

**NAUILO LIMA COSTA**

**Sobrecarga de sal durante o período perinatal : efeito sobre a modulação do Sistema Renina-Angiotensina em resposta à variação no consumo de sal na prole adulta**

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa

São Paulo

2008

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Costa, Nauilo Lima

Sobrecarga de sal durante o período perinatal : efeito sobre a modulação do Sistema Renina-Angiotensina em resposta à variação no consumo de sal na prole adulta / Nauilo Lima Costa. -- São Paulo, 2008.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Luzia Naoko Shinohara Furukawa.

Descritores: 1.Sistema renina-angiotensina 2.Cloreto de sódio na dieta 3.Hipertensão 4.Gravidez 5.Inibidores de enzima conversora da angiotensina 6.Dieta hipossódica 7.Óxido nítrico sintase tipo 1 8.Ciclooxigenase 2

USP/FM/SBD-397/08

## DEDICATÓRIA

À **Antonia Lima da Costa**, minha querida mãe, que me ensinou que os árduos obstáculos da vida são insignificantes quando a sabedoria e a persistência prevalecem: “Todo sofrimento é relativo diante da dimensão do que é o viver”.

Aos meus irmãos Antonio, Júnior, Goretti, Águida, Marluce e Vânia pelo constante apoio, mesmo que à longa distância.

Ao amigo Jeffrey Arseneau (*in memoriam*), exemplo de honestidade e amor pela vida, apesar de tudo...

À família que me “adotou” em terras paulistanas: Maurício, Genyr, Bete, Juliana, Caio e Afonso.

## **AGRADECIMENTOS**

**Especiais à Doutora Luzia Naôko Shinohara Furukawa**, por ter me orientado com paciência e dedicação e ter cumprido com competência o seu papel de orientadora, estando sempre presente em todos os momentos, desde a elaboração deste projeto à sua realização plena.

**Especiais ao Professor Doutor Joel Claudio Heimann**, por ter me aceito no grupo do laboratório e pela oportunidade de desenvolver este trabalho no seu laboratório.

**Especiais à Débora Rothstein Ramos**, cuja colaboração foi fundamental em todas as etapas de elaboração deste trabalho.

À doutora Miriam Serman Dolnikoff, pela amizade e ensinamentos.

Ao Dr. Carlos Antonio Nascimento pela colaboração na determinação dos níveis séricos de nitrito.

À doutora Karen Lucasechi Lopes Jang pelo auxílio na elaboração dos experimentos do Western Blotting para a COX-2.

À Mestra Ivone Braga de Oliveira, pela inestimável ajuda, pela amizade e dedicação; colaborando sempre em todos os projetos do nosso laboratório.

Aos meus queridos colegas de laboratório, Danielle Ferreira, Michella Araújo, Sandra Márcia Leandro, Daniela Mirandola, Armando Vidonho, Edson R. Júnior, Ísis katayama, Michele Sousa e Heloísa Negri pela amizade e pelo constante apoio durante a realização desta dissertação.

À mestra Luciana Carvalho pelo auxílio na confecção das lâminas e cortes histológicos.

Ao Dr. Isac de Castro, pela sua importante contribuição na análise estatística.

Aos amigos Walter Campestre e Janice da Graça Pião da Silva pela dedicação e apoio no cuidado dos animais e materiais utilizados neste trabalho.

À amiga Tatiana Tavares por ter me apresentado ao chefe do Laboratório de Hipertensão Experimental.

Às secretárias Denise Cristina Duarte e Marineide Ribeiro pela disponibilidade e grande ajuda em todos os momentos.

A todos os colegas do Lim 16 .

À FAPESP pelo suporte financeiro essencial, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.

**“Nascemos para manifestar a glória do universo que existe em nosso ser. Isto não existe apenas em um de nós, mas em todos nós. À medida que permitimos deixar que a nossa própria luz brilhe, inconscientemente, damos às outras pessoas permissão para que façam o mesmo. E conforme nos libertamos de nossos próprios medos, nossa presença, automaticamente, tende a promover a libertação dos outros”.**

**Nelson Mandela**

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	19
3. MÉTODOS .....	21
3.1 Protocolo experimental .....	22
3.2 Teste de estímulo e inibição da liberação de renina.....	25
3.3 Método de quantificação dos ramos vasculares com grânulos de renina (%)......	27
3.4 Avaliação da expressão do mRNA por RT-PCR .....	29
3.4.1 Extração de RNA total .....	29
3.4.2 Síntese de DNA complementar por transcrição reversa (RT) .....	31
3.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) .....	32
3.4.4 Eletroforese em gel de agarose.....	33
3.5 Avaliação da expressão protéica da COX-2 por Western blotting.....	35
3.6 Avaliação da expressão da nNOS renal por imuno- histoquímica.....	36
3.6.1 Preparo do tecido renal .....	36
3.6.2 Processo de parafinização do tecido renal.....	37
3.6.3 Processo de silanização de lâminas.....	38
3.6.4 Reação de imuno-histoquímica para nNOS .....	38
3.6.5 Desparafinização para reações de imuno-histoquímica.....	39
3.6.6 Uso do forno de microondas na técnica de imuno- histoquímica .....	39
3.6.7 Técnica de LSB por sistema HRP .....	40
3.7 Métodos analíticos.....	41
3.7.1 Medida da atividade da renina plasmática (ARP).....	41
3.7.2 Determinação da concentração de aldosterona sérica.....	42

3.7.3	Avaliação da atividade da renina no córtex renal (ARR) .....	42
3.7.4	Determinação da concentração sérica de nitrito.....	43
3.8	Análise estatística.....	43
4.	RESULTADOS .....	44
4.1	Grupo materno .....	45
4.1.1	Reprodução materna.....	45
4.1.2	Evolução ponderal.....	46
4.1.3	Pressão arterial caudal.....	47
4.2	Prole feminina.....	49
4.2.1	Evolução ponderal.....	49
4.2.2	Pressão arterial caudal.....	50
4.2.3	Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio .....	50
4.2.3.1	Pressão arterial caudal .....	51
4.2.3.2	Quantificação dos ramos vasculares com grânulos de renina (%) .....	53
4.2.3.3	Medida da atividade da renina no córtex renal .....	55
4.2.3.4	Medida da atividade da renina plasmática .....	57
4.2.3.5	Expressão do mRNA da renina na medula .....	59
4.2.3.6	Expressão do mRNA da renina no córtex.....	61
4.2.3.7	Aldosterona sérica .....	63
4.2.3.8	Concentração sérica de nitrito .....	64
4.2.3.9	Expressão do mRNA da nNOS na medula .....	66
4.2.4	Expressão do mRNA da nNOS no córtex.....	68
4.2.5	Expressão da nNOS renal por imuno-histoquímica .....	70
4.2.6	Expressão do mRNA da COX-2 na medula.....	71
4.2.7	Expressão do mRNA da COX-2 no córtex.....	73
4.2.8	Expressão protéica da COX-2 na medula por Western Blotting.....	75
4.2.9	Expressão protéica da COX-2 na córtex por Western Blotting.....	75
5.	DISCUSSÃO .....	76
6.	CONCLUSÕES .....	87
7.	ANEXOS.....	89
9.	REFERÊNCIAS .....	116



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ - SMA –  $\alpha$ - actina da musculatura lisa

AA – Ácido araquidônico

AC – Adenil ciclase

ADH – Vasopressina

All – Angiotensina II

ALDO – Aldosterona

ANG 1,7 – Angiotensina 1,7

ANG I – Angiotensina I

ANG III – Angiotensina III

ANG IV – Angiotensina IV

ARP – atividade de renina plasmática

AT1 – Receptor do tipo 1 da ANG II

AT2 – Receptor do tipo 2 da ANG II

cAMP – monofosfato de adenosina cíclico

Cap – Captopril

cDNA – DNA complementar

cGMP – Monofosfato de guanosina cíclico

cNOS – Óxido nítrico sintase constitutiva

COX – Ciclooxygenase

COX-1 – Ciclooxygenase 1

COX-2 – Ciclooxygenase 2

DNA – Ácido desoxirribonucléico

ECA – Enzima conversora de angiotensina I

ECA2 ou ACE2 – Enzima conversora de angiotensina tipo 2

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial

GFR – Taxa de filtração glomerular

HCl – Ácido Clorídrico

HIPER – Teste de sobrecarga de NaCl 8%

HO – Dieta hipossódica

HR1 – Dieta hipersódica 1

HR2 – Dieta hipersódica 2

IP – Intraperitoneal

LSAB – Labeled Streptavidin Biotin Method

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NR – Dieta normossódica

PA – Pressão arterial

PAC – Pressão arterial caudal

PG2 – Prostaglandina G2

PGE – Prostaglandina E

PGF – Prostaglandina F

PGH2 – Prostaglandina H2

PGI2 – Prostaciclina

PKA – Proteína quinase A

PL – Fosfolipase

PLA – Fosfolipase A

PLB – Fosfolipase B

PLC – Fosfolipase C

PLD – Fosfolipase D

RBF – Fluxo sanguíneo renal

RNA – Ácido ribonucléico

RT-PCR – Reação de cadeia da polimerase por transcrição reversa

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – SDS-eletroforese em gel de poliacrilamida

sGC – Guanilato ciclase solúvel

SRA – Sistema renina-angiotensina

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

TGF – Feedback túbulo-glomerular

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Seqüência dos “primers” utilizados.....	34
<b>Tabela 2:</b>	“Melting Temperature” (T <sub>m</sub> ) e nº de ciclos (RT-PCR) determinados para a córtex e medula renal.....	34
<b>Tabela 3:</b>	Grupos maternos. Falha da concepção, relação filhotes/rata e óbitos de mães que receberam dieta normossódica (NR = 1,3% de NaCl), hipersódica 1 (HR1 = 4,0% de NaCl) ou hipersódica 2 (HR2 = 8,0% de NaCl) da 8 <sup>a</sup> a 15 <sup>a</sup> semana.....	46
<b>Tabela 4:</b>	Evolução ponderal materna da 8 <sup>a</sup> a 17 <sup>a</sup> semana de vida .....	99
<b>Tabela 5:</b>	Pressão arterial caudal (PAC) materna antes, durante e após a gestação.....	100
<b>Tabela 6:</b>	Evolução ponderal das proles femininas, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR), hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR) durante a gestação. As proles receberam dieta normossódica, independente da dieta que as mães receberam.....	101
<b>Tabela 7:</b>	Pressão arterial caudal (mmHg) das proles femininas da 6 <sup>a</sup> a 12 <sup>a</sup> semana de vida, cujas mães receberam respectivamente dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação.....	102
<b>Tabela 8:</b>	Pressão arterial caudal (PAC) das proles femininas do grupo controle e nos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação .....	103
<b>Tabela 9:</b>	Ramos vasculares com grânulos de renina nas proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga de sódio (HIPER), cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação .....	104
<b>Tabela 10:</b>	Atividade da renina no córtex renal das proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam, as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação .....	105

- Tabela 11:** Atividade de renina plasmática das proles femininas do grupo controle e nos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação ..... 106
- Tabela 12:** Expressão do mRNA da renina da medula renal das proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam, as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação..... 107
- Tabela 13:** Expressão do mRNA da renina no córtex renal das proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação..... 108
- Tabela 14:** Concentração sérica de aldosterona das proles femininas do grupo basal e nos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação .....63
- Tabela 15:** Concentração sérica de nitrito nas proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam, as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação..... 109
- Tabela 16:** Expressão do mRNA da nNOS na medula do rim nas proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação..... 110
- Tabela 17:** Expressão do mRNA da nNOS no córtex do rim das proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação..... 111
- Tabela 18:** Expressão do mRNA da COX-2 medula do rim nas proles do grupo controle e nos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação..... 112

- Tabela 19:** Expressão do mRNA da COX-2 no córtex do rim nas proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga(HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação..... 113
- Tabela 20:** Expressão protéica de COX-2 na medula renal das proles do grupo basal e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga de sódio (HIPER), cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação ..... 114
- Tabela 21:** Expressão protéica de COX-2 na córtex renal das proles do grupo basal e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação ..... 115

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Grupo materno. As mães receberam dieta normossódica (NR), hipersódica I (HR1) ou hipersódica II (HR2) da gestação até o nascimento da prole. A prole, logo depois do nascimento, recebeu dieta NR independentemente da dieta materna.....22
- Figura 2.** Grupos de proles femininas, cujas mães receberam dieta NR (pNR), HR1 (pHR1) ou HR2 (pHR2). Desde o nascimento até a 12<sup>a</sup> semana de vida, as proles receberam dieta normossódica, independentemente da dieta materna. \*Teste de estímulo ou inibição da secreção de renina realizados na prole adulta. ....24
- Figura 3.** Teste de estímulo ou inibição da liberação de renina na prole feminina com 12 semanas de idade. ....25
- Figura 4.** Método de quantificação dos ramos vasculares com grânulos renina. ....28
- Figura 5.** Fotomicrografias da rede renovascular. As setas (figura A) mostram grânulos de reninas em torno da arteríola, estimulados pelo uso de captopril, enquanto a cabeça de seta (figura B), mostra uma arteríola sem grânulo de renina. ....28
- Figura 6.** Evolução ponderal das mães que receberam dieta NR (normossódica, 1,3% de NaCl), HR1 (hipersódica 4,0% de NaCl) ou HR2 (hipersódica 8,0%de NaCl) da 8<sup>a</sup> a 15<sup>a</sup> semana de gestação. Após o nascimento da prole, as mães receberam dieta normossódica nacional (Nuvilab). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (Two way-ANOVA). ....47
- Figura 7.** Pressão arterial caudal das mães que receberam dieta NR (normossódica, 1,3% de NaCl), HR1 (hipersódica, 4,0% de NaCl) ou HR2 (hipersódica, 8,0% de NaCl) desde a 8<sup>a</sup> semana a 15<sup>a</sup> semana de vida. Após o nascimento da prole, as mães passaram a receber dieta normossódica (Nuvilab). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (Two way-ANOVA). ....48
- Figura 8.** Evolução ponderal das proles femininas, cujas mães receberam as dietas normossódica [1,3% NaCl (pNR)], hipersódica 1 [4,0%NaCl (pHR1)] ou hipersódica 2 [8% NaCl (pHR2)] durante a gestação. Após o nascimento, as proles receberam dieta normossódica (Nuvital) até a vida adulta. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Two way-ANOVA). ....49

- Figura 9.** Pressão arterial caudal (PAC) das proles femininas da 6<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana de vida, cujas mães receberam dieta normossódica [1,3% NaCl (pNR)], hipersódica 1 [4,0%NaCl (pHR1)] ou hipersódica 2 [8% NaCl (pHR2)] durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (Two-Way ANOVA). .....50
- Figura 10.** Pressão arterial caudal da prole do grupo basal (10A) e dos grupos que foram submetidos aos testes de restrição (HO e HO+ Cap) ou sobrecarga de sódio (Hiper), provenientes de mães que receberam dieta normossódica (pNR- figura 10B), hipersódica 1 (pHR1- figura 10C) ou hipersódica 2 (pHR2- figura 10D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). ..... 52
- Figura 11.** Porcentagem de ramos vasculares com grânulos de renina na prole do grupo basal (11A) e dos que foram submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga de sódio (Hiper) cujas mães receberam dieta normossódica (pNR- figura 11B), hipersódica 1 (pHR1- figura 11C) ou hipersódica 2 (pHR2- figura 11D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). .....54
- Figura 12.** Atividade da renina renal das proles do grupo basal (figura 12A) e dos grupos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga de sódio (Hiper), cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 12B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 12C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 12D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). ..... 56
- Figura 13.** Atividade da renina plasmática das proles do grupo basal (figura 13A) e dos grupos submetidos a restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 13B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 13C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 13D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). ..... 58
- Figura 14.** Expressão do mRNA da renina da medula renal das proles do grupo basal (figura 14A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 14B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 14C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 14D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). .....60



- Figura 15.** Expressão do mRNA da renina do córtex renal das proles do grupo basal (figura 15A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO+ ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 15B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 15C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 15D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). .....62
- Figura 16.** Concentração sérica de nitrito nas proles do grupo basal (figura 16A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER)de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 16B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 16C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 16D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). \* $p < 0,05$  vs controle. ....65
- Figura 17.** Expressão do mRNA da nNOS na medula renal das proles do grupo basal (figura 17A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 17B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 17C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 17D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). .....67
- Figura 18.** Expressão do mRNA da nNOS no córtex renal das proles do grupo basal (figura 18A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 18B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 18C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 18D) durante a gestação. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). .....69
- Figura 19.** Expressão do mRNA da COX-2 na medula renal das proles do grupo basal (figura 19A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 19B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 19C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 19D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). .....72
- Figura 20.** Expressão do mRNA da COX-2 no córtex renal das proles do grupo controle (figura 20A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 20B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 20C) ou

hipersódica 2 (pHR2 - figura 20D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).....74

- Figura 21.** Reconstrução total das estruturas renovasculares, determinadas pela expressão da  $\alpha$ -SMA e da renina imunorreativas em rins de camundongos em desenvolvimento. A barra menor da região inferior da figura indica o estágio embrionário (E) e a barra maior, o período pós-natal (pp). O caractere “a” corresponde ao 13º dia do período embrionário (E13), seguido de outros períodos até E18. O caractere “i” corresponde ao 1º dia pós-natal (pp1) seguido de outros períodos até pp10 e o caractere “o” representa a idade adulta. A cor verde indica a renina imunorreativa e o marrom representa arteríolas  $\alpha$ -SMA-imunorreativas. .... 90
- Figura 22.** Ilustração do Sistema renina-angiotensina atual (Adaptado de Kobori e colab., 2007).....91
- Figura 23.** Desenho esquemático da arquitetura do néfron e componentes do aparelho justaglomerular, mostrando a posição da mácula densa e sua relação com seu glomérulo de origem. Em destaque à direita, nota-se a área de contato da mácula com o glomérulo. MD, mácula densa; AA, arteríola aferente; EA, arteríola eferente; GC, célula granulosa produtora de renina; SMC, célula da musculatura lisa (Adaptado de Schnermann e Briggs, 1999).....92
- Figura 24.** Sítios de hidrólise das fosfolipases (PLs) nos fosfolipídios. a1, a2, B, C e D, representam respectivamente PLA1, PLA2, PLB, PLC e PLD. A PLA1, hidrolisa o éster acil-1; PLA2 hidrolisa o éster acil-2; PLB hidrolisa ambos ésteres, PLC hidrolisa o glicerol-fostato e PLD cliva a base nitrogenada. R1 e R2 são ácidos graxos (Adaptado de Bonventre, 1992).....93
- Figura 25.** Metabólitos derivados do ácido araquidônico (Adaptado de Hilário e colab., 2006).....1
- Figura 26.** Efeito da inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) na pressão arterial. SRA = Sistema renina-angiotensina; GFR= taxa de filtração glomerular; RBF= fluxo sanguíneo renal; ADH= vasopressina; PG= prostaglandinas; P.A.= pressão arterial (Adaptado de Cheng e Harris, 2004). ....95
- Figura 27.** Biossíntese do óxido nítrico (NO) e sua ação vasodilatadora via cGMP (monofosfato cíclico de guanosina). A cNOS corresponde as óxido nítrico sintases constitutivas (eNOS e nNOS). A cNOS utiliza o oxigênio molecular e o aminoácido L-arginina pra produzir o NO e promove o relaxamento vascular via cGMP. Adaptado de Farrel e Blake (1996) e modificado por Cerqueira e Yoshida (2002) ..... 96

- Figura 28.** Mecanismos pelos quais a COX-2 pode influenciar na liberação de renina. PLA2 =fosfolipase A2; cAMP = Adenosina monofosfato cíclico; AC = Adenil ciclase, PKA = Proteína quinase A; AA = ácido araquidônico, PGE2 = prostaglandina E2, PGI2 = prostaciclina e COX-2 = ciclooxigenase-2. (Adaptado de Harris e Breyer, 2001).....97
- Figura 29.** Interrelações possíveis entre nNOS e SRAA no controle da regulação da expressão da COX-2 na mácula densa e alça de Henle espessa. Aldo=aldosterona; COX-2= ciclooxigenase-2; ANG II = angiotensina II e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). (Adaptado de Harris e Breyer, 2001).....98

## RESUMO

Costa NL. *Sobrecarga de sal durante o período perinatal: efeito sobre a modulação do Sistema Renina-Angiotensina em resposta à variação no consumo de sal na prole adulta* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 128p.

O objetivo deste estudo foi avaliar se a sobrecarga de sal durante a gestação interfere na liberação de renina renal e circulante e a sua relação com a COX-2 e nNOS no rim após estímulo ou inibição do sistema renina-angiotensina (SRA) nas proles femininas adultas. Ratas fêmeas Wistar receberam dieta normossódica (1,3%), hipersódica 4,0% ou hipersódica 8,0%NaCl durante a gestação. Ao nascimento, as proles receberam dieta normossódica. As proles com 12 semanas de vida foram submetidas ao teste de restrição (0,15%) ou a sobrecarga de sódio (8,0%NaCl). Foram avaliados pesos corpóreos, a pressão arterial, atividades da renina plasmática e renal; porcentagem de ramos vasculares com grânulos de renina, nitrito sérico; expressão do mRNA e proteína de renina, COX-2 e nNOS no córtex e medula renal. A pressão arterial, peso corpóreo, atividade da renina plasmática e renal não foram diferentes entre os grupos. A prole HR1 apresentou modulação do SRA, enquanto que prole HR2 não apresentou modulação adequada frente à restrição ou sobrecarga de sódio. Além disso, a expressão do mRNA da renina, COX-2 e nNOS foi estimulada na medula, e diminuída no córtex renal das proles HR1 diante da restrição ou sobrecarga de sódio. Em conclusão, a sobrecarga de sódio durante a gestação modifica as respostas do sistema renina-angiotensina, da COX-2 e da nNOS diante de subsequente restrição e sobrecarga de sódio nas proles femininas adultas.

Descritores: 1.Sistema Renina-Angiotensina 2.Inibidores da Enzima Conversora de Angiotensina 3.Cloreto de Sódio na Dieta 4.Dieta Hipossódica 5.Hipertensão 6.Gravidez 7.Ciclooxygenase 2 8.Óxido Nítrico Sintase Tipo 1

## SUMMARY

Costa NL. *Dietary salt load during perinatal period: effects on the renin-angiotensin system in response to sodium intake in the adult offspring rat* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 128p.

The objective was to evaluate whether mother high salt diet interferes in circulating and local renin release and its relation to kidney COX-2 and nNOS under RAS stimulation or inhibition by sodium in female offspring. Female rats were fed a normal (1,3%NaCl, NSD) or high 1 (4,0%, HSD1) or high 2 (8,0%, HSD2) diet throughout pregnancy. Mating occurred on the 12<sup>th</sup> week of age. From birthday, the offspring received normal salt diet. In adult offspring; plasma, renal renin activity, granulated renin cell, serum Nox, medullar and cortical renin, COX-2 and nNOS mRNA and protein expression were measured in basal condition and after one week of RAS stimulation or inhibition by sodium. Results: In basal condition, renin activity was not different among groups; however HSD1 offspring was more responsive to RAS stimulation or inhibition. Medulla COX-2 and nNOS mRNA of HSD1 offspring were decreased in basal conditions and they were more responsive to RAS stimulation or inhibition. Enhanced responses of circulating and local renin, COX-2 and nNOS to RAS stimulation or inhibition by sodium in offspring from maternal high salt diet during pregnancy lead to activation of renin angiotensin system, prostaglandin and nitric oxide pathways, and could be origin of hypertension in late life.

Descriptors: 1.Renin-Angiotensin System 2.Angiotensin-Convulsive Enzyme Inhibitors 3.Sodium Chloride Dietary 4.Diet, Sodium-Restricted 5.Hypertension 6.Pregnancy 7.Cyclooxygenase 2 8.Nitric Oxide Synthase Type 1

## **1. INTRODUÇÃO**

A gestação é uma condição fisiológica complexa que envolve a integração de uma grande variedade de sistemas reguladores e orgânicos, que permitem a evolução normal da gravidez e o aporte adequado de nutrientes ao feto. Uma característica específica deste período é o remodelamento dos segmentos radiais da vasculatura uterina, que resulta em vasos de maior calibre, distensibilidade e comprimento (Osol e Cipolla, 1993). Esta modificação estrutural transforma a vasculatura uterina em um “shunt” de baixa resistência, permitindo acomodar o grande fluxo útero-placentário necessário à evolução normal da gestação. Nesta fase primordial da vida, a menor resistência vascular pode ser atribuída a uma perda da musculatura lisa de vasos de resistência do miométrio tais como as artérias espiraladas e artérias radiais e também à dilatação adicional das artérias uterinas de maior calibre. Outra adaptação observada é o aumento do volume plasmático materno que pode ser explicado pela diminuição de excreção de sódio e água e pela menor síntese de peptídeos natriuréticos atriais (Kaufman e Deng, 1993). Estas adaptações fisiológicas são acompanhadas de uma redução significativa da pressão sangüínea, que é proporcional à queda da resistência vascular periférica (Saint-Louis e Massicote, 1985). Associado a estas alterações existe ainda o seqüestro de fluidos, por parte do feto, o que também contribui para a redução da pressão arterial materna (Svensson, 1985).

Ao aumento adaptativo do volume plasmático no compartimento vascular, nesta fase da vida, segue-se a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) (Verkeste e colab., 1998), de modo que já é visível o aumento da atividade da renina circulante desde o início da gestação (Hsueh e colab., 1982). Segundo Sealey e colab. (1986) esta elevada atividade da renina plasmática é decorrente da secreção aumentada desta protease pelo ovário e de sua produção adicional pela decídua (porção materna da placenta). Em paralelo, a concentração de outros componentes do SRA como o angiotensinogênio circulante também se eleva durante o período de desenvolvimento fetal, porém, o período exato em que ocorre essa alteração ainda não está bem estabelecido. Provavelmente, o aumento das concentrações plasmáticas de angiotensinogênio e da atividade de renina é induzido pelos elevados níveis de estrogênio, o qual por sua vez diminui a afinidade do angiotensinogênio pela renina, evitando o aumento da síntese de angiotensinas que, em excesso, traria efeitos deletérios ao feto (Daniels e colab, 1987).

A concentração de aldosterona plasmática também acompanha a elevação da atividade de renina circulante e do angiotensinogênio circulante, o que contribui ainda mais com a retenção de sódio e água e, conseqüentemente, com a expansão do volume sanguíneo (Brown e colab., 1988).

Diante de uma maior atividade do SRAA, seria esperada uma maior resistência vascular sistêmica, mas a gestação normal se caracteriza pela refratariedade ou menor sensibilidade da vasculatura à ação da angiotensina



---

II (ANG II). A refratariedade à ANG II durante a gestação tem sido atribuída, em parte, à concentração elevada de progesterona e às prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), sendo as PGI<sub>2</sub> produtos da ação enzimática da ciclooxigenase II sobre o ácido araquidônico (COX-2) (Gant e colab., 1980).

Estudos recentes têm investigado a origem da hipertensão arterial em humanos e animais, com ênfase na programação fetal de alterações funcionais e adaptativas do sistema renina-angiotensina decorrentes da deficiência de nutrientes específicos durante a gestação.

O primeiro estudo de programação fetal foi realizado em aves domésticas por Spalding em 1873, no qual demonstrou que aves reconhecidamente nidífugas foram precocemente impedidas de voar, e quando posteriormente libertas, conseguiram “iniciar” os movimentos das asas, com pouco ou nenhum atraso, indicando que havia uma programação natural e inerente que independia da experiência prévia de voar, mas que poderia sofrer influência do ambiente após o nascimento. Em 1950, o etólogo austríaco Lorenz ao estudar o comportamento animal na natureza a partir de ovos de gansos que foram divididos em dois grupos (incubados pela mãe ou em incubadora), observou que, logo após o nascimento, a prole do grupo que não teve contato materno seguiu o pesquisador como se fosse a sua “verdadeira mãe”; verificando que o vínculo do filhote recém-nascido ao pesquisador ou mãe (denominados de objeto de vinculação) ocorria se, e apenas se, o filhote era exposto ao objeto de vinculação durante um período do início da vida ao qual denominou de período crítico.

---

Mais recentemente, estudos epidemiológicos observaram que pequenas modificações no crescimento fetal e no ambiente materno podem levar a alterações na vida adulta (Barker e colab., 2007, Law e colab., 2001), o que pode explicar a origem de algumas doenças como a doença coronariana, hipertensão arterial e diabetes tipo II (Lucas, 1998, Osmond e Barker, 2000).

Lucas, em concordância com a teoria de Lorenz, foi quem empregou pela primeira vez o termo “programming”, enfatizando que os estímulos ou insultos que determinam alterações persistentes na vida adulta (imprinting ou “estampagem”) devem ser aplicados em períodos críticos e não em qualquer período da vida.

De fato, desde 1986, Scott já aventara a hipótese que o período crítico ocorria no momento em que os processos de organização celular se davam com maior rapidez.

Tendo em comum o estudo da influência da dieta e dos fatores ambientais na origem da hipertensão, vários trabalhos têm se preocupado com o papel do cloreto de sódio no período gestacional, cuja ação inibitória sobre o sistema renina-angiotensina é conhecida de longa data (Beausejour e colab., 2003). Entretanto, pouco se tem estudado a respeito da influência do sal na programação do SRAA durante a gestação e, particularmente, sobre a programação da hipertensão arterial em proles cujas mães receberam sobrecargas de sódio na dieta durante este período de grande atividade do sistema renina-angiotensina. Quais seriam as repercussões na vida adulta em decorrência da inibição do SRAA no período gestacional, período no qual o mesmo está fisiologicamente ativado.

Preocupado com esta temática, trabalho anterior realizado em nosso laboratório observou que proles adultas, cujas mães receberam sobrecarga de sódio (NaCl a 8,0%) na dieta durante a gestação e lactação têm maior pressão arterial, menor peso corpóreo e angiotensina II renal aumentada quando comparadas com as proles cujas mães consumiram dieta hipossódica e normossódica. Curiosamente, quando adultos, a atividade da renina plasmática nesses animais não se alterou em resposta ao elevado conteúdo de sal da dieta (da Silva e colab, 2003).

Vários grupos de pesquisa da atualidade arguem a favor da existência de diferenças funcionais nos componentes do SRA entre machos e fêmeas, fato relatado em revisão publicada recentemente por Sullivan (2008), que destaca que há maior atividade da renina plasmática (ARP), da enzima conversora de angiotensina (ECA) e elevada expressão do mRNA do receptor tipo 1 da angiotensina II (AT1) no tecido renal da prole masculina em relação à prole feminina em ratos e humanos.

Diante das fortes evidências de dimorfismo sexual existente entre os componentes do SRA e da grande complexidade funcional deste sistema, que até onde sabemos, também é controlado por vias alternativas, foi necessário superar conceitos antigos e, incluir o processo de vasculogênese renal entre os assuntos de nosso interesse, uma vez que supomos que o conteúdo de sódio materno na gestação poderia influenciar na quantidade de grânulos de renina da rede renovascular da prole adulta. De início, abordaremos a formação vascular e angiogênese renal bem retratada em um trabalho recente de Sauter e colaboradores [anexos: figura 21].

Estes autores estudaram a formação dos vasos renais no período embrionário e pós-natal, por meio de imuno-histoquímica, reconhecendo áreas de maior e menor expressão da renina em arteríolas e artérias renais de camundongos. Os mesmos observaram que, no 12º dia de desenvolvimento embrionário, há no mesênquima metanéfrico, a formação de um broto protuberante, do qual logo se originará a artéria renal. Um dia depois, esta artéria se ramifica nas artérias interlobares. A partir deste estágio, surgem progressivamente novas estruturas e componentes vasculares como o tronco arqueado, sendo que no 15º dia de desenvolvimento embrionário já é possível notar ramos colaterais que emergem destes troncos. Em seguida, os ramos colaterais se dividem em dois grupos de segmentos. O primeiro grupo advém da porção convexa do tronco arqueado e origina as arteríolas aferentes que nutrem prontamente os glomérulos em desenvolvimento; enquanto que o segundo se ramifica quase que perpendicularmente à porção côncava do tronco arqueado e é responsável pela formação das artérias colaterais arqueadas. Em estágio posterior, das ramificações do segundo grupo emergem os glomérulos justamedulares.

Este tipo de divisão em grupos é restrito às artérias originadas diretamente do tronco arqueado, não sendo vista nas artérias de maior calibre como artérias renais e interlobares. O processo de ramificação e formação vascular no rim torna-se cada vez mais intenso até o nascimento da prole. Assim, no 1º dia de vida do recém-nascido, a artéria interlobular na zona subcapsular renal já se encontra presente. Neste momento, as arteríolas aferentes passam a se distribuir nas camadas próximas da medula

---

renal. O apogeu deste processo, finalmente, coincidirá com a maturação do sistema de arteríolas interlobulares e aferentes por volta do décimo dia de vida pós-natal.

Ao mesmo tempo em que as árvores renovasculares são formadas, as células da musculatura lisa do tronco das artérias arqueadas (por volta do 14<sup>o</sup> dia do embrião) e de outros vasos pré-glomerulares expressam progressivamente renina, sendo que após o nascimento, os grânulos de renina lentamente desaparecem das porções terminais das árvores renovasculares e passam a se estabelecer nas arteríolas aferentes.

Em virtude deste rearranjo, as porções proximais da rede renovascular sofrem “silenciamento progressivo da expressão da renina”, de forma que, ao término do processo de vasculogênese, os grânulos de renina se concentram estritamente nas porções terminais das arteríolas aferentes. Curiosamente, pode haver aumento da produção de renina, pois células especiais da musculatura lisa das arteríolas aferentes podem adquirir a propriedade de se transformar em células produtoras de renina (Taugner e Hackental, 1989).

Esta modificação morfofuncional promovida durante a angiogênese e vasculogênese, também pode ser evidenciada em resposta ao estímulo crônico do SRA com inibidores da ECA, à depleção de volume pelo uso de diuréticos ou ao aumento da atividade dos nervos simpáticos por meio de drogas agonistas dos receptores  $\beta$ -1 adrenérgicos e/ou antagonistas dos adrenoceptores- $\alpha$ . Diante destes estímulos e com a subsequente transformação das células da musculatura lisa dos vasos em células

---

granulosas pode haver alteração da expressão protéica de renina, não só nas células justaglomerulares da parede das artérias renais de menor calibre, mas também nas artérias de maior calibre, tais como as artérias renais arqueadas e interlobares, de forma semelhante ao que acontece durante o período embrionário (Cantin e colab, 1977).

Diversos estudiosos do SRA têm superado a visão tradicional deste sistema, focalizando com nitidez o sistema renina local, o que amplia o entendimento sobre a fisiopatologia da hipertensão. Essa abordagem que se desvia do eixo central à periferia não implica em destituir de sua importância, mas, ao contrário, realça a contribuição de cada um destes componentes ao universo do SRA (Kobori e colab., 2007) [anexos: figura 22].

No ápice da cascata do SRA clássico encontra-se o angiotensinogênio. O angiotensinogênio é o substrato da renina, uma aspartil-protease. Sua síntese é hepática, sendo influenciada por fatores nucleares de transcrição e é secretado constitutivamente para a circulação (Brasier e Li, 1996), onde alcança níveis plasmáticos mil vezes maiores que a angiotensina I e angiotensina II (Navar e Nishiyama, 2001).

O tecido renal é a única fonte de produção e liberação de renina ativa, sendo responsável por 15% da renina circulante. Por outro lado, sua forma precursora, a prorenina, responde com a maior parcela da renina circulante (75%) sem contar com a prorenina circulante oriunda de tecidos extra-renais. Uma vez na circulação, a prorenina tem basicamente dois caminhos: ou é alvo de enzimas proteolíticas como a tripsina e catepsina para a formação da renina ativa (Sealey e colab., 1986) ou se liga a receptores em tecidos

diversos como ovário, útero e glândulas adrenais, sendo, portanto, alvo de captação extra-renal (Clausmeyer e colab, 1999, Danser e colab, 1989; Itskovitz e colab.,1992; Sealey e colab.,1977).

Diante de um estímulo, a renina armazenada substancialmente nos grânulos das células justaglomerulares das paredes das arteríolas aferentes, é liberada para o plasma e converte o angiotensinogênio, a partir da clivagem de sua porção N-terminal, no decapeptídeo angiotensina I (Hackenthal e colab., 1990; Schnermann e colab., 1997, Schweda e Kurtz, 2004; Paul e colab. 2006, Navar e colab., 1997).

A ANG I então produzida sofre a ação da enzima conversora (ECA) e se converte em angiotensina II (ANG II), um octapeptídeo com potente ação vasopressora. Embora existam vias outras de formação de angiotensina II em vários tecidos como no tecido cardíaco, os níveis plasmáticos da ANG II estão primariamente sob regulação da via clássica de formação da ANG II (Erdös, 1990; Johnston, 1994). O controle estreito dos níveis plasmáticos de ANG II pode prevenir a sua ação potencial sobre a absorção de sódio via receptor AT1 (Timmermans e colab., 1993; Paul e colab., 2006).

Em adição, vários peptídeos vasoativos são produzidos pelo SRA, a exemplo da Ang III, Ang IV, e Ang 1–7 que têm atividades biológicas reconhecidas no leito vascular, porém, são encontradas no plasma em níveis bem inferiores aos da Ang II (Haulica e colab., 2005; Pendergrass e colab., 2006). A ANG II alternativamente é clivada à ANG 1-7 por meio da ação enzimática da ECA2 com perda resultante de um aminoácido, acoplando-se diretamente no receptor Mas (Chappell, 2007).

Nos últimos anos foram descritas inúmeras vias alternativas de formação direta da ANG II a partir do angiotensinogênio a exemplo das quimases, toninas, catepsinas e calicreínas (Hu e colab., 2003), das quais se destacam as quimases pelo importante papel na geração de ANG II no tecido cardíaco (Urata e colab., 1993; Miyazaki e Takai, 2000, 2001).

A partir da difusão dos novos conhecimentos sobre o SRA, vários estudos têm se preocupado em esclarecer alguns aspectos morfofuncionais do aparelho justaglomerular (AJG). Este aparelho constitui-se no principal local de síntese da renina, exercendo papel fundamental no controle da pressão arterial ao interagir com importantes sítios reguladores da conservação de sal e água dos túbulos renais (Yang e colab, 2000). Este aparelho é constituído principalmente de um componente tubular, a mácula densa (MD), e de um componente vascular, a arteríola aferente, que possui células especializadas produtoras de renina denominadas de células justaglomerulares (JG), (Schnermann e Briggs, 1999) [anexos: figura 23] As células da mácula densa são verdadeiros sensores, estrategicamente localizados, que detectam alterações na composição do fluido tubular distal a todo o momento (Komlosi e colab. 2004). Esta ação é exercida principalmente por meio de cotransportadores  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  (NKCC2 ou BSC1) presentes na membrana apical das células tubulares, os quais são responsáveis por 80% do influxo de sódio (Lapointe, Lamart e Bell, 1998).

Os cotransportadores NKCC2 da mácula densa percebem oscilações nas concentrações de NaCl tubular desde valores inferiores a 25 mM a



valores superiores a 60 mM, exibindo, por sua vez, nesta última concentração saturação funcional e a máxima taxa de transporte de sódio. Embora ocorra predomínio funcional deste cotransportador, a absorção de sódio também é realizada pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , da isoforma NHE2, que responde pela absorção de 20% de sódio restante (Fowler e colab, 1995, Peti-Peterdi e colab., 2000).

Existem fortes evidências que a sobrecarga de sal da dieta materna influencia negativamente sobre as vias alternativas que regulam o SRA intrarenal e sistêmico, sendo implicado na origem fetal da hipertensão. Este foi um dos motivos pelos quais duas vias alternativas de controle da secreção de renina foram selecionadas para o presente estudo. Especificamente, as enzimas ciclooxigenase II e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), cuja alteração da expressão do mRNA e/ou protéica na região cortical e/ou medular, diante da restrição ou sobrecarga de sódio influencia(m) na síntese e secreção de renina diferencialmente. A ciclooxigenase (COX) é uma enzima que age sobre o ácido araquidônico produzindo a prostaglandina instável PG<sub>2</sub>, que é subseqüentemente convertida à PGH<sub>2</sub>. Esta, por sua vez, é transformada em diversas prostaglandinas e tromboxanas por isomerases tecido-específicas (Bonventre, 1992).

Inicialmente as fosfolipases (PLs) hidrolisam os fosfolipídios da membrana plasmática que estão ligados ao ácido araquidônico, dando origem à fração livre desses fosfolipídios. Estas fosfolipases compreendem duas grandes classes: as fosfodiesterases e as acil-hidrolases. As primeiras são representadas pelas fosfolipases A (PLA) e B (PLB), enquanto que as

últimas são representadas pelas fosfolipases C (PLC) e D (PLD). Fundamentalmente, cada fosfolipase tem seu sítio de hidrólise nos fosfolípidios, que pode ser específico ou não. Assim, as PLs podem agir no grupo éster-acil-1 (PLA1), éster-acil-2 (PLA2), glicerol-fosfato (PLC) ou em uma base (PLD). Entretanto, a PLB tem como sítio de hidrólise tanto o éster-acil-1 quanto o éster-acil-2 (anexos: figura 24) (Bonventre, 1992). Uma vez liberado por ação das fosfolipases, o ácido araquidônico é metabolizado por duas diferentes enzimas, a lipoxigenase e a ciclooxigenase, originando eicosanóides distintos. O produto das lipoxigenases são os leucotrienos, ao passo que, as ciclooxigenases originam as prostaglandinas [anexos: figura 25] (Hilário e colab., 2006).

A ciclooxigenase é encontrada principalmente em duas isoformas, a COX-1 (forma constitutiva) de ampla distribuição tecidual e a COX-2 (forma predominantemente induzível), as quais embora compartilhem 60% de homologia, são produtos de diferentes genes e apresentam distintos padrões de expressão e regulação (Xie e colab., 2004). O gene da COX-1 codifica um transcrito de 2,7- 2,9 Kb (DeWitt e Smith, 1988), enquanto que o gene da COX-2 codifica um transcrito de 4,2- 4,5 Kb (Rosen e colab, 1989).

Os produtos da ação enzimática da COX-2 são as PGs que constituem um grupo de ácidos graxos insaturados encontrados em uma grande variedade de tecidos. Três membros da classe das prostaglandinas já foram isolados de extratos de medula renal em diferentes espécies, as PGE, PGA e PGF. A PGE possui atividade vasodilatadora, além de estimularem a musculatura lisa de origem não-vascular.

A PGF apresenta predominantemente ação vasoconstritora, enquanto a PGA têm potente ação vasodilatadora (Lee, 1969). As PGs vasodilatadoras PGE2 e prostaciclina (PGI2) são as principais PGs sintetizadas nos vasos sanguíneos e túbulos renais, respectivamente, destacando-se o importante papel fisiológico da PGE2 ao promover a excreção de sódio na medula renal (Walker e Frölich, 1987). Além do papel pró-natriurético, diante da restrição de sódio, as PLs e PGs também podem ser recrutadas para promover absorção adicional tubular de sódio. Com a restrição de sódio, cotransportadores Na/K/2Cl da mácula densa são ativados, estimulando o aumento da atividade da fosfolipase A2 (PLA2) e a resultante liberação do ácido araquidônico da membrana celular. O ácido araquidônico sofre ação enzimática da COX-2 da mácula densa, que teve sua expressão potencialmente estimulada pela restrição de sódio, obtendo como produto final as PGE2 e prostaciclina (PGI2) (Harris e Breyer, 2001). Por fim, estas prostaglandinas acopladas à proteína G solúvel (Gs) ativam a adenil ciclase (AC) e estimulam a produção de adenosina-monofosfato cíclico (cAMP) por meio da proteína quinase A (PKA) levando à liberação da renina das células justaglomerulares, que promove maior geração de ANG II e maior reabsorção de sódio tubular [anexos: figura 28]

Em geral, as prostaglandinas renais exercem ação natriurética e contribuem com o aumento do fluxo sanguíneo medular. Em elevadas doses, estes mediadores reduzem a pressão arterial com conseqüente diminuição da pressão de perfusão renal (Lee, 1969).

Sumariamente, as prostaglandinas medeiam o tônus vascular, o balanço de sal e água e aumentam a liberação de renina. Assim, diante da inibição da COX-2 e, conseqüentemente, das PGs pode-se promover alteração da pressão arterial de diversas formas: pela modificação no controle do fluxo sanguíneo renal; pela modificação da reabsorção e da excreção tubular de sódio e água e pela modulação dos níveis de vasopressina (Cheng e Harris, 2004) [anexos: figura 26]. Em contraste, camundongos COX-1-null não apresentam alteração significativa da atividade da renina plasmática e renal, em condições basais, quando comparado ao camundongo selvagem, indicando COX-1 não influencia no controle do SRAA (Cheng e colab., 2002). Em vista de suas propriedades natriuréticas, o aumento da síntese de PGs na medula, diante de sobrecarga de sódio, pode ser entendido como um mecanismo compensatório desenvolvido pelo rim para manutenção da homeostase de sódio. Assim, a falha desta compensação pode induzir e/ou facilitar a manutenção da hipertensão arterial (Limas e colab, 1981). Em outras palavras, o rim tem a capacidade de se adaptar à sobrecarga de sódio por meio de mecanismos adicionais de controle da síntese e liberação de renina, como, por exemplo, o aumento da expressão regional do mRNA dos receptores específicos das prostaglandinas EP1 e EP3 na medula renal (Jensen e colaboradores, 1999).

Alguns trabalhos têm observado que a concentração de sódio na mácula densa tem papel determinante no controle do SRA e na expressão da COX-2 no rim. A conexão entre concentração de sódio, liberação de

renina e expressão da COX-2 no rim torna-se possível pelo fato de a mácula densa possuir receptores AT1 da ANG II que controlam localmente a expressão da COX-2 no córtex renal. Após ativação destes receptores pela ANG II ocorre estímulo dos cotransportadores Na/K/2Cl que estão presentes na membrana apical das células da mácula densa, o que leva ao aumento do influxo de sódio e a inibição da liberação de renina com menor expressão cortical da COX-2 (Kovacs e colab, 2002, Zhang e colab.,2006).

A inibição da enzima conversora da angiotensina I (ECA) (Cheng e colab. 1999), a administração de diuréticos e a hipertensão renovascular experimental (Wang e colab. 1999) aumentam a atividade de renina plasmática e a expressão do mRNA e protéica da COX-2 na mácula densa e na porção ascendente espessa da alça de Henle; sendo que efeito similar ocorre com a inibição do receptor AT1 no córtex renal pelo uso de losartan (Cheng e colab.,1999). O consumo de sal na dieta também interfere no padrão de expressão regional da ciclooxigenase-2. Diante da restrição de sódio, a expressão de mRNA de COX-2 se eleva na região cortical (Harris e colab, 1994; Jensen e Kurtz, 1997). Em contraste, a sobrecarga crônica de sódio eleva a expressão protéica e do mRNA da COX-2 medula interna renal. Entretanto, esses resultados são controversos. O mecanismo pelo qual a expressão da COX-2 na região medular se eleva com a sobrecarga de sódio ainda não está totalmente esclarecido e representa assunto de nosso interesse, pois pode esclarecer o papel da COX-2, diante da sobrecarga de sódio, sobre a modulação da renina intra-renal nas fêmeas da prole (Harris e colab, 1994; Jensen e Kurtz, 1997).

A expressão do mRNA e protéica de COX-2 altera-se ao longo da nefrogênese e, deste modo, pode interferir diferentemente na liberação de renina durante o período perinatal. No período pós-natal precoce (1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dias de vida), os níveis de mRNA da COX-2 são bem inferiores aos níveis do pós-natal tardio provavelmente devido ao “feedback” negativo que ANG II exerce sobre a COX-2 nesta época. Isto se reverte até a quarta semana de vida, quando a COX-2 alcança elevados níveis de expressão do mRNA e protéica passando a influenciar na liberação de renina de forma relevante (Stubbe e colab., 2003).

Outra enzima que exerce influência sobre o SRA é a óxido nítrico sintase neuronal ou do tipo 1 (nNOS). A óxido nítrico sintase neuronal e a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) são enzimas com atividade calmodulina/cálcio dependentes descritas em diferentes tecidos e são isoformas constitutivas da óxido nítrico sintase envolvidas na geração de óxido nítrico (Nathan, 1992). Diante de vários estímulos, estas isoformas constitutivas são ativadas e agem sobre o aminoácido L-arginina na presença de oxigênio molecular, gerando o óxido nítrico (NO) e a L-citrulina. O óxido nítrico é um mediador gasoso com alta afinidade por hemoproteínas ferrosas como a guanilato-ciclase solúvel (sGC), sendo responsável por uma grande variedade de fenômenos fisiológicos e cuja oxidação produz nitrito e nitrato (Kiechle e Malinski, 1993, Archer, 1993). O óxido nítrico produzido no endotélio vascular se difunde para as células da musculatura lisa dos vasos onde pode ativar reações que envolvem a guanilil ciclase e elevar os níveis intracelulares de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) e, deste modo,

promovem vasodilatação (Farrel e Blake,1996, Cerqueira e Yoshida, 2002) [anexos: figura 27]. O óxido nítrico também é encontrado na mácula densa, podendo controlar a resistência das arteríolas aferente e eferente, antagonizar o efeito vasoconstritor da ANG II (Ito e colab.,1995), inibir o feedback túbulo-glomerular (TGF) ao atenuar a taxa de filtração glomerular (Wilcox e colab., 1992) e como evento final, influenciar na liberação de renina das células justaglomerulares (Castrop e colab., 2004).

Estudos que envolvem a inibição da nNOS e PGs, na vigência de sobrecarga de sódio na dieta, demonstram que o aumento da reabsorção de sódio no túbulo proximal via ANG II, pode decorrer do importante papel destas enzimas no balanço de sódio (Llinás e colab.,1995).

Em resumo, vários estudos apontam que as expressões gênicas e protéicas da COX-2, nNOS e da renina podem ser moduladas por diversos mecanismos de “feedback” e “cross-talking”, cujo fim comum é o controle da pressão arterial, o que influencia determinantemente na regulação da síntese e liberação da renina do rim para o plasma (Harris e Breyer, 2001) [anexos: figura 29]. Em razão da complexidade, a modulação do SRA pelas vias alternativas, diante de sobrecarga de sódio, merece maior elucidação.

## **2. OBJETIVOS**



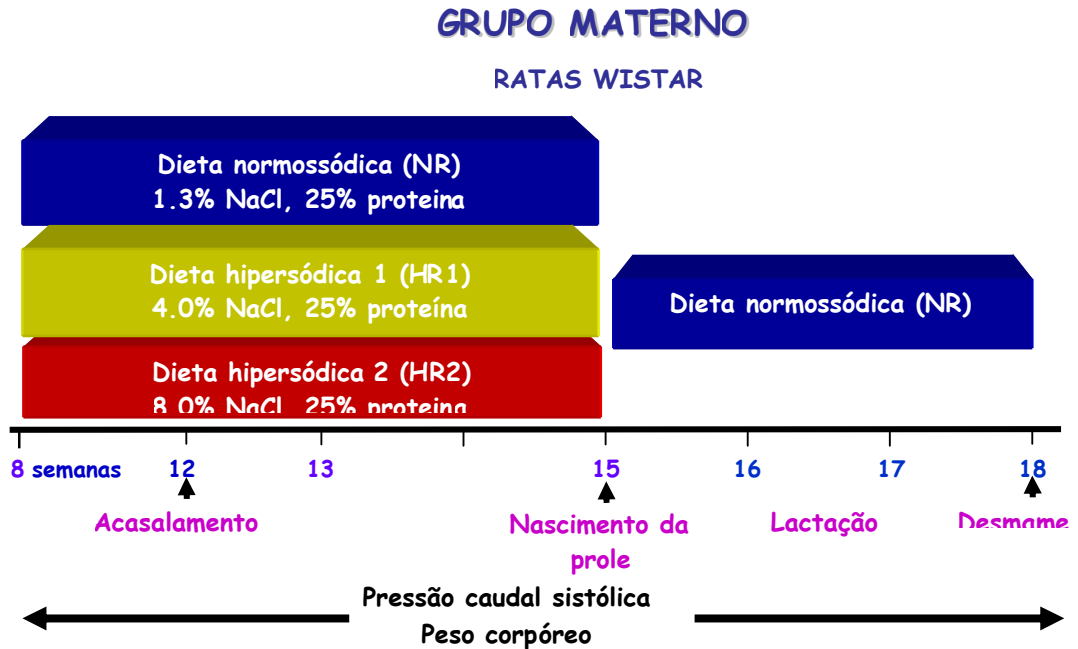
O presente estudo tem como objetivos: 1) avaliar a influência do consumo materno de diferentes conteúdos sódio durante a gestação sobre a modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona renal e circulante em proles femininas adultas, e 2) a interação regional entre COX-2, nNOS e o sistema renina angiotensina renal em resposta à restrição e sobrecarga de sódio.

### **3. MÉTODOS**

Os experimentos realizados neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – registro nº 664/05.

### 3.1 Protocolo experimental

Ratas Wistar adultas foram submetidas ao seguinte protocolo:

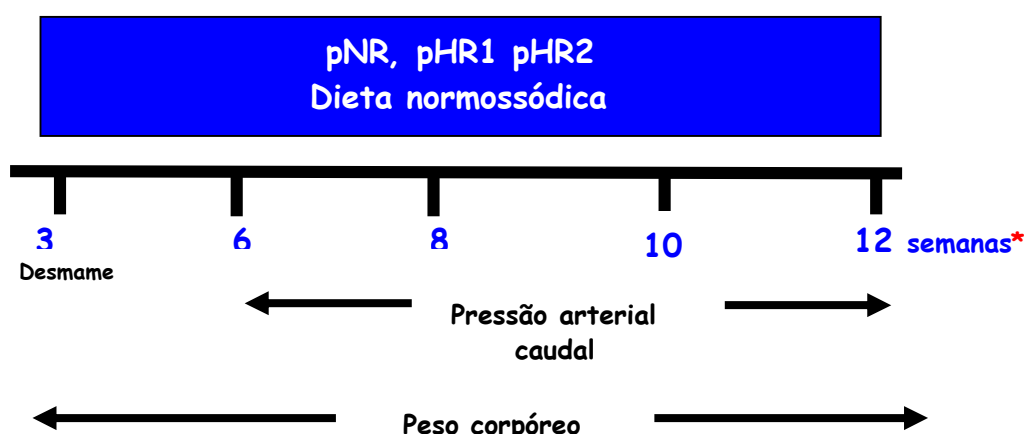


**Figura 1.** Grupo materno. As mães receberam dieta normossódica (NR), hipersódica I (HR1) ou hipersódica II (HR2) da gestação até o nascimento da prole. A prole, logo depois do nascimento, recebeu dieta NR independentemente da dieta materna.

Inicialmente, fêmeas com oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram acondicionadas em gaiolas de plástico (2 animais por gaiola), mantidas em ambiente climatizado a 22°C com ciclos alternados de 12 horas (claro e escuro), água e ração *ad libitum*. Estes animais foram divididos em três grupos, os quais receberam, desde a 8ª semana de idade até o nascimento da prole, uma das seguintes dietas (Harlan/ USA): normossódica - NR (1,3 % NaCl e 25% de proteína), hipersódica 1- HR1 (4,0% NaCl e 25% de proteína) e hipersódica 2- HR2 (8,0% NaCl e 25% de proteína). Ao completarem 12 semanas de vida, estas ratas foram acasaladas com machos Wistar que receberam dieta normossódica (Nuvital/Curitiba/Brasil).

Ao nascimento das proles, as mães passaram a consumir dieta normossódica (Nuvilab, Curitiba, PR – Brasil). Logo ao nascimento, foram realizadas a contagem do número total de filhotes e a medida do peso corpóreo das proles. Quatro fêmeas e quatro machos de cada mãe foram selecionados ao nascimento, no entanto, apenas as fêmeas foram utilizadas neste estudo, enquanto os machos foram reservados para outro estudo em andamento no nosso laboratório. Os filhotes restantes foram sacrificados.

Ao atingir a 3ª semana de vida, as proles foram desmamadas. A figura 2 ilustra o protocolo experimental ao qual a prole feminina foi submetida.



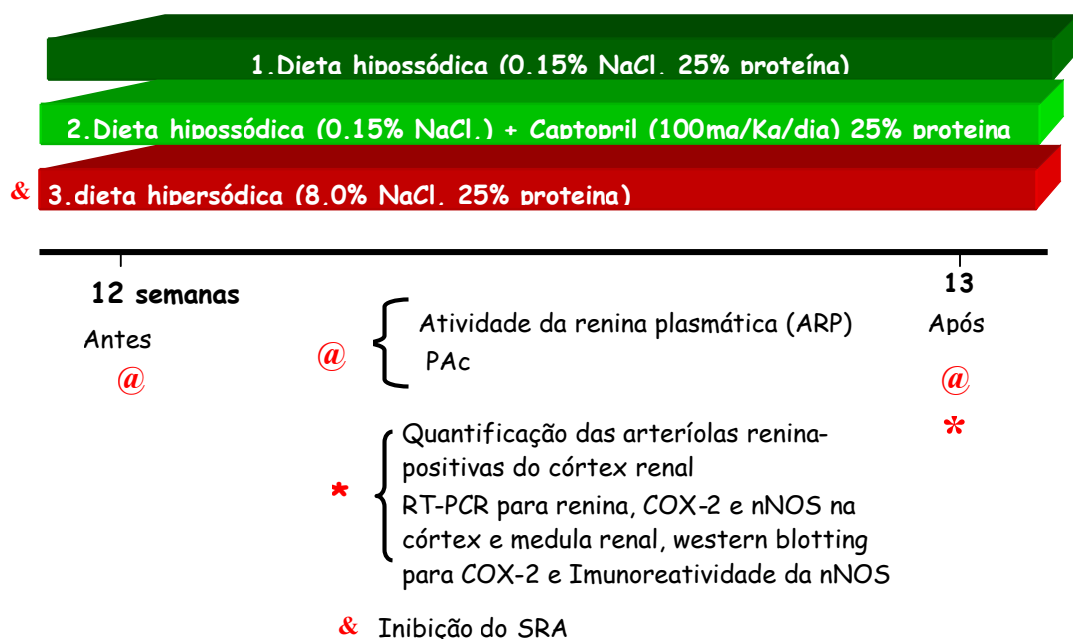
**Figura 2.** Grupos de proles femininas, cujas mães receberam dieta NR (pNR), HR1 (pHR1) ou HR2 (pHR2). Desde o nascimento até a 12ª semana de vida, as proles receberam dieta normossódica, independentemente da dieta materna. \*Teste de estímulo ou inibição da secreção de renina realizados na prole adulta.

A medida do peso corpóreo das fêmeas da prole foi realizada semanalmente desde o nascimento até a 12ª semana de vida por meio de balança eletrônica específica para pesagem de animais (modelo AS5500, Marte Balança). A partir da 6ª semana de vida, iniciou-se a medida de pressão arterial caudal (PAC) com intervalo de duas semanas entre as medidas, até a prole atingir a 12ª semana de idade. A medida da pressão caudal foi realizada pelo método oscilométrico (RTBP 2045 - Kent Scientific Corporation, USA) em sala apropriada, considerando apenas as medidas obtidas na ausência de movimentação espontânea da cauda do animal. A medida de PAC foi considerada como sendo a média de 4 aferições consecutivas.

Na 12ª semana de vida, as fêmeas da prole, então, foram submetidas aos testes de estímulo ou inibição da liberação de renina que são descritos em detalhes a seguir.

### 3.2 Teste de estímulo e inibição da liberação de renina

É bem estabelecido que o uso de inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA) e da dieta com restrição de cloreto de sódio são fatores que aumentam a liberação de renina e, por conseguinte, a expressão do mRNA da COX-2 na mácula densa e na porção ascendente espessa da alça de Henle (Harris RC, 2003). A administração de dieta rica em cloreto de sódio tem efeito oposto. Diante destas considerações, resolvemos realizar experimentos que visam o estudo do estímulo e inibição do SRA na prole feminina, que se encontra representado na figura 3.



**Figura 3.** Teste de estímulo ou inibição da liberação de renina na prole feminina com 12 semanas de idade.

Antes dos testes, foi aferida a PAc nos grupos de oito fêmeas adultas provenientes de mães que receberam dietas NR, HR1 ou HR2. Amostras de sangue foram então coletadas pela cauda para posterior medida da atividade de renina plasmática (ARP). Em seguida, as proles foram submetidas aos seguintes testes:

**Grupo HO:** os animais receberam dieta hipossódica (0,15% NaCl) com 25% de proteínas por 07 dias.

**Grupo HO + captopril:** os animais receberam inibidor da ECA (captopril), na dose 100 mg/kg/dia, em água de beber e dieta hipossódica (0.06% Na) por sete dias.

**Grupo Hiper:** os animais receberam dieta hipersódica (8% NaCl) por 7 dias.

Ao final de cada teste, os animais foram submetidos à medida de PAc e logo após, eutanasiados por guilhotina. Amostras de sangue foram coletadas. O plasma ou soro foi separado e conservado a -20°C para a medida da atividade da renina plasmática, aldosterona e nitrito como será descrito futuramente. Os rins foram removidos e separados em região cortical e medular. A região cortical do rim esquerdo foi utilizada para quantificação dos ramos vasculares com grânulos de renina (%). As regiões cortical e medular do rim foram reservadas e mantidas a -80°C para a realização dos seguintes experimentos: RT-PCR para renina, COX-2 e nNOS, Western Blotting para COX-2 e determinação de atividade de renina no córtex.

Foram incluídos grupos controles para cada grupo tratado e realizados ensaios bioquímicos nas amostras de sangue e de tecido renal para efeito de comparação. Em complemento, foi realizada imunohistoquímica para verificar a localização regional da nNOS e se a expressão da nNOS intra-renal está alterada no grupo controle.

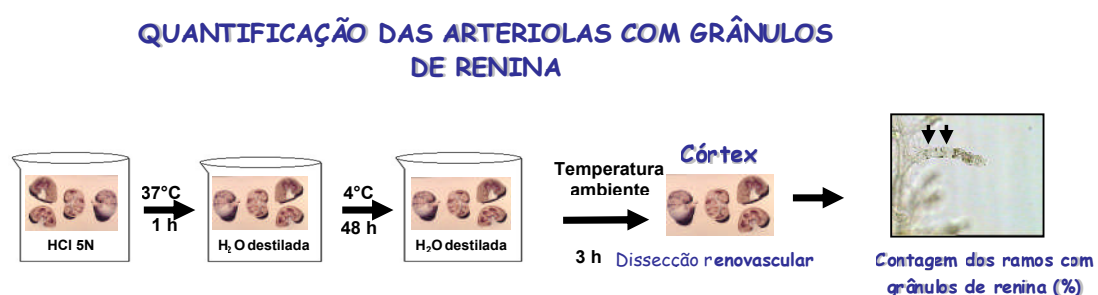
### **3.3 Método de quantificação dos ramos vasculares com grânulos de renina (%)**

O método de Casellas e colab. (1993) foi utilizado com o propósito de visualizar e quantificar percentualmente os ramos vasculares renais com grânulos de renina.

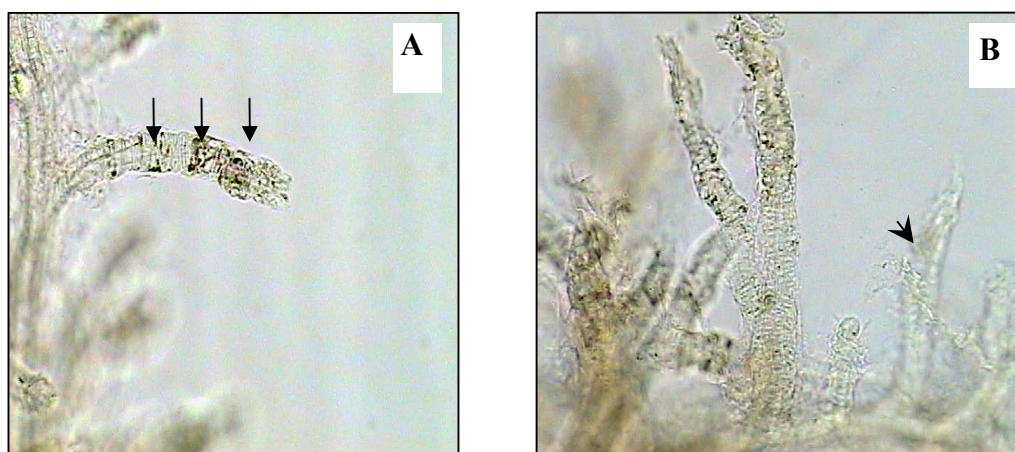
O rim esquerdo foi seccionado no plano coronal e a região cortical foi incubada a 37°C na solução de HCl 5N por um período de 60 minutos. Em seguida, o mesmo foi lavado e reidratado em água destilada, e mantido por dois dias a 4°C. Após a retirada da geladeira, a água foi trocada e o rim deixado em água destilada por 4 horas em temperatura ambiente (Figura 4).

A dissecação do tecido vascular foi realizada sob lupa e com utilização de pinças pequenas com pontas delgadas. Após a dissecação e durante a visualização, o tecido vascular foi mantido em água acidificada, pH 2,5. Os ramos vasculares foram visualizados e quantificados sob microscópio óptico comum. A quantificação dessas ramos foi realizada em duplo cego. Tal quantificação foi obtida pelo cálculo da relação de ramos com grânulos (+) e sem grânulos de renina (-) e representada em porcentagem (%). De cada rim utilizado, foram contados os ramos vasculares até que fosse atingido um total de 200 ramos. Cada ramo foi considerado ou positivo ou negativo para renina, sem levar em consideração o número de grânulos presentes nos vasos sanguíneos renais. São mostradas na figura 5, fotomicrografias da rede renovascular com ramos com grânulos (setas) e sem grânulos de renina (ponte de seta).





**Figura 4.** Método de quantificação dos ramos vasculares com grânulos renina.



**Figura 5.** Fotomicrografias da rede renovascular. As setas (figura A) mostram grânulos de reninas em torno da arteríola, estimulados pelo uso de captopril, enquanto a cabeça de seta (figura B), mostra uma arteríola sem grânulo de renina.

### 3.4 Avaliação da expressão do mRNA por RT-PCR

A expressão do mRNA da COX-2, nNOS e renina no córtex e medula renais foram determinadas a partir do RNA total, utilizando o método de transcrição reversa (RT) para a obtenção do DNA complementar (cDNA). O RT-PCR consistiu de 2 etapas.

#### 3.4.1 Extração de RNA total

O RNA total do córtex e medula renal foi extraído utilizando o reagente TRIzol (TRIzol reagent, Invitrogen). Para isto, foram pesadas 50,0 mg de tecido renal em tubo de plástico estéril. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de TRIzol e homogeneizado em aparelho Ultra-Turrax (IKA Works Inc., modelo T-25, EUA). Todo o procedimento foi realizado sob gelo.

O homogenato foi transferido para um tubo de plástico livre de RNase e incubado por 5 min à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Este homogenato foi centrifugado a 4°C por 10 min a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de plástico e foi adicionado 200 µL de clorofórmio para separação da amostra em fase orgânica e inorgânica e desnaturação das proteínas. Esta solução foi agitada no vórtex por 15 segundos e incubada à temperatura ambiente por 2 min, sendo a seguir centrifugada a 4°C por 15 min, a 14.000 rpm. Após a centrifugação, as amostras apresentaram 3 fases no tubo: a fase aquosa (onde se encontra o RNA total extraído – parte superior do tubo) e a fase orgânica ou intermediária (onde ficam o DNA e proteínas).

A fase superior da solução foi transferida para outro tubo de plástico e foram acrescentados 500  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico para precipitação do RNA total. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 4°C por 10 min, a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 1,0 mL de etanol gelado a 75%. Novamente o material foi centrifugado a 4°C a 9.000 rpm por 5 min e o sobrenadante desprezado. Para a solubilização do RNA, o *pellet* foi ressuscitado com 100  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e esta solução foi incubada em banho seco a 65°C por 10 min. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C após a quantificação do RNA total e o teste de pureza.

Foi transferido 5,0  $\mu\text{L}$  de amostra de RNA total e 995  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q e incubado em banho seco a 65°C por 10 min. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e realizadas leituras de absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-1100, Japão).

Para o cálculo da pureza do RNA total foram usados os valores da razão entre a leitura a 260 nm (que detecta RNA) e a leitura a 280 nm (que detecta proteína) no espectrofotômetro. O resultado aceitável deve estar entre 1,6 a 2,2.

As extrações de RNA que efetuamos apresentaram uma razão equivalente entre 1,8-2,0.

A quantificação do RNA total foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Valor da leitura (260nm)} \times \text{diluição (200x)} \times 40/1000 = \mu\text{g}/\mu\text{L}.$$

A integridade do RNA total foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%. Para esse fim, foi aplicado 1 µg de cada amostra no gel e submetido a uma corrente elétrica entre 80 ou 90V do pólo negativo para positivo por 50 minutos numa cuba de eletroforese contendo tampão TBE 1X (tampão borato-EDTA). As duas bandas de 18S e 28S foram visualizadas no transluminador sob luz UV.

### 3.4.2 Síntese de DNA complementar por transcrição reversa (RT)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por meio da transcrição reversa, utilizando a enzima transcriptase reversa ImProm II (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

Para a síntese de cDNA foi utilizado 1 µg de RNA total de cada amostra, 1 µL de oligo-deoxirribonucleotídeo T (dT) 150 ng/mL e completou-se o volume com água milli-Q para 5 µL em mini tubo livre de RNase, mantido no gelo. Estes tubos foram incubados a 70°C por 5 min e resfriados imediatamente a 4°C por 5 minutos no termociclador (Gradient Cycler, modelo PTC-200, Bio Rad Inc. EUA). Terminada esta reação, as amostras foram mantidas no gelo.

Numa segunda etapa, foi acrescentado um *MIX* de soluções contendo 4 µL de tampão de reação da enzima transcriptase reversa 5X, 1 µL da mistura de dNTPs (2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato, 10 mM), 2,4 µL de cloreto de magnésio 25 mM; 6,6 µL de água Milli-Q e 1 µL da enzima transcriptase reversa ImProm II. Após a adição deste *MIX*, as amostras foram levadas ao termociclador para desnaturação por 15 min a 70°C;

anelamento por 5 min a 25°C e para extensão por 60 min a 42°C. O cDNA obtido foi então guardado em freezer -20 °C para amplificação dos genes de interesse por PCR.

### 3.4.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada para amplificar os produtos gênicos da renina, COX-2, nNOS e beta-actina a partir do cDNA.

Em cada 1 µL de cDNA, adicionou-se um *MIX* contendo 2,5 µL de tampão da enzima Taq DNA polimerase 10X [100 mM Tris HCl, pH 8,5 e 500 mM KCl]; 0,75 µL de cloreto de magnésio 50 mM; 0,5 µL de mistura dNTPs (10 mM cada); 1 µL (12 pMol/ µL) ou 3 µL (5 pMol/ µL), de *primer* sense (conforme a tabela 1); 1 µL (12 pMol/ µL) ou 3 µL (5 pMol/ µL) de *primer* antisense (conforme tabela 1); 0,4 µL de enzima Taq DNA polimerase 5000U/mL e água Milli-Q quantidade suficiente para 25 µL.

Foi preparado um tubo controle negativo contendo a solução *MIX* sem o cDNA com objetivo de detectar contaminação. Em seguida, as amostras e o controle negativo foram colocados no termociclador (marca Bio-Rad-DNAEngine®, Peltier Thermal Cycler) para a reação de PCR, onde a fase inicial de dissociação da fita molde de cDNA foi a 94° C por 3min, seguida de desnaturação a 94° C por 1 minuto, sendo que a temperatura de anelamento e o numero de ciclos variou conforme o primer usado (Tabelas 2). A extensão final foi realizada a 72° C por 10 minutos e em seguida foi resfriado a 4° C por tempo indeterminado. Ao término da reação no termociclador, as

amostras foram retiradas e conservadas a  $-20^{\circ}$  C até a realização da eletroforese em gel de agarose a 2%.

#### 3.4.4 Eletroforese em gel de agarose

Aos produtos amplificados da reação de PCR foram adicionados 2  $\mu$ L de solução de *Blue* RNA em cada amostra, sendo depois aplicados 20  $\mu$ L desta amostra em gel de agarose 2% em tampão TBE (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 0,05M e pH 8,0) contendo brometo de etídio.

No mesmo gel foi aplicado um marcador de peso molecular (leader, 100 pares de base). Foi utilizado tampão de TBE 1X para corrida da eletroforese na tensão de 80-90V, por 50 minutos.

Ao término desta corrida, as bandas foram visualizadas no transiluminador de luz UV, fotografadas e semiquantificadas usando um equipamento de foto-documentação. O software Alpha Imager™ 1220 version 5.5 (Alpha Innotech Corporation, EUA) foi usado para análise densidade das bandas visualizadas no gel de agarose e os valores foram expressos como valor da densidade integrada (IDV). Os resultados obtidos foram normalizados pela expressão do mRNA da  $\beta$ -actina (razão entre os valores da densidade integrada dos genes estudados e da  $\beta$ -actina).

**Tabela 1:** Seqüência dos “primers” utilizados

<b>Genes</b>	<b>Seqüência dos Primers</b>
<b><math>\beta</math>-actina</b>	(s) 5`TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG -3` (as) 5`TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT -3`
<b>Renina</b>	(s) 5`CATTACCAGGGCAACTTTCAC -3` (as) 5`TCATCGTTCCTGAAGGAATTC -3`
<b>nNOS</b>	(s) 5`GAATACCAGCCTGATCCATGGAACACC -3` (as) 5`CTCCAGGAGGGTGTCCACCGCATGCC -3`
<b>COX-2</b>	(s) 5`ACACTCTATCACTGGCATCC -3` (as) 5`GAAGGGACACCCTTTCACAT -3`

**Tabela 2:** “Melting Temperature” (Tm) e nº de ciclos (RT-PCR) determinados para a córtex e medula renal

<b>Genes</b>	<b>Tm</b>	<b>Nº deciclos</b>	<b>Fabricante</b>
<b><math>\beta</math>- actina</b>	<b>57,8°C</b>	<b>35</b>	<b>IDT, IA, (USA)</b>
<b>COX-2</b>	<b>58,3°C</b>	<b>40</b>	<b>IDT, IA, (USA)</b>
<b>Renina</b>	<b>51,5°C</b>	<b>35</b>	<b>IDT, IA, (USA)</b>
<b>nNOS</b>	<b>71,9°C</b>	<b>40</b>	<b>IDT, IA, (USA)</b>

### 3.5 Avaliação da expressão protéica da COX-2 por Western blotting

Amostras de tecidos foram pesadas e depois homogeneizadas em tampão de extração protéica (30 mM Tris HCl, PH 8.0 e 100  $\mu$ M PMSF), 1:9 peso do tecido/volume. A seguir o homogenato foi centrifugado em tubos Eppendorf a 10.000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi retirado dos tubos e centrifugado em ultracentrífuga a 100.000 G por 1 hora para o preparo dos microssomos como descrito por Harris RC e colab., 1994. Os microssomos foram ressuspensos em tampão SDS. Alíquotas foram guardadas a -80°C. A concentração de proteína total foi determinada usando o método de Bradford.

Todas as amostras com quantidades iguais de proteínas totais (100 $\mu$ g) foram misturadas a um tampão SDS e colocadas nos *slots* do gel SDS – PAGE (sódio dodecilsulfato de poliácridamida) 10% e submetidas à eletroforese. Após este processo, as amostras contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Biosciences) utilizando o Trans-blot semi-dry (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) . As membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado a 5% no tampão TBST por 30 minutos. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários policlonais anti-COX-2 (Cayman Chemical, MI, USA), diluição 1:200, por overnight ou monoclonal anti- $\beta$ -actina clone AC-15 (Sigma, Missouri, USA), diluição 1:500, por 2h a 4°C. A seguir as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários ligados a peroxidase (HRP) anti-rabbit para COX-2, diluição 1:5000 por 2 h em



temperatura ambiente (código SC 2030, Santa Cruz, CA, USA), e anti-mouse para  $\beta$ -actina, diluição 1:5000 por 2h, temperatura ambiente (código P0206, Dako North América, CA, USA). O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado com o substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences, UK).

A seguir os *blots* foram expostos aos filmes de raios-X (Agfa, Argentina) ou (Amersham Biosciences, UK Ltd). As quantificações das bandas foram feitas por meio do programa Scion image for Windows (Scion Corporation, USA).

### **3.6 Avaliação da expressão da nNOS renal por imunohistoquímica**

Antes da realização desta técnica foi necessário padronizar os seguintes procedimentos:

#### **3.6.1 Preparo do tecido renal**

Ao final de cada experimento, ratas Wistar adultas foram anestesiadas com pentobarbital sódico na dose de 50 mg/kg IP (Cristália, São Paulo, Brasil) para a remoção cirúrgica dos rins. O rim, cortado transversalmente, foi fixado com solução de Dubosq-Brasil durante 40 minutos com a finalidade de conservação das estruturas. Em seguida, os

rins permaneceram por 2 horas em solução de formol a 10% em tampão fosfato 0,1M e foram incluídos em blocos de parafina.

### **3.6.2 Processo de parafinização do tecido renal**

Para realização do processo de parafinização e inclusão dos tecidos, os rins foram retirados da solução de formol 10% em tampão fosfato 0,1M e foram, subseqüentemente, colocados em caixetas perfuradas e identificadas. Este processo de inclusão foi realizado no processador automático de tecidos "Histokinette" (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha) por um período que durou cerca de 14 horas, como descrito a seguir.

O processo de inclusão foi iniciado com a desidratação dos tecidos passando sucessivamente em banhos de álcool em concentrações crescente, na ordem seguinte: álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos), álcool absoluto (2 banhos). Em seguida, inicia-se a fase da diafanização, processo de tornar o tecido translúcido e permeável para a impregnação da parafina, que são banhos de xilol + álcool e 3 banhos de xilol. O processo de parafinização finaliza-se com 2 banhos em parafina fundida a 60°C.

O material parafinado foi incluído em blocos/moldes e após solidificação, permaneceu em temperatura ambiente.

Antes da realização do corte, os blocos de parafina permaneceram 30 minutos no freezer a -20°C. Os tecidos emblocados foram cortados em micrótomo (Reichert Jung Supercort 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) e por

navalhas descartáveis, numa espessura de 3 a 4  $\mu\text{m}$  e aderidos em lâminas previamente revestidas por silano 2% (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). As lâminas que receberam os tecidos permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e, em seguida, foram armazenadas e conservadas a 4°C.

### **3.6.3 Processo de silanização de lâminas**

A silanização das lâminas é realizada antes que as lâminas recebam os cortes do tecido renal. Para isso, as mesmas foram previamente lavadas com detergente neutro não iônico (2,5%). As lâminas foram mergulhadas por 5 minutos em acetona e em seguida em solução de (3-aminopropil) trietoxisilane 2% (Sigma, Chemical Co, St Louis, EUA) em acetona por 2 minutos. Para a retirada do excesso da solução de silano, as lâminas passaram por 2 banhos de acetona por 10 segundos, seguidos por 2 banhos em água destilada por 10 segundos. A lâminas foram inclinadas sobre papel-toalha e secas em estufa a 60° C por 30 minutos.

### **3.6.4 Reação de imuno-histoquímica para nNOS**

Para a realização da imuno-histoquímica foram utilizados anticorpos específicos para a identificação da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) no tecido renal. O controle negativo do método foi realizado em todos os experimentos, omitindo-se o anticorpo primário específico. O método é descrito a seguir.

### 3.6.5 Desparafinização para reações de imuno-histoquímica

Antes da realização da imuno-histoquímica, as lâminas passaram por um processo de desparafinização. Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol durante 9 minutos, por 3 vezes. A seguir, as mesmas foram mergulhadas em álcool absoluto por 5 minutos, 2 vezes, seguida de álcool 96% por 3 minutos, 2 vezes e finalmente água destilada por 5 minutos. Finalizado este processo, as lâminas foram hidratadas em solução salina fosfato-tamponada 1X (PBS) pH7,4.

A solução PBS 10X, pH7.4.0 foi preparada utilizando-se fosfato de sódio dibásico a 0,074 M, ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), fosfato de sódio monobásico a 0,026 M ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) dissolvidos em cloreto de sódio 1,4 M e ajustando-se o pH para 7.4 com ácido clorídrico 6N (Merck, Darmstadt, Alemanha).

### 3.6.6 Uso do forno de microondas na técnica de imuno-histoquímica

A técnica de microondas foi utilizada para aumentar a exposição antigênica, uma vez que durante o processo de parafinização pode ocorrer o “mascaramento” de antígenos no tecido, dificultando assim sua detecção. Para tanto, as lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1 g de ácido cítrico mono hidratado dissolvidos em 1000 mL de água destilada), ajustando-se o pH para 6,0 com hidróxido de sódio 6N. As lâminas foram conduzidas ao forno microondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2400 watts. Este procedimento foi realizado inicialmente durante 10 minutos seguido de mais 5 minutos (Leong e Milios, 1990), Haerslev e Jacobsen (1994).

### 3.6.7 Técnica de LSB por sistema HRP

Para a marcação da nNOS foi realizada pela técnica de LSB por HRP. Após desparafinização e exposição antigênica das lâminas, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com uma solução de peróxido de hidrogênio 10% em álcool metílico apresentando uma concentração final de 3%, durante 30 minutos e após este período, as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos. Em uma próxima etapa do experimento, foi utilizada uma solução de bloqueio da avidina (Vector, Burlingame, EUA) por 15 minutos, seguido do bloqueio da biotina endógena durante o mesmo período (Vector, Burlingame, EUA). Após este procedimento, foi realizado bloqueio inespecífico com soro não-imune de cavalo (Vector, Burlingame, EUA) na diluição de 1:70, durante 30 minutos.

Para a marcação da nNOS, os cortes foram submetidos à incubação com anticorpo primário monoclonal anti-mouse nNOS (código N31020-150, Dako North América, CA, USA) na diluição de 1:100, por aproximadamente 20 horas, a 4°C, em câmara úmida. Ao final deste período, as lâminas foram lavadas em PBS durante 10 minutos. Em seguida, O anticorpo secundário biotinilado (*Dako Cytomation LSAB and System-HRP*) foi adicionado em cada lâmina por 30 minutos, em temperatura ambiente, em câmara úmida. Então, lavagens com PBS foram realizadas e as lâminas foram secas. O complexo estreptoavidina peroxidase (*Dako Cytomation LSAB and System-HRP cód. K0609*) foi adicionado por 30 minutos nas mesmas condições acima.

A revelação foi realizada com um substrato cromógeno AEC (código K3464, Dako North América, CA, USA). A contra-coloração das lâminas foi realizada utilizando-se o corante hemalumbre de Mayer. As lamínulas foram aderidas às laminas com gelatina glicerizada Kaiser (Merck, Darmstadt, Alemanha) previamente aquecida. A quantificação da nNOS imunorreativa no córtex e medula renais foi realizada sob microscópio óptico (200 X), sendo a positividade contada por área. Para tal finalidade, foi calculada a relação do número total de glomérulos positivos por  $\text{cm}^2$  pelo total de campos (para o córtex), sendo o resultado multiplicado pelo fator de correção da objetiva 0,3348. Para a medula, foi feito o mesmo cálculo, considerando tanto a medula interna quanto externa, levando em consideração locais onde a nNOS comumente se expressa.

### **3.7 Métodos analíticos**

#### **3.7.1 Medida da atividade da renina plasmática (ARP)**

Dois mililitros (2mL) de sangue foi coletado em tubos de ensaio contendo anticoagulante (32  $\mu\text{l}$  de EDTA 3,8%, pH 5,5 por 1mL de sangue) sob gelo. Após centrifugação, o plasma foi armazenado em freezer -20 °C até o seu processamento. A ARP foi medida pelo método de radioimunoensaio (RIE) utilizando “kit” comercial da marca DiaSorin (código CA-1533, MN, USA).

### 3.7.2 Determinação da concentração de aldosterona sérica

O sangue foi coletado da cauda dos animais ou por decapitação e o soro separado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  em freezer. A concentração de aldosterona foi quantificada por RIE utilizando “kit” comercial marca DSL (código 8600, Texas, USA).

### 3.7.3 Avaliação da atividade da renina no córtex renal (ARR)

Este método foi realizado conforme descrito por Giammattei e colab., 1999. À cinqüenta miligramas (50 mg) de fragmento de córtex renal foi adicionado 1mL de solução fisiológica 0,9% NaCl gelado para homogeneização. O homogenato foi centrifugado a  $4^{\circ}\text{C}$  na velocidade de 1.100g por 10 minutos (modelo CR 21, Hitachi, Tóquio, Japão). A seguir o sobrenadante foi separado e rediluído a uma concentração de 0,5 mg/mL em tampão pH 7,4 [15 mM de dissodium EDTA (Vetec, código 114), 5 mM de 2,3 dimercaprol (Riedel-de-Haën, código 64046) e 3,5mM de 8-hidroxiquinolina (Sigma-Aldrich, código 164984)].

A atividade de renina tecidual foi medida a partir da geração de ANG I. Com essa finalidade, alíquotas de 40  $\mu\text{L}$  do homogenato 0,5 mg/mL, foram adicionadas a 200  $\mu\text{L}$  de plasma contendo excesso de angiotensinogênio, obtido de ratos adultos binefrectomizados por 48 horas.

Estas amostras foram homogeneizadas e incubadas por 2 horas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ . A angiotensina I gerada foi quantificada utilizando “kit” de radioimunoensaio (RIE), da marca Diasorin (código CA-1533, MN, USA).

A atividade da renina renal foi determinada e corrigida por mg de tecido renal por hora (ng/mg de tecido/h).

### 3.7.4 Determinação da concentração sérica de nitrito

Concentração sérica de nitrito foi medida por espectrofotometria a partir da reação de Griess. A reação de Griess consiste na reação do nitrito presente na amostra com a sulfanilamida, originando um íon diazônio que, por sua vez, reage com o reagente acoplador N-(1-Naftil)-etilenodiamina (NEDA) para formar um azocromofóro (Schmidt e Kelm, 1998, Gilliam e colab., 1993).

## 3.8 Análise estatística

Os resultados são apresentados como média e erro padrão da média ( $\pm$ EPM) e foi adotado como nível de significância  $p < 0,05$ .

Foi utilizado One Way ANOVA para medidas não repetidas e, quando as variâncias foram semelhantes, o Bartlett's test. No caso de variâncias diferentes, utilizou-se o teste t com a correção de Welch.

Para análise das variáveis "tempo versus grupos tratados", foi utilizado Two Way ANOVA. Entretanto, quando o valor do resíduo estatístico foi elevado, utilizou-se One Way ANOVA para medidas repetidas e não repetidas, distintamente. Em ambos os casos foram utilizados o pós-teste de Dunnett.



## **4. RESULTADOS**

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão da média e representados em gráficos. Alguns resultados são apresentados em tabelas descritas no texto. Entretanto, a maioria das tabelas pode ser consultada em anexos.

## **4.1 Grupo materno**

### **4.1.1 Reprodução materna**

O número médio de recém-nascidos por rata grávida não foi diferente nos três grupos maternos utilizados neste estudo (Tabela 3). Entretanto, observou-se maior dificuldade em obter a prole NR, uma vez que das vinte e uma (21) fêmeas que foram solicitadas do biotério para acasalamento, apenas 12 engravidaram; havendo um (01) óbito por causa natural. Dentre as ratas que não engravidaram, oito (8) não foram concebidas mesmo com a 2ª tentativa de acasalamento.

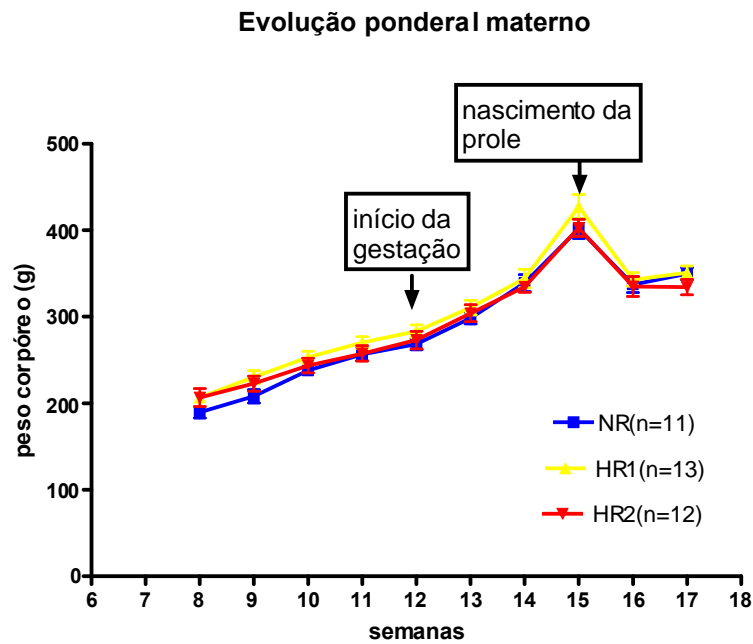
Das 19 ratas utilizadas para geração da prole pHR1, quinze (15) engravidaram, duas ratas deste grupo morreram por causas naturais e duas foram acasaladas pela 2ª vez com insucesso na concepção. O grupo de mães da prole pHR2 se constituiu inicialmente de 17 ratas para acasalamento, sendo que 13 ratas engravidaram e houve um óbito por causa natural. Três (03) ratas foram acasaladas com falha na concepção.

**Tabela 3:** Grupos maternos. Falha da concepção, relação filhotes/rata e óbitos de mães que receberam dieta normossódica (NR = 1,3% de NaCl), hipersódica 1 (HR1 = 4,0% de NaCl) ou hipersódica 2 (HR2 = 8,0% de NaCl) da 8ª a 15ª semana

<b>Dietas</b>	<b>Total de ratas</b>	<b>Total de grávidas</b>	<b>Falha da concepção 2º cruzamento</b>	<b>Óbitos maternos</b>	<b>Nº de filhotes/rata</b>
<b>NR</b>	21	12	08	01	7,3
<b>HR1</b>	19	15	02	02	12,12
<b>HR2</b>	17	13	03	01	10,18

#### 4.1.2 Evolução ponderal

A evolução ponderal das mães submetidas a diferentes conteúdos de sódio na dieta foi avaliada antes, durante e após a gravidez (Figura 6). Durante todo o crescimento e desenvolvimento desses animais não foram observadas diferenças no peso corpóreo nos três grupos maternos. Entretanto, observou-se maior ganho de peso corpóreo materno nos 3 grupos na 15ª semana de gestação (semana do nascimento da prole), seguido de um declínio progressivo do mesmo na 16ª semana de vida, acompanhado de um período de estabilidade de peso corpóreo nos 3 grupos de mães durante o consumo da dieta normossódica. As mães receberam dieta normossódica após o nascimento da prole para afastar a influência da sobrecarga de sódio no período de lactação nos resultados (Tabela 4).



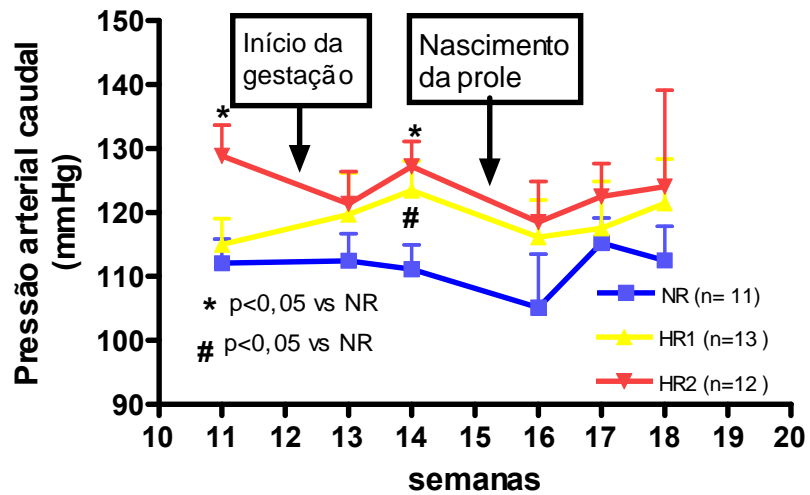
**Figura 6.** Evolução ponderal das mães que receberam dieta NR (normossódica, 1,3% de NaCl), HR1 (hipersódica 4,0% de NaCl) ou HR2 (hipersódica 8,0% de NaCl) da 8<sup>a</sup> a 15<sup>a</sup> semana de gestação. Após o nascimento da prole, as mães receberam dieta normossódica nacional (Nuvilab). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (Two way-ANOVA).

#### 4.1.3 Pressão arterial caudal

A medida de pressão arterial caudal destes animais foi medida antes (11<sup>a</sup> semana), durante (13<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semanas) e após o nascimento (16<sup>a</sup>, 17<sup>a</sup> e 18<sup>a</sup> semanas). Na 12<sup>a</sup> semana não foi medida a pressão arterial caudal uma vez que o stress causado pela manipulação da mãe pode interferir no sucesso do acasalamento.

Antes da gestação, na 11<sup>a</sup> semana de vida, as fêmeas que receberam dieta HR2 apresentaram maior pressão arterial caudal quando comparada ao grupo de dieta NR. Na 14<sup>a</sup> semana de vida (2<sup>a</sup> semana de gestação) as mães que receberam dieta HR1 e HR2 apresentaram maior pressão arterial

caudal comparada com o grupo que recebeu dieta NR (Nuvilab, Brasil) (Figura 7, Tabela 5).

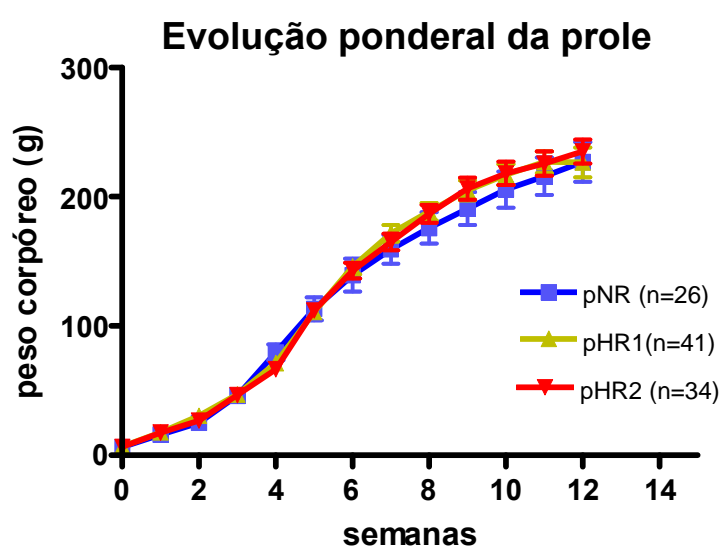


**Figura 7.** Pressão arterial caudal das mães que receberam dieta NR (normossódica, 1,3% de NaCl), HR1 (hipersódica, 4,0% de NaCl) ou HR2 (hipersódica, 8,0% de NaCl) desde a 8ª semana a 15ª semana de vida. Após o nascimento da prole, as mães passaram a receber dieta normossódica (Nuvilab). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (Two way-ANOVA).

## 4.2 Prole feminina

### 4.2.1 Evolução ponderal

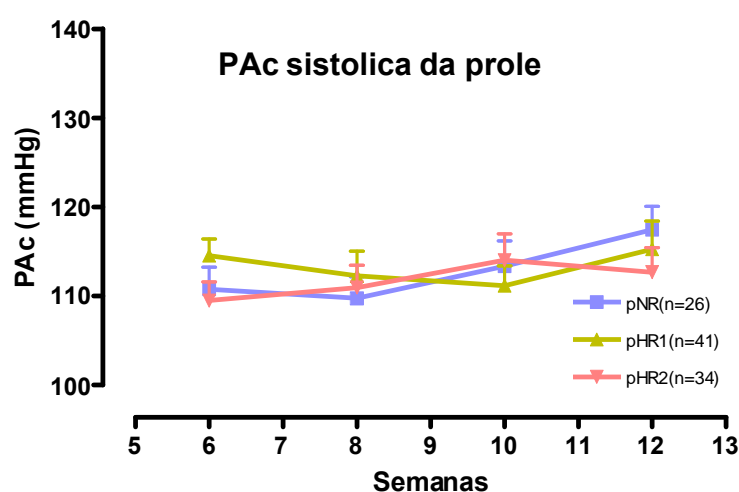
A evolução ponderal não foi diferente entre as proles femininas, cujas mães receberam diferentes conteúdos de sódio durante a gestação desde o nascimento até a 12<sup>a</sup> semana de vida. Estes resultados são representados na figura 8 e na Tabela 6.



**Figura 8.** Evolução ponderal das proles femininas, cujas mães receberam as dietas normossódica [1,3% NaCl (pNR)], hipersódica 1 [4,0%NaCl (pHR1)] ou hipersódica 2 [8% NaCl (pHR2)] durante a gestação. Após o nascimento, as proles receberam dieta normossódica (Nuvital) até a vida adulta. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Two way-ANOVA).

#### 4.2.2 Pressão arterial caudal

A figura 9 mostra que a pressão caudal não foi diferente entre as proles. Estes dados indicam que a sobrecarga de sódio durante a gestação não influenciou na pressão arterial das proles femininas ao longo do crescimento (Tabela 7).



**Figura 9.** Pressão arterial caudal (PAC) das proles femininas da 6ª a 12ª semana de vida, cujas mães receberam dieta normossódica [1,3% NaCl (pNR)], hipersódica 1 [4,0%NaCl (pHR1)] ou hipersódica 2 [8% NaCl (pHR2)] durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. (Two-Way ANOVA).

#### 4.2.3 Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

Na 12ª semana de idade, as proles femininas foram submetidas aos testes de restrição ou sobrecarga de sódio durante 07 dias. Foram realizadas medidas de PAC antes e depois dos testes. Após estes testes, foram quantificadas as arteríolas renais positivas para os grânulos de renina. Avaliamos ainda: atividade da renina no córtex renal e no plasma, os níveis

séricos de nitrito e aldosterona. Adicionalmente foram determinadas a expressão do mRNA da renina, COX-2 e nNOS no córtex e medula renal. Todas estas variáveis foram analisadas nos animais em condições basais.

#### **4.2.3.1 Pressão arterial caudal**

Os resultados de PAc das proles femininas em condições basais e após os testes de restrição e sobrecarga de sódio são ilustrados na figura 10. Não foi observada diferença na PAc nos três grupos de prole em condições basais (Tabela 8).

A PAc do grupo pNR quando submetido à restrição com dieta HO foi semelhante ao seu grupo controle. Entretanto, no teste de restrição com HO + CAP, a PAc foi menor e no teste de sobrecarga de sódio (HIPER) foi maior quando comparado ao seu grupo controle (Figura 10B).

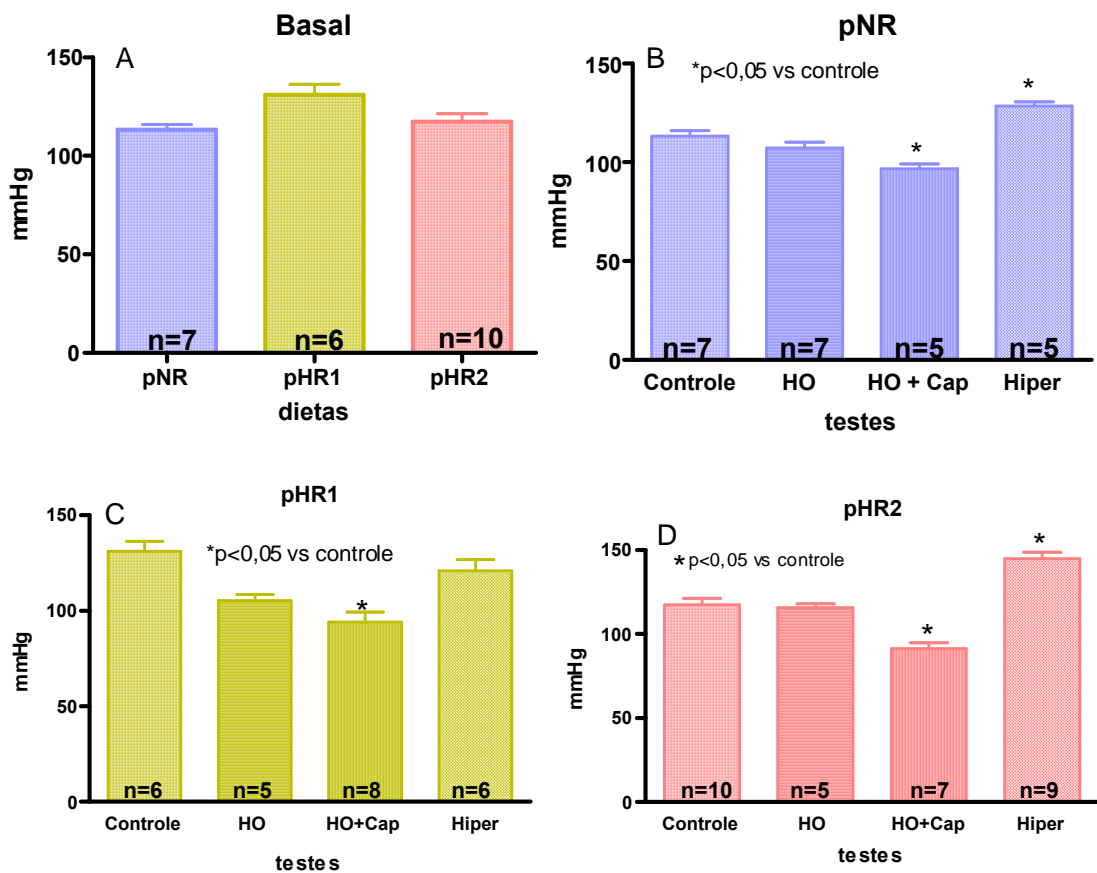
O grupo pHR1 apresentou PAc menor quando submetido ao teste de restrição de sódio HO + CAP em relação ao seu grupo controle, entretanto quando submetido ao teste de sobrecarga HIPER, a PAc não foi diferente do seu grupo controle (Figura 10C).

A PAc da prole pHR2 foi menor quando submetida ao teste de restrição HO+CAP e maior no teste de sódio HIPER quando comparado ao seu grupo controle (Figura 10D). Os resultados demonstram que apenas a restrição de sódio por 7 dias não alterou a PAc da prole feminina, independente da dieta recebida pela mãe durante a gestação.



## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## PAC



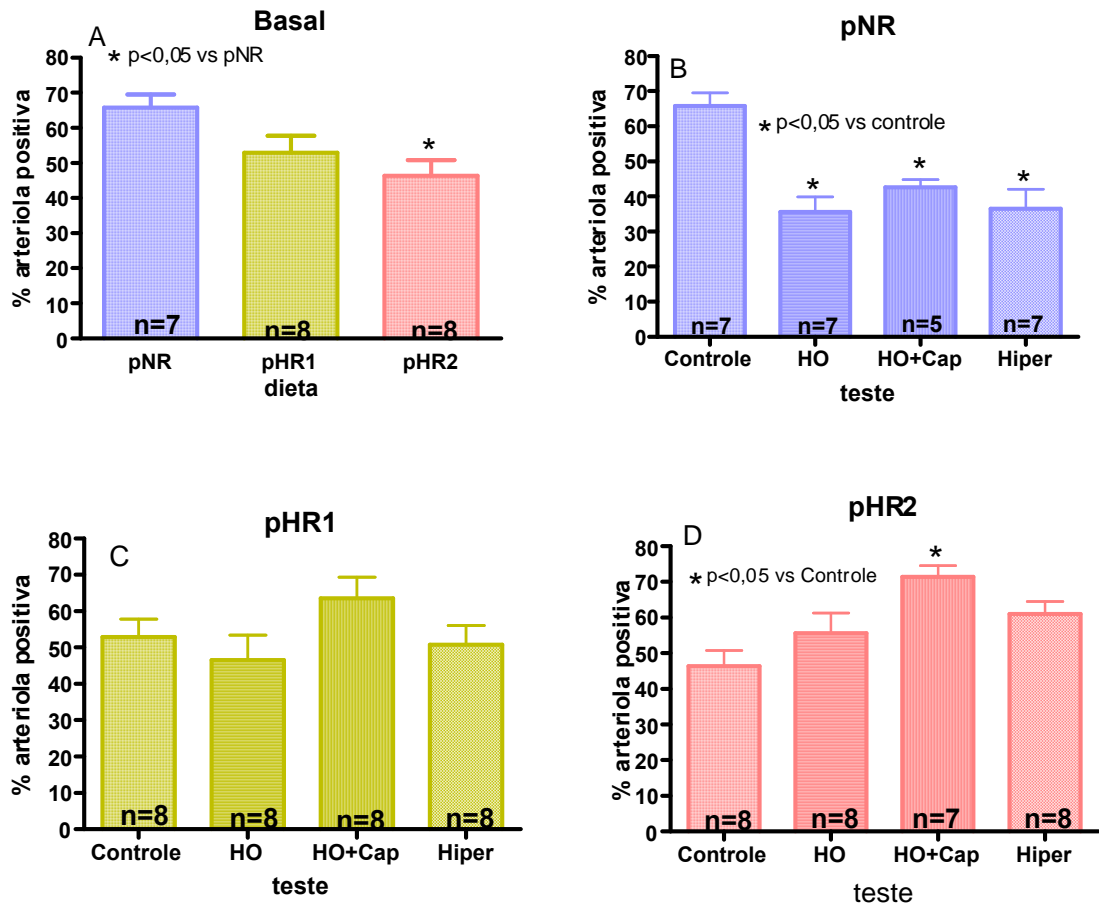
**Figura 10.** Pressão arterial caudal da prole do grupo basal (10A) e dos grupos que foram submetidos aos testes de restrição (HO e HO+ Cap) ou sobrecarga de sódio (Hiper), provenientes de mães que receberam dieta normossódica (pNR- figura 10B), hipersódica 1 (pHR1- figura 10C) ou hipersódica 2 (pHR2- figura 10D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

#### **4.2.3.2 Quantificação dos ramos vasculares com grânulos de renina (%)**

A quantificação dos ramos com grânulos de renina foi realizada tanto em condições basais quanto após restrição ou sobrecarga de sódio nas proles femininas cujas mães receberam diferentes conteúdos de sódio durante a gestação (Figura 11, Tabela 9). Em condições basais, a prole pHR2 apresentou menor porcentagem de ramos com grânulos de renina em relação ao grupo pNR, indicando que o excesso de sal da dieta materna durante a gestação diminuiu o número de ramos com grânulos de renina na prole adulta. A prole pNR quando submetida tanto ao teste de restrição (HO ou HO+Cap) ou sobrecarga de sódio (HIPER) apresentaram menor porcentagem dos ramos com grânulos de renina quando comparada ao grupo controle (Figura 11B). A porcentagem de ramos com grânulos de renina não foi diferente entre os testes na prole pHR1 (Figura 11C). Por sua vez, a prole pHR2 apresentou maior porcentagem de ramos com grânulos de renina no teste de restrição de sódio HO+CAP em comparação com o seu controle (Figura 11D).

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## Ramos vasculares com grânulos de renina



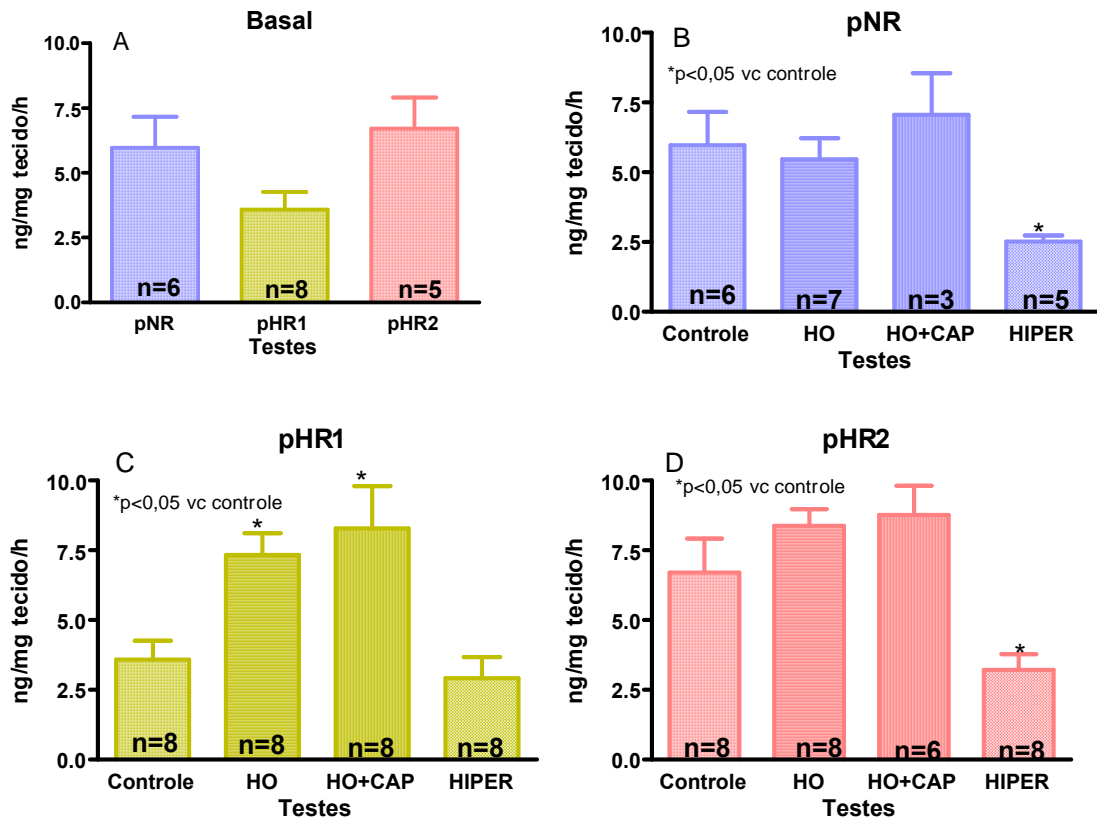
**Figura 11.** Porcentagem de ramos vasculares com grânulos de renina na prole do grupo basal (11A) e dos que foram submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga de sódio (Hiper) cujas mães receberam dieta normossódica (pNR- figura 11B), hipersódica 1 (pHR1- figura 11C) ou hipersódica 2 (pHR2- figura 11D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

#### 4.2.3.3 Medida da atividade da renina no córtex renal

Os resultados da atividade da renina do córtex renal (ARR) estão representados na figura 12. Em condições basais, não foi observada diferença na ARR no córtex entre as proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sódio durante a gestação (Figura 12A, Tabela 10). Atividade de renina no córtex renal da prole pNR não foi diferente quando submetida à restrição (HO ou HO+CAP), porém estava diminuída significativamente quando exposta à sobrecarga de sódio (HIPER) em relação ao seu grupo controle (Figura 12B). Por outro lado, a prole pHR1 apresentou, aumento significativo da atividade da ARR em ambos testes de restrição de sódio, sem, no entanto, não apresentar diferença na ARR ao teste HIPER (Figura 12C). Por sua vez, a prole pHR2, o teste de sobrecarga de sódio (HIPER), diminuiu significativamente a ARR em relação ao seu grupo controle (Figura 12D), entretanto, sem alterar a ARR na restrição de sódio. Estes resultados demonstram que a sobrecarga de sódio durante a gestação torna o sistema renina angiotensina mais responsivo ao seu estímulo ou a sua inibição

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## Atividade da renina no córtex renal



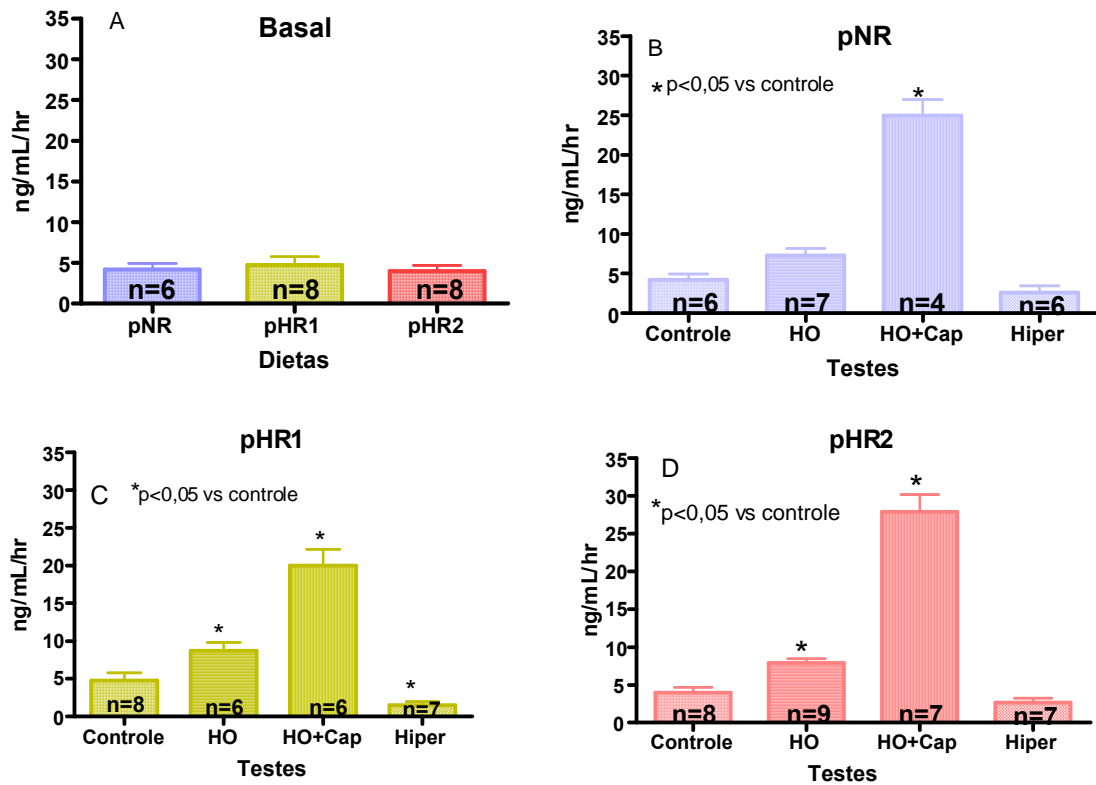
**Figura 12.** Atividade da renina renal das proles do grupo basal (figura 12A) e dos grupos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga de sódio (Hiper), cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 12B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 12C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 12D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

#### 4.2.3.4 Medida da atividade da renina plasmática

A atividade da renina plasmática (ARP), em condições basais, não foi significativamente diferente nos 3 grupos de prole (pNR,  $4,2 \pm 0,7$  [n=6]; pHR1,  $4,7 \pm 1,03$  [n=8] e pHR2,  $4,0 \pm 0,7$  [n=8]), independente da dieta recebida pela mãe durante a gestação (Figura 13A, Tabela 11). a ARP da pNR foi maior no teste de restrição de sódio (HO+Cap) comparado ao seu controle (Figura 13B). As proles pHR1 e pHR2 tiveram maior ARP no teste de restrição de sódio tanto com HO como HO+ Cap quando comparado com os seus respectivos grupos controle (Figuras 13C, 13D). No teste de sobrecarga de sódio (HIPER), a ARP foi menor no pHR1, mas não no pHR2 quando comparado aos seus respectivos controles.

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## Atividade da renina plasmática



**Figura 13.** Atividade da renina plasmática das proles do grupo basal (figura 13A) e dos grupos submetidos a restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 13B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 13C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 13D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

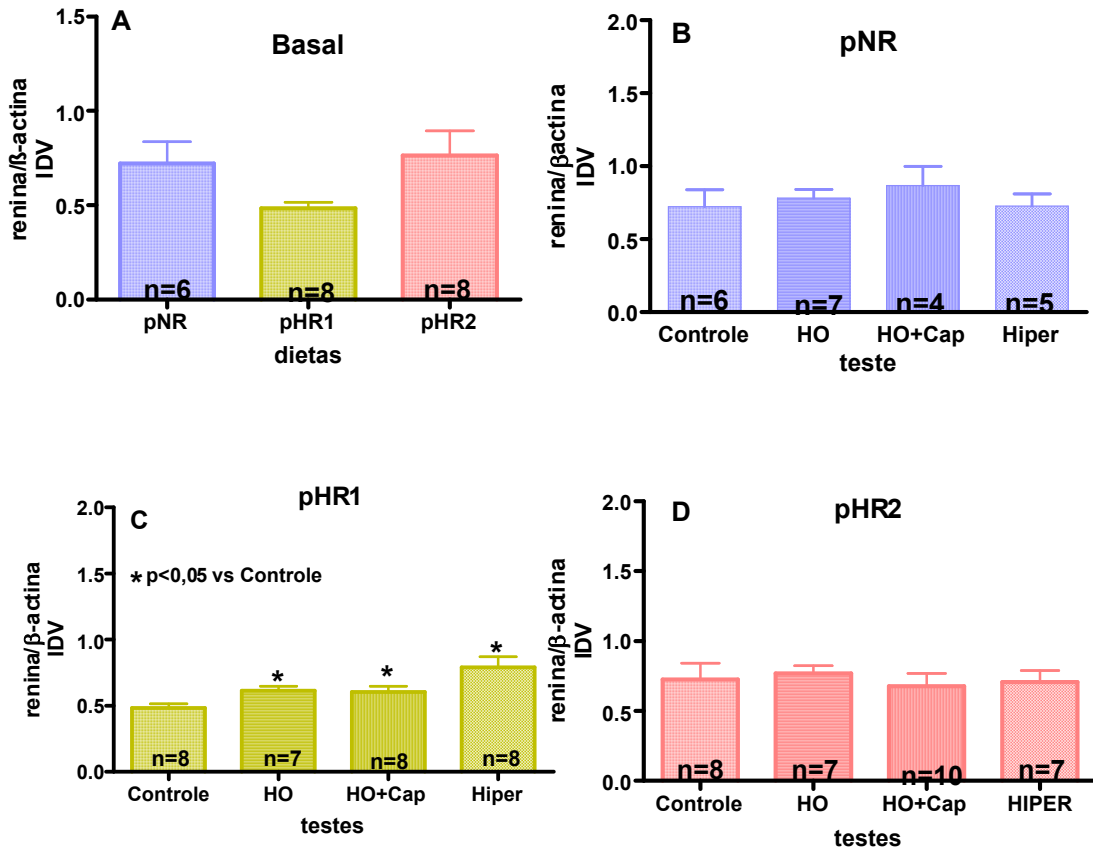
#### 4.2.3.5 Expressão do mRNA da renina na medula

A figura 14 mostra a expressão do mRNA da renina na medula renal (Tabela 12). Não houve diferença significativa na expressão do mRNA da renina em condições basais entre as proles cujas mães receberam diferentes conteúdos de sódio durante a gestação (Figura 14A).

A prole pHR1 apresentou maior expressão do mRNA da renina comparada ao seu grupo controle, quando submetida tanto ao teste de restrição como de sobrecarga de sódio, (Figura 14C). As proles pNR e pHR2 não apresentaram diferença na expressão do mRNA da renina comparadas aos seus respectivos controles quando submetidas aos testes de restrição ou sobrecarga de sódio (Figuras 14B e 14D).



**Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio  
mRNA da renina na medula renal**



**Figura 14.** Expressão do mRNA da renina da medula renal das proles do grupo basal (figura 14A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 14B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 14C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 14D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

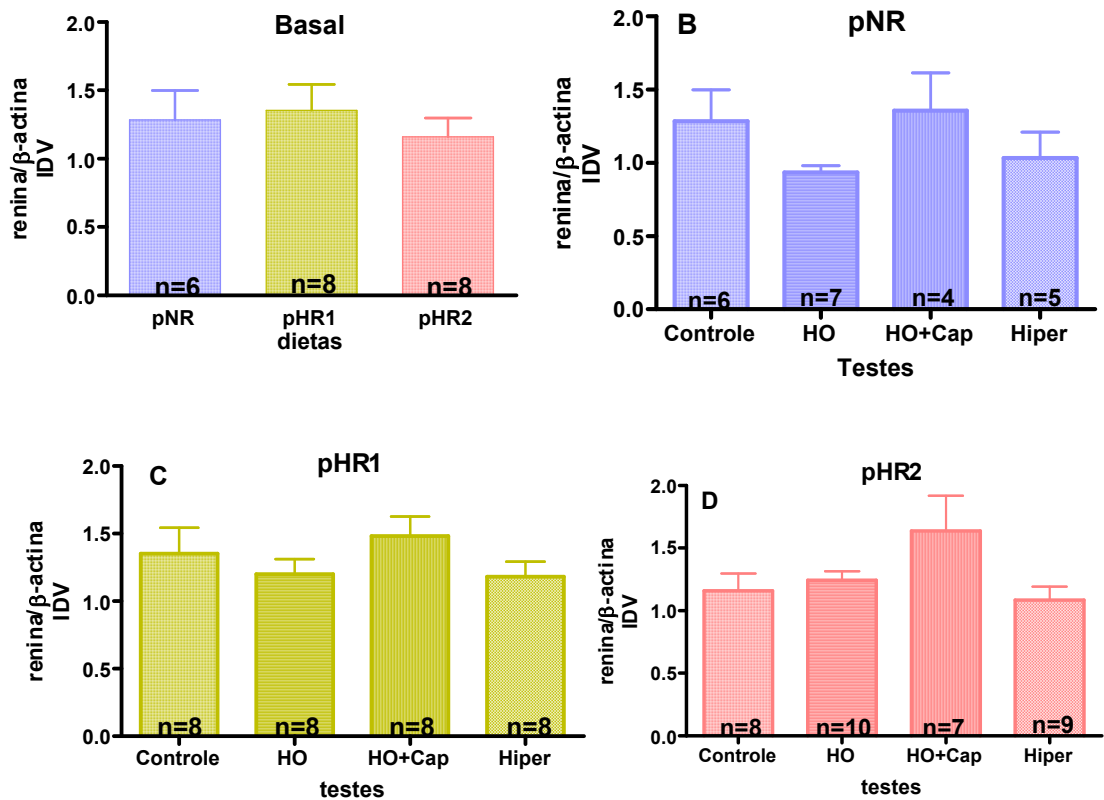
#### **4.2.3.6 Expressão do mRNA da renina no córtex**

A figura 15 mostra os resultados da expressão do mRNA da renina no córtex renal das proles femininas (Tabela 13). Nos três grupos de proles não houve diferença na expressão do mRNA da renina no córtex renal, em condições basais (Figura 15A).

A expressão do mRNA da renina nos três grupos de prole não foi diferente dos seus respectivos grupos controles (Figura 15B, 15C e 15D), quando as proles foram submetidas aos testes de restrição (HO ou HO+Cap) ou sobrecarga de sódio (HIPER) (Figura 15B, 15C e 15D).

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## mRNA da renina córtex renal



**Figura 15.** Expressão do mRNA da renina do córtex renal das proles do grupo basal (figura 15A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO+ ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 15B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 15C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 15D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (One Way ANOVA).

#### 4.2.3.7 Aldosterona sérica

A aldosterona sérica foi quantificada, em condições basais e pós-teste de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga de sódio (HIPER) nas proles femininas pNR, pHR1 e pHR2.

A concentração de aldosterona sérica não foi diferente entre as proles. Em resposta aos testes de restrição de sódio (HO), a prole pNR apresentou menor concentração ( $p < 0,05$ ) de aldosterona sérica quando comparado ao seu grupo controle, em condições basais. Nos demais testes não houve diferença nos níveis de aldosterona nas proles pNR, pHR1 e pHR2 quando comparados aos seus respectivos grupos controles (Tabela 14).

**Tabela 14:** Concentração sérica de aldosterona das proles femininas do grupo basal e nos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Aldosterona sérica (pg/ml)</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	1005,0±153,3 n=6	384,3±145,5* n=7	695,3±286,9 n=3	681,6±66,49 n=5
pHR1	680,9±161,7 n=9	598,0±145,5 n=8	536,4±64,33 n=8	350,6±67,52 n=7
pHR2	988,9±210,2 n=12	713,8±185,0 n=8	660,7±124,2 n=6	725,6±60,63 n=9

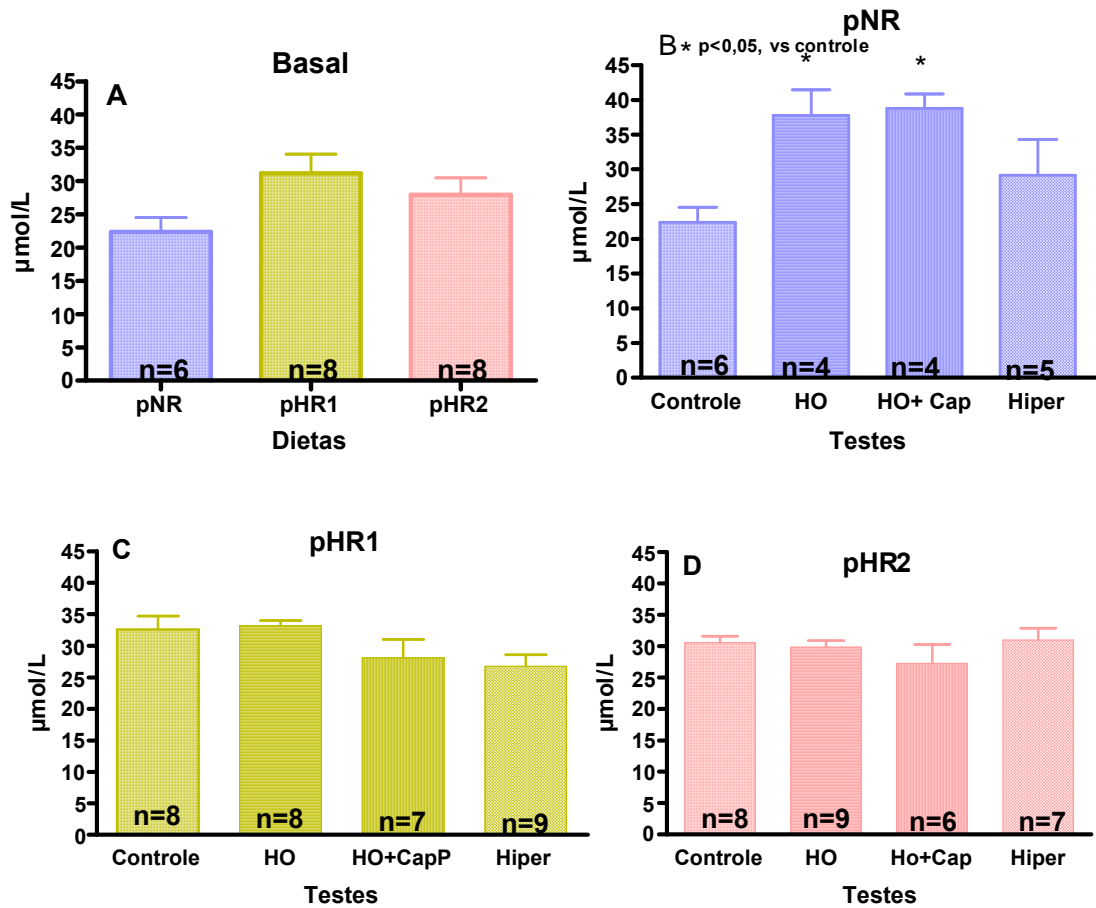
Os valores são expressos como média + erro-padrão das médias. \* $p < 0,05$  vs pNR-basal; (One Way ANOVA).

#### **4.2.3.8 Concentração sérica de nitrito**

As concentrações séricas de nitrito quantificadas na prole feminina são apresentadas na figura 16 e tabela 15. As proles pHR1 e pHR2 apresentaram níveis séricos de nitrito mais elevados, porém não significantes, comparado a prole pNR, em condições basais (Figura 16A). A prole pNR quando submetida ao teste de restrição de sódio (HO e HO+CAP) apresentou maiores concentrações de nitrito em relação ao seu grupo controle (Figura 16B). Por sua vez, as proles pHR1 e pHR2 quando submetidas ao teste de restrição ou sobrecarga de sódio não apresentaram diferenças significativas dos níveis séricos de nitrito comparado aos seus respectivos grupos controles (Figuras 16C e 16D).

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## Concentração de nitrito



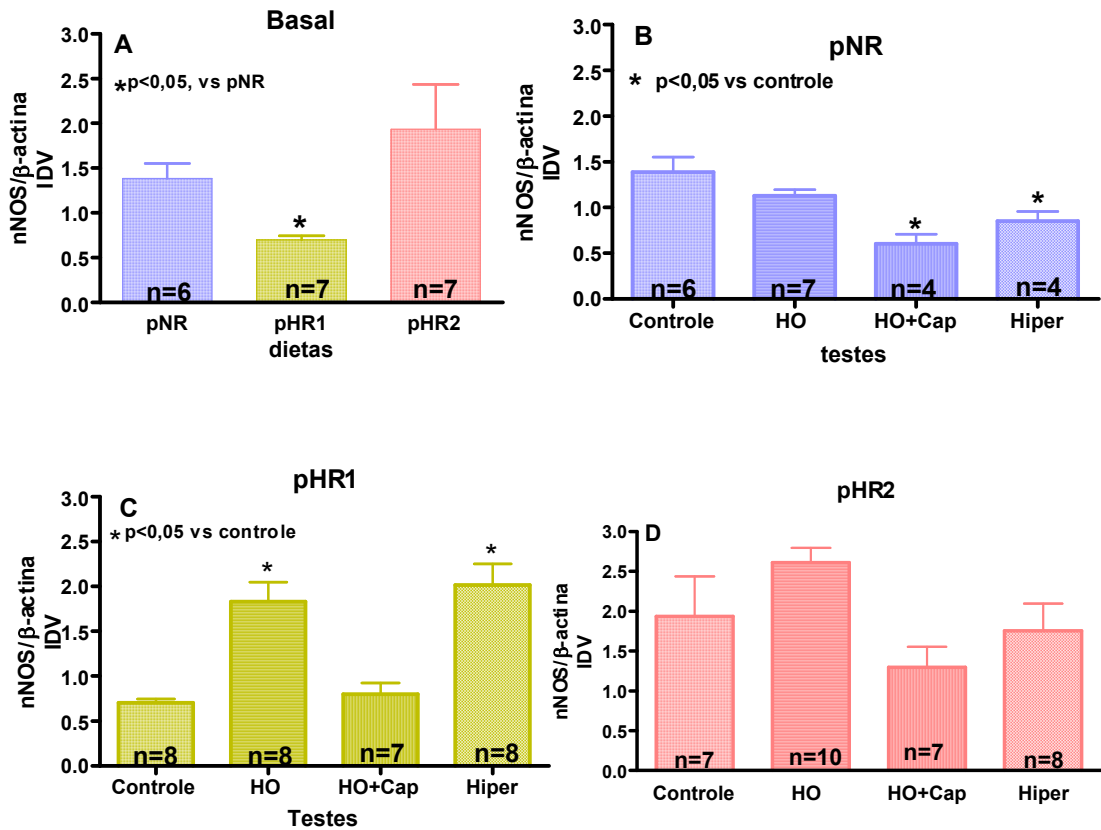
**Figura 16.** Concentração sérica de nitrito nas proles do grupo basal (figura 16A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 16B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 16C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 16D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). \* $p < 0,05$  vs controle.

#### 4.2.3.9 Expressão do mRNA da nNOS na medula

Os resultados de expressão do mRNA do mRNA da nNOS na medula renal das proles são apresentados na figura 17 e tabela 16. As fêmeas da prole pHR1 apresentaram menor expressão do mRNA do mRNA da nNOS na medula quando comparadas às fêmeas da prole pNR, em condições basais (Figura 17A). A prole pNR, tanto o teste de restrição (HO+CAP) quanto de sobrecarga (HIPER) de sódio apresentaram menor expressão do mRNA da nNOS quando comparado ao seu grupo controle (Figura 17B). Por sua vez, a prole pHR1 apresentou um aumento significativo da expressão do mRNA da nNOS quando comparado ao seu grupo controle frente ao teste de restrição (HO) e sobrecarga de sódio (HIPER) (Figura 17C). A prole pHR2 não apresentou diferença na expressão do mRNA da nNOS na medula renal quando submetida ao testes de restrição e de sobrecarga de sódio em relação ao seu grupo controle (Figura 17D).

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## mRNA da nNOS na medula renal



**Figura 17.** Expressão do mRNA da nNOS na medula renal das proles do grupo basal (figura 17A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 17B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 17C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 17D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

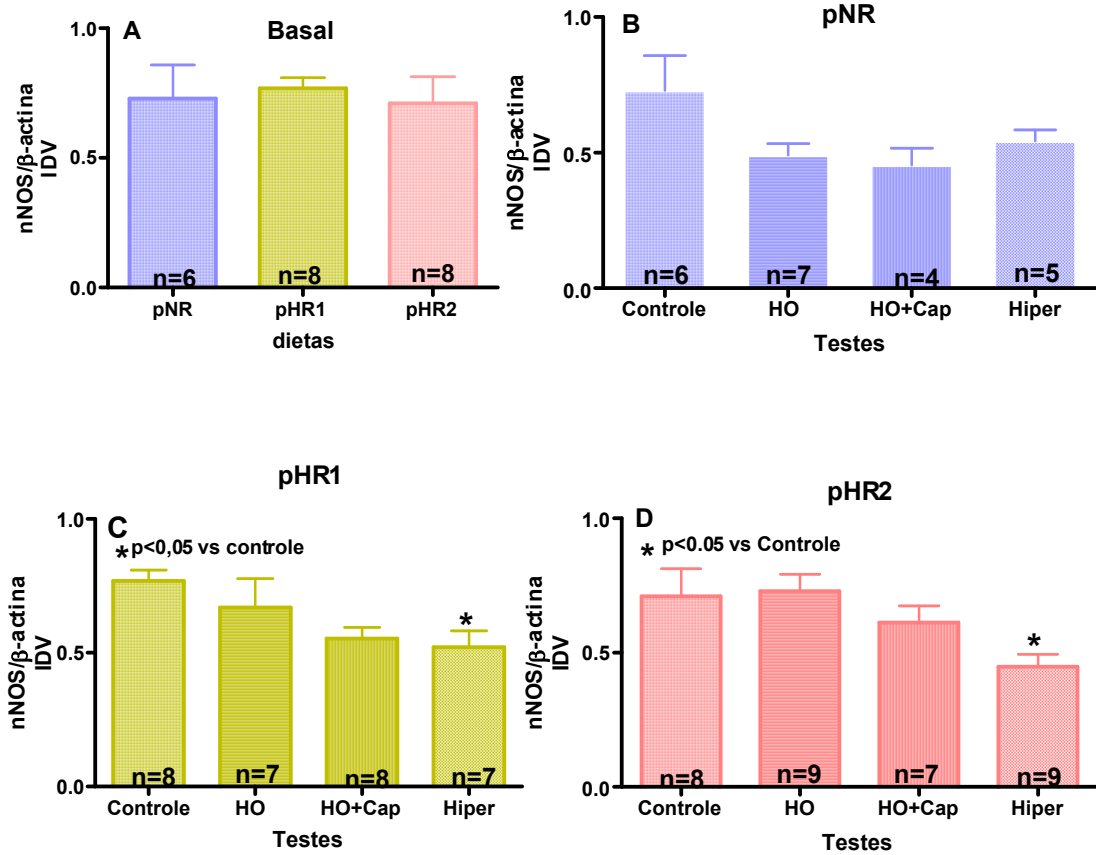


#### **4.2.4 Expressão do mRNA da nNOS no córtex**

A expressão do mRNA da nNOS no córtex renal não foi diferente entre as proles, em condições basais, (Figura 18A, Tabela 17). A prole pNR não apresentou diferença significativa na expressão do mRNA da nNOS no córtex renal em relação ao grupo controle quando submetida aos testes de restrição ou à sobrecarga de sódio (Figura 18B). Por outro lado, diante de sobrecarga de sódio (HIPER), as proles pHR1 e pHR2 apresentaram menor expressão do mRNA da nNOS em relação aos seus respectivos grupos controles (Figuras 18C e 18D).

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## mRNA da nNOS no córtex renal



**Figura 18.** Expressão do mRNA da nNOS no córtex renal das proles do grupo basal (figura 18A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 18B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 18C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 18D) durante a gestação. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

#### 4.2.5 Expressão da nNOS renal por imuno-histoquímica

A expressão da nNOS por imunohistoquímica foi avaliada no rim no intuito de localizar e quantificar a expressão no córtex e medula renal das proles adultas, cujas mães receberam dieta normossódica ou hipersódica 1 ou hipersódica 2, em condições basais.

Observamos que não houve diferença significativa na expressão desta enzima entre os três grupos tanto na medula [ $pNR = 2.07 \pm 0.98$  cels/mm<sup>2</sup>, n= 7;  $pHR1 = 1.54 \pm 0.64$  cels/mm<sup>2</sup>, n= 8;  $pHR2 = 3.03 \pm 0.85$  cels/mm<sup>2</sup>, n= 8] como no córtex [ $pNR = 1.96 \pm 0.16$  cels/mm<sup>2</sup>, n= 7;  $pHR1 = 1.53 \pm 0.17$  cels/mm<sup>2</sup>, n= 8;  $pHR2 = 1.64 \pm 0.13$  cels/mm<sup>2</sup>, n= 8].

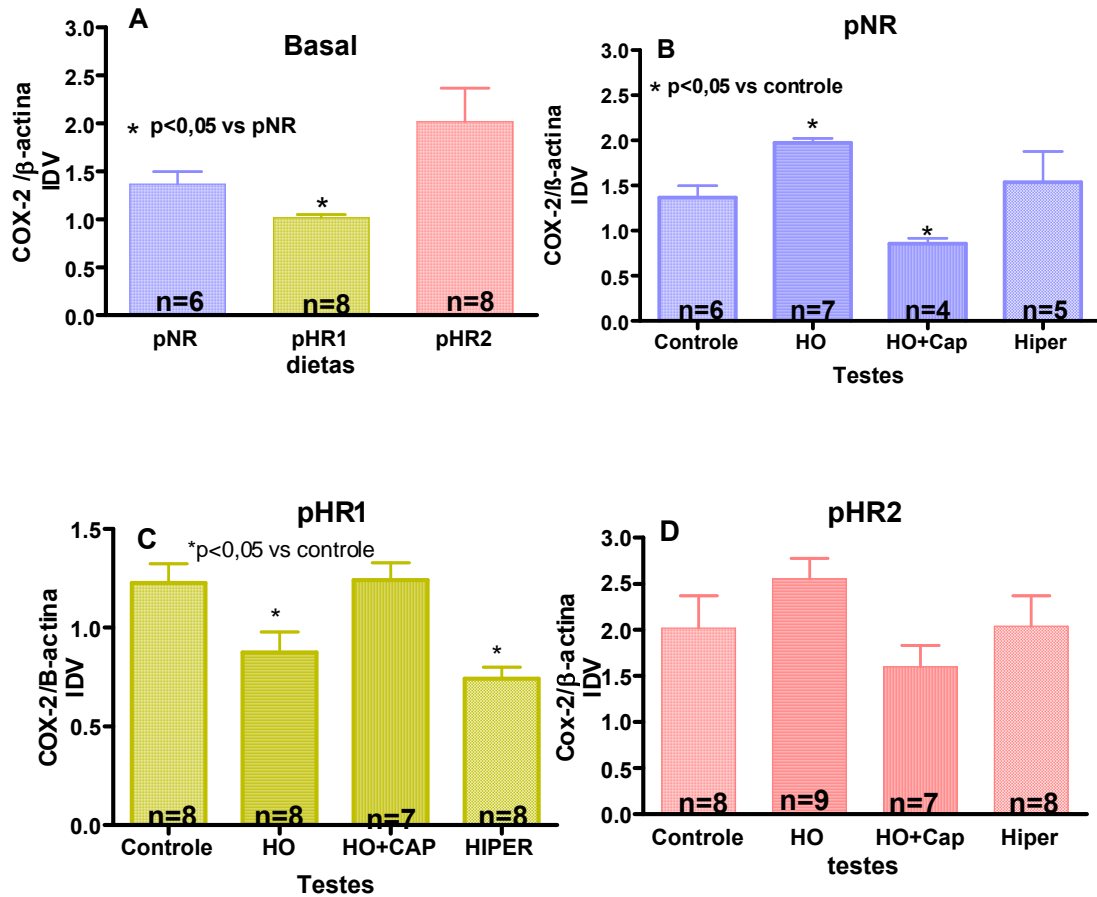
A expressão imuno-histoquímica da nNOS foi encontrada nas células da macula densa na região cortical; enquanto que na medula, a expressão desta enzima se restringiu aos ductos coletores. Foi observado que a relação medula/córtex da expressão imuno-histoquímica de nNOS é duas vezes maior na prole de pHR2 em relação as outras proles.

#### 4.2.6 Expressão do mRNA da COX-2 na medula

Os resultados de expressão do mRNA da COX-2 da medula estão apresentados na figura 19 e tabela 18. A prole do grupo pHR1 apresentou menor expressão mRNA da COX-2 quando comparada com a prole pNR, em condições basais (Figura 19A). As proles pNR apresentaram maior e menor expressão do mRNA da COX-2, respectivamente, quando comparadas com seus grupos controle e submetidas aos testes de restrição de sódio com HO e HO+Cap (Figura 19B). A prole pHR1 apresentou menor expressão do mRNA da COX-2 tanto no teste de restrição (HO) como no teste de sobrecarga (HIPER) de sódio relação ao controle (Figura 19C). Por outro lado, a prole pHR2 não apresentou alteração na expressão do mRNA da COX-2 nos testes de restrição e de sobrecarga de sódio quando comparado ao seu grupo controle (Figura 19D).

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## mRNA da COX-2 na medula renal



**Figura 19.** Expressão do mRNA da COX-2 na medula renal das proles do grupo basal (figura 19A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 19B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 19C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 19D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

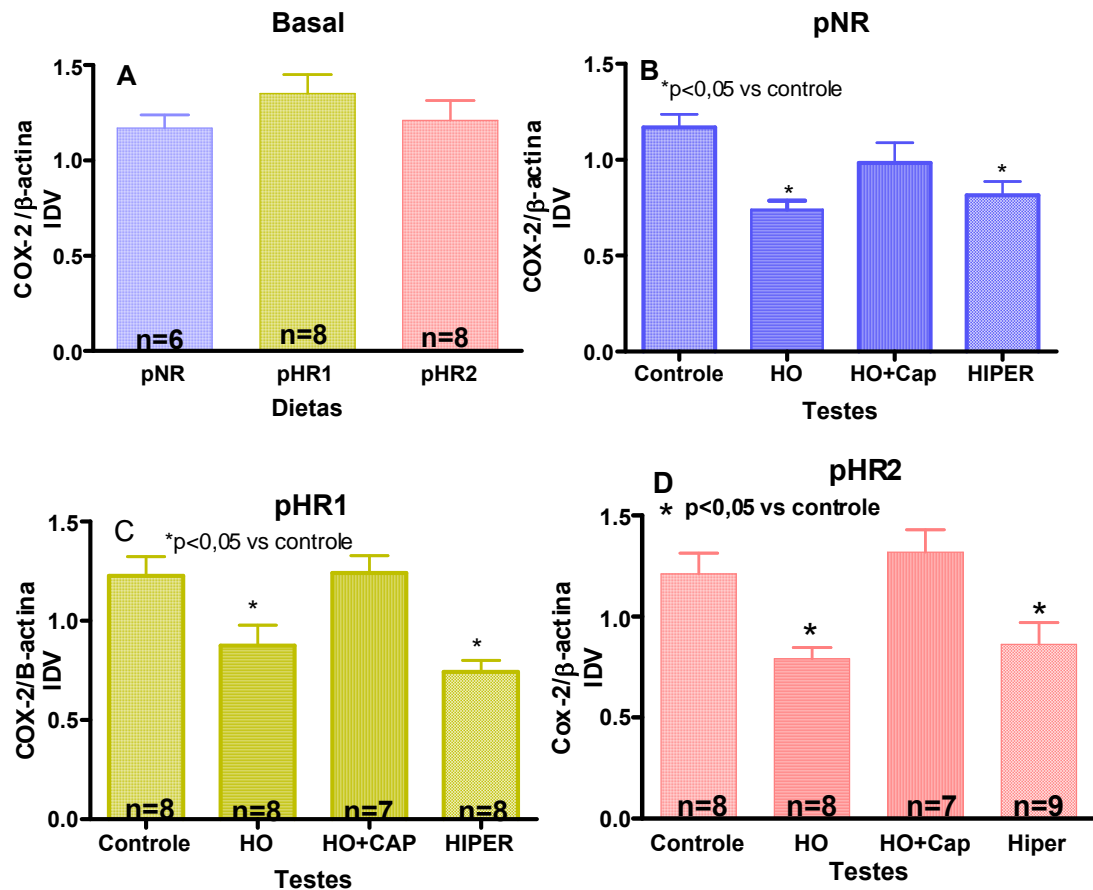
#### 4.2.7 Expressão do mRNA da COX-2 no córtex

Os resultados da expressão do mRNA da COX-2 do córtex renal da prole feminina estão na tabela 19. Em condições basais, a expressão do mRNA da COX-2 na região cortical não foi diferente entre os grupos (Figura 20A).

As proles de pNR, pHR1 e pHR2 apresentaram menor expressão do mRNA da COX-2 no córtex renal em relação ao seu respectivo grupo controle quando submetidas aos testes de restrição (HO) e de sobrecarga de sódio (HIPER) (Figura 20B, 20C e 20D). Os três grupos de prole não apresentaram diferença significativa na expressão do mRNA da COX-2 no teste com HO + CAP quando comparados com seus respectivos grupos controle.

## Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio

## mRNA da COX-2 no córtex renal



**Figura 20.** Expressão do mRNA da COX-2 no córtex renal das proles do grupo controle (figura 20A) e dos submetidos aos testes de restrição (HO ou HO+Captopril) ou sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dieta normossódica (pNR – figura 20B); hipersódica 1 (pHR1 – figura 20C) ou hipersódica 2 (pHR2 - figura 20D) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA).

#### **4.2.8 Expressão protéica da COX-2 na medula por Western Blotting**

Os resultados de expressão protéica da COX-2 na medula estão na tabela 20. A pNR apresentou aumento significativo da expressão protéica da COX-2 na medula quando diante do teste de restrição (HO+Cap) e de sobrecarga de sódio (HIPER) quando comparado ao seu grupo controle. As proles pHR1 apresentaram um aumento significativo da expressão protéica da COX-2 quando submetidas à restrição de sódio (HO e HO+Cap) em comparação com o seu controle. Por sua vez, as proles pHR2 apresentaram um aumento significativo da expressão protéica somente no teste com sobrecarga de sódio (HIPER).

#### **4.2.9 Expressão protéica da COX-2 na córtex por Western Blotting**

As proles pHR1 e pHR2 apresentaram aumento significativo da expressão protéica nesta região diante do teste de restrição de sódio (HO), quando comparado às proles pNR (Tabela 21).



## **5. DISCUSSÃO**

No presente estudo avaliamos: 1) a influência do consumo materno de dietas com diferentes conteúdos sódio durante a gestação sobre a modulação do sistema renina-angiotensina-aldosterona renal e circulante em proles femininas adultas e 2) a interação regional entre COX-2, nNOS e o sistema renina-angiotensina renal em resposta à restrição e sobrecarga de sódio.

Vários estudos observaram que desnutrição materna ou sobrecarga de sódio durante a gestação resultam em hipertensão arterial na vida adulta. Estudo prévio no nosso laboratório observou aumento da pressão arterial nas proles adultas de ambos os sexos, cujas mães receberam sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação. A partir deste achado, foi testada a hipótese se a sobrecarga de sódio limitada ao período gestacional levaria também ao aumento da pressão arterial em fase tardia da vida. Interessantemente, no presente trabalho a pressão arterial não se elevou nas fêmeas da prole adulta nascidas de mães que receberam dieta HR1 (4% NaCl) ou HR2 (8% NaCl) na gestação. Estes resultados são consistentes com estudo recente de Porter e colab., (2007) onde observou que proles adultas de ratos Sprague-Dawley de ambos os sexos, cujas mães receberam dieta hipersódica (8% NaCl) ou normossódica (0,7% NaCl) durante a gestação apresentaram-se normotensas, sendo as medidas de pressão arterial realizadas por radiotelemetria. Em contraste, Tonkiss e

colab., (1998) detectaram aumento da pressão arterial pelo mesmo método na prole adulta, que foi mais expressivo quando se utilizou o método de aferição caudal, o que eles atribuíram ao estresse causado pela restrição do animal durante a medida da pressão arterial caudal. Em nosso estudo não observamos aumento da pressão arterial caudal na prole adulta nascida de mães que consumiram diferentes conteúdos de sódio na gestação, sendo possível conjecturar que o método de medida da pressão arterial caudal é válido e confiável tanto quanto a telemetria.

Vários trabalhos têm observado um efeito protetor do estrogênio sobre aumento da pressão arterial (Daniel, Eisen e Slater, 1987). Ojeda e colab., (2007) criaram um modelo de insuficiência placentária que resultou em fêmeas com baixo peso corpóreo ao nascimento, porém peso semelhante ao grupo controle quando adultas. Na pré-puberdade, no grupo com insuficiência placentária, tanto as fêmeas quanto os machos da prole se tornaram hipertensos, e somente os machos permaneceram hipertensos na pós-puberdade. As fêmeas ao atingir a idade adulta, tinham níveis pressóricos comparáveis aos das fêmeas adultas do grupo controle após reposição estrogênica, demonstrando que o estrogênio pode ser um fator estabilizador da pressão arterial e que diferenças entre sexos são determinantes em modelos de hipertensão programada. Embora nosso estudo não tenha avaliado os níveis séricos de estrogênio da prole, podemos supor que o efeito protetor do estrogênio pode ter prevenido a elevação da pressão arterial na prole de fêmeas em resposta ao aumento do conteúdo de sal da dieta materna.

Em concordância com os resultados obtidos por Porter e colab., (2007), o peso corpóreo da prole de fêmeas ao nascimento até a idade adulta, no presente trabalho, não foi influenciado pelo consumo de sódio materno durante o período gestacional, mesmo na vigência do aumento transitório da pressão arterial antes da gravidez (11<sup>a</sup> semana de vida) e na 2<sup>a</sup> semana de gestação. Estudo de da Silva e colab., (2003) observou menor peso corpóreo na prole feminina, cujas mães receberam sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação. Em contraste, o presente trabalho detectou que somente sobrecarga de sódio durante a gestação não foi capaz de modificar o peso corpóreo e a pressão arterial em fase tardia da vida.

Nosso estudo avaliou os níveis pressóricos em resposta à restrição e à sobrecarga de sódio nas proles femininas adultas. Foi observado que a pressão arterial não foi diferente em resposta à dieta hipossódica (HO) comparada aos seus respectivos grupos-controles. Entretanto, notou-se diminuição da pressão arterial no grupo HO+captopril, em todas as proles, independentemente do conteúdo de sódio da dieta materna, o que indica que mesmo com a sobrecarga de sal na gestação, a resposta hipotensora diante da restrição de sódio e captopril está preservada.

Além disso, estes resultados indicam que a ANGII circulante provavelmente tem papel importante na regulação da pressão arterial nas fêmeas da prole adulta nascida de mães que receberam sobrecarga crônica de sal na gestação, uma vez que diante da inibição da ECA e, conseqüentemente, bloqueio da síntese de ANGII, houve redução significativa da pressão arterial nesta prole.

Houve aumento da pressão arterial quando as proles cujas mães receberam dieta com 8,0% de NaCl na gravidez foram submetidas à sobrecarga de sódio na vida adulta, porém não se observou tal resposta nas proles cujas mães alimentadas foram com dieta normossódica. Este resultado sugere que diferentes mecanismos reguladores da pressão arterial são acionados diante da sobrecarga de sódio na vida adulta e tal ativação depende do conteúdo de sal da dieta materna. Contreras e colab., (2000) verificaram maior pressão arterial nas proles adultas nascidas de mães que receberam dieta com menor conteúdo de sódio (3,0% NaCl) durante a gestação e lactação, o que não foi observado quando utilizamos dieta materna com 4% e 8% NaCl somente na gestação. O nosso estudo verificou que há necessidade de uma segunda exposição da prole à sobrecarga de sal para que ocorra um incremento na pressão arterial. Resultados prévios de nosso laboratório observaram que a atividade de renina plasmática não é modulada pela variação no consumo de sal na prole adulta cujas mães receberam sobrecarga de sódio durante a gestação e amamentação (da Silva e colab, 2003). Com o objetivo de elucidar quais mecanismos estariam envolvidos nesta alteração da modulação do SRA, avaliamos neste estudo, as atividades da renina plasmática e intra-renal, a quantificação dos ramos vasculares com grânulos de renina, a expressão do mRNA da renina no córtex e na medula renal tanto em condições basais como após restrição ou sobrecarga de sódio na prole feminina adulta.

De acordo com resultados do estudo anterior, neste trabalho também foi observado que a atividade de renina plasmática não foi diferente do

controle na vigência de sobrecarga de sódio nas proles adultas nascidas de mães que receberam dieta hipersódica com 8,0% NaCl durante a gestação, enquanto que as proles provenientes de mães que receberam dieta hipersódica 4,0% NaCl apresentaram significativa redução na atividade da renina plasmática. A sobrecarga de sódio (8% NaCl) causou diminuição no número de ramos vasculares com grânulos de renina na prole pNR, mas não na pHR2. Estes achados podem explicar, em parte, um dos motivos pelos quais não houve alteração na modulação do SRA plasmático na prole cuja mãe recebeu dieta com 8.0% NaCl, evidenciado por nós e por da Silva e colab (2003). A prole cuja mãe recebeu dieta com 4.0% NaCl apresentou modulação adequada do SRA intra-renal e plasmático, mas não a prole pHR2, a partir deste achado pode se conjecturar que o efeito do sobrecarga de sódio sobre o sistema local e plasmático da prole dependeu da quantidade de sódio consumido durante a gestação. Entretanto, estudos da repercussão da sobrecarga de sódio durante a gestação sobre o sistema renina-angiotensina nas proles ainda é alvo de investigação.

Além da atividade de renina plasmática aumentada, a porcentagem de ramos renovasculares com grânulos de renina também estava aumentada em resposta à restrição de sódio associada ao captopril nas proles provenientes de mães que receberam sobrecarga de sódio. Este resultado está de acordo com o trabalho de Cheng e colab., (2001), no qual demonstrou que a restrição de sódio associada ao inibidor da ECA aumenta o conteúdo de renina renal. Tal resultado provavelmente é devido: 1) à inibição da síntese de angiotensina II pelo captopril, uma vez que a ANG II exerce feedback negativo sobre a

produção e liberação da renina, ou 2) devido ao maior recrutamento de células produtoras de renina de vasos renais de maior calibre imposta pelo uso do inibidor da ECA (Johns *et al.*, 1990; Shricker *et al.*, 1997). Além disso, nossos dados mostram que houve estímulo da expressão do mRNA da renina na medula com a restrição de sódio na dieta, principalmente nas proles provenientes de mães que receberam dieta com 4.0% NaCl. Tal achado também foi observado quando esta prole foi submetida ao teste de sobrecarga de sódio na vida adulta. Estes resultados demonstram que a sobrecarga de sódio durante a gestação aumenta o grau de resposta do sistema renina-angiotensina local diante de condições de restrição ou sobrecarga de sódio na vida adulta, porém tal resposta está na dependência da concentração de sódio que a mãe recebeu durante a gestação.

Vários estudos têm demonstrado que o controle da secreção de renina depende diretamente da nNOS e da COX-2 no aparelho justaglomerular, notadamente na mácula densa (Schnermann, 1998). É conhecido que as expressões do mRNA e protéica de COX-2 na região cortical aumentam em situações de restrição de sódio, inibição da enzima conversora de angiotensina e com aumento concomitante da atividade de renina plasmática (Cheng *et al.*, 2001). Um estudo recente verificou que o controle da expressão da COX-2 no córtex renal é via ANG II, sugerindo que angiotensina II inibe diretamente a expressão da COX-2 no córtex renal (Lim *et al.*, 2003). Os resultados do presente estudo estão de acordo com os resultados obtidos por Lim *et al.*, pois, observamos que restrição de sódio da dieta, causou uma diminuição da expressão do mRNA da COX-2 na

região cortical nos três grupos de prole feminina, provavelmente por ação inibitória da ANG II; e compensatoriamente, observamos um predominante aumento da expressão do mRNA da COX-2 na região medular. Para confirmar tais achados, analisamos a expressão protéica da COX-2 por Western Blotting, que demonstrou aumento da expressão protéica da COX-2 na região medular. Curiosamente, foi observado que o aumento da expressão do mRNA da renina foi acompanhado do aumento da expressão do mRNA da COX-2 e nNOS na região medular, na vigência de restrição de sódio, na prole cujas mães receberam sobrecarga de 4,0% NaCl. Este é um dos nossos achados mais importantes, pois evidencia que a prole cuja mãe recebeu 4.0% NaCl responde à ativação do SRA or meio de vias alternativas da COX-2 e nNOS da medula em condições de restrição de sódio; enquanto que a prole, cuja mãe recebeu 8% NaCl não respondeu da mesma maneira, diante do mesmo estímulo.

Yang e colab., (1998) demonstraram que há maior expressão do mRNA e protéica da COX-2 na região medular em resposta à sobrecarga de sódio. Resultados do presente estudo estão de acordo esses achados, pois observamos aumento da expressão do mRNA da COX-2 na região medular e, compensatoriamente, diminuição da expressão desta enzima na região cortical em resposta à sobrecarga de sódio na prole feminina adulta. O achado de menor expressão do mRNA da COX-2 na região cortical também está de acordo com estudos Hashimoto e colab., (2006), onde verificaram em camundongos que a sobrecarga de sódio por 10 dias tende a inibir a expressão da COX-2 nesta região.



A regulação diferencial da COX-2 no córtex e medula, na dependência de diferentes conteúdos de sódio na dieta, sugere que prostaglandinas em diferentes regiões do rim devem exercer diferentes funções: 1) na medula renal, participariam da excreção de sal e água numa situação de expansão de volume e 2) no córtex renal, atuariam preponderantemente na regulação da secreção de renina (Yang e colab, 1998).

Há evidências que o óxido nítrico (NO) tem efeito tanto inibitório como estimulador sobre a síntese e secreção de renina, que depende da ativação da proteína quinase-G ou da guanilato ciclase solúvel, respectivamente (Sigmon e colab., 1992; Johnson e colab., 1994). A secreção de renina do aparelho justaglomerular depende da ação estimuladora do óxido nítrico diante da restrição de sódio (Schnermann, 1998). O presente estudo observou também maior secreção de renina para o plasma, provavelmente em função da maior expressão imuno-histoquímica da óxido nítrico sintase neuronal na mácula densa e dos elevados níveis séricos de nitrito nas proles adultas nascidas de mães que receberam dieta normossódica, quando submetidas à restrição de sódio associada ao captopril. Apesar das proles, cujas mães receberam sobrecarga de sódio, apresentarem atividade de renina aumentada, a concentração sérica de nitrito não modificou, quando estas proles foram submetidas à restrição de sódio associado ao captopril. Este resultado sugere que a secreção da renina pode ser independente do estímulo do óxido nítrico nas proles que as mães receberam sobrecarga de sódio na dieta.

Não foi observada diferença na expressão do mRNA da nNOS da região cortical na prole cuja mãe recebeu dieta normossódica em relação ao controle, quando submetida à sobrecarga de sódio por uma semana. Estes resultados estão de acordo com estudo de Roczniak e colab.(1998) que suporta que alteração da expressão do mRNA da nNOS pode ser transitória, diante de sobrecarga de sódio aguda (3 dias), porém ao se estender o tempo de sobrecarga nenhuma alteração da expressão da nNOS no rim é evidenciada. Por outro lado, a prole cuja mãe recebeu sobrecarga de sódio durante a gestação apresentou aumento na expressão do mRNA da nNOS na região medular e, ao contrário, diminuição no córtex quando submetida ao tratamento de sobrecarga de sódio por uma semana. Estes resultados estão de acordo com relatos de Mattson e Higgins (1996) que evidenciaram aumento da expressão de nNOS na medula na vigência de sobrecarga crônica, mas não detectaram alteração da expressão da nNOS na região cortical. Diante dos resultados apresentados, o presente estudo sugere que o aumento do consumo materno de sal durante a gestação leva à alteração expressiva da expressão da nNOS no rim com menor tempo de sobrecarga de sódio nas fêmeas da prole, o que gera maior produção local de NO e resulta em uma resposta adaptativa ao consumo de diferentes conteúdos de sódio na dieta. Observamos que não só a sobrecarga, mas também a restrição de sódio podem levar ao aumento da expressão do mRNA de nNOS na região medular na prole cuja mãe recebeu dieta hipersódica durante a gestação. A escassez de estudos sobre o efeito da sobrecarga de sal na gestação sobre o sistema renina-angiotensina renal e suas inter-

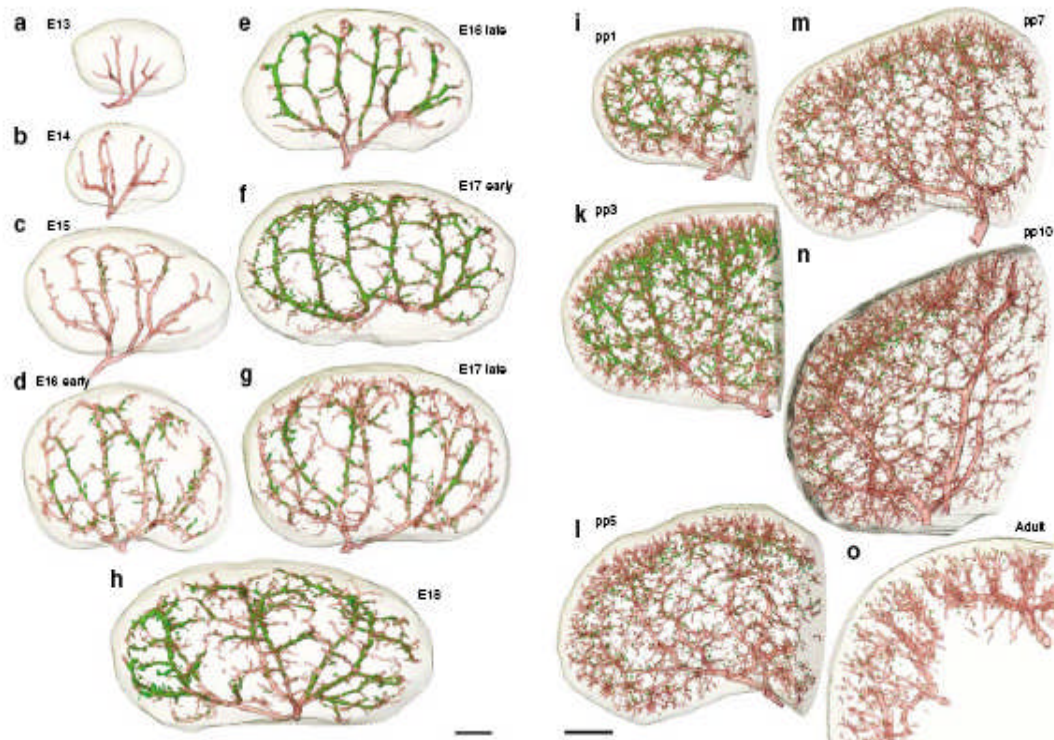
relações com as vias alternativas de controle de secreção da renina da prole adulta dificulta a interpretação dos resultados e, portanto, este assunto merece futuras investigações. Além disso, outros mecanismos intrínsecos podem estar envolvidos na regulação do balanço de sódio no rim em uma situação de sobrecarga de sódio, como por exemplo, participação de mediadores e moduladores da resposta do "feedback" túbulo glomerular e mecanismos intracelulares tais como concentração de cálcio intracelular, de cAMP/PKA e adenosina que estão envolvidos na secreção de renina do aparelho justaglomerular (Schnermann, 1998). Estes mecanismos merecem, portanto, serem estudados com mais detalhes, nas proles nascidas de mãe que receberam sobrecarga de sódio durante a gestação.

## **6. CONCLUSÕES**

- 1- Há uma associação direta entre a quantidade de cloreto de sódio consumida durante a gestação e a pressão arterial na prole feminina adulta diante de subsequente sobrecarga de sódio.
- 2- A sobrecarga de sódio durante a gestação influencia na ativação ou inibição do sistema renina-angiotensina intra-renal, da COX-2 e de nNOS da prole feminina adulta.
- 3- Sobrecarga de sal materna pode causar alteração do número de ramos vasculares com grânulos de renina nas fêmeas da prole adulta.

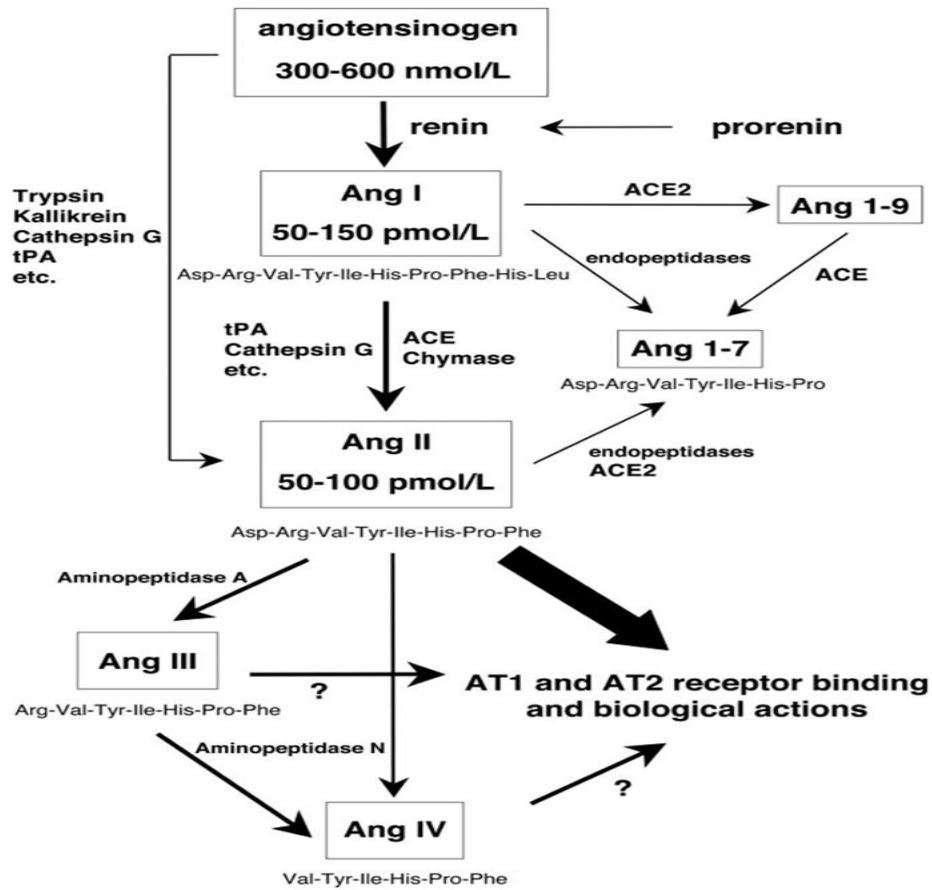
## **7. ANEXOS**

## ANGIOGÊNESE E VASCULOGÊNESE RENAL



**Figura 21.** Reconstrução das estruturas renovasculares, determinadas pela expressão da  $\alpha$ -SMA e da renina imunorreativas em rins de camundongos em desenvolvimento. A barra menor da região inferior da figura indica o estágio embrionário (E) e a barra maior, o período pós-natal (pp). O caractere “a” corresponde ao 13º dia do período embrionário (E13), seguido de outros períodos até E18. O caractere “i” corresponde ao 1º dia pós-natal (pp1) seguido de outros períodos até pp10 e o caractere “o” representa a idade adulta. A cor verde indica a renina imunorreativa e o marrom representa arteríolas  $\alpha$ -SMA-imunorreativas. (Adaptado de sauter e colab, 2007)

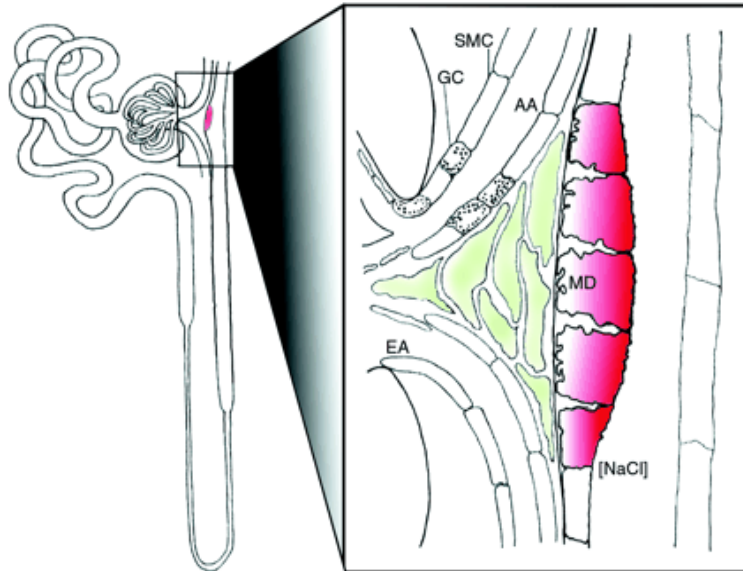
## OS COMPONENTES DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA



**Figura 22.** Ilustração do Sistema renina-angiotensina atual (Adaptado de Kobori e colab., 2007).

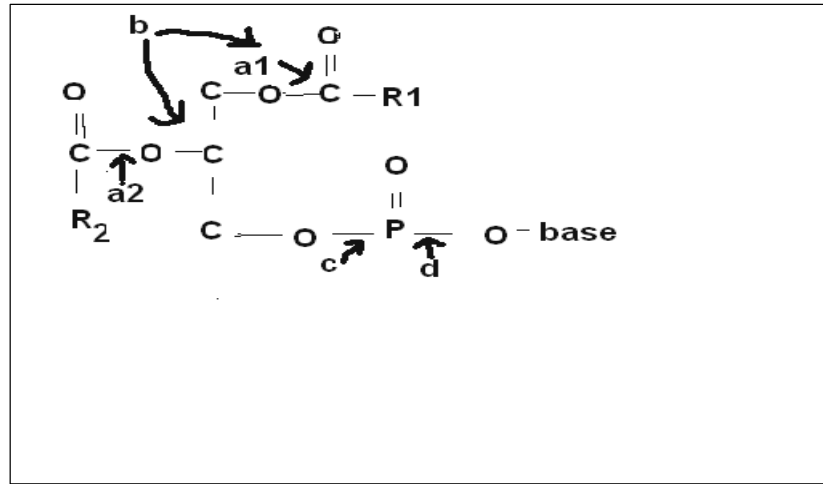


## O APARELHO JUSTAGLOMERULAR



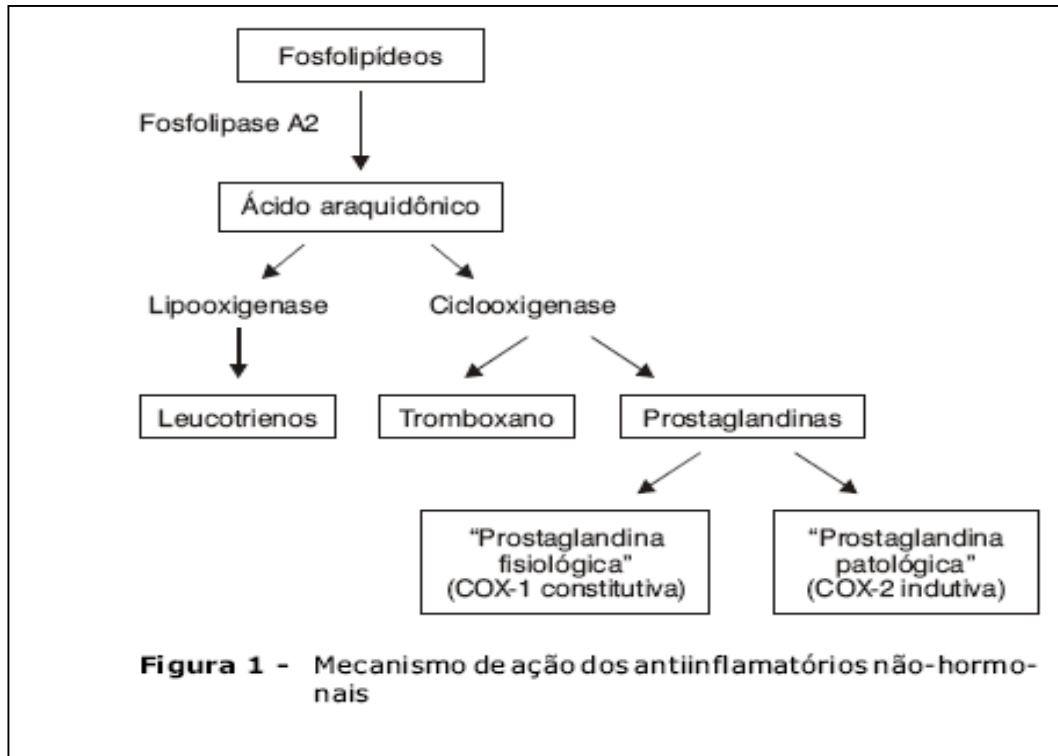
**Figura 23.** Desenho esquemático da arquitetura do néfron e componentes do aparelho justaglomerular, mostrando a posição da mácula densa e sua relação com seu glomérulo de origem. Em destaque à direita, nota-se a área de contato da mácula com o glomérulo. MD, mácula densa; AA, arteríola aferente; EA, arteríola eferente; GC, célula granulosa produtora de renina; SMC, célula da musculatura lisa (Adaptado de Schnermann e Briggs, 1999).

## AS CICLOOXIGENASES E SÍTIOS DE HIDRÓLISE



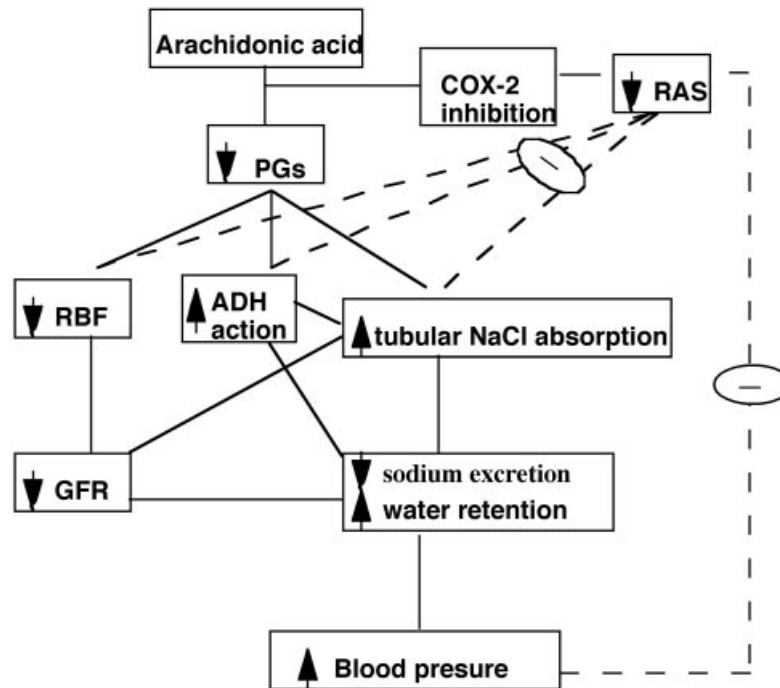
**Figura 24.** Sítios de hidrólise das fosfolipases (PLs) nos fosfolipídios. a1, a2, B, C e D, representam respectivamente PLA1, PLA2, PLB, PLC e PLD. A PLA1, hidrolisa o éster acil-1; PLA2 hidrolisa o éster acil-2; PLB hidrolisa ambos ésteres, PLC hidrolisa o glicerol-fostato e PLD cliva a base nitrogenada. R1 e R2 são ácidos graxos (Adaptado de Bonventre, 1992)

## AS CICLOOXIGENASES E LIPOXIGENASES



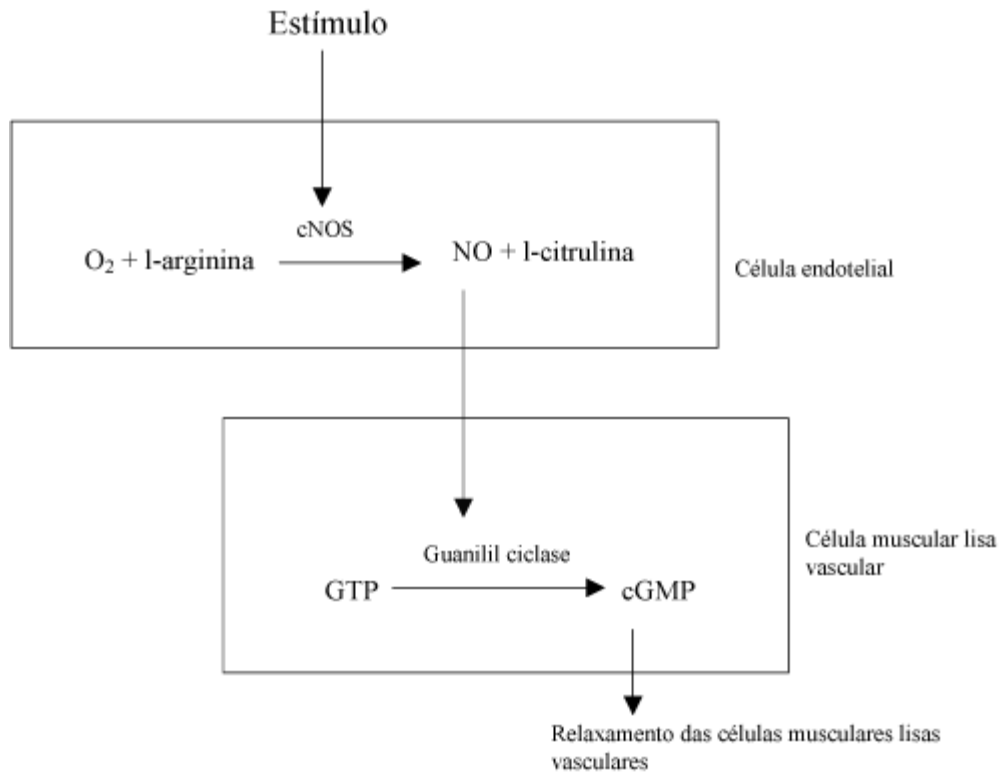
**Figura 25.** Metabólitos derivados do ácido araquidônico (Adaptado de Hilário e colab., 2006).

## INIBIÇÃO DO SRA X AUMENTO DA PRESSÃO ARTERIAL

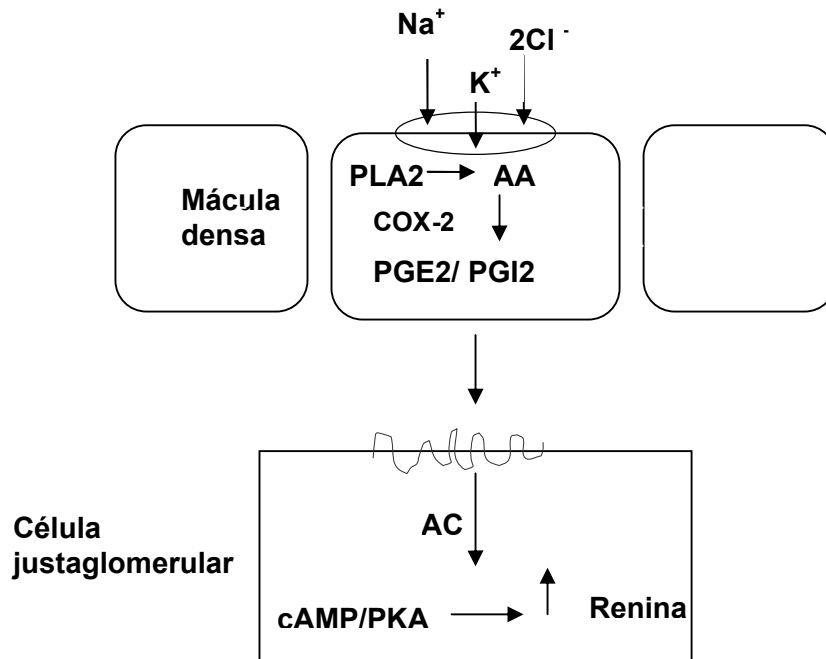


**Figura 26.** Efeito da inibição da ciclooxigenase-2 (COX-2) na pressão arterial. SRA = Sistema renina-angiotensina; GFR= taxa de filtração glomerular; RBF= fluxo sanguíneo renal; ADH= vasopressina; PG= prostaglandinas; P.A.= pressão arterial (Adaptado de Cheng e Harris, 2004).

## ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL E SEUS METABÓLITOS

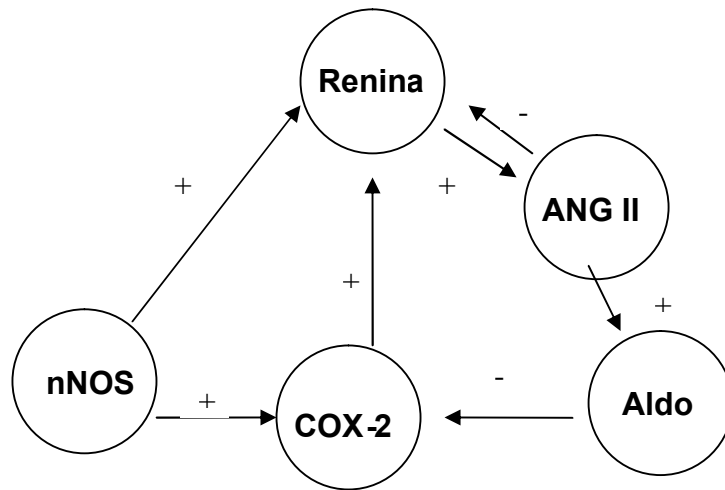


**Figura 27.** Biossíntese do óxido nítrico (NO) e sua ação vasodilatadora via cGMP (monofosfato cíclico de guanosina). A cNOS corresponde as óxido nítrico sintases constitutivas (eNOS e nNOS). A cNOS utiliza o oxigênio molecular e o aminoácido L-arginina pra produzir o NO e promove o relaxamento vascular via cGMP. Adaptado de Farrel e Blake (1996) e modificado por Cerqueira e Yoshida (2002)

**COX-2 E LIBERAÇÃO DE RENINA**

**Figura 28.** Mecanismos pelos quais a COX-2 pode influenciar na liberação de renina. PLA2 = fosfolipase A2; cAMP = Adenosina monofosfato cíclico; AC = Adenil ciclase, PKA = Proteína quinase A; AA = ácido araquidônico, PGE2 = prostaglandina E2, PGI2 = prostaciclina e COX-2 = ciclooxigenase-2. (Adaptado de Harris e Breyer, 2001)

### AS INTERRELAÇÕES DA COX-2



**Figura 29.** Interrelações possíveis entre nNOS e SRAA no controle da regulação da expressão da COX-2 na mácula densa e alça de Henle espessa. Aldo = aldosterona; COX-2 = ciclooxigenase-2; ANG II = angiotensina II e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). (Adaptado de Harris e Breyer, 2001)

## TABELAS DE RESULTADOS

**Tabela 4:** Evolução ponderal materna da 8<sup>a</sup> a 17<sup>a</sup> semana de vida

Evolução ponderal materna						
Dieta	NR n= 11		HR1 n=12		HR2 n=12	
semana	média	± EPM	média	±EPM	média	±EPM
8	189,26	6,13	206,51	6,11	206,58	10,30
9	208,14	7,79	230,29	7,48	222,78	8,75
10	238,15	6,03	253,14	7,21	243,54	8,67
11	256,61	7,52	270,07	6,69	257,52	8,82
12	268,16	6,58	283,35	7,02	273,05	10,11
13	298,53	6,88	310,49	8,63	304,12	9,81
14	338,93	9,68	344,23	10,76	334,61	6,19
15	401,80	11,54	427,17	13,96	402,67	10,10
16	337,22	9,12	343,02	7,914	335,03	11,48
17	349,89	6,94	350,97	7,53	334,30	8,95

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da media. As mães receberam dieta NR (normossódica, 1,3% de NaCl), HR1 (hipersódica 4,0% de NaCl) ou HR2 (hipersódica 8,0%de NaCl) da 8<sup>a</sup> a 15<sup>a</sup> semana de gestação.



**Tabela 5:** Pressão arterial caudal (PAC) materna antes, durante e após a gestação

<b>Pressão arterial caudal materna (mmHg)</b>						
<b>Dieta</b>	<b>NR n= 11</b>		<b>HR1 n=13</b>		<b>HR2 n=12</b>	
<b>semana</b>	<b>média</b>	<b>± EPM</b>	<b>média</b>	<b>±EPM</b>	<b>média</b>	<b>±EPM</b>
11	112,09	3,78	115,02	4,08	128,85*	4,84
13	112,46	4,26	119,72	6,49	121,39	5,03
14	111,11	3,88	123,46**	4,63	127,21**	3,93
16	105,12	8,40	116,17	5,78	118,52	6,35
17	115,26	3,90	117,58	7,30	122,54	5,13
18	112,54	5,36	121,48	6,92	124,06	15,08

Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da media. As mães receberam dieta NR (normossódica, 1,3% de NaCl), HR1 (hipersódica 4,0% de NaCl) ou HR2 (hipersódica 8,0% de NaCl) da 8ª a 18ª semana de vida. A pressão arterial caudal sistólica foi medida da 11ª a 18ª semana de vida. \* $p < 0,05$  vs 11ª NR. \*\* $p < 0,05$  vs 14ª NR. A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 6:** Evolução ponderal das proles femininas, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR), hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR) durante a gestação. As proles receberam dieta normossódica, independente da dieta que as mães receberam

<b>Evolução ponderal da prole (g)</b>						
<b>Dieta</b>	<b>pNR n= 26</b>		<b>pHR1 n=37</b>		<b>pHR2 n=34</b>	
<b>semana</b>	<b>média</b>	<b>± EPM</b>	<b>média</b>	<b>±EPM</b>	<b>média</b>	<b>±EPM</b>
0	6,45	0,44	6,88	0,26	6,69	0,28
1	16,11	1,42	17,76	1,31	17,65	0,90
2	25,03	1,77	30,67	1,58	26,96	1,55
3	46,20	3,49	47,15	2,03	46,68	2,71
4	79,66	6,20	71,26	3,79	66,58	3,61
5	113,27	8,82	110,79	5,10	112,19	5,52
6	139,45	12,73	146,03	5,89	142,83	6,02
7	159,40	11,30	171,76	6,41	165,10	6,53
8	175,96	12,11	188,51	6,89	186,92	7,05
9	190,90	12,83	204,98	7,64	206,39	8,59
10	205,70	14,01	217,14	7,99	218,10	9,08
11	215,93	14,47	226,76	8,32	225,72	9,34
12	226,93	15,33	226,67	11,50	235,03	9,44

Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da media. O caractere letra n representa o número de animais utilizados nos experimentos.

**Tabela 7:** Pressão arterial caudal (mmHg) das proles femininas da 6<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana de vida, cujas mães receberam respectivamente dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

Pressão arterial caudal (mmHg)						
Prole	pNR n= 26		pHR1 n=37		pHR2 n=34	
	média	± EPM	média	±EPM	média	±EPM
6	110,76	2,46	114,55	1,83	109,48	2,09
8	109,72	2,44	112,24	2,79	110,95	2,48
10	113,34	2,83	111,17	2,20	114,01	2,94
12	117,44	2,62	115,26	3,15	112,68	2,75

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da media. A letra **n** representa o numero de animais utilizados nos experimentos.

**Tabela 8:** Pressão arterial caudal (PAC) das proles femininas do grupo controle e nos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Pressão arterial caudal (mmHg)</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	113,30±2,6 n=7	107,30±2,9 n=7	96,71±5,5* n=5	128,50±2,1* n=5
pHR1	119,80±3,2 n=6	105,30±3,1 n=5	94,020±5,2 # n=8	120,90±5,9 n=6
pHR2	129,90±3,9 n=8	115,80±2,3 n=5	91,450±3,3 & n=7	145,00±3,8& n=9

Os valores são expressos como média + erro-padrão da média. \*p<0.05 vs pNR controle; #p<0,05 vs pHR1 controle e &p<0,05 vs pHR2 controle. O caractere **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 9:** Ramos vasculares com grânulos de renina nas proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga de sódio (HIPER), cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Ramos vasculares com grânulos de renina (%)</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	65,79±3,70 n=7	35,57±4,30 # n=7	42,60±2,20# n=5	36,50±5,62# n=8
pHR1	52,88±4,91 n=8	46,50±6,91 n=8	63,50±5,82 n=8	50,75±5,27 n=8
pHR2	46,380±4,42 n=8	55,63±5,62 n=8	71,43±3,17 & n=7	61,00±3,51 n=8

Os valores estão expressos em média + erro-padrão das médias. #p<0.05 vs pNR-controle, &p<0.05 vs pHR2-controle (One way ANOVA). O caractere **n** representa o número de animais utilizados no experimento

**Tabela 10:** Atividade da renina no córtex renal das proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam, as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Atividade da renina no córtex renal (nmol /g tecido/h)</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	5,973±1,193 n=6	5,460±0,758 n=7	7,057±1,492 n=3	2,516±0,210* n=5
pHR1	3,589±0,672 n=8	7,339±0,770** n=8	8,285±1,508** n=8	2,917±0,751 n=8
pHR2	6,704±1,209 n=8	8,369±0,598 n=8	8,762 1,051 n=6	3,220±0,562*** n=8

Os valores são expressos em média + erro-padrão das médias. \*p<0.05 vs pHR2 controle. O caractere **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 11:** Atividade de renina plasmática das proles femininas do grupo controle e nos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Atividade da renina plasmática (ng/mL/h)</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	4,17±0,73 n=6	7,27±0,88 n=7	24,95±2,01* n=4	2,59±0,82 n=6
pHR1	4,73±1,03 n=8	8,70±1,08# n=6	20,01±2,14 # n=6	1,48±0,46# n=7
pHR2	3,97±0,70 n=8	7,88±0,61& n=9	27,89±2,31 & n=7	2,67±0,58 n=7

Os valores estão expressos como média + erro-padrão das médias. \*p<0.05 vs pNR-controle; #p<0,05 vs pHR1-controle e &p<0,05 vs pHR2- controle. O caractere n representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 12:** Expressão do mRNA da renina da medula renal das proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam, as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Expressão do mRNA da renina da medula renal</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	0,72±0,12 n=6	0,78±0,06 n=7	0,87±0,13 n=4	0,73±0,08 n=4
pHR1	0,49±0,03 n=8	0,61±0,03* n=7	0,60±0,04* n=8	0,79±0,08* n=8
pHR2	0,72±0,12 n=8	0,77±0,06 n=10	0,68±0,09 n=7	0,71±0,08 n=8

Os valores são expressos em média ± erro padrão da média. \* p<0.05 vs controle pHR1 (One Way ANOVA). O caractere **n** representa o número de animais utilizados no experimento.



**Tabela 13:** Expressão do mRNA da renina no córtex renal das proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Expressão do mRNA da renina no córtex renal</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	1,29±0,21 n=6	0,93±0,05 n=4	1,36±0,25 n=7	1,03±0,18 n=5
pHR1	1,35±0,19 n=8	1,20±0,11 n=8	1,48±0,15 n=8	1,18±0,11 n=8
pHR2	1,16±0,14 n=8	1,24±0,07 n=10	1,64±0,28 n=7	1,08±0,11 n=9

Os valores são expressos em média ± erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 15:** Concentração sérica de nitrito nas proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam, as dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Concentração sérica de nitrito (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	22,39 $\pm$ 2,16 n=6	37,79 $\pm$ 3,69* n=7	38,80 $\pm$ 2,089* n=4	29,19 $\pm$ 5,16 n=5
pHR1	31,17 $\pm$ 2,85 n=8	33,19 $\pm$ 0,64 n=8	28,07 $\pm$ 2,96 n=7	26,77 $\pm$ 1,77 n=9
pHR2	27,96 $\pm$ 2,56 n=8	29,01 $\pm$ 1,13 n=9	27,26 $\pm$ 3,01 n=6	30,94 $\pm$ 1,91 n=7

Os valores são expressos em média + erro-padrão das médias. \*p<0.05 vs pNR controle. A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 16:** Expressão do mRNA da nNOS na medula do rim nas proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Expressão do mRNA da nNOS na medula renal</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	1,39±0,16 n=6	1,13±0,06 n=7	0,60±0,10 * n=4	0,85±0,10* n=4
pHR1	0,70±0,04** n=8	1,83±0,21# n=8	0,80±0,12 n=7	2,02±0,27# n=8
pHR2	1,94±0,50 n=7	2,61±0,18 n=10	1,30±0,26 n=7	1,76±0,34 n=8

Os valores são expressos em média + erro-padrão das médias. \*p<0.05 vs pNR controle, \*\*p<0.05 vs pNR controle, #p<0.05 vs pHR1 controle (One Way ANOVA). O caractere **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 17:** Expressão do mRNA da nNOS no córtex do rim das proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Expressão do mRNA da nNOS no córtex renal</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	0,70±0,12 n=6	0,49±0,04 n=7	0,45±0,06 n=4	0,54±0,04 n=5
pHR1	0,77±0,04 n=8	0,67±0,11 n=7	0,55±0,04 n=8	0,52±0,06* n=7
pHR2	0,71±0,10 n=8	0,73±0,06 n=9	0,61±0,06 n=7	0,45±0,05** n=9

Os valores são expressos em média + erro-padrão das médias. \*p<0.05 vs pHR1 controle, \*\*p<0.05 vs pHR2 controle. O caractere **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 18:** Expressão do mRNA da COX-2 medula do rim nas proles do grupo controle e nos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Expressão do mRNA da COX-2 na medula renal</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	1,37±0,13 n=6	1,97±0,05* n=7	0,86±0,06* n=4	1,54±0,34 n=5
pHR1	1,02±0,03** n=8	1,87±0,08# n=8	1,18±0,10 n=7	2,19±0,28# n=7
pHR2	2,02±0,34 n=8	2,55±0,22 n=9	1,60±0,23 n=7	2,040±0,33 n=8

Os valores são expressos em média + erro-padrão das médias. \*p<0.05 vs pNR controle, \*\* p<0.05 vs pNR controle e # p<0.05 vs pHR1 controle. One Way ANOVA. A letra n representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 19:** Expressão do mRNA da COX-2 no córtex do rim nas proles do grupo controle e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga(HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Expressão do mRNA da COX-2 no córtex renal</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	1,17±0,07 n=6	0,72±0,06* n=7	0,98±0,10 n=4	0,815±0,07* n=5
pHR1	1,35±0,09 n=8	0,95±0,08** n=7	1,25±0,12 n=8	0,709±0,05** n=7
pHR2	1,21±0,10 n=8	0,79±0,06# n=8	1,32±0,11 n=7	0,86±0,11# n=9

Os valores são expressos em média + erro-padrão das médias. \*p<0.05 vs pNR controle, \*\*p<0.05 vs pHR1 controle, #p<0.05 vs pHR2 controle. One Way ANOVA. A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 20:** Expressão protéica de COX-2 na medula renal das proles do grupo basal e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga de sódio (HIPER), cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Expressão protéica de COX-2 na medula renal</b>				
<b>Prole</b>	<b>Controle</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	0,59±0,11 n=5	1,36±0,54 n=5	1,04±0,13* n=4	1,43±0,29* n=5
pHR1	0,39±0,03 n=5	1,15±0,21# n=4	0,97±0,13# n=4	0,85±0,33 n=5
pHR2	0,64±0,13 n=5	0,97±0,24 n=5	2,04±0,87 n=5	1,89±0,46& n=5

Os valores são expressos em média  $\pm$  EPM. \*p<0.05 vs pNR-controle, # p<0.05 vs pHR1-controle, &. p<0.05 vs pHR2-controle. (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 21:** Expressão protéica de COX-2 na córtex renal das proles do grupo basal e dos testes de restrição (HO ou HO+Cap) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR); hipersódica 1 (pHR1) ou hipersódica 2 (pHR2) durante a gestação

<b>Efeito da restrição ou sobrecarga de sódio na prole</b>				
<b>Expressão protéica de COX-2 no córtex renal</b>				
<b>Prole</b>	<b>Basal</b>	<b>HO</b>	<b>HO+CAP</b>	<b>HIPER</b>
pNR	0,58±0,06 n=4	0,64±0,14 n=5	1,6±0,49 n=5	0,95±0,37 n=7
pHR1	1,36±0,41 n=5	1,65±0,56 <sup>a</sup> n=5	0,77±0,08 n=5	2,14±0,58 n=5
pHR2	2,85±1,8 n=5	0,92±0,18 <sup>a</sup> n=2	0,83±0,23 n=3	1,35±0,53 n=4

Os valores são expressos em média ± EPM. a, indica p<0.05 vs HO-pNR (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento



## **9. REFERÊNCIAS**

Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J*, 7:349-60; 1993.

Barker DJ; Osmond C; Forsen TJ; Kajantie E; Eriksson, JG. Maternal and social origins of hypertension. *Hypertension*. 50(3):565-71, 2007.

Beausejour A; Auger K; St-Louis J; Brochu M. High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285:375-383, 2003.

Bonventre JV. Phospholipase A2 and Signal Transduction *J Am Soc Nephrol*. 3:128-50, 1992.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72: 248-54, 1976.

Brasier AR; Li J. Mechanisms for Inducible Control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension*. 27:465-75, 1996.

Brown MA; Gallery ED; Ross MR; Esber RP. Sodium excretion in normal and hypertensive pregnancy: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol*. 159:297-307, 1988.

Cantin M; Araújo Nascimento MD; Benchimol S; Desormeaux Y. Metaplasia of smooth muscle cells into juxtaglomerular apparatus, arteries e arterioles of the ischemic (endocrine) kidney: an ultrastructural-cytochemical and autoradiographic study. *Am J Pathol*. 87:581-602, 1977.

Casellas D; Dupont M; Kaskel FJ; Inagami TI; Moore LC. Direct visualization of renin-cell distribution in preglomerular vascular trees dissected from rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 265: F151-6, 1993.

Castrop H; Schweda F; Mizel D; Huang Y; Briggs J; Kurtz A; Schnermann J. Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 286: F848-57, 2004.

Cerqueira NR; Yoshida WB. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cir Bras.*, 17(6), 2002.

Chappell MC. Emerging evidence for a functional angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS receptor axis: more than regulation of blood pressure? *Hypertension.* 50(4):596-99. 2007.

Cheng HF; Wang JL; Zhang MZ; Wang SW; Mckanna JA; Harris RC. Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280(3):F449-56, 2001.

Cheng HF; Wang JL; Zhang MZ; Miyazaki Y; Ichikawa I; Mckanna JA; Harris RC. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest.* 103(7):953-61, 1999.

Cheng HF; Wang SW; Zhang MZ; Mckanna JA; Breyer R; Harris RC. Prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 283:R638-46, 2001.

Clausmeyer S; Sturzebecher R; Peters J. An alternative transcript of the rat renin gene can result in a truncated prorenin that is transported into adrenal mitochondria. *Circ Res.* 84:337-4, 1999.

Contreras RJ; Wong DL.; Henderson R; Curtis KS; Smith JC. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. *Physiology & Behavior*. 71: 173-81, 2000.

da Silva AA; Noronha LL; Oliveira LB; Malheiros DMC; Heimman JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 13: 133-39, 2003.

Daniels CR; Eisen V; Slater JD. The renin-angiotensinogen reaction during pregnancy and oral contraception: estimation of kinetic parameters by an autologous plasma renin assay. *J Endocrinol*. 112(3), 465-72, 1987.

Danser AHJ; Van Den Dorpel MA; Deinum J; Derkx FHM; Franken AAM; Peperkamp E; De Jong PTVM; Schalekamp MADH. Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 68:160-67, 1989.

Dewitt DL; Smith WL. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci*. 85: 1412-6, 1988.

Erdös EG. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years: Lewis K. Dahl Memorial Lecture. *Hypertension*. 16:363-70, 1990.

Farrel AJ; Blake DR. Nitric oxide (review). *Ann Rheum Dis*. 55:7-20, 1996.

Fowler BC; Chang YS; Laamarti A; Higdon M; Lapointe JY; Bell PD. Evidence for apical sodium proton exchange in macula densa cells. *Kidney Int*. 47:746-51, 1995.

Gant NF; Worley RJ; Everett RB; Macdonald PC. Control of vascular responsiveness during human pregnancy. *Kidney Int.* 18: 253-8, 1980.

Giammattei CE; Strandhoy JW; Rose JC. Regulation of in vitro renin secretion by ANG II feedback manipulation in vivo in the ovine fetus. *Am J Physiol.* 277(4 Pt 2):R1230-8, 1999.

Gilliam MB; Sherman MP; Griscavage JM; Ignarro L. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. *Anal Biochem.* 12:359-65, 1993.

Hackenthal E; Paul M; Ganten D; Taugner R. Morphology, physiology and molecular biology of renin secretion. *Physiological Reviews.* 70 (4):1067-116, 1990.

Haerlev T; Jacobsen GK. Microwave processing for immunohistochemical demonstration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Acta Path Microb Et Immunol Scand.* 102:395-400, 1994.

Harris RC; Breyer MD. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 281: F1-11, 2001.

Harris RC; Mckanna J; Akai Y; Jacobson HR; Dubois RN; Breyer MD Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest.* 94:2504-10, 1994.

Haulica I; Bild W; Serban DN. Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 6:121-31, 2005.

Hilário MO; Terreri MT; Len C.A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *J Pediatr.* 82(5 Suppl):S206-12, 2006.

Hsueh WA; Luetscher JA; Carlson EJ; Grislis G; Frazee E; Mchargue A. Changes in active and inactive renin throughout pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 54:1010-6, 1982.

Hu WY; Fukuda N; Ikeda Y; Suzuki R; Tahira Y; Takagi H; Matsumoto K; Kanmatsuse K; Mugishima H. Human-derived vascular smooth muscle cells produce angiotensin II by changing to the synthetic phenotype. *J Cell Physiol.* 196:284-92, 2003.

Inger C; Grima M; Coquard C; Barthelmebs M; Imbs Jean-Louis. Effects of dietary salt changes on renal renin-angiotensin system in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 283:F995-1002, 2000.

Itskovitz J; Rubattu S; Levron J; Sealey JE. Highest concentrations of prorenin and human chorionic gonadotropin in gestational sacs during early human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 75:906-10, 1992.

Jensen BL; Kurtz A. Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int.* 52(5):1242-9, 1997.

Johns DW; Peach MJ; Gomez RA; Inagami T; Carey RM. Angiotensin II regulates renin gene expression. *Am J Physiol.* 259: F882-7, 1990.

Johnson RA; Freeman RH. Renin release in rats during blockade of nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.* 266 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 35):R1723-9, 1994.

Johnston CI. Tissue angiotensin converting enzyme in cardiac and vascular hypertrophy, repair, and remodeling. *Hypertension.* 23:258-268, 1994.

Kaufman S; Deng Y. Renal response to atrial stretch during pregnancy in conscious rats. *Am J Physiol.* 265 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 34): R902-6, 1993.

Kiechle FL; Malinski T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology, and detection. *Am J Clin Pathol.* 100(5):567-75, 1993.

Kobori H; Nangaku M; Navar LG; Nishiyama A. The intrarenal Renin-Angiotensin System: from physiology to the pathobiology of hypertension and kidney disease. *Pharmacol Rev.* 59(3): 251-87 2007.

Komlosi P; Fintha A; Bell PD. Current mechanisms of macula densa cell signaling. *Acta Physiol Scand.* 181: 463-9, 2004.

Kovacs G; Peti-Peterdi J; Rosivall L; Bell PD. *Am J Physiol.* 282:F301-6, 2002.

Lapointe JY; Laamarti A; Bell PD. Ionic transport in macula densa cells. *Kidney Int.* 67:S58-64., 1998.

Law CM; Egger P; Dada O; Delgado H; Kylberg E; Lavin P; Tang G.H; Von Hertzen H; Shiell AW; Barker DJ. Body size at birth and blood pressure among children in developing countries. *Int J Epidemiol.* 30(1):57-9, 2001.

Lee JB. Hypertension, natriuresis and prostaglandins. *Ann Internal Med.* 70:1033-8, 1969.

Leong ASY; Milios J. Accelerated immunohistochemical staining by microwaves. *J Pathol.* 161: 327-34, 1990.

Lim WC; Park JB; Lee YJ. Analysis of Angiotensin II Mediated COX-2 downregulation in angiotensin II- or aldosterone-infused hypertensive rat. *Biol Pharm Bull.* 26(8) 1086-8 2003.

Limas C; Goldman P; Limas CJ; Iwai J. Effect of salt on prostaglandin metabolism in hypertension-prone and - resistant Dahl rats. *Hypertension.* 3;219-24, 1981.

Llinás MT; Gonzalez, JD; Salazar, FJ. Interactions between angiotensin and nitric oxide in the renal response to volume expansion. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 269:504-10, 1995.

Lorenz K. The comparative method in studying innate behaviour patterns. J.F. Danielli and R. Brown (Eds.). *Physiological mechanisms in animal behaviour. Symposia of the Society of Experimental Biology in Great Britain, nº 4, Cambridge University Press.* 221-68, 1950.

Lucas A. Programming by Early Nutrition: An Experimental Approach. *J Nutr.* 128:401S-6S, 1998.

Mattson DL; Higgins DJ. Influence of dietary sodium intake on renal medullary nitric oxide synthase. *Hypertension.* 27: 688-92, 1996.

Mckee M; Scavone C; Nathanson JA. Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium transport. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 12056-60, 1994.

Miyazaki M; Takai S. Local angiotensin II-generating system in vascular tissues: the roles of chymase. *Hypertens Res.* 2001; 24:189-93.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6:3051-64,1992.



Navar LG; Imig JD; Zou L, Wang CT. Intrarenal production of angiotensin II. *Semin Nephrol.* 17:412-22, 1997.

Navar GL; Nishiyama A. The Renin-Angiotensin System and progression of renal diseases. *Contrib Nephrol. Basel, Karger.* 135:1-15, 2001.

Ojeda NB; Grigore D; Robertson EB; Alexander BT. Estrogen protects against increased blood pressure in postpubertal female growth restricted offspring. *Hypertension.* 50;679-85, 2007.

Osmond C; Barker DJ. Fetal, infant, and childhood Growth are predictors of coronary heart disease Diabetes, and Hypertension in adult Men and women. *Environ Health Perspect.* 108(suppl 3):545-53, 2000.

Osol G; Cipolla M. Pregnancy-induced changes in the three-dimensional mechanical properties of pressurized rat uteroplacental (radial) arteries. *Am J Obstet Gynecol.* 168 (1 Pt1):268-74, 1993.

Paul M; Mehr AP; Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 86:747-803, 2006.

Pendergrass KD; Averill DB; Ferrario CM; Diz DI; Chappell, MC. Differential expression of nuclear AT1 receptors and angiotensin II within the kidney of the male congenic mRen2 Lewis rat. *Am J Physiol.* 290:F1497-506, 2006.

Peti-Peterdi J; Chambrey R; Bebok Z e colaboradores. Macula densa Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activities mediated by apical NHE2 and basolateral NHE4 isoforms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 278: F452-63, 2000.

Porter JP; King SH; Honeycutt AD. Prenatal high-salt diet in the Sprague-Dawley rat programs blood pressure and heart rate hyperresponsiveness to stress in adult female offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293: R334-42, 2007.

Roczniak A; Zimpelmann J; Burns KD. Effect of dietary salt on neuronal nitric oxide synthase in the inner medullary collecting duct. *Am J Physiol.*, 275 (*Renal Physiol.* 44): F46-54, 1998.

Rosen GD; Birkenmeier TM; Raz A; Holtzman MJ Identification of cyclooxygenase-related gene and its potential role in prostaglandin formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 164:1358-65, 1989.

Saint-Louis J; Massicote G. Chronic decrease of blood pressure by rat relaxin in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 37:1351-7,1985.

Sauter A; Machura K; Neubauer B; Kurtz A; Wagner C. Development of renin expression in the mouse kidney. *Kidney International.* 73:43-51. 2007.

Schmidt HHHW; Kelm M. Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In: M. Feelisch and J.S. Stamler, Editors, *Methods in Nitric Oxide Research.* John Wiley & Sons, Chichester (UK), 491-497, 1996.

Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol.* 274 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 43): R263-79, 1998.

Schnermann J; Briggs JP. The macula densa is worth its salt. *J Clin Invest.* 104(8):1007-9,1999.

Schnermann J; Traynor T; Yang T; Huang Y.G; Oliverio M.I; Coffman T; Briggs JP. Absence of tubuloglomerular feedback responses in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol (Renal Physiol).* 42: F315-20, 1997.

Schweda F; Kurtz A. Cellular mechanism of renin release. *Acta Physiol Scand.* 181:383-90, 2004.

Scott, JP. Critical periods in organizational processes. In: Falkner F, Tanner JM, eds. Human growth: a comprehensive treatise. Methodology; ecological, genetic and nutritional effects on growth. New York: *Plenum Press*. 3:181-96, 1986.

Sealey JE; Moon C; Laragh JH; Atlas SA. Plasma prorenin in normal, hypertensive, and anephric subjects and its effect on renin measurements. *Circ Res*. 40:141-5, 1977.

Sealey JE; Glorioso N; Itskovitz J; Troffa C; Cholst I; Rosenwaks Z. Plasma prorenin during early pregnancy: ovarian secretion under gonadotropin control? *J Hypertens*. suppl 4:S2-S95, 1986.

Shricker K; Holmer S; Kramer BK; Riegger GA; Kurtz A. The role for angiotensin II in the feedback control of renin gene expression. *Pflugers Archiv - Eur J Physiol*. 434:166-72, 1997.

Sigmon DH; Carretero OA; Beierwaltes, WH. Endothelium-derived relaxing factor regulates renin release in vivo. *Am. J. Physiol*. 263 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol*. 32): F256-61, 1992.

Singh I; Grams M; Wang W e colaboradores. Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. *Am J Physiol*. 270, F1027-37, 1996.

Spalding DA. Instinct with original observation on young animals. *Br J Animal Behav*, 2:2-11, 1954. (Reprinted from *Macmillan's Magazine*, 27:282-93, 1873).

Stubbe J; Jensen BL; Bachmann S; Morsing P; Skott O. Cyclooxygenase-2 contributes to elevated rennin in the early postnatal period in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003.

Sullivan JC. Sex and the Renin-Angiotensin System: Inequality between the sexes in response to RAS stimulation and inhibition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1-35, 2008.

Svensson A. Hypertension in pregnancy: state of art lecture. *J Hypertens.* 3:S395-S403, 1985.

Taugner R; Hackental E. The juxtaglomerular apparatus. *Springer Heideberg.* 1989.

Timmermans PB; Wong PC; Chiu AT; Herblin WF; Benfield P; Carini DJ, Lee RJ; Wexler RR; Saye JA; Smith RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45:205-51, 1993.

Tonkiss J; Trzcin´ska M; Galler J.R; Ruiz-Opazo N; Herrera VLM. *Hypertension.* 32:108-114, 1998.

Urata H; Boehm KD; Philip A; Kinoshita A; Gabrovsek J; Bumpus FM; Husain A. Cellular localization and regional distribution of an angiotensin II-forming chymase in the heart. *J Clin Invest.* 91:1269-81, 1993.

Verkeste CM; Slinger BFM; Dubelaar ML; Van Kreel BK; Peeters LLH. Mechanism of volume adaptation in the awake early pregnant rat. *Am J Physiol.* 274 (*Heart Circ. Physiol*, (43): H1662-6, 1998.

Walker L; Frölich JC. Renal prostaglandins e leukotrienes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 107: 1-72, 1987.

Wang JL; Cheng HF; Harris, RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension.* 34:96-101, 1999.

Wilcox CS; Welch WJ; Murad F; Gross SS; Taylor G; Levy R; Schmidt HH. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci*. 89: 11993-7, 1992.

Xie WL; Chipman JG; Robertson DL; Erikson RL.; Simmons, DL. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci*. 88:2692-6, 1991.

Yang T; Singh I; Pham H; Sun D; Smart A; Schnermann J.B; Briggs JP. Regulation of cyclooxygenase expression in the kidney by dietary salt. *Am J Physiol. (Renal Physiol)*: F481–F489, 1998.

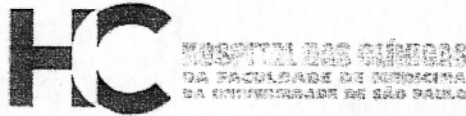
Yang T; Park JM; Arend L; Huang Y; Topaloglu R; Pasumarthy A; Praetorius H; Spring K; Briggs JP; Schnermann J. Low chloride stimulation of prostaglandin E<sub>2</sub> release and cyclooxygenase-2 expression in a mouse macula densa cell line. *J Biol Chem*. 275 (48), 37922-9, 2000.

Zhang MZ; Yao B; Cheng HF; Wang SW; Inagami T; Harris RC. Renal cortical cyclooxygenase 2 expression is differentially regulated by angiotensin II At(1) and At(2) receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(43):16045-50, 2006

clbr

RECEBIDO SPG 30/09/05

ASS: Jaive



## APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.09.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **664/05**, intitulado: "Sobrecarga de sal durante o período perinatal: Efeito sobre a modulação do sistema renina-angiotensina em resposta à variação no consumo de sal na prole adulta" apresentado pela **ÁREA DE FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**.

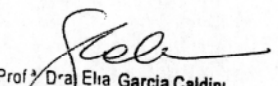
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")


Pesquisador(a) Responsável: **Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa**

Pesquisador (a) Executante: **Dr. Nauilo Lima Costa**

CAPPesq, 14 de Setembro de 2005.

Encaminhe-se à CPG-FMUSP  
para as devidas providências.  
S.P., 30/09/05

  
Prof. Dra. Elia Garcia Caldini  
Vice Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Clínica

  
PROF. DR. CLAUDIO LEONE  
Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

---

**Data:** 29 Oct 2008 11:42:24 -0400 [13:42:24 EST]

---

**De:** Pediatric Research Editorial Office <info@pedres.org>

---

**Para:** luzia@usp.br

---

**Assunto:** Ped Res - Manuscript Submission Confirmation

---

Dear Furukawa,

Your submission entitled "Maternal high salt diet in Wistar rat programs renin, COX-2 and nNOS hyperresponsiveness to sodium restriction or load in adult female offspring." has been received by the Pediatric Research Editorial Office.

Your manuscript will be assigned to an Editor once we have received your Author Agreement/Copyright Transfer Form (available for download through Editorial Manager). Please have all authors sign and complete this form. Original signatures, not photocopies, are required. Please send the completed form to:

Susan Tsujimoto, Managing Editor  
Pediatric Research, Editorial Office  
3400 Research Forest Drive, Suite B7  
The Woodlands, TX 77381 U.S.A.

Upon receipt of your completed Author Agreement/Copyright Transfer Form, your manuscript will be given a reference number and assigned to an Editor.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

<http://pr.edmgr.com/>

Your username is: luziansf  
Your password is: furukawa

Thank you for submitting your work to Pediatric Research.

Kind regards,  
Susan Tsujimoto  
Managing Editor  
Pediatric Research

Pediatric Research, Editorial Office  
3400 Research Forest Drive, Suite B-7  
The Woodlands, TX 77381  
Office: (281) 419-0645  
Fax: (281) 419-0082

---