading in SHR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287: H767-72.

Baddeley AJ, Gundersen HJG, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc*. 1986; 142: 259–76.

Bagby SP. Maternal nutrition, low nephron number, and hypertension in later life: pathways of nutritional programming. *J Nutr*. 2007; 137:1066–72.

Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989; 2: 577-80.

Bauer R, Walter B, Bauer K, Klupsch R, Patt S, Zwiener U. Intrauterine growth restriction reduces nephron number and renal excretory function in newborn piglets. *Acta Physiol Scand*. 2002; 176: 83-90.

Beinlich CJ, White GJ, Barker KM, Morgan HE. Angiotensin II and left ventricular growth in newborn pig heart. *J Mol Cell Cardiol* .1991; 23:1031-38.

Bertram J F, Mcewen L A C, Egan G F Gretz N, Baldelomar E, Beeman S C, Bennett K M, Scott C. Why and how we determine nephron number .Review *Pediatr Nephrol*. 2014; 29: 575–80.

Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomerular and blood pressure. Less of one more the other? *Am J Hypertens*. 1988; 1: 335-47.

Brüel A, Nyengaard JR. Design-based stereological estimation of the total number of cardiac myocytes in histological sections. *Basic Res Cardiol*. 2005; 100: 311-19.

Cardoso HD, Cabral EV, Vieira-Filho LD, Vieyra A, Paixão AD. Fetal development and renal function in adult rats prenatally subjected to sodium overload. *Pediatr Nephrol*. 2009; 24: 1959-65.

Chahine MN, Mioulane M, Sikkil MB, O'Gara P, Dos Remedios CG, Pierce GN, Lyon AR, Földes G, Harding SE. Nuclear pore rearrangements and nuclear trafficking in cardiomyocytes from rat and human failing hearts. *Cardiovasc Res*. 2015; 1:105:31-43.

Coimbra TM, Francescato HD, Balbi AP, Marin EC, Costa RS. Renal Development and Blood Pressure in Offspring from Dams Submitted to High-Sodium Intake during Pregnancy and Lactation. *Int J Nephrol*. 2012; 919128.

Da Silva AA, De Noronha IL, De Oliveira IB, Malheiros DM, Heimann JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc*. 2003; 13: 133-9.

Ding Y, Lv J, Mao C, Zhang H, Wang A, Zhu L, Zhu H, Xu Z. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes. *J Hypertens*. 2010; 28:1290-7.

Egan BM, Weder AB.; Petrin J.; Hoffman R G. Neurohumoral and metabolic effects of short-term dietary NaCL restriction in man. *Am. J. Hypertens*. 1991; 4: 416-21.

Eriksson JG, Forsen TJ, Kajantie E, Osmond C, Barker DJ. Childhood growth and hypertension in later life. *Hypertension*. 2007; 49: 1415–21.

Ferreira DN, Katayama IA, Oliveira IB, Rosa KT, Coelho MS, Casarini DE, Heimann JC. Salt-induced cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to a blood pressure-independent mechanism in Wistar rats. *J Nutr*. 2010; 140: 1742–51.

Forsen T.; Eriksson J, Tuomilehto J, Reunanen A, Osmond C, Barker D.J.P. The fetal and childhood growth of persons who develop type 2 diabetes. *Ann of Intern Med*. 2000; 133: 176-82.

Fröhlich ED, Chien Y, Sesoko S, Pegram BL. Relationship between dietary sodium intake, hemodynamics, and cardiac mass in SHR and WKY rats. *Am J Physiol*. 1993; 264: R30–4.

Fliser D, Nowack R, AllendorF-Ostwald N, Kohl B, Hübinger A., Ritz E. Serum lipid changes on low salt – effect of alpha-1 adrenergic blockade. *Am. J. Hypertens*. 1993; 6: 320-4.

García-Villalba P, Denkersa ND, Wittwerb CT, Hoffa C, Nelson RD, Maucha TJ. Real-Time PCR Quantification of AT1 and AT2 Angiotensin Receptor mRNA Expression in the Developing Rat Kidney. *Nephron Exp Nephrol.* 2003; 94: 154-9.

Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF-beta 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res.* 1998; 40: 352-63.

Grishko V, Pastukh V, Solodushko V, Gillespie M, Azuma J, Schaffer S. Apoptotic cascade initiated by angiotensin II in neonatal cardiomyocytes: role of DNA damage. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H2364-72.

Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol.* 1989; 257: F850-58.

Gundersen HJ. The smooth fractionator. *J Microsc.* 2002; 207: 191-210.

Guron G, Friberg P. An intact renin-angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens.* 2000; 18: 123–137.

Hallan S, Euser AM, Irgens LM, Finken MJ, Holmen J, Dekker FW. Effect of intrauterine growth restriction on kidney function at young adult age: the Nord Trøndelag Health (HUNT 2) Study. *Am J Kidney Dis.* 2008; 51:10-20.

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; 56:1072-7.

Iosipiv IV, Schroeder M. A role for angiotensin II AT1 receptors in ureteric bud cell branching. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 285: F199-207. Epub 2003 Mar 25.

Jung FF, Bouyounes B, Barrio R, Tang SS, Diamant D, Ingelfinger JR. Angiotensin converting enzyme in renal ontogeny: hypothesis for multiple roles. *Pediatr Nephrol.* 1993; 7: 834– 40.

Kakuchi J, Ichiki T, Kiyama S, Hogan BL, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I. Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in the mouse. *Kidney Int.* 1995; 47:140-7.

Katayama IA, Pereira RC, Dopona EP, Shimizu MH, Furukawa LN, Oliveira IB, Heimann JC. High-salt intake induces cardiomyocyte hypertrophy in rats in response to local angiotensin II type 1 receptor activation. *J Nutr.* 2014; 144:1571-8.

Koleganova N, Piecha G, Ritz E, Becker LE, Müller A, Weckbach M, Nyengaard JR, Schirmacher P, Gross-Weissmann ML. Both high and low maternal salt intake in pregnancy alter kidney development in the offspring. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011; 301:F344-54.

Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18:208–14.

Law CM, Shiell AW, Newsome CA, Syddall HE, Shinebourne EA. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from systematic review of the literature. *J Hypertens.*1996; 14: 935-41.

Lind L.; Lithell H.; Gustafsson I.B.; Pollare T.; Liunghall S. Metabolic cardiovascular risk factors and sodium sensitivity in hypertensive subjects. *Am. J. Hypertens.*1992; 5: 502-5.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001; 25: 402-8.

Mao C, Shi L, Li N, Xu F, Xu Z. Development of Local RAS in Cardiovascular/Body Fluid Regulatory Systems and Hypertension in Fetal Origins. Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration. Boca Raton (FL): CRC Press. *Frontiers in Neuroscience.* 2014; Chapter 13.

McEwan PE, Gray GA, Sherry L, Webb DJ, Kenyon CJ. Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation.*1998; 15; 98: 2765-73.

Mozaffarian D, Fahimi S, Singh GM, Micha R, Khatibzadeh S, Engell RE, Lim S, Danaei G, Ezzati M, Powles J. Global sodium consumption and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med.* 2014. 14; 371: 624-34.

Moritz K M, Dodic M, Wintour E. M. Kidney development and the fetal programming of adult disease. *Bioessays.* 2003; vol. 25: 212–20.

Mühlfeld C, Nyengaard JR, Mayhew TM. A review of state-of-the-art stereology for better quantitative 3D morphology in cardiac research. *Cardiovasc Pathol*. 2010; 19: 65-82.

Nigam SK, Aperia AC, Brenner BM. Development and maturation of the kidney *The kidney*. 1996; 72–98.

Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. *Am J Physiol*. 1997; 272: R662-68.

Nyengaard JR. Stereologic methods and their application in kidney research. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10:1100-23.

Ozono R, Wang ZQ, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension*. 1997; 1238–46.

Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. *Physiol Rev*. 2006; 86: 747-803.

Papadopoulos F, Spinelli M, Valente S, Foroni L, Orrico C, Alviano F, Pasquinelli G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol*. 2007; 31: 401-07.

Pardo IM, Geloneze B, Tambascia MA, Pereira JL, Barros Filho AA. Leptin as a marker of sexual dimorphism in newborn infants. *J Pediatr*. 2004; 80: 305-8.

Pearson AM, Wolzak AM. Salt-its use in animal products- a human health dilemma. *J Anim Sci*. 1982; 54:1263-78.

Prieto M, Dipp S, Meleg-Smith S, El-Dahr SS. Ureteric bud derivatives express angiotensinogen and AT1 receptors. *Physiol Genomics*. 2001; 6: 29–37.

Powles J, Fahimi S, Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Ezzati M, Engell RE, Lim SS, Danaei G, Mozaffarian D. Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide. *BMJ Open*. 2013; 23; 3: e003733.

Prada PO, Okamoto MM, Furukawa LN, Machado UF, Heimann JC, Dolnikoff MS. High-or-low salt diet from weaning to adulthood: Effect on insulin sensitivity in Wistar rats. *Hypertension*. 2000; 35: 424-29.

Pryde PG, Sedman AB, Nugent CE, Barr M. Angiotensin-converting enzyme inhibitor fetopathy. *J Am Soc Nephrol*. 1993; 3: 1575–82.

Re RN. Tissue renin angiotensin systems. *Med Clin North Am*. 2004; 88:19–38.

Ritz E, Koleganova N, Piecha G. Role of sodium intake in the progression of chronic kidney disease. *J Ren Nutr*. 2009; 19: 61-2.

Sadoshima J, Izumo S. Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res*. 1993; 73: 413-23.

Saxen L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol*. 1987; 1: 385-92.

Siqueira FR, Furukawa LN, Oliveira IB, Heimann JC. Glucose metabolism and hepatic Igf1 DNA methylation are altered in the offspring of dams fed a low-salt diet during pregnancy. *Physiol Behav*. 2015;1 7; 154: 68-75.

Schutz S, Lemoullec JM, Corvol P, Gasc JM. Early expression of all the components of the renin-angiotensin-system in human development. *Am J Pathol*. 1996; 149: 2067–79.

Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc*. 1984; 134: 127-36.

Tufro-MC, Reddie A, Romano LM, Harris JM, Ferder L, Gomez RA. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am J Physiol*. 1995; 269: F110-15.

Vidinho AF JR, Da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa LN, Campos RR, De Toledo Bergamaschi CM, Carpinelli AR, Quintão EC, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult wistar rats. *Pediatr Res*. 2004; 56: 842-8.

Wolf G. Angiotensin as a renal growth promoting factor. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 377: 225–36.

Woods LL, Weeks DA, Rasch R. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: Role of nephrogenesis. *Kidney Int.* 2004; Vol. 65, pp. 1339–48.

Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal Protein Restriction Suppresses the Newborn Renin-Angiotensin System and Programs Adult Hypertension in Rats. *Pediatric Res.* 2001; 49: 460-7.

Yang z, Huffman SL. Nutrition in pregnancy and early childhood and associations with obesity in developing countries. *Matern child nutr.* 2013; 1: 105-19.

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; 20: 1219-29. Epub.

Zohdi V, Moritz KM, Bubb KJ, Cock ML, Wreford N, Harding R, Black MJ. Nephrogenesis and the renal renin-angiotensin system in fetal sheep: effects of intrauterine growth restriction during late gestation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293 saxen: R1267-73.

8 APÊNDICE

ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

-----Mensagem Original-----

From: Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases

Sent: Monday, January 04, 2016 3:57 PM

To: jheimann@usp.br

Subject: Submission Confirmation

Title: High and low salt intake during pregnancy: impact on cardiac and renal structure in newborns

Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

Research Paper

Dear Dr. Joel C. Heimann,

Your submission entitled "High and low salt intake during pregnancy: impact on cardiac and renal structure in newborns" has been received by Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nmcd/>.

Your username is: jheimann@usp.br