

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Participação da Angiotensina II e MAP-quinases
(*Mitogenic-Activated Protein Kinase*) no
desenvolvimento renal pós-natal de ratas Wistar.**

Ana Paula Coelho Balbi

Ribeirão Preto

2006

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

**Participação da Angiotensina II e MAP-quinases
(*Mitogenic-Activated Protein Kinase*) no
desenvolvimento renal pós-natal de ratas Wistar.**

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Fisiologia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Fisiologia

Pós-graduanda: Ana Paula Coelho Balbi

Orientadora: Prof^a.Dr^a. Terezila Machado Coimbra

Ribeirão Preto

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

Balbi, Ana Paula Coelho

Participação da AII (Angiotensina II) e Map-quinases (Mitogenic-activated protein kinase) no desenvolvimento renal pós-natal de ratas Wistar. Ribeirão Preto, 2006.

128p. : il. ; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Coimbra, Terezila Machado

1. desenvolvimento renal. 2. angiotensina II. 3. MAP-quinases
4. ratas Wistar.

*“Ilustrar o espírito é pouco, temperar o caráter é tudo
A educação não faz almas: exercita-as
E o exercício moral não vem das belas palavras de virtude, mas
do atrito com a circunstâncias.”
(Machado de Assis)*

Dedicatória

Aos meus pais Sérgio Luiz Balbi e Sueli Elisabete Coelho Balbi, meus verdadeiros orientadores... Sem vocês nada faria sentido, obrigada pelo apoio, carinho, incentivo e principalmente pelo amor incondicional. Vocês são minha vida!!!

Agradecimentos

À Profa. Dra. Terezila Machado Coimbra, por sua dedicação constante ao ensino e à pesquisa, pela orientação e principalmente pelo incentivo durante estes 6 anos de trabalho.

Aos professores doutores Roberto Silva Costa, Eduardo Coelho, Emmanuel Burdmann e Mirian Aparecida Boim, por aceitarem participar da avaliação deste trabalho.

À todos os docentes do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, que muito contribuíram para minha formação acadêmica e científica e também, pela convivência.

À todos os técnicos que estiveram direta ou indiretamente envolvidos neste trabalho:

- Cleonice Giovanini Alves da Silva, pelo apoio técnico e principalmente pela amizade.
- Érica Pontin Delloiagono Gual e Adriana G. C. de Almeida do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Rubens Fernando de Melo pelo imprescindível apoio nas inclusões e cortes de tecidos em parafina.
- Leonardo Fidélis Filho e Eduardo Gomes pela amizade e cuidados com os animais no Biotério.
- Maria Luísa Montanha Xavier pela amizade e cafezinhos.

À toda a equipe da secretaria Elisa, Cláudia, Fernando e Carlos pela convivência, amizade e auxílio nos assuntos burocráticos.

À minha avó Adélia Augusto Balbi, que há pouco cumpriu sua missão deixando muitas saudades. Obrigada por todo o carinho, palavras de incentivo e amor presentes mesmo após sua partida.

À Gustavo Henrique Coelho Balbi, Selma Santos Carvalho, Sônia Maria Coelho Toledo e toda minha família por estarem sempre presentes na minha vida.

A minha sobrinha Milena Carvalho Balbi, por iluminar tantas vezes meu caminho com o seu sorriso. Você é um presente.

A Marcos Galdiano Lopes, por tudo o que significou pra mim neste período.

A Samara Urban de Oliva e Wellerson Rodrigo Scarano, amigos da graduação que com certeza serão amigos pra vida inteira.

A Danielle Dias Barreto Senador e Maria Theresa Cerávolo Laguna de Abreu, por todo o tempo em que moramos juntas durante a pós-graduação, nossa amizade já diz tudo.

A minha prima e agora irmã, Fernanda Coelho de Oliveira por tudo o que estamos passando juntas.

Aos “queridos amigos” do laboratório de Fisiologia Renal: Telma, Heloísa, Rildo, Evelyn, Andréa, Bia e Cléo, que dividiram não só o trabalho mas o dia-a-dia, as risadas, as tristezas, as angústias, as conquistas, e principalmente a amizade. Que eu encontre sempre pessoas como vocês pelo caminho.

A todos os meus amigos de São José do Rio Preto, Karina, Sebastião, Analúcia, Mercedes, Juliano, Rosangela, Edson, Carlos, Mauro, Kátia, Mori, Sílvio, Valter, Joelson e Leandra, “pessoas” vocês foram fundamentais na fase final dessa trajetória. Vocês estarão sempre na “minha lista”...

A todos os amigos da pós-graduação, os que estão presentes, os que já se foram, e àqueles que por uma eventual falha de memória eu tenha me esquecido de mencionar, obrigada.

À FAPESP por financiar e tornar possível a realização deste trabalho.

“Cada um que passa em nossa vida, passa sozinho. Mas não vai só, nem nos deixa só, leva um pouco de nós mesmos e deixa um pouco de si. Há os que levam muito, mas há os que não levam nada. Esta é a maior responsabilidade de nossa vida, é a prova evidente que duas almas não se encontram por acaso.” (Saint Exupéry)

ÍNDICE GERAL

	Páginas
Lista de Abreviaturas.....	2
Índice de Figuras.....	3
I - Resumo.....	8
II - Summary.....	10
III - Introdução.....	12
IV - Objetivos.....	22
V - Material e Métodos.....	23
VI - Resultados	
Estudo 1.....	30
Estudo 2.....	53
Estudo 3.....	78
VII - Discussão	
Estudo 1.....	100
Estudo 2.....	107
Estudo 3.....	107
VIII - Referências Bibliográficas.....	112
IX - Artigo publicado no “Pediatric Nephrology”.....	129

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

SRA - Sistema renina-angiotensina

ECA - Enzima conversora de angiotensina

AII - Angiotensina II

AT 1 - Receptor do tipo 1 de AII

AT 2 - Receptor do tipo 2 de AII

TGF- β - Transforming Growth Factor

MEC - Matriz extracelular

VFEC - Volume de fluido extracelular

α -SMA - α -smooth actin

PCNA - Proliferating Cell Nuclear Antigen

MAP quinases - Mitogenic Activated Protein quinases

p-ERK - Extracellular Signal Regulated Kinase

p-JNK - Jun N-Terminal Kinase

Índice de Figuras

Estudo 1 - Sobrecarga de sódio durante a gestação e amamentação

- Fig.1-** Área glomerular em μm^2 das ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.36
- Fig.2-** Cortes histológicos e imunolocalização de fibronectina do córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.37
- Fig.3-** Escore para fibronectina no compartimento glomerular de ratas dos grupos controle e experimental.....p.38
- Fig.4-** Imunorreação para PCNA e α -SMA no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.39
- Fig.5-** Número de células PCNA positivas por glomérulo de ratas dos grupos controle e experimental.....p.40
- Fig.6-** Escore para α -SMA no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.41
- Fig.7-** Imunorreação para All no córtex renal de ratas de 1, 7 e 30 dias do grupo controlep.42
- Fig.8-** Número de células All positivas por glomérulo e por área de $0,245 \text{ mm}^2$ do compartimento tubulointersticial do córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.43
- Fig.9-** Imunorreação para p-ERK no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.44
- Fig.10-** Escore para p-ERK no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.45
- Fig.11-** Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.46
- Fig.12-** Escore para p-JNK no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.47
- Fig.13-** *Western blot*: expressão de p-p38 no córtex renal de ratas de 1 dia dos grupos controle e experimental.....p.48
- Fig.14-** *Western blot*: expressão de p-p38 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.48

Fig.15- <i>Western blot</i> : expressão de AT 1 no córtex renal de ratas de 1 dia dos grupos controle e experimental.....	p.49
Fig.16- <i>Western blot</i> : expressão de AT 1 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.49
Fig.17- <i>Western blot</i> : expressão de AT 2 no córtex renal de ratas de 1 dia dos grupos controle e experimental.....	p.50
Fig.18- <i>Western blot</i> : expressão de AT 2 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.50
Fig.19- Detecção de células TUNEL positivas no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.51
Fig.20- Número de células TUNEL positivas por área de 0,245 mm ² do compartimento tubulointersticial de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.52

Estudo 2 - Exposição ao losartan durante a gestação e amamentação

Fig.21- Cortes histológicos do córtex renal de ratas de 15 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.59
Fig.22- Área glomerular em μm^2 e área intersticial relativa (%) do córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.60
Fig.23- Imunorreação para α -SMA no córtex renal de ratas de 15 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.61
Fig.24- Escore para α -SMA no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....	p.62
Fig.25- Imunorreação para fibronectina no córtex renal de ratas de 15 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.63
Fig.26- Escore para fibronectina no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....	p.64
Fig.27- Imunorreação para PCNA no córtex renal de ratas de 15 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.65

Fig.28- Número de células PCNA positivas por glomérulo e por área de 0,245 mm ² do compartimento tubulointersticial de ratas de 15 dias dos grupos controle e experimental.....	p.66
Fig.29- Imunorreação para All nos glomérulos e compartimento tubulointersticial do córtex renal de ratas de 15 dias dos grupos controle e experimental.....	p.67
Fig.30- Número de células All positivas no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....	p.68
Fig.31- Imunorreação para p-ERK no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.69
Fig.32- Escore para p-ERK no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....	p.70
Fig.33- Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.71
Fig.34- Escore para p-JNK no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....	p.72
Fig.35- <i>Western blot</i> : expressão de p-p38 no córtex renal de ratas de 1 dia dos grupos controle e experimental.....	p.73
Fig.36- <i>Western blot</i> : expressão de p-p38 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.73
Fig.37- <i>Western blot</i> : expressão de AT 1 no córtex renal de ratas de 1 dia dos grupos controle e experimental.....	p.74
Fig.38- <i>Western blot</i> : expressão de AT 1 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.74
Fig.39- <i>Western blot</i> : expressão de AT 2 no córtex renal de ratas de 1 dia dos grupos controle e experimental.....	p.75
Fig.40- <i>Western blot</i> : expressão de AT 2 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.75
Fig.41- Detecção de células TUNEL positivas no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....	p.76

Fig.42- Número de células TUNEL positivas por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial de ratas de 15 dias dos grupos controle e experimental.....p.77

Estudo 3 - Exposição ao losartan durante a amamentação

Fig.43- Cortes histológicos do córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.84

Fig.44- Área glomerular em μm^2 e área intersticial relativa (%) do córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.85

Fig.45- Imunorreação para α -SMA no córtex renal de ratas 7, 15 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.86

Fig.46- Escore para α -SMA no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.87

Fig.47- Imunorreação para fibronectina no córtex renal de ratas de 7,15 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.88

Fig.48- Escore para fibronectina no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.89

Fig.49- Imunorreação para PCNA no córtex renal de ratas de 7, 15 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.90

Fig.50- Número de células PCNA positivas por glomérulo e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial de ratas dos grupos controle e experimental.....p.91

Fig.51- Imunorreação para All no córtex renal de ratas 7, 15 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.92

Fig.52- Número de células All positivas por glomérulo e por área de 0,245mm² do compartimento tubulointersticial do córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.93

Fig.53- Imunorreação para p-ERK no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.94

- Fig.54-** Escore para p-ERK no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.95
- Fig.55-** Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.96
- Fig.56-** Escore para p-JNK no córtex renal de ratas dos grupos controle e experimental.....p.97
- Fig.57-** *Western blot*: expressão de p-p38 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.98
- Fig.58-** *Western blot*: expressão de AT 1 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.99
- Fig.59-** *Western blot*: expressão de AT 2 no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos controle e experimental.....p.99

O desenvolvimento renal em ratos e camundongos começa por volta do 11° ou 12° dia de vida intra-uterina e continua até a segunda semana após o nascimento. A formação de matriz extracelular (MEC) representa um dos eventos-chave na diferenciação de glomérulos. Várias linhas de evidências experimentais mostram que o sistema-renina-angiotensina (SRA) participa do desenvolvimento renal. Muitos sinais são transmitidos da superfície celular para o núcleo através da cascata das MAP (*Mitogenic-Activated Protein*) quinases. Esse estudo visa avaliar a expressão das MAP quinases no córtex renal durante o desenvolvimento renal pós-natal e a participação da AII na ativação dessas vias nos filhotes de mães submetidas à uma dieta com conteúdo elevado de sódio ou à exposição ao losartan durante a gestação e amamentação ou somente durante a amamentação. Analisamos também os efeitos desses tratamentos na estrutura e na função renal.

Os filhotes de ratas Wistar de 1, 7, 15 e 30 dias foram divididos em 3 estudos com 2 sub-grupos em cada um: Estudo 1- Controle 1 (C1): filhotes de mães com ingestão normal de NaCl, Experimental 1 (E1): filhotes de mães submetidas à ingestão de solução salina 0,15 M; Estudo 2- Controle 2 (C2): filhotes de mães que receberam solução sacarose 2% durante a gestação e amamentação; Experimental 2 (E2): filhotes de mães que receberam losartan (0,4 g/L) diluído em solução de sacarose 2% durante a gestação e amamentação e Estudo 3- Controle 3 (C3): filhotes de mães que receberam solução sacarose 2% durante a amamentação, Experimental 3 (E3): filhotes de mães que receberam losartan (0,4 g/L) diluído em solução de sacarose 2% durante a amamentação. Os filhotes foram sacrificados em diferentes períodos após o nascimento (1, 7, 15 e 30 dias) e os rins retirados para análise histológica, imunohistoquímica, TUNEL e estudos de *Western blot*. As avaliações das reações imunohistoquímicas para α -SMA, fibronectina, p-ERK e p-JNK foram feitas através de escores que refletem a extensão da área com imunorreação. Foram contadas as células PCNA e AII positivas e células apoptóticas por glomérulo e por área de córtex renal de 0,245 mm². A análise da densitometria das bandas obtidas nos estudos de *Western blot* para AT 1, AT 2, p-p38 e tubulina foi realizada utilizando-se o programa Image J.

As expressões de α -SMA, fibronectina, PCNA, All e p-ERK no córtex renal foram maiores no primeiro dia após o nascimento e diminuíram com o desenvolvimento renal. No estudo 1, verificamos redução nas expressões de α -SMA, fibronectina e PCNA no córtex renal dos animais de 1 dia de mães submetidas à dieta com alto conteúdo em sódio quando comparados aos controles de mesma idade. Estas alterações foram acompanhadas por redução no número de células All positivas no córtex renal desses animais. A expressão de p-ERK foi menor no córtex renal dos animais de 1 dia do grupo E1 comparados aos controles, enquanto que as expressões das MAP quinases p-JNK e p-p38 foram maiores no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo E1 quando comparados aos controles. Nestes animais também foi verificado maior número de células apoptóticas. Os animais de 30 dias deste grupo apresentaram redução na taxa de filtração glomerular (TFG) e aumento da pressão arterial quando comparados aos controles de mesma idade. A expressão de receptores AT 1 estava reduzida e a de AT 2 aumentada no córtex renal dos animais de 1 e 30 dias do grupo E1.

O tratamento com losartan durante a gestação e amamentação (Estudo 2), bem como durante a amamentação (Estudo 3) provocou aumento das expressões de α -SMA, fibronectina, PCNA e o número de células apoptóticas no córtex renal dos animais de 15 e 30 dias em relação aos respectivos controles. Os animais de 30 dias do grupo E2 apresentaram também redução da expressão de receptores AT 1 e aumento de receptores AT 2, e alterações na estrutura renal caracterizadas pelo alargamento do espaço intersticial do córtex renal, atrofia e dilatação tubulares. A excreção urinária de albumina estava bastante elevada nos animais de 30 dias do grupo E2. Concluindo, as alterações de estrutura e função renal observadas nos filhotes de mães submetidas a tratamentos que interferem com a atividade do SRA, estavam associadas com as modificações nas expressões dos receptores AT1 e AT2 de All e de MAP quinases durante o desenvolvimento renal pós-natal.

II - Summary

Renal development in rats and mice usually begins around the 11st and 12nd day of intrauterine life and continues until postnatal second week. Extracellular matrix (ECM) production has an important role on the glomerular differentiation process. Experimental evidences suggest that angiotensin II (All) participates on postnatal renal development. Many signals are transmitted from cellular surface to the nucleus through MAPK (Mitogenic-Activated Protein Kinase) cascade. Several effects of All are related to the activation of these pathways. The aim of this study was evaluate the MAPK expression on the renal cortex during postnatal renal development and the role of All on the activation of these pathways in rats born from mothers submitted to high salt intake or exposed to losartan during gestation and lactation or during lactation. We also analyzed the effects of those treatments on renal structure and function.

Newborn Wistar rats aging 1, 7, 15 and 30 days old were divided into 6 groups for performing of 3 studies: Study 1: Control 1 (C1), newborn rats from mothers that received normal salt intake; Experimental 1 (E1), newborn rats from mothers that received increased salt intake; Study 2: Control 2 (C2), newborn rats from mothers exposed to sacarose 2% solution during gestation and lactation; Experimental 2 (E2), newborn rats from mothers exposed to losartan (0,4 g/L) diluted in sacarose 2% solution during gestation and lactation; Study 3: Control 3 (C3), newborn rats from mothers exposed to sacarose 2% solution during lactation; Experimental 3 (E3), newborn rats from mothers exposed to losartan (0,4 g/L) diluted in sacarose 2% solution during lactation. Pups rats were killed and kidneys removed for histological and immunohistochemical studies, evaluation of apoptotic cells by TUNEL and Western blot analysis. The evaluation of α -SMA, fibronectin, p-ERK and p-JNK reactions was performed by scores which reflected mainly the changes in the extent rather than intensity of staining, and number of PCNA, All and apoptotic positive cells were counted the by glomerulus or grid fields from renal cortex measuring 0.245mm². Densitometry analysis of bands from Western blot studies for AT 1, AT 2, p-p38 and tubulin was performed using the Image J computerized program.

α -SMA, fibronectin, PCNA, All and p-ERK expressions in renal cortex were higher on 1 day-old animal and decreased with the renal development. In study 1, we

verified reduced expressions of α -SMA, fibronectin and PCNA on renal cortex of 1 day-old animals from mothers submitted to increased salt intake when compared to the controls of same age. These alterations were associated with the reduction of All positive cells on renal cortex of these animals. p-ERK expression was lower on renal cortex of 1 day-old animals from E1 group compared to the controls, while p-p38 and p-JNK MAPK expressions were higher on the renal cortex of the 30 day-old animals from E1 group when compared to the controls of same age. We also observed higher number of apoptotic cells in renal cortex from these animals. Thirty days-old animals from this group also showed reduction in glomerular filtration rate (GFR) and an increase in blood pressure when compared to the controls of the same age. One and 30 day-old animals from E1 group presented reduction of AT 1 receptor and increase of AT 2 receptor expressions in renal cortex.

The treatment with Losartan during gestation and lactation (Study 2) and during lactation (Study 3) provoked increase in fibronectin, PCNA and α -SMA expressions as well in the number of apoptotic cells on renal cortex from 15 and 30 day-old animals compared to the respective controls. Thirty day-old animals from E2 and E3 groups showed a reduction in AT 1 and an increase in AT 2 expressions, and intense alterations on renal structure characterized by widening of interstitial space of renal cortex, atrophy and tubular lumen dilatation. Moreover, albumin urinary excretion of the 30 days-old animals was noticeably increased. In conclusion, renal structure and function alterations observed in newborn rats from mothers exposed to treatments that interfere with the activity of RAS was associated with modifications on AT 1 and AT 2 receptors and MAPK expressions during postnatal renal development.

Desenvolvimento Renal

O desenvolvimento renal em humanos começa em torno da 5ª semana de gestação e se completa *in utero* antes da 36ª semana gestacional (Nigam et al, 1996; MacDonald et al, 1959), mas a maturação funcional continua após esse período (Baun et al, 2000). Em camundongos e ratos, a nefrogênese começa no 11º e 12º dia embrionário e continua pelo restante da gestação até a segunda semana após o nascimento, enquanto a maturação estrutural final e funcional só está completa por volta da 3ª semana pós-natal, durante o período de desmame (Nigam et al, 1996). No rato recém-nascido, os glomérulos mais maduros estão localizados mais próximos da junção corticomedular (justamedulares) enquanto que os glomérulos imaturos na região mais superficial do córtex renal (Nigam et al, 1996; Reeves et al, 1978).

O rim de mamíferos é derivado de três estruturas fetais de acordo com a seguinte seqüência de desenvolvimento: pronefros, mesonefros e metanefros. Na maioria dos mamíferos, incluindo humanos e roedores, os pronefros e mesonefros aparecem cedo na gestação e sofrem regressão, enquanto que os metanefros se diferenciam para se tornarem o rim adulto (Nigam et al, 1996).

Durante a nefrogênese, ocorre a interação entre as células mesenquimais do blastema metanéfrico e as células epiteliais do broto ureteral, um ramo do ducto mesonéfrico (ou ducto de *Wolffian*). As células mesenquimais indiferenciadas migram, condensando-se ao redor das extremidades do ureter em ascensão e sofrem conversão mesenquimal-epitelial. As células epiteliais formadas se proliferam formando vesículas que sequencialmente se desenvolvem em forma de vírgula e corpos em forma de S, estruturas precursoras do nefro. O desenvolvimento glomerular é um processo contínuo que pode ser dividido em 4 estágios: 1 - formação em vesícula, 2 - formação em S, 3 - desenvolvimento de alças capilares e 4 - maturação de glomérulos (Reeves et al, 1978) (**Figura A**).

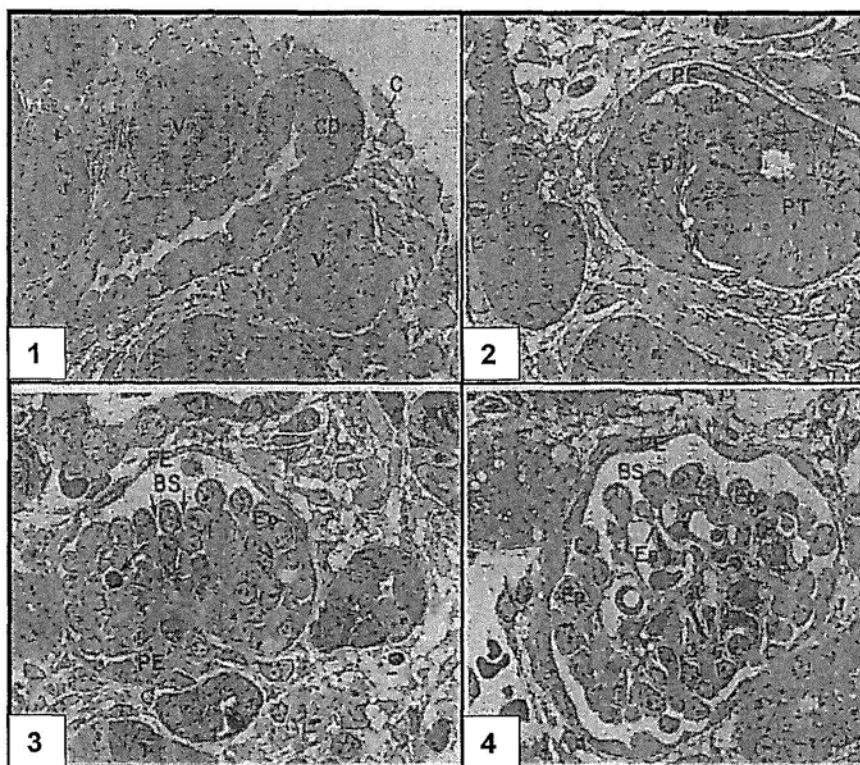


Figura A – Fases do desenvolvimento glomerular em ratos: 1 - formação em vesículas, 2 - formação em S, 3 - desenvolvimento de alças capilares e 4 - maturação de glomérulos (Reeves, W.; Caulfield, J.P.; Farquhar, M.G. *Lab. Invest.* 39: 90-100, 1978).

No primeiro estágio (formação em vesículas), as vesículas são formadas por um grupo de células epiteliais colunares que formarão o revestimento da luz vesical. Essas células são unidas em seus ápices por junções oclusoras típicas. No segundo estágio (corpos em forma de S), o epitélio visceral tem duas ou mais camadas de células em profundidade, entre elas irá se formar o espaço de Bowman. Durante esta fase, se inicia a formação de alças capilares, o epitélio sofre uma reorganização passando de desorganizado, arranjo pseudoestratificado para uma camada celular simples polarizada. Conforme as células se diferenciam, as junções migram na superfície celular lateral do ápice para a base. Como essas junções migram, os espaços intercelulares os quais estão em continuidade com o espaço de Bowman, tornam-se visíveis entre as células epiteliais viscerais. No final dessa fase, a membrana basal surge entre o epitélio visceral e o endotélio. No terceiro estágio (desenvolvimento das alças capilares) podem ser observadas várias alças capilares

em diversos estágios de maturação e também espaços ao longo da margem lateral entre as células epiteliais viscerais, devido ao movimento das junções oclusoras para a base das células. A membrana basal e as fenestrações endoteliais se diferenciam ao mesmo tempo em que os processos podais. A membrana basal aumenta em espessura e dá origem a uma estrutura madura com uma camada densa central, a lâmina densa e as lâminas rara interna e externa adjacentes ao endotélio e epitélio, respectivamente. Os glomérulos podem ser considerados maduros quando apresentam múltiplas alças capilares, embora o epitélio visceral ainda não tenha alcançado o seu padrão normal, ou seja, uma configuração mais achatada e a diferenciação dos processos podais e fendas completamente estabelecidas. No estágio final (maturação dos glomérulos), o endotélio bem como o epitélio visceral, apresentam sua configuração achatada madura (Reeves et al, 1978).

A formação da matriz extracelular (MEC) representa um dos eventos chaves na diferenciação dos glomérulos. Os principais componentes da MEC são: colágenos tipo IV e III, fibronectina, lamininas e proteoglicanas. A fibronectina é uma glicoproteína que pode interagir com outras proteínas da matriz e proteínas associadas a células, induzindo mudanças na adesão e migração celulares (Thiery et al, 1989; Yamada et al, 1991). Os fatores de crescimento liberados localmente participam da formação e regulam a produção da matriz. Esses polipeptídeos regulam a remodelação tecidual que ocorre na embriogênese e no desenvolvimento (Border et al, 1994). O TGF- β (Transforming Growth Factor- β) é uma das principais citocinas envolvidas na embriogênese (Akhurst et al, 1990; Heine et al, 1990; Pelton et al, 1990; Schmid et al, 1991).

Participação da Angiotensina II no Desenvolvimento Renal

Várias linhas de evidências experimentais mostram que o sistema renina-angiotensina (SRA) participa do desenvolvimento renal (Bagby et al, 1988; Campbell-Boswell et al, 1981; Fernandez et al, 1985; Homma et al, 1990; Singhal et al, 1990; Fogo et al, 1990). As atividades da renina plasmática e da enzima conversora de angiotensina II (ECA) plasmática aumentam durante a gestação e são maiores em

neonatos quando comparados com animais adultos (Wallace et al, 1980; Wilson et al, 1996; Kotchen et al, 1972; Fiselier et al, 1983). A expressão de RNAm para renina também se encontra em seus níveis máximos durante a nefrogênese em ratos recém-nascidos (Rosenberg et al, 1990). Todos os componentes do SRA estão presentes desde cedo na vida embrionária (Gomez et al, 1989; Gomez et al, 1993).

Os receptores de angiotensina II (AII) estão expressos em maior quantidade em fetos de ratos (Millan et al, 1989) do que em animais adultos. O RNAm para receptor do tipo 1 de AII (receptor AT 1) é detectado nos glomérulos renais, vasos e córtex nefrogênico em ratos recém-nascidos, onde a proliferação e diferenciação celulares ocorrem simultaneamente (Tufro-McReddie et al, 1993).

Tem sido demonstrado que a AII é capaz de induzir o crescimento celular (Geisterfer et al, 1998) e a expressão precoce de genes para fatores do crescimento (Taubman et al, 1989; Coles et al, 1993; Woolf et al, 1998). A AII pode estimular a produção de MEC pelas células mesangiais em cultura, pela indução do aumento na produção de TGF- β (Kagami et al, 1994). O TGF- β influencia a proliferação e diferenciação de vários tipos de células e, estimula a síntese de diversos componentes da MEC (Roberts et al, 1992; Igotz et al, 1987; Lyons et al, 1990; Rizzino et al, 1988; Roberts et al, 1990; Sporn et al, 1987). O TGF- β pode aumentar a produção de colágeno, fibronectina (Igotz et al, 1987; Coimbra et al, 1991) e proteoglicanas (Border et al, 1990) por fibroblastos, células mesangiais e epiteliais e reduzir a degradação da MEC (Edwards et al, 1987). Experimentos realizados em nosso laboratório mostraram que a produção renal de TGF- β está aumentada nos rins de ratos recém-nascidos quando comparados aos animais adultos (Coimbra et al, 1994).

Foi constatado que a inibição do SRA pela administração de inibidores da ECA ou de antagonistas de receptores AT 1 durante o desenvolvimento pós-natal (3 a 21 dias) em ratos, provoca anormalidades na estrutura (redução do volume glomerular, dilatação tubular, atrofia papilar, bem como alargamento do compartimento intersticial) e na função renal (redução da habilidade de concentração da urina) (Friberg et al, 1994; MacCausland et al, 1994; MacCausland et al, 1996).

As alterações estruturais parecem resultar de uma interrupção do desenvolvimento vascular e tubular renal em todas as regiões do rim (MacCausland et al, 1994).

Ratos neonatos tratados com losartan por 12 dias, a partir do dia de nascimento, apresentaram alterações tubulares e comprometimento de glomérulos, que se mostraram menores, imaturos e em menor número (Tufro-McReddie et al, 1995). Em todos os outros estudos que descrevem as alterações na morfologia renal de ratos induzidas pelo bloqueio do SRA, as drogas eram dadas aos neonatos a partir do 1º (Tufro-McReddie et al, 1995, Charbit et al, 1995) ou 3º dia de vida (Friberg et al, 1994; McCausland et al, 1996). Quando o tratamento com losartan era realizado em ratos com mais de 21 dias, nenhuma mudança morfológica grave ocorria (Tufro-McReddie et al, 1994). Portanto essas observações sugerem que o desenvolvimento renal de ratos está suscetível aos efeitos do bloqueio do SRA principalmente durante os últimos 5 dias da gestação e as 2 primeiras semanas de vida pós-natal (Hilgers et al, 1997).

Vários tipos de receptores de All foram identificados em diferentes tecidos de mamíferos (Kambayashi et al, 1993; Mukoyama et al, 1993; Murphy et al, 1991), porém a maioria das ações da All são mediadas pelos receptores AT 1 (Chiu et al, 1991; Gomez et al, 1994, Wong et al, 1992). Alguns autores constataram que os receptores AT 1 aparecem mais tarde no desenvolvimento renal e que sua expressão aumenta com a maturação. Esta observação evidencia uma possível relação destes receptores com o desenvolvimento da função renal (Tufro-McReddie et al, 1994). Os receptores AT 2 intra-renais são abundantes durante a vida fetal e diminuem logo após o nascimento, alguns autores sugeriram que esses receptores poderiam ter uma rápida e precoce participação, provavelmente na diferenciação mesenquimal (Ciuffo et al, 1993; Grady et al, 1991; Norwood et al, 1994). Recentemente tem sido demonstrado que receptores AT 2 podem mediar morte celular programada (apoptose) e inibição do crescimento (Horiuchi et al, 1999). Kakuchi e colaboradores detectaram em camundongos a presença de RNAm para receptores AT 2 no interstício que envolve os ductos coletores e, em menor quantidade, no mesênquima nefrogênico, sugerindo uma ligação entre apoptose e receptores AT 2, o que resultaria em remoção do excesso de mesênquima (Kakuchi

et al, 1995). Koseki e colaboradores têm postulado que o mesênquima nefrogênico pode ser automaticamente programado para morte celular e, necessite ser removido por fatores de crescimento para ocorrer o processo de desenvolvimento renal (Koseki et al, 1992).

O volume de fluido extracelular (VFEC) é regulado fundamentalmente pelos mesmos mecanismos que controlam o balanço de sódio, sendo mantido dentro de limites estreitos em indivíduos normais apesar das variações de ingestão de sódio. O aumento do VFEC e a redução da atividade do sistema simpático que ocorrem em condições de elevada ingestão de sódio irão inibir a atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), um dos principais reguladores do VFEC (Winaver et al, 2000). Portanto, uma das formas de reduzir a atividade do SRAA é aumentando a ingestão de sódio.

Miofibroblastos e Proliferação Celular durante o Desenvolvimento Renal

A actina é a principal proteína do sistema de microfilamentos de células eucarióticas. Interage com um grande número de proteínas associadas, o que resulta em uma organização supramolecular estável. A actina também é uma das proteínas fundamentais nos processos de motilidade ou interações actino-miosina dependentes de ATP, incluindo motilidade celular e fluxo citoplasmático (Romano et al, 1994). A α -SMA (*α -smooth actin*) é uma das seis isoformas de actina intimamente relacionadas dos mamíferos, a presença da α -SMA de músculo liso no rim adulto em condições normais, é restrita a musculatura lisa dos vasos cuja função principal é a contratilidade (Johnson et al, 1991).

Tem sido demonstrado que sob condições patológicas, as células mesangiais, tubulares e intersticiais apresentam alterações no fenótipo passando a expressar a proteína α -SMA de músculo liso e algumas proteínas de filamentos intermediários, tornando-se potencialmente capazes de produzir mais colágeno e outros elementos da MEC (Igotz et al, 1987; Johnson et al, 1991; Meguid El Nahas et al, 1996). Essas modificações estão relacionadas à proliferação celular e produção de MEC, mostrando que a α -SMA pode ser usada como marcador de ativação da célula

mesangial em modelos de glomerulonefrite no rato (Johnson et al, 1991; Meguid El Nahas et al, 1996).

A α -SMA está também expressa em maior quantidade nos glomérulos e capilares peritubulares durante o início do desenvolvimento e, essa expressão desaparece com a maturação dos glomérulos e capilares peritubulares (Tufro-McReddie et al, 1994). Segundo Naruse e colaboradores, as células mesangiais imaturas expressam α -SMA na fase S e na fase de desenvolvimento de alças capilares, deixando de expressar no estágio de maturação dos glomérulos (Naruse et al, 2000). Este fato mostra que a ativação de células mesangiais ocorre também durante o desenvolvimento glomerular (Carey et al, 1992).

Foi também verificado, durante o desenvolvimento renal um número elevado de células PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) positivas na zona nefrogênica nos primeiros estágios da diferenciação glomerular epitelial, onde virtualmente todas as células nas vesículas e formações em S estão se dividindo (Marquez, 2002). O PCNA é uma proteína nuclear de 36 KD que está associada com o ciclo celular (Hall et al, 1990). Sua expressão aumenta da fase final "G1" para as fases iniciais "S" do ciclo celular. Vários estudos de imunohistoquímica realizados com anticorpos anti-PCNA mostram que eles são capazes de identificar células na fase de divisão (Hall et al, 1990; Marquez et al, 2002).

Atividade de MAP quinases (Mitogenic-Activated Protein) no desenvolvimento renal

Estímulos extra e intracelulares controlam a proliferação e diferenciação das células. A ativação de fatores de transcrição por sinais extracelulares pode ocorrer no núcleo, na membrana ou no citoplasma. Contudo, em uma dessas etapas sempre existe uma translocação para o núcleo. Algumas vias envolvem a migração da própria molécula sinalizadora para o núcleo, enquanto que em outras são os fatores de transcrição que migram para o núcleo após ativação no citoplasma (Hill et al, 1995).

Muitos sinais são transmitidos da superfície celular para o núcleo através da cascata das MAP quinases (*mitogenic-activated protein kinase*). As MAP quinases são ativadas pela fosforilação da MAP quinase quinase (MEK), que é fosforilada pelo *Raf*, *Mos* ou por um grupo de quinases estruturalmente relacionadas denominado MEKK. Várias MAP quinases foram identificadas incluindo o ERK (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*), o JNK (*Jun N-terminal kinase*)/SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*) e as quinases da família p38 (Hill et al, 1995; Bokemeyer et al, 2000). ERK é ativada por vários fatores de crescimento e substâncias vasoativas, e tem um papel chave na proliferação e diferenciação celular. Enquanto que, o p38 e JNK são ativados por citocinas e estresses celulares (luz ultravioleta, choque térmico, hiperosmolaridade), e tem sido implicados na inibição da proliferação e apoptose (Xia et al, 1995). Todas as três MAPKs têm fatores de transcrição como seus alvos, e regulam a indução de um conjunto de genes que determinam a resposta biológica da célula (Force et al, 1998).

A ligação do fator de estímulo extracelular com receptores acoplados a proteína - G ou receptores proteína - tirosina quinase, induz a formação de GTP-Ras que irá induzir a ativação em sequência de proteínas quinases citoplasmáticas, provocando a fosforilação e ativação do MEK. O MEK, um ativador específico de ERK, é uma proteína quinase que fosforila ambos os sítios regulatórios treonina e tirosina no ERK. Embora existam várias evidências mostrando que a contribuição dessa via de sinalização é fundamental no controle da proliferação e diferenciação celular *in vitro* (Hill et al, 1995; Hamaguchi et al, 1999), a participação do ERK *in vivo* no desenvolvimento renal é pouco conhecida (**Figura B**).

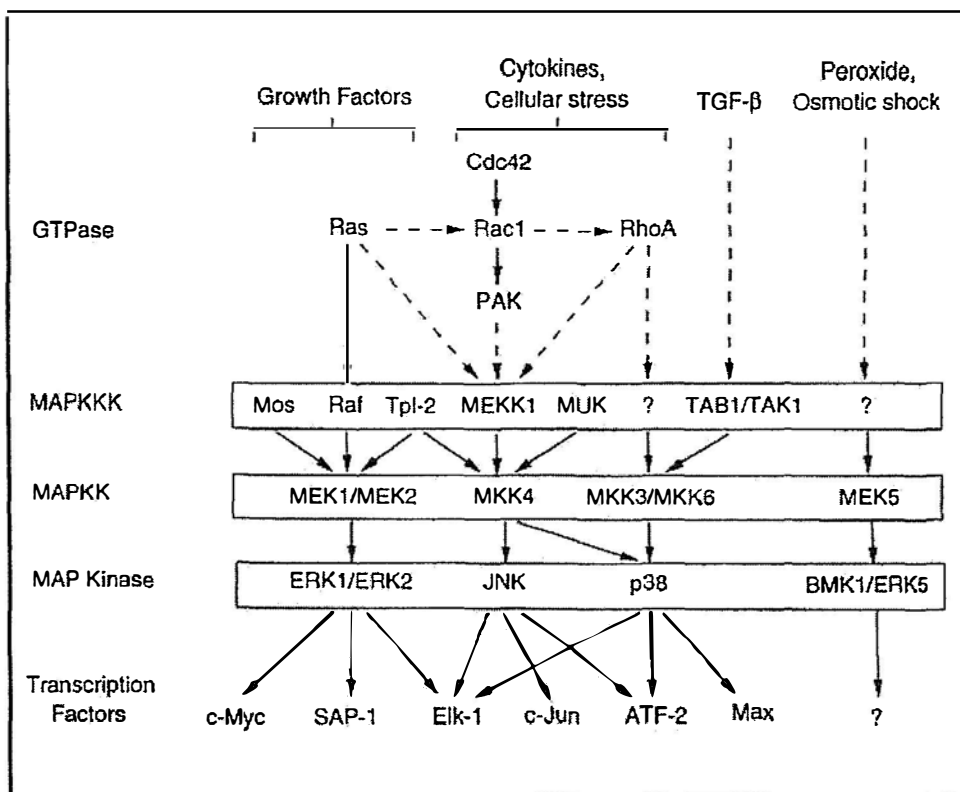


Figura B – Cascata das MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Whitmarsh AJ ; Davis RJ, *J Mol Med*, 1996).

Durante o desenvolvimento renal tem sido observada uma proliferação em grande escala e apoptose (Coles et al, 1993). As expressões de fatores de crescimento, protooncogenes e fatores de transcrição que regulam a proliferação ou apoptose, estão aumentadas durante a ontogenia renal (Woolf et al, 1998). Contudo, pouco é conhecido sobre as moléculas sinalizadoras intermediárias que transmitem estímulos extracelulares para o núcleo, e ativam genes durante o desenvolvimento renal. Existem evidências de que a família de MAP quinases pode participar desse processo regulando a proliferação e apoptose. Omori e cols. em estudos de *immunoblot* com homogenatos de rim e imunohistoquímica verificaram que ERK, p38 e MKP-1 são predominantemente expressos no rim embrionário. Por outro lado, JNK não foi detectado no rim dos fetos, tornando-se detectável sete dias após o nascimento, sendo mais abundante no rim adulto (40 dias). A expressão de ERK tem sido correlacionada com os processos maturacionais da nefrogênese e tubulogênese (Omori et al, 2000). Hida e colaboradores verificaram em cultura de células

metanéfricas que as expressões de p38 e ERK estavam aumentadas no rim embrionário, sendo que p38 foi uniformemente expressa no rim embrionário (Fisher et al, 2001; Hida et al, 2002).

Anormalidades no desenvolvimento renal podem ser resultantes da ação de teratógenos, nutrição materna, obstrução e mutações. Vários fatores químicos e físicos podem afetar a atividade das MAP quinases. É provável que estímulos extracelulares possam interferir, em algumas situações, na sinalização através da ativação de ERK, JNK ou p38, prejudicando o desenvolvimento normal e resultando em malformação renal (Hida et al, 2002).

Foi constatado em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* que o aumento da produção de AII pode contribuir para a ativação de MAP quinases. Kubo e cols. mostraram que em células musculares lisas vasculares, a AII e endotelina I causam um aumento da atividade MAP quinase, e que esta ativação foi inibida pelo losartan e por um antagonista de receptor de endotelina (BQ123), respectivamente (Kubo et al, 2001). Kim e colaboradores verificaram que a lesão arterial provocada por um cateter com um balão introduzido nas carótidas induzia a ativação de MAP quinases. Os autores observaram também que essa ativação era mediada, pelo menos em parte, via receptores AT 1 de AII (Kim et al, 1998). Choi e colaboradores verificaram que a família de MAP quinases pode ser modulada pela inibição da ECA no rim em desenvolvimento. Nos animais tratados com enalapril por 7 dias após o nascimento, houve um aumento nas expressões de JNK-2, p38, p-JNK-2, p-p38 no córtex renal. Portanto, estas MAP quinases parecem estar envolvidas nas vias de sinalização intracelular relacionadas a AII nesta fase (Choi et al, 2005).

Considerando que AII pode estar relacionada à ativação da cascata de MAP quinases em vários modelos experimentais, e também durante o desenvolvimento renal pós-natal, é importante verificar se esta relação também se estabelece nas seguintes condições: 1) durante inibição no SRA provocada pela elevada ingestão de sódio durante a gestação e amamentação; e 2) após o bloqueio de receptores AT 1 realizado durante o período de gestação e/ou amamentação. Além disso, tentamos estabelecer uma relação entre a expressão de AII e de receptores AT 1 e AT 2 com a ativação da cascata de MAP quinases.

IV - Objetivos

Avaliar as expressões das MAP quinases (p-ERK, p-JNK e p-p38) durante o desenvolvimento e diferenciação do córtex renal de ratos recém-nascidos.

- Analisar o efeito da sobrecarga de salina e do tratamento com losartan durante a gestação e/ou amamentação nas expressões de MAP quinases no córtex renal de ratos recém-nascidos e adultos.
- Analisar o efeito da sobrecarga de salina e do tratamento com losartan durante a gestação e/ou amamentação nas expressões de receptores AT 1 e AT 2 no córtex renal de ratos recém-nascidos e adultos.
- Verificar as conseqüências da sobrecarga de salina e da inibição dos receptores AT 1 no período intrauterino e pós-natal na função e estrutura renais dos animais na idade adulta e suas relações com as expressões de MAP quinases no córtex renal.

V - Material e Métodos

1) Animais

Foram utilizadas 90 ratas Wistar de 180 g e 35 ratos Wistar de 300 g para acasalamento, e filhotes (fêmeas) de diferentes idades, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo – Câmpus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da mesma universidade, à temperatura de 22°C e ciclo claro-escuro de 12 horas.

As fêmeas de ratos Wistar foram colocadas para acasalamento na proporção de três fêmeas para um macho, a gravidez foi constatada pela análise do esfregaço vaginal. Após a constatação da gravidez, as fêmeas foram separadas e os tratamentos iniciados, os filhotes (fêmeas) após o nascimento foram divididos em 3 estudos com 2 sub-grupos cada um:

Estudo 1 - Influência da dieta com elevado conteúdo de NaCl durante a gestação e amamentação no desenvolvimento renal pós-natal dos filhotes.

- A) Grupo I** (Controle 1) - filhotes de mães submetidas à ingestão normal de água e sal durante a gestação e amamentação, sacrificados com 1 (n=17), 7 (n=7), 15 (n=8) e 30 dias (n=16) de idade.
- B) Grupo II** (Experimental 1) - filhotes de mães submetidas à ingestão de salina 0,15M em substituição à água, durante a gestação e amamentação, sacrificados com 1 (n=20), 7 (n=10), 15 (n=9) e 30 dias (n=23) de idade.

Estudo 2 - Influência da exposição ao Losartan durante a gestação e amamentação no desenvolvimento renal pós-natal dos filhotes.

- C) Grupo I** (Controle 2) - filhotes de mães submetidas à ingestão de solução de sacarose 2% (solvente do losartan) em substituição à água, durante a gestação e amamentação, sacrificados com 1 (n=23), 7 (n=14), 15 (n=14) e 30 dias (n=20) de idade.
- D) Grupo II** (Experimental 2) - filhotes de mães submetidas à ingestão de losartan potássio (0,4 g/L) (All Chemistry, SP, BR) diluído em solução de sacarose 2% em substituição à água, durante a gestação e amamentação, sacrificados com 1 (n=26), 7 (n=16) e 15 (n=20) e 30 dias (n=22) de idade.

Estudo 3 - Influência da exposição ao Losartan durante a amamentação no desenvolvimento renal pós-natal dos filhotes.

E) Grupo I (Controle 3) - filhotes de mães submetidas à ingestão de solução de sacarose 2% (solvente do losartan) em substituição à água, durante a amamentação, sacrificados com 1 (n=8), 7 (n=16), 15 (n=13) e 30 (n=10) dias de idade.

F) Grupo II (Experimental 3) - filhotes de mães submetidas à ingestão de losartan potássio (0,4 g/L) diluído em solução de sacarose 2% em substituição à água, durante a amamentação, sacrificados com 1 (n=26), 7 (n=15), 15 (n=16) e 30 (n=7) dias de idade.

2) Análise Histológica

As secções de 5 µm de tecido renal, foram coradas com tricrômico de Masson, para a análise histológica das diferentes fases do desenvolvimento renal. Foi também contado, o número de glomérulos por área de 0,245 mm² do córtex renal dos animais de 30 dias dos 3 estudos.

3) Análise Morfométrica

Foi realizada a mensuração das áreas correspondentes aos tufo glomerulares de todos os glomérulos contidos em um corte de tecido renal dos animais de 30 dias de todos os estudos, além disso foi analisada a área intersticial relativa do córtex renal dos animais de 30 dias dos Estudos 2 e 3. As imagens obtidas à microscopia de luz comum foram captadas por meio de vídeo-câmara e transmitidas ao microcomputador para avaliação morfométrica. A análise das imagens foi realizada utilizando-se o programa AxioVision Release 4.3 (Carl Zeiss).

4) Análise Imunohistoquímica

As secções de 5 µm de tecido renal dos animais dos 3 Estudos foram desparafinizadas e submetidas a análise imunohistoquímica, onde os cortes foram inicialmente incubados com os seguintes anticorpos primários:

anti- AII (1/200), policlonal (Península Laboratories Inc, San Carlos, USA), *overnight* à 4°C.

- **anti- α -SMA** (1/1000), monoclonal (DAKO Corporation, Denmark), *overnight* à 4°C.
- **anti-fibronectina** (1/500), policlonal (CHEMICON International Inc, Temecula, CA, USA), *overnight* à 4°C.
- **anti-PCNA** (1/1000), monoclonal (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) durante 60 minutos em temperatura ambiente.
- **anti-pERK** (1/20), policlonal (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) *overnight* à 4°C.
- **anti-pJNK** (1/30), monoclonal (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), *overnight* à 4°C.

Os cortes foram incubados em seguida, com anticorpos secundários anti-IgG de coelho ou de camundongo. O produto da reação foi detectado com o sistema avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e a cor desenvolvida pela adição de 3,3 diaminobenzidina (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) na presença de água oxigenada. As ligações inespecíficas foram bloqueadas pelas diluições dos anticorpos primários e secundários com solução de PBS, contendo albumina bovina 1%. Os controles negativos foram feitos, substituindo o anticorpo primário por IgG de coelho normal (policlonal) ou de camundongo (monoclonal) em concentrações equivalentes. A contracoloração foi feita com *metilgreen* ou *hematoxilina* de Harris.

5) Avaliação dos Resultados de Imunohistoquímica

A avaliação dos resultados da imunorreação para α -SMA e fibronectina, p-ERK e p-JNK foi feita através da análise da porcentagem do glomérulo ou do córtex renal marcado, atribuindo um escore de 0 a 4. O escore 0, equivale em 0 a 5% do campo marcado, o escore 1, entre 5 e 25%, o escore 2, entre 25 e 50%, o escore 3, entre 50 e 75% e o escore 4, entre 75 e 100% (Kliem et al, 1996). A análise das imunorreações para AII e PCNA foi feita pela contagem de células positivas por

glomérulo ou por área do córtex renal medindo $0,245 \text{ mm}^2$. Foi determinado um escore ou número médio de células por campo e por glomérulo para cada rato.

6) Análise da Expressão de Receptores AT 1, AT 2 e da MAP quinase p-p38

O tecido renal dos animais de 1 (n=20) e 30 dias (n=12) de idade do Estudo 1; 1 (n=20) e 30 dias (n=14) de idade do Estudo 2; e 30 dias (n=10) de idade do Estudo 3, foi homogeneizado em 2 mL de tampão de lise Triton X-100 (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% SDS, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin e 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) à 4°C. Após a incubação por 5 min, os lisados foram centrifugados à 4°C por 15 min a 10000 rpm. As expressões da MAP quinase p-38 e dos receptores AT 1 e AT 2 nessas amostras foi avaliada por *Western Blot* (Stambe et al, 2003). Foram aplicadas por canaleta, amostras de lisado renal contendo 30 µg de proteínas cada em gel SDS-PAGE 10%. A dosagem de proteínas nas amostras de lisado renal foi realizada pelo método de Hartree (Hartree et al, 1972). As amostras contendo proteínas foram transferidas do gel para a membrana de nitrocelulose, as membranas foram incubadas por 3 horas em 30 mL de tampão de bloqueio (solução de PBS: NaCl 0,15M, tampão PO_4^{-3} 0,01M, pH 7,4 e 5% leite desnatado), em seguida a membranas foram lavadas em tampão TBS (NaCl 0,15M e trizma base 0,05M, 0,1% Tween 20, pH 8,0) e incubadas com os anticorpos primários: anti-p-p38 (1/1000) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), anti-AT 1 (1/200) e anti-AT 2 (1/200) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e anti-tubulina (1/1000) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) como controle quantitativo, diluídos em 5% bovine serum albumin (BSA) *overnight* à 4°C. As membranas em seguida, foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1/5000) (anti-p-p38, anti-tubulina) ou anti-IgG de coelho (1/10000) (anti-AT 1 e AT 2) ligado a peroxidase (Dako, Glostrup, Denmark) por uma hora em temperatura ambiente. As membranas foram lavadas e o resultado da reação detectado pelo Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA) e capturado em filme de raio-X. A análise da densitometria foi realizada utilizando o programa Image J.

7) Determinação da Apoptose In Situ

A avaliação da apoptose foi feita no córtex renal dos animais de 30 dias do Estudo 1 (Controle 1 n=7, e Experimental 1 n=8) e animais de 15 dias do Estudo 2 (Controle 2 n=6, e Experimental 2 n=7). A quantificação da apoptose foi feita utilizando-se o teste de TUNEL (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) (Gavrieli et al, 1992). Cortes histológicos de 4 μm foram desparafinizados e incubados com proteinase K (20 mg/ml), por 15 minutos à temperatura ambiente. Após o bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram encubados em tampão TdT (Tris 30 mM, cacodilato de sódio 140 mM, cloreto de cobalto 1 mM), pH 7.2, e incubados com TdT 1:100 e d-UTP-biotinilado 1:200 em tampão TdT por 60 minutos à 37°C. Os núcleos marcados foram detectados com DAB/cloreto de níquel/peróxido de hidrogênio e a contracoloração feita com *methyl green*.

Foi contado o número de núcleos corados por campo (30 campos) medindo 0,245mm² do córtex renal e determinado o número de células/campo/animal.

8) Estudos de Função Renal

A função renal foi avaliada pelo clearance de inulina em animais de 30 dias de idade do Estudo 1 (Controle 1, n=15 e Experimental 1, n=10). Os animais foram anestesiados com injeções i.p. (0,8 mL/100 g de rato) de Urethana 25% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). A temperatura foi mantida a 37°C durante o experimento. A artéria e veia femorais foram canuladas para coleta de amostras de sangue e injetar fluidos e a bexiga urinária foi canulada para coleta de urina. Os animais receberam uma dose priming de inulina de 12 mg/100g seguida por uma dose manutenção de 42 mg/h/100g. Após a estabilização de 60 min, a urina foi coletada por um período de 90 min e o sangue coletado aos 45 e 90 min. A inulina plasmática e urinária foi avaliada utilizando o método de Fuehr (Fuehr et al, 1955). Nos animais de 30 dias do Estudo 3, a função renal foi avaliada pelo clearance de creatinina.

9) Determinação de Creatinina, Na⁺ e K⁺ e Osmolalidade nas Amostras de Sangue e Urina

Amostras de urina 24 horas foram coletadas em gaiolas metabólicas, e amostras de sangue foram retiradas da cauda desses animais. A análise de creatinina nas amostras foi realizada pelo método colorimétrico utilizando ácido pícrico (Haygen, 1953). As quantificações de sódio e potássio foram feitas pelo fotômetro de chama e a determinação da osmolalidade por Osmômetro (Fiske) pelo método do abaixamento do ponto de congelação.

No Estudo 1, foram coletadas amostras de urina 24 horas das ratas grávidas no início (3º dia) e final (17º dia) da gestação e dos filhotes ao completarem 30 dias de idade, e as amostras de sangue foram coletadas no dia seguinte. No Estudo 3, este procedimento foi realizado somente com os filhotes de 30 dias de idade.

10) Quantificação de Albumina nas Amostras de Urina

A excreção urinária de albumina foi avaliada pelo método de eletroimunoensaio (Laurell, 1972) em amostras de urina de 24 horas dos animais de 30 dias de idade do Estudo 2 (Controle 2, n=20 e Experimental 2, n=7) e Estudo 3 (Controle 3, n=11 e Experimental 3, n=6). As amostras foram conservadas em azida sódica 20% à temperatura de - 20°C. Foram utilizados nesse processo anticorpo anti-albumina de rato produzido em coelhos nesse laboratório, soluções padrões de albumina de rato (0,04; 0,06 e 0,10 mg/mL), agarose tipo II (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e tampão tris-acetato, pH 8,6.

11) Determinação da Pressão Arterial

A pressão arterial foi avaliada nas ratas grávidas no início (2º dia) e término (16º dia) da gestação e também nos filhotes de 30 dias do Estudo 1, de maneira indireta por pletismografia. Os animais foram previamente aquecidos em uma câmara durante 15 minutos para elevação da temperatura e dilatação das artérias da cauda e, em seguida, submetidos à mensuração da pressão arterial utilizando-se um manguito, colocado diretamente na cauda desses animais.

12) Análise Estatística

A análise dos dados referentes à albuminúria foi feita pelo teste de Mann-Whitney. Para os demais parâmetros foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey para comparações no mesmo grupo em diferentes idades ou grupos diferentes na mesma idade e o teste t com correção de Welch para comparações entre os grupos estudados em determinada idade.

O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Estudo 1 - Influência da dieta com aumento do conteúdo de NaCl durante a gestação e amamentação no desenvolvimento renal pós-natal dos filhotes.

Estudo Funcional das Ratas Grávidas e dos Filhotes de 30 dias

O volume urinário de 24 horas (**Tabela 1**), bem como o volume de líquidos ingeridos (**Tabela 1**), foi maior nas mães submetidas à ingestão de salina, quando comparadas às mães do grupo controle, evidenciando um aumento do volume de líquido extracelular nas mães do grupo experimental. A pressão arterial avaliada por pletismografia (**Tabela 1**) das ratas grávidas verificada em dois momentos da gestação (início e fim), não foi diferente estatisticamente entre as mães de ambos os grupos.

As concentrações plasmáticas de sódio e potássio e osmolaridade plasmática, não mostraram diferenças significativas entre as mães do grupo controle em relação as do grupo experimental. Não houve também diferenças significativas no consumo de ração pelas mães de ambos os grupos, esses valores são mostrados na **Tabela 2**.

A avaliação da função renal pelo clearance de inulina mostrou um decréscimo na TFG nos animais de 30 dias de idade do grupo experimental, quando comparados aos controles de mesma idade. Estes animais também apresentaram valores elevados de pressão arterial quando comparados aos controles (**Tabela 3**).

Análise Histológica e Morfométrica

A análise histológica mostrou a presença de glomérulos em diferentes fases de evolução no córtex renal dos animais de 1 e 7 dias, enquanto que os animais de 15 e 30 dias apresentaram os glomérulos em fase final de diferenciação (**Figuras 2A e 2B**). Não foram observadas alterações quanto ao número de glomérulos por área de 0,245 mm² do córtex renal dos animais de 30 dias do grupo experimental ($4,09 \pm 0,21$), quando comparados aos animais controles ($3,98 \pm 0,14$) de mesma idade.

A análise morfométrica (**Figura 1**) não evidenciou também, alterações significativas na área dos glomérulos dos animais de 30 dias do grupo experimental

($3772 \mu\text{m}^2 \pm 116$), quando comparados aos controles de mesma idade ($3757 \mu\text{m}^2 \pm 117$).

Análise Imunohistoquímica

A expressão de fibronectina nos animais do grupo controle estava aumentada nos glomérulos em fase de desenvolvimento (1 dia) em relação aos de 30 dias, como pode ser observado nas **Figuras 2C e 2D**. Foi constatada uma redução na expressão de fibronectina glomerular, tanto no grupo controle como no experimental, durante o processo de desenvolvimento glomerular (**Figura 3**). Houve uma redução significativa na expressão de fibronectina glomerular ($2,10 \pm 0,12$) nos animais de 1 dia, de mães submetidas à ingestão de salina 0,15M quando comparados aos animais do grupo controle de mesma idade ($2,53 \pm 0,06$).

O número de células PCNA positivas por glomérulo no grupo controle e experimental foi maior nos animais de 1 (**Figuras 4A**) e 7 dias quando comparados aos animais de 30 dias (**Figuras 4B**), embora existisse também atividade replicativa nestes últimos, devido ao processo de maturação e crescimento renais continuarem mesmo após o término da nefrogênese. Nos animais de 1 dia do grupo experimental (**Figura 5**), ocorreu uma redução no número dessas células ($4,99 \pm 0,59$) quando comparados aos animais do grupo controle de mesma idade ($7,85 \pm 0,29$).

A imunorreação para α -SMA no córtex renal das ratas do grupo controle e experimental, foi mais intensa nos animais de 1 dia (**Figura 4C**), tanto no compartimento glomerular (região mesangial), como no compartimento tubulointersticial quando comparados aos animais de 30 dias de ambos os grupos, nestes a expressão de α -SMA estava restrita às paredes dos vasos, como pode ser observado na **Figura 4D**. Nos animais de 1 dia, de mães que ingeriram salina durante a gestação, houve uma tendência a redução na expressão de α -SMA glomerular ($1,40 \pm 0,08$) (**Figura 6A**), quando comparados a dos animais do grupo controle de mesma idade ($1,67 \pm 0,12$), enquanto que no compartimento tubulointersticial (**Figura 6B**), a redução na expressão de α -SMA nos animais de 1 dia do grupo experimental foi estatisticamente significativa ($1,59 \pm 0,19$) quando comparados aos animais de 1 dia do grupo controle ($2,22 \pm 0,16$).

O número de células All positivas foi maior tanto nos glomérulos como no compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais durante a nefrogênese, ou seja, animais de 1 e 7 dias (**Figuras 7A e 7B**), enquanto que nos de 30 dias a expressão de All estava limitada ao aparelho justaglomerular (**Figura 7C**). Os animais de 1 ($0,39 \pm 0,07$) e 7 dias ($0,58 \pm 0,08$) do grupo experimental apresentaram menor número de células All positivas por glomérulo (**Figura 8A**), quando comparados aos controles de 1 ($0,80 \pm 0,08$) e 7 dias ($1,07 \pm 0,21$). No compartimento tubulointersticial (**Figura 8B**) dos animais de 1 dia de mães que receberam salina em substituição à água, houve também uma redução no número de células All positivas ($4,27 \pm 0,42$), quando comparados aos controles de mesma idade ($5,87 \pm 0,35$).

A expressão de p-ERK (**Figura 9**) nos compartimentos glomerular ($1,17 \pm 0,13$) e tubulointersticial ($1,72 \pm 0,16$) do córtex renal foi maior nos animais controles de 1 dia quando comparados aos de 30 dias ($0,04 \pm 0,03$ e $0,08 \pm 0,04$ respectivamente). Observamos também uma redução na expressão de p-ERK nos compartimentos glomerular ($0,46 \pm 0,09$) (**Figura 10A**) e tubulointersticial ($1,07 \pm 0,20$) (**Figura 10B**) do córtex renal dos animais de 1 dia, de mães submetidas a elevada ingestão de sódio durante a gestação e amamentação, em relação aos controles de mesma idade ($1,17 \pm 0,13$ e $1,72 \pm 0,16$, respectivamente).

Constatamos também que a expressão de p-JNK (**Figura 11**) estava aumentada nos animais controles de 1 dia, tanto no compartimento glomerular ($1,85 \pm 0,19$) como no tubulointersticial ($1,59 \pm 0,15$), quando comparados aos de 30 dias ($0,64 \pm 0,29$ e $0,10 \pm 0,05$ respectivamente). Não houve diferenças significativas na expressão de p-JNK no córtex renal dos animais de 1 dia do grupo experimental quando comparados aos controles de mesma idade. No entanto, a expressão de p-JNK nos animais de 30 dias de mães submetidas à elevada ingestão de sódio, foi maior tanto nos glomérulos ($1,85 \pm 0,28$) (**Figura 12A**) como no compartimento tubulointersticial ($0,67 \pm 0,09$) (**Figura 12B**) em relação aos controles de mesma idade (glomerular: $0,64 \pm 0,29$ e tubulointersticial: $0,10 \pm 0,05$ respectivamente).

Os estudos de *Western blot* evidenciaram que expressão da MAPK p-p38 estava reduzida no córtex renal dos filhotes de 1 dia do grupo experimental (**Figura 13**) e aumentada no córtex renal dos animais de 30 dias do mesmo grupo (**Figura 14**), quando comparados aos controles de mesma idade.

Foram avaliadas também por *Western blot*, as expressões dos receptores AT 1 e AT 2 de All no córtex renal dos animais. A expressão de receptores AT 1 estava diminuída no córtex renal dos animais de 1 dia (**Figura 15**) do grupo de mães tratadas com solução salina durante a gestação e amamentação, quando comparados aos controles. Esta redução foi também observada no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo experimental quando comparados aos controles (**Figura 16**). No entanto, a expressão de receptores AT 2 estava aumentada no córtex renal dos animais de 1 (**Figura 17**) e 30 dias (**Figura 18**) do grupo experimental quando comparados aos respectivos controles.

O teste de TUNEL (**Figura 19**) realizado para a determinação da apoptose no córtex renal dos animais de 30 dias, mostrou um aumento no número de células TUNEL positivas no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo experimental, quando comparados aos controles de mesma idade (**Figura 20**).

Tabela 1 - Pressão Arterial avaliada por pletismografia (PA) e Volume Urinário de 24 horas (VU) no início e final da gestação, Variação de Peso corporal (ΔP_c) e Volume de Líquidos Ingeridos (VL) pelas mães submetidas à ingestão normal (CONTROLE 1) ou aumentada de sódio (EXPERIMENTAL 1)

	PA (mmHg)		VU (mL/24 h)		ΔP_c (g/dia)	VL (mL/24h)
	início	final	início	final		
CON 1	132,3 \pm 4,05	121,2 \pm 2,50	11,58 \pm 0,91	13,05 \pm 1,70	78,67 \pm 13,52	48,63 \pm 3,61
EXP 1	135,5 \pm 5,21	127,7 \pm 1,96	28,00 \pm 1,77*	30,25 \pm 3,30*	136,4 \pm 13,86*	86,04 \pm 4,51*

Os dados são expressos como Média \pm EPM, * $p < 0,05$ (vs Controle no mesmo período).

Tabela 2 – Concentrações plasmáticas de Na^+ e K^+ (P_{Na^+} e P_{K^+}), consumo (Cons) de ração em 24 horas por animal e osmolalidade ($Posm$) plasmática das ratas grávidas submetidas às dietas com conteúdo normal (CONTROLE 1) ou aumentado de sódio (EXPERIMENTAL 1).

	P_{Na^+} (mEq/L)	P_{K^+} (mEq/L)	Cons. de ração (g)	$Posm$ (mOsm/Kg H_2O)
CON 1	149,30 \pm 4,67	4,23 \pm 0,50	44,50 \pm 7,52	304,30 \pm 1,86
EXP 1	149,70 \pm 1,52	5,58 \pm 0,12	44,40 \pm 5,52	302,30 \pm 1,48

Os dados são expressos como Média \pm EPM.

Tabela 3 – Taxa de filtração glomerular (TFG) e Pressão Arterial avaliada por pletismografia (PA) em mmHg dos animais de 30 dias de ratas grávidas submetidas às dietas com conteúdo normal (CONTROLE 1) ou aumentado de sódio (EXPERIMENTAL 1).

	TFG (mL/min/100g)	PA (mmHg)
CON 1	0,80 ± 0,07	126,20 ± 1,71
EXP 1	0,67 ± 0,05*	137,50 ± 1,89*

Os dados são expressos como Média ± EPM, * p< 0,05 (vs Controle de mesma idade).

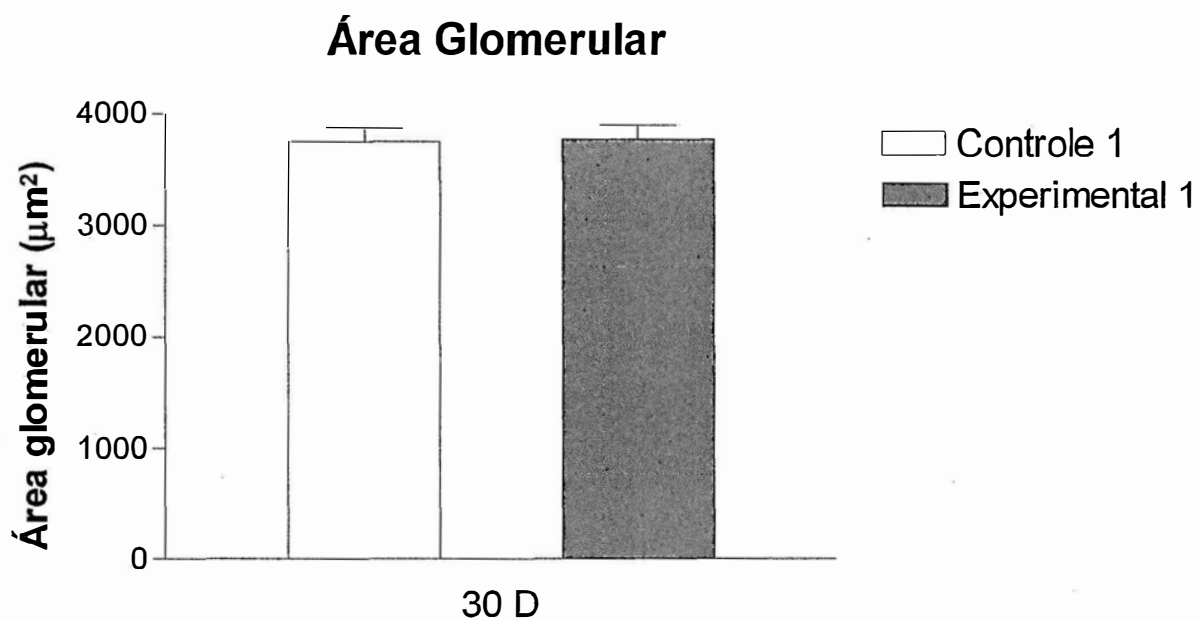
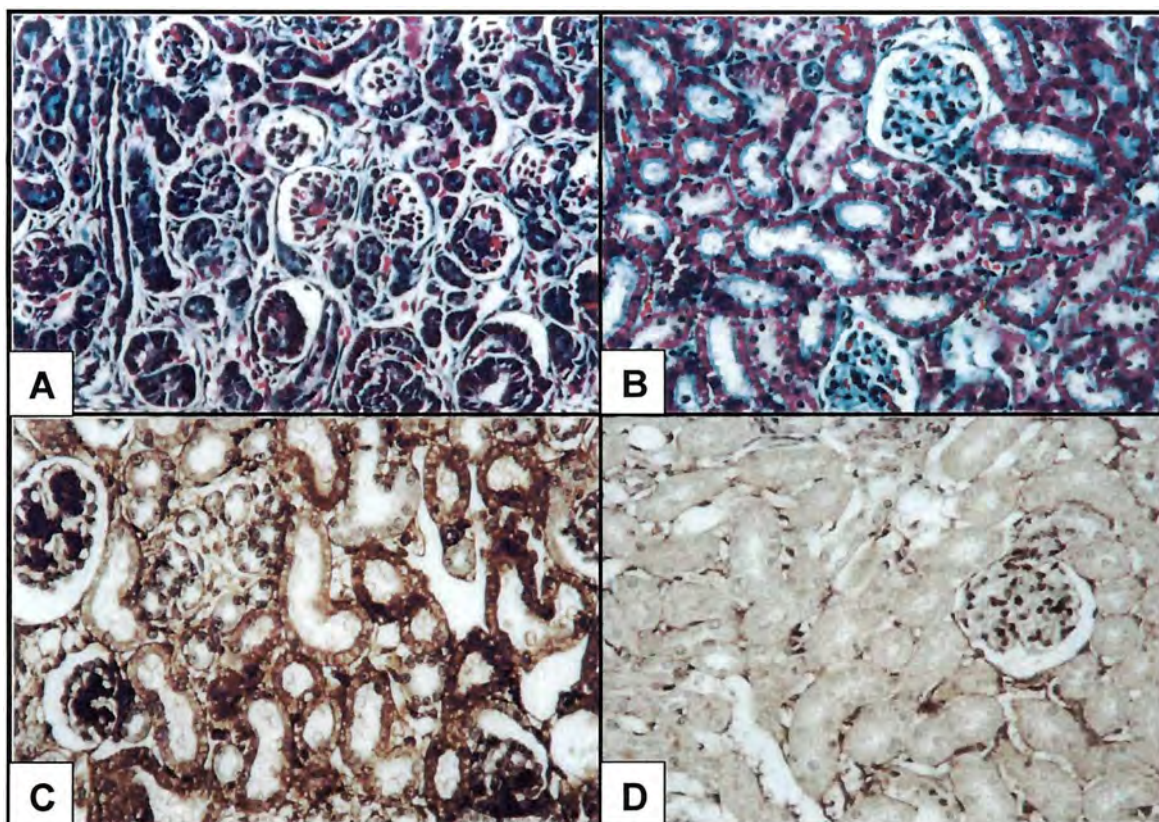


Figura 1 - Área glomerular em μm^2 do córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) e grupo EXPERIMENTAL 1 (NaCl). Os dados são expressos como Média \pm EPM (Teste t com correção de Welch).



Figuras: 2A e 2B Cortes histológicos do córtex renal de ratas de 7 e 30 dias de idade respectivamente, corados com Tricrômico de Masson; **2C e 2D** – Imunolocalização de fibronectina no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias de idade respectivamente, de mães submetidas à ingestão normal de água e sal (grupo CONTROLE 1). Observar em A a presença de glomérulos em diferentes estágios de evolução e em C, que a intensidade da reação para fibronectina é maior nos glomérulos dos animais de 1 dia.

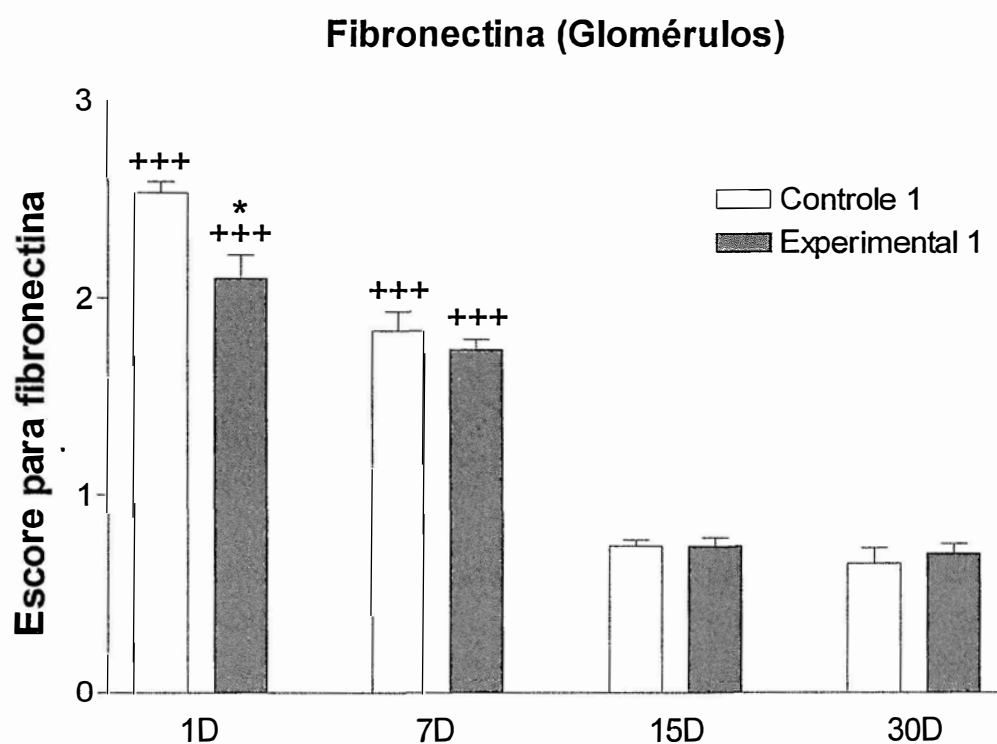
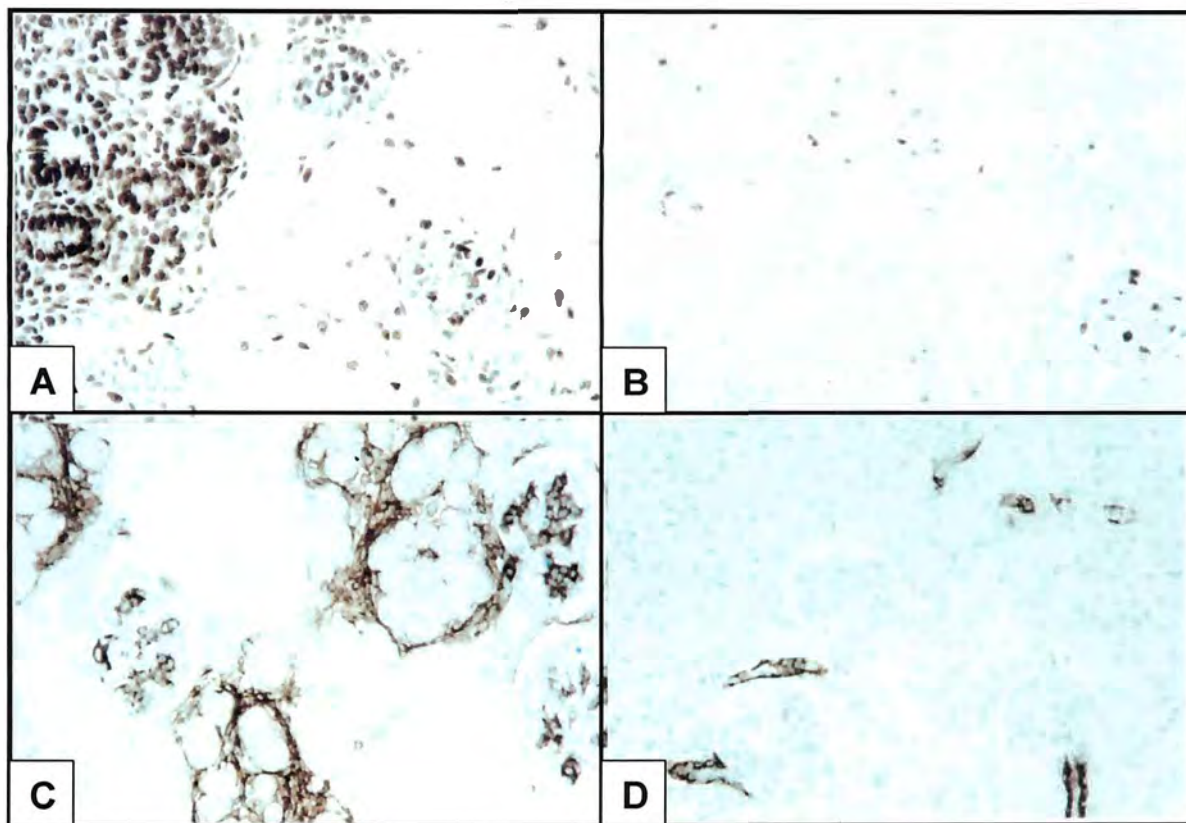


Figura 3 - Escore para fibronectina no compartimento glomerular de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias, dos grupos CONTROLE 1 (água) e grupo EXPERIMENTAL 1 (NaCl). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++ p <0,001 (vs 30D do mesmo grupo); * p <0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).



Figuras: 4A e 4B – Imunorreação para PCNA no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias respectivamente; e **4C e 4D** – Imunorreação para α -SM actina no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias respectivamente, de mães submetidas à ingestão normal de água e sal (grupo CONTROLE 1). Observar em A que o número de células PCNA-positivas é maior nos glomérulos dos animais de 1 dia, e em C, a expressão aumentada de α -SM actina nos compartimentos glomerular e tubulointersticial dos animais de 1 dia.

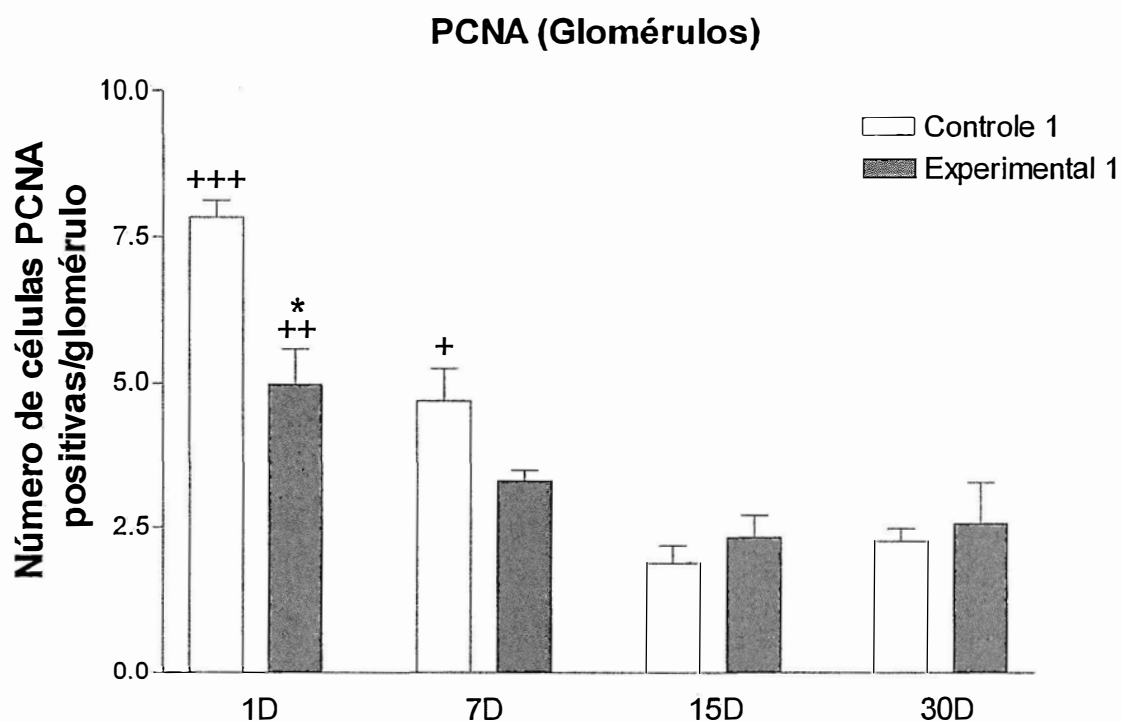


Figura 5 – Número de células PCNA positivas por glomérulo de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++ p <0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++ p <0,01 (vs 30D do mesmo grupo); + p <0,05 (vs 30D do mesmo grupo); * p <0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

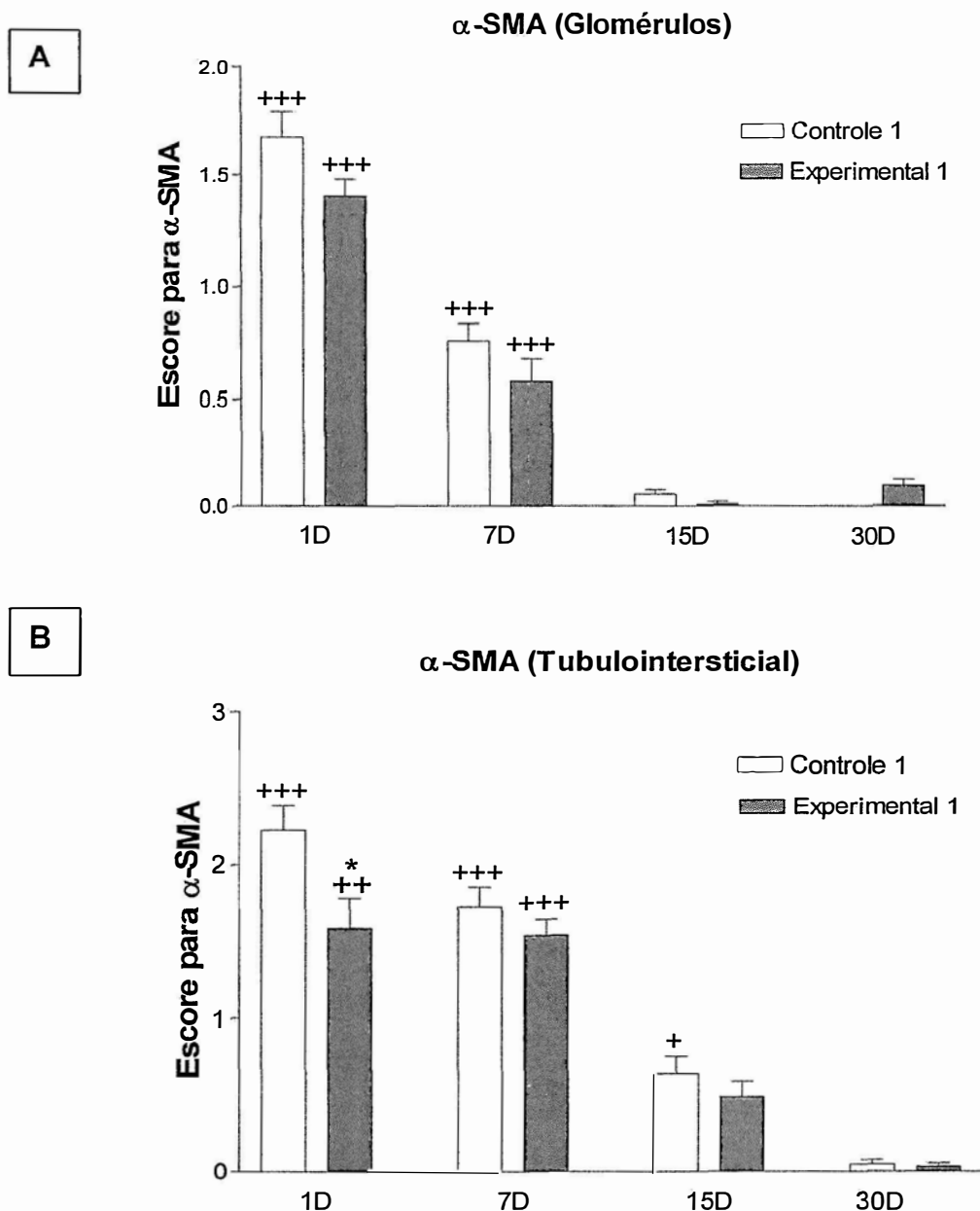
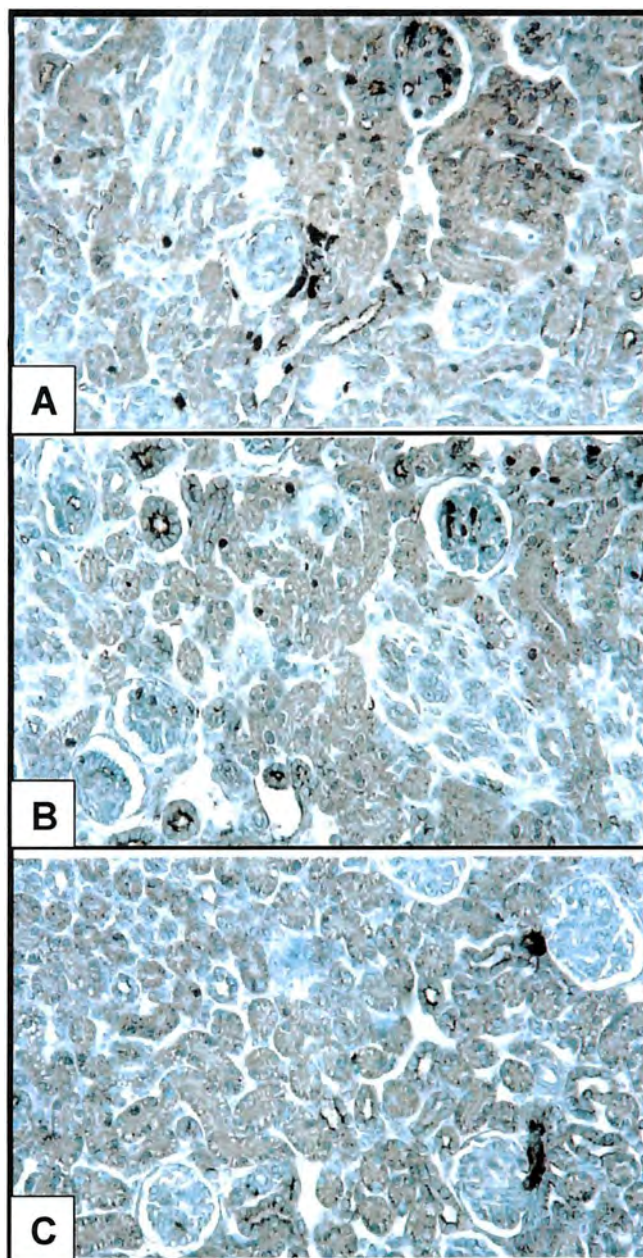


Figura 6 - Escore para α -SMA nos glomérulos (**A**) e por área de $0,245\text{mm}^2$ do compartimento tubulointersticial (**B**) do córtex renal de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++ $p < 0,001$ (vs 30D do mesmo grupo); ++ $p < 0,01$ (vs 30D do mesmo grupo); + $p < 0,05$ (vs 30D do mesmo grupo); * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).



Figuras: 7A, 7B e 7C – Imunorreação para All no córtex renal de ratas de 1, 7 e 30 dias respectivamente, de mães submetidas à ingestão normal de água e sal (grupo CONTROLE 1). Observar que nos animais em fase inicial de desenvolvimento renal pós-natal (1 e 7 dias), o número de células All positivas é maior nos dois compartimentos em relação aos de 30 dias.

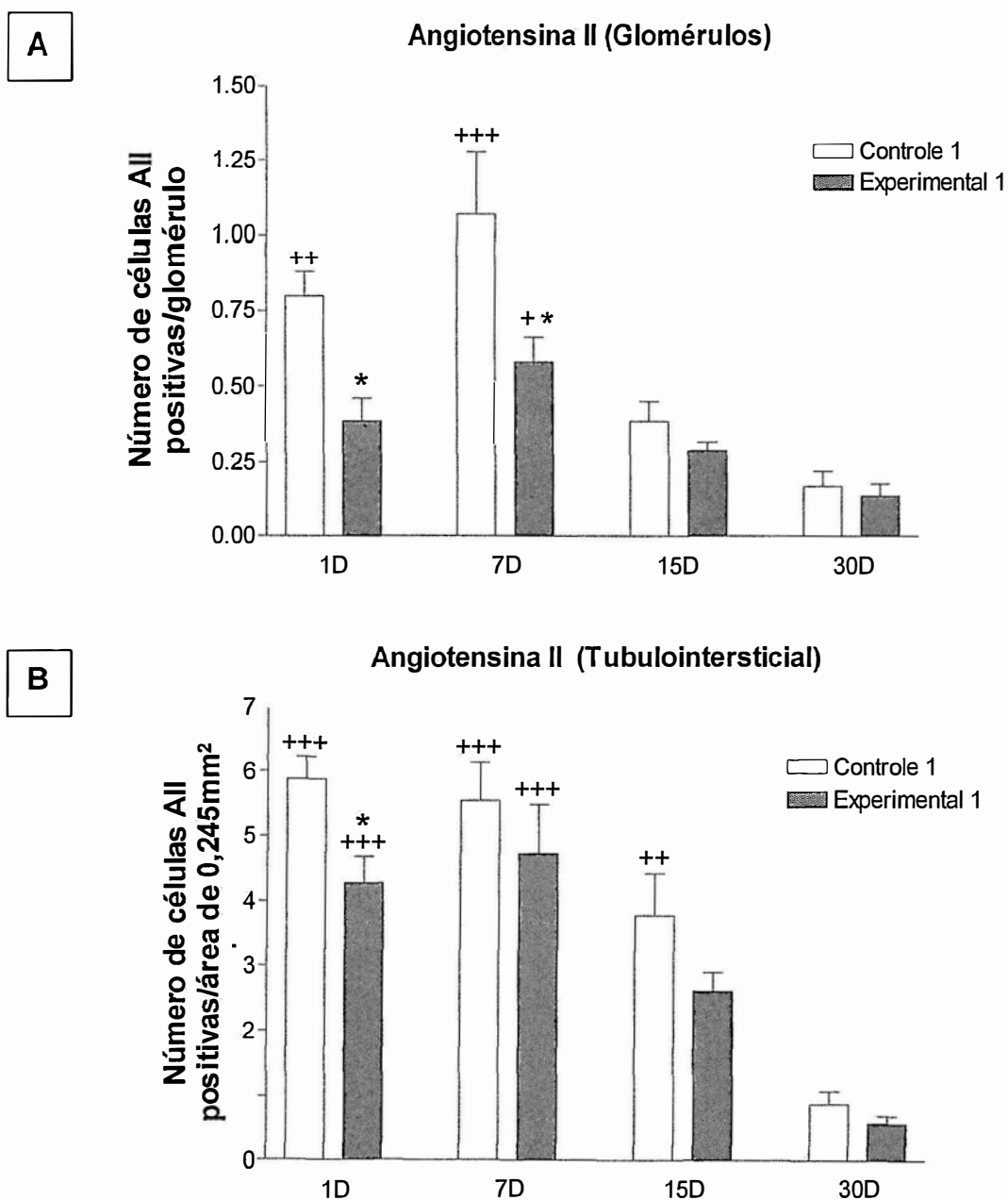


Figura 8 – Número de células All positivas por glomérulo (**A**) e por área de 0,245mm² do compartimento tubulointersticial (**B**) do córtex renal de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl). Os dados são expressos como Média ± EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++p<0,01 (vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey)

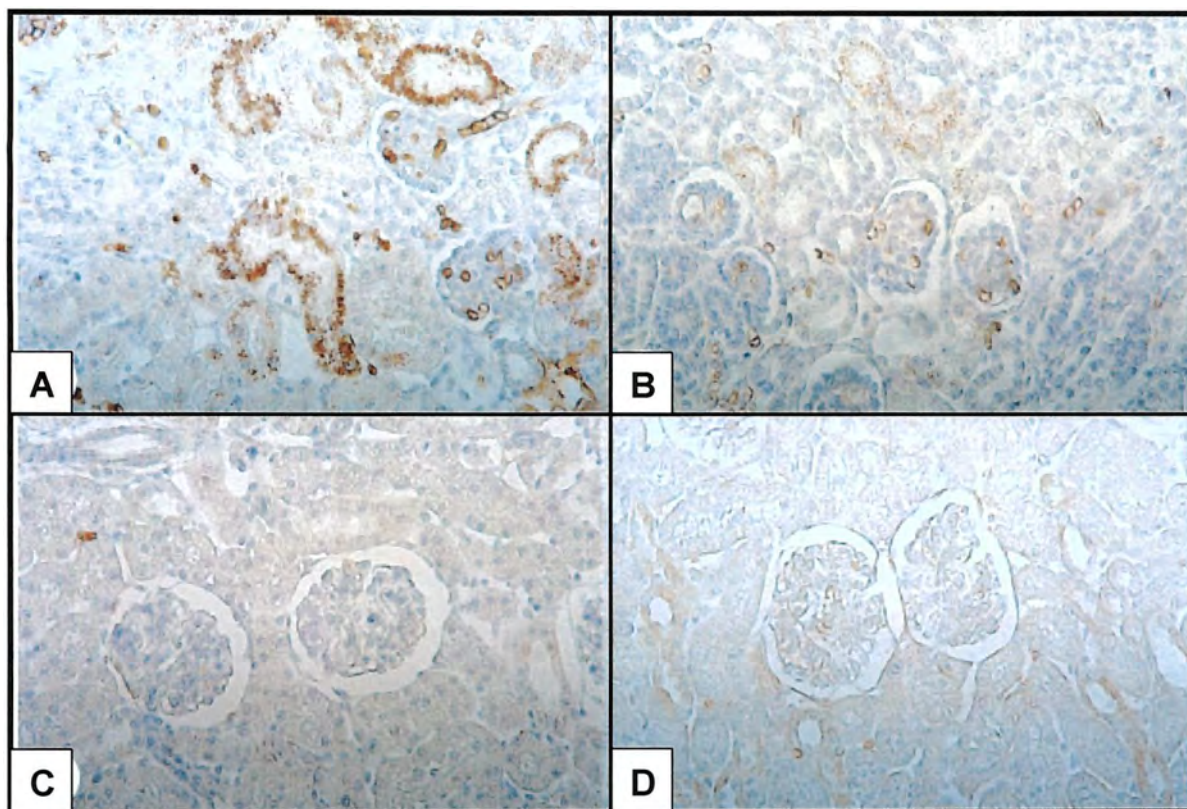


Figura 9 - Imunorreação para p-ERK no córtex renal de ratas de 1 dia de idade dos grupos CONTROLE 1 (água) (A) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (B) e de ratas de 30 dias de idade dos grupos CONTROLE 1 (água) (C) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (D), respectivamente. Observar que a reação é mais intensa em A do que em B.

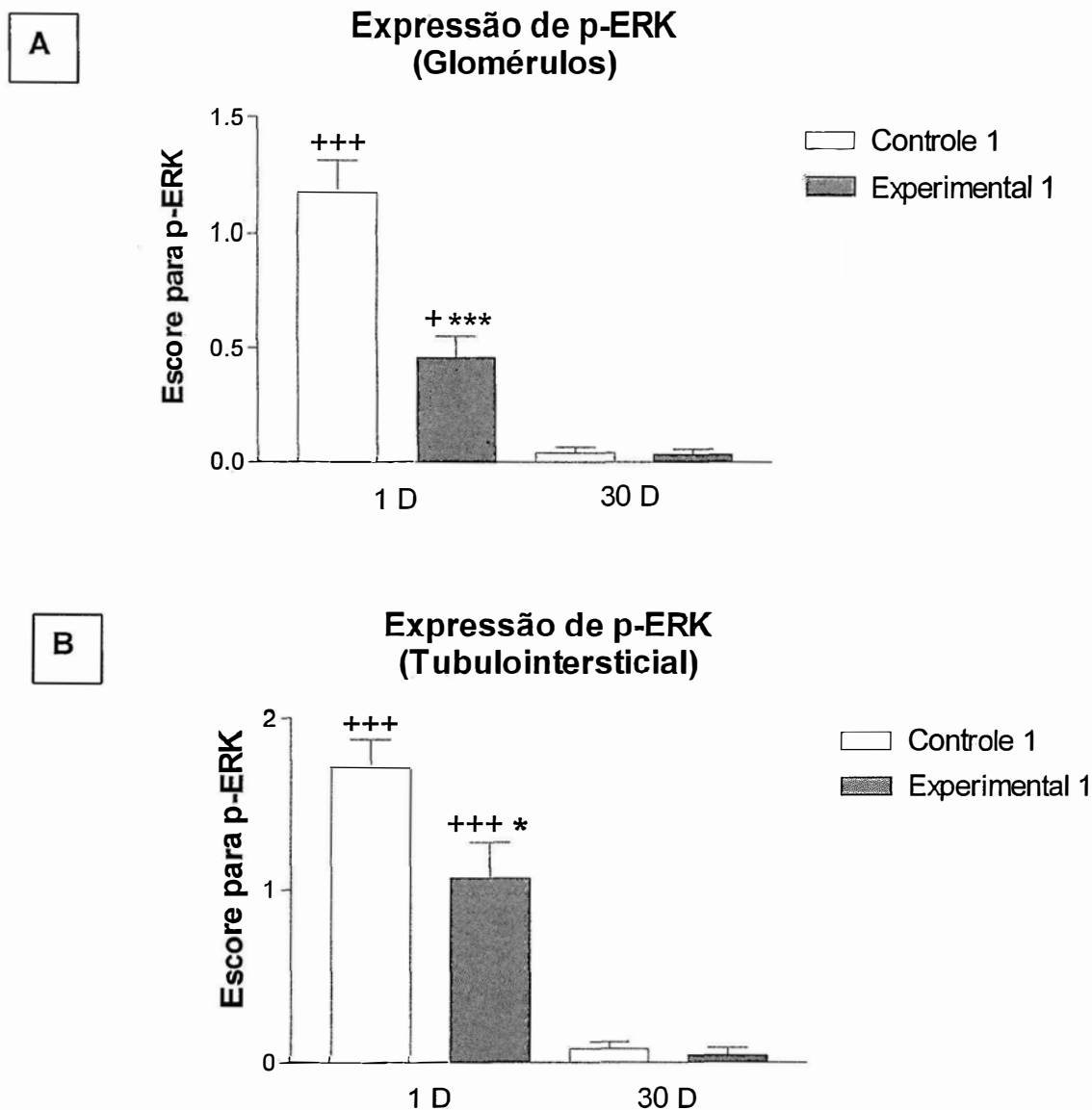


Figura 10 - Escore para p-ERK nos glomérulos (A) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (B) do córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++p<0,001 (vs 30 D do mesmo grupo), +p<0,05 (vs 30 D do mesmo grupo), ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

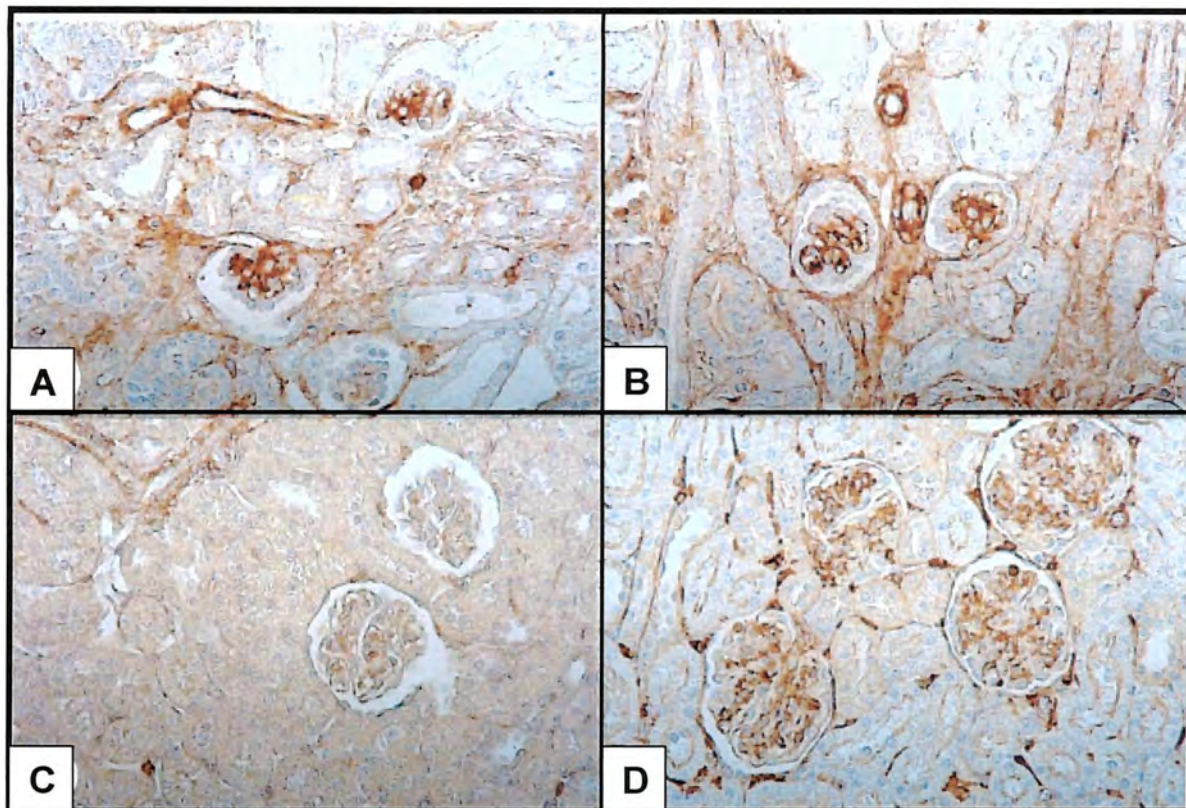


Figura 11 - Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas de 1 dia de idade dos grupos CONTROLE 1 (água) (A) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (B) e de ratas de 30 dias de idade dos grupos CONTROLE 1 (C) e EXPERIMENTAL 1 (D), respectivamente. Observar que a reação é mais intensa em D do que em C.

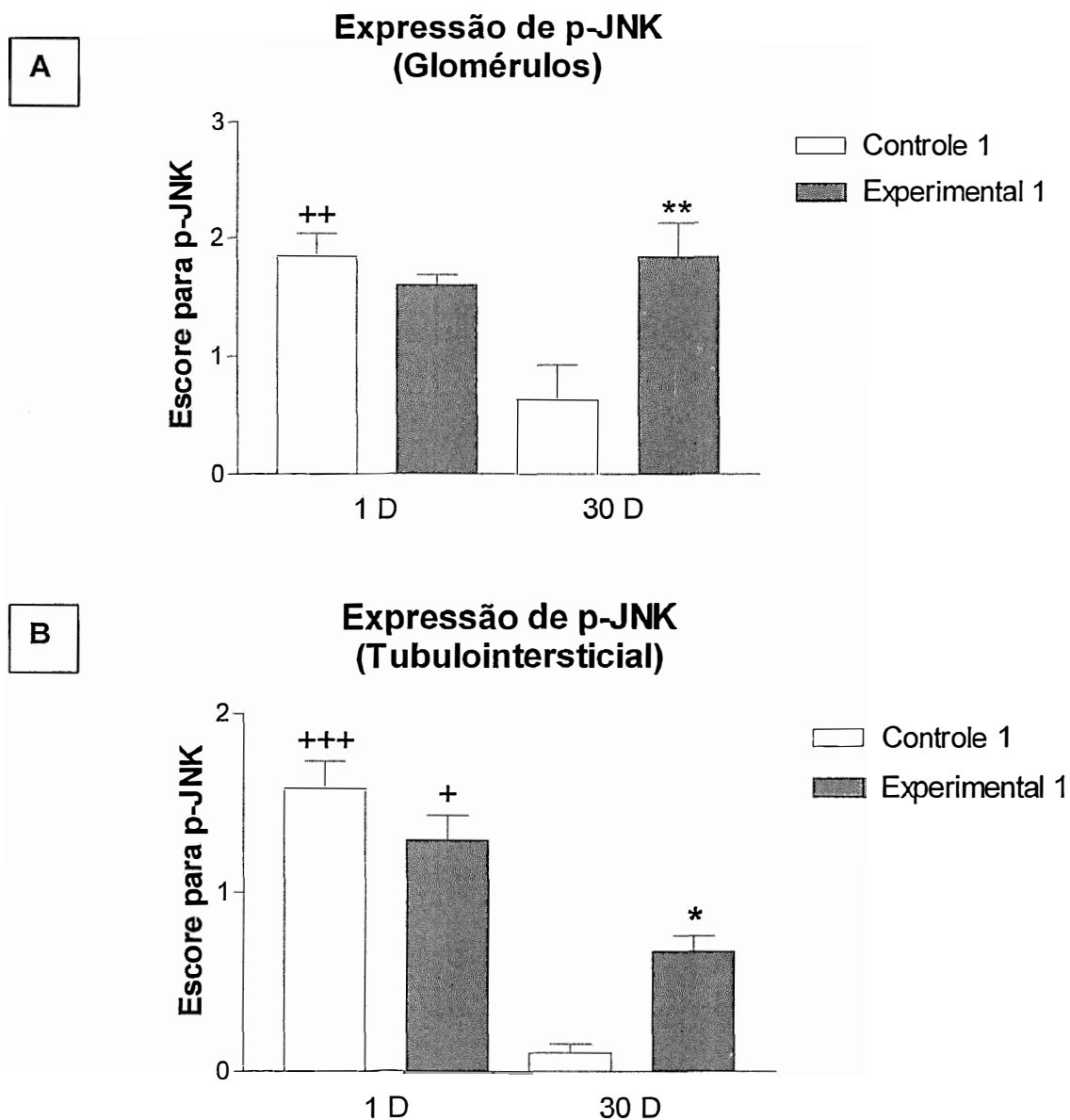


Figura 12 - Escore para p-JNK nos glomérulos (A) e por área de 0,245mm² do compartimento tubulointersticial (B) do córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++p<0,001 (vs 30 D do mesmo grupo), ++p<0,01 (vs 30 D do mesmo grupo), +p<0,05 (vs 30 D do mesmo grupo), **p<0,01 (vs Controle de mesma idade); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

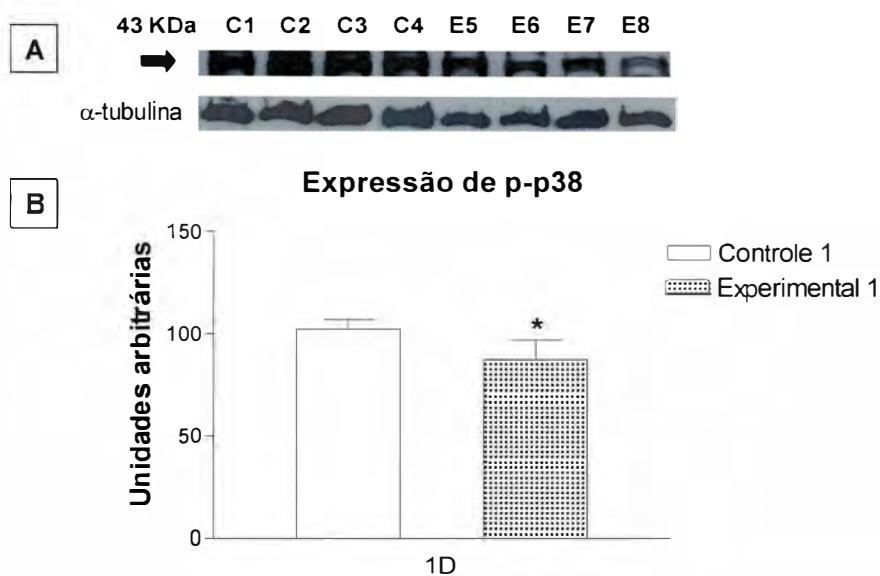


Figura 13- Expressão da MAPK p-p38 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 1 dia dos grupos CONTROLE 1 (água) (bandas 1 a 4) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (bandas 5 a 8). **(A)** A análise da densidade das bandas de 43 KDa mostrou uma significativa redução na expressão da MAPK p-p38 no córtex renal dos animais de 1 dia do grupo EXPERIMENTAL 1. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

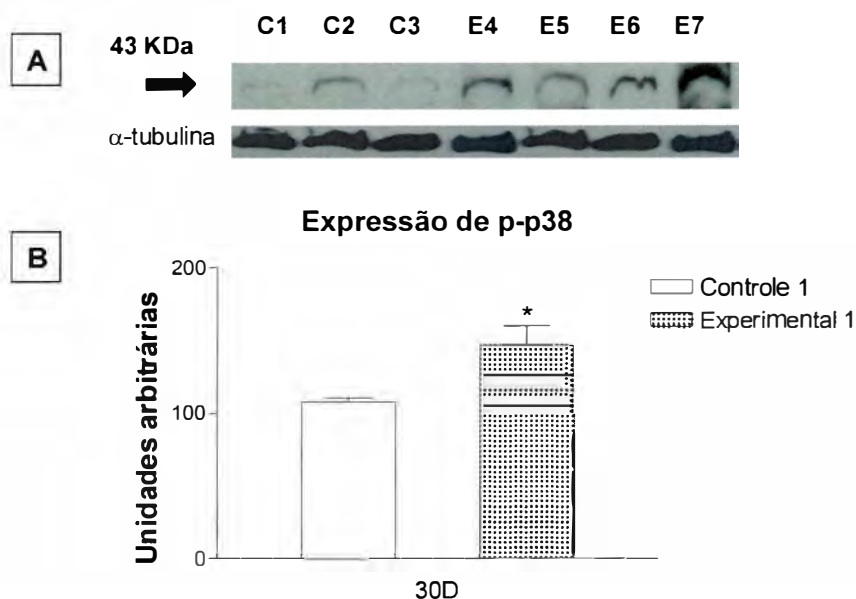


Figura 14 - Expressão da MAPK p-p38 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) (bandas 1 a 3) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (bandas 4 a 7). **(A)** A análise da densidade das bandas de 43 KDa mostrou um significativo aumento na expressão da MAPK p-p38 no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo EXPERIMENTAL 1. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

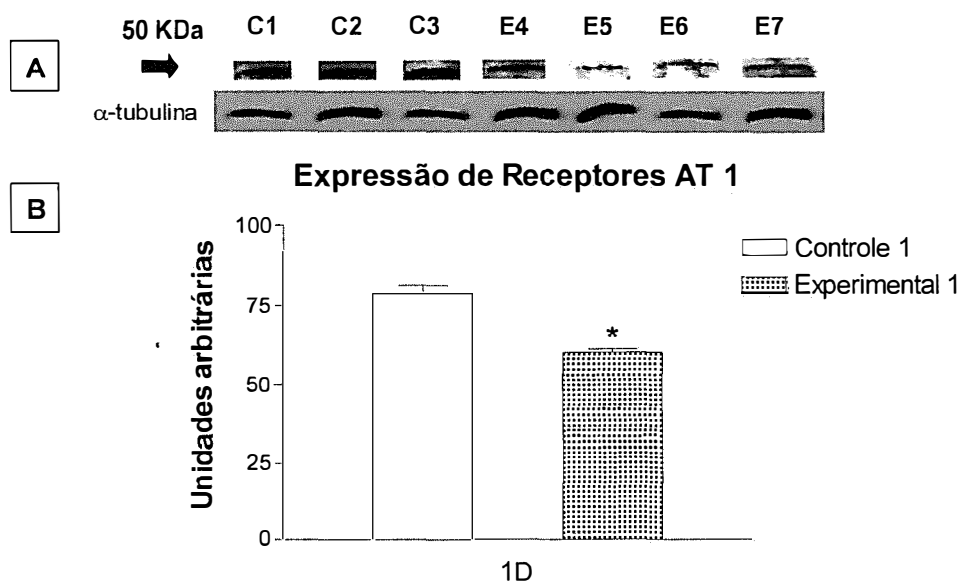


Figura 15 – Expressão de receptores AT 1 avaliada por *Western blot* no córtex renal dos animais de 1 dia dos grupos CONTROLE 1 (água) (bandas 1 a 3) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (bandas 4 a 7). **(A)** A análise de densidade das bandas de 50KDa mostrou uma significativa redução nos níveis de AT 1 no córtex renal dos animais do grupo EXPERIMENTAL 1. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs. Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

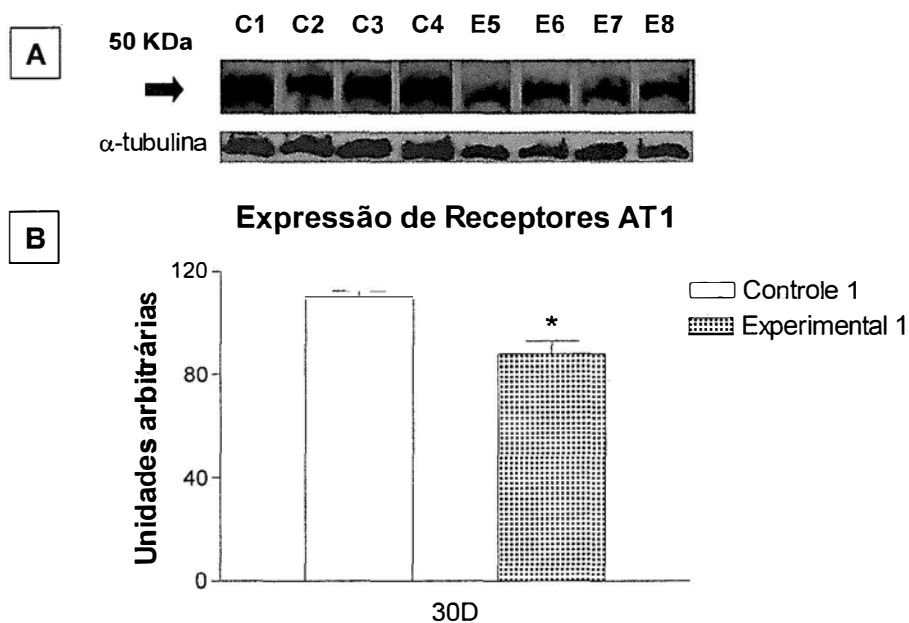


Figura 16 - Expressão de receptores AT 1 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) (bandas 1 a 4) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (bandas 5 a 8). **(A)** A análise da densidade das bandas de 50 KDa mostrou uma significativa redução na expressão de receptores AT 1 no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo EXPERIMENTAL 1. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

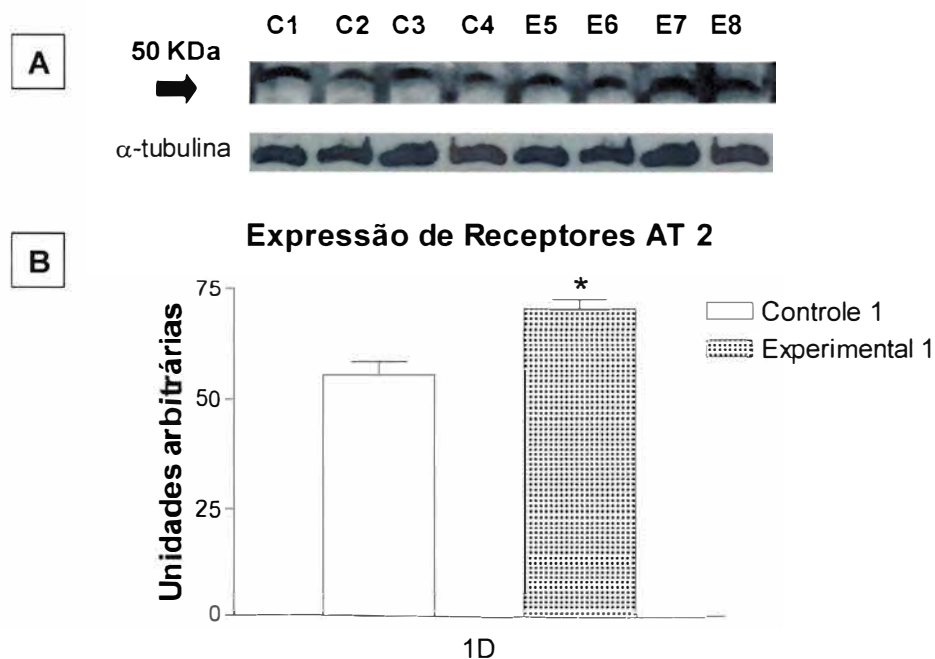


Figura 17 - Expressão de receptores AT 2 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 1 dia dos grupos CONTROLE 1 (água) (bandas 1 a 4) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (bandas 5 a 8). **(A)** A análise da densidade das bandas de 50 KDa mostrou um significativo aumento na expressão de receptores AT 2 no córtex renal dos animais de 1 dia do grupo EXPERIMENTAL 1. **(B)** Os dados são expressos como Média ± EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

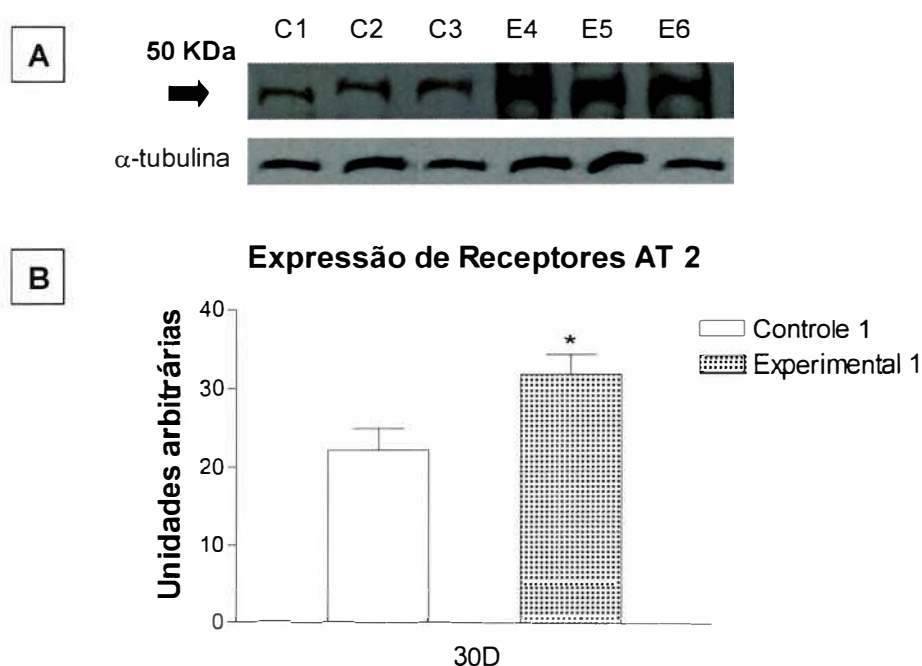


Figura 18 - Expressão de receptores AT 2 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) (bandas 1 a 3) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (bandas 4 a 6). **(A)** A análise da densidade das bandas de 50 KDa mostrou um significativo aumento na expressão de receptores AT 2 no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo EXPERIMENTAL 1. **(B)** Os dados são expressos como Média ± EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

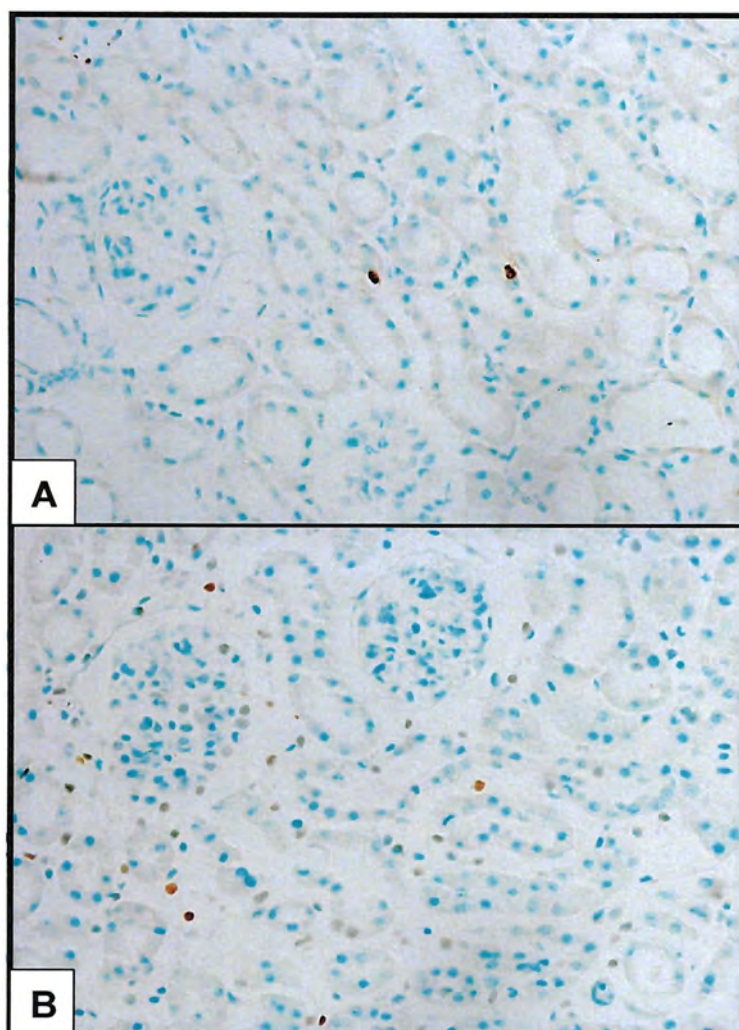


Figura 19 - Detecção de células TUNEL positivas no córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) (A) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl) (B). Observar em B que o número de células TUNEL positivas no córtex renal é maior nos animais do grupo EXPERIMENTAL 1 quando comparados aos controles de mesma idade.

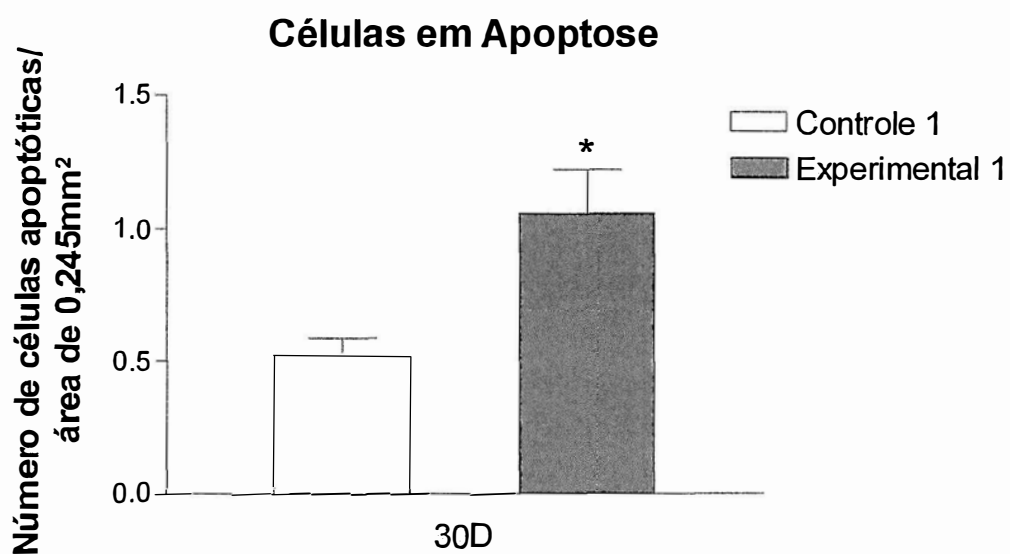


Figura 20 - Número de células TUNEL positivas por área de 0,245mm² do compartimento tubulointerstitial do córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos CONTROLE 1 (água) e EXPERIMENTAL 1 (NaCl). Os dados são expressos como Média \pm EPM; *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

Estudo 2 - Influência da exposição ao Losartan durante a gestação e amamentação no desenvolvimento renal pós-natal dos filhotes.

Ingestão de Líquidos e Consumo Diário de Ração

A ingestão de líquido em 24 horas (**Tabela 4**) e o consumo diário de ração (**Tabela 4**) foram avaliados nas ratas dos grupos controle e experimental durante a gestação. Não houve diferenças estatísticas tanto na ingestão de líquidos entre os grupos controle ($63,58 \text{ mL} \pm 4,54$) e experimental ($73,53 \text{ mL} \pm 3,05$), como no consumo diário de ração (C2: $30,48 \text{ g} \pm 1,77$ e E2: $29,63 \text{ g} \pm 1,09$).

Análise Histológica e Morfométrica

A análise histológica (**Figura 21**) mostrou várias alterações como expansão do compartimento tubulointersticial, achatamento das células tubulares com dilatação e atrofia tubular, perda da borda em escova e infiltrado inflamatório, no córtex renal dos animais de 15 (**Figura 21 B**) e 30 (**Figura 21 D**) dias de mães tratadas com losartan durante a gestação e amamentação. A análise morfométrica (**Figura 22**) mostrou uma redução significativa da área do tufo glomerular nos animais de 30 dias do grupo experimental ($2128,20 \mu\text{m}^2 \pm 105,4$) (**Figura 22A**) e um aumento da área intersticial relativa ($12,55 \% \pm 1,08$) (**Figura 22B**) do córtex renal desses animais quando comparados aos controles ($3758,09 \mu\text{m}^2 \pm 188,90$; $2,49 \% \pm 0,42$, respectivamente). Os animais de 30 dias do grupo experimental apresentaram menor número de glomérulos ($3,25 \pm 0,13$) quando comparados aos respectivos controles ($4,49 \pm 0,28$).

Estudos Imunohistoquímicos

A expressão de α -SMA (**Figura 23**) reduziu durante o processo de desenvolvimento renal pós-natal nos glomérulos e no compartimento tubulointersticial tanto nos animais do grupo controle como nos do grupo experimental. Contudo, a expressão de α -SMA estava aumentada no compartimento tubulointersticial (**Tabela 6, Figura 24B**) do córtex renal dos animais de 15 ($1,37 \pm 0,15$) e 30 ($1,09 \pm 0,11$) dias do grupo experimental quando

comparados aos controles ($0,64 \pm 0,10$; $0,06 \pm 0,05$, respectivamente) de mesma idade. Não houve diferenças significativas na expressão de α -SMA glomerular entre os animais dos grupos controle e experimental (**Figura 24A**) nos diferentes períodos analisados.

A expressão de fibronectina (**Figuras 25**) estava reduzida no córtex renal dos animais de ambos os grupos durante o desenvolvimento renal pós-natal, contudo a expressão dessa proteína foi mais intensa nos glomérulos (**Tabela 5, Figura 26A**) dos animais de 15 ($1,68 \pm 0,14$) e 30 ($0,94 \pm 0,09$) dias do grupo experimental quando comparados aos controles ($0,99 \pm 0,09$; $0,26 \pm 0,02$) de mesma idade. A expressão de fibronectina foi maior também no compartimento tubulointersticial (**Tabela 6, Figura 26B**) dos animais de 30 dias do grupo experimental ($1,28 \pm 0,09$) quando comparados aos controles ($0,32 \pm 0,04$).

Os nossos resultados mostram que o número de células PCNA positivas (**Figura 27**) reduziu durante o processo de desenvolvimento no córtex renal dos animais de ambos os grupos, contudo o número de células PCNA positivas nos glomérulos (**Tabela 5, Figura 28A**) dos animais de 15 ($4,40 \pm 0,19$) e 30 ($4,40 \pm 0,72$) dias do grupo experimental foi maior que o observado nos controles ($3,06 \pm 0,27$; $1,74 \pm 0,22$, respectivamente) de mesma idade. O número de células PCNA positivas foi maior no compartimento tubulointersticial (**Tabela 6, Figura 28B**) dos animais de 30 ($23,90 \pm 3,10$) dias de mães submetidas ao tratamento com losartan quando comparados aos animais controles ($7,87 \pm 0,46$).

O número de células All positivas (**Figura 29**) estava elevado no córtex renal no início do desenvolvimento. No grupo tratado com losartan, o número de células All positivas (**Tabela 6, Figura 30B**) foi significativamente menor no compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais de 7 ($1,75 \pm 0,19$) e 15 ($1,34 \pm 0,09$) dias quando comparados aos controles ($3,38 \pm 0,22$; $3,07 \pm 0,26$, respectivamente) de mesma idade. Não houve diferenças entre os dois grupos quando considerado o número de células All positivas nos glomérulos dos animais nas diferentes idades (**Tabela 5, Figura 30A**).

A expressão da MAP quinase p-ERK foi maior nos compartimentos glomerular e tubulointersticial (**Figura 31**) do córtex renal dos animais controles no início do desenvolvimento renal pós-natal. Nos animais de 30 dias de mães tratadas com losartan, a expressão de p-ERK foi maior nos glomérulos ($0,47 \pm 0,06$) (**Tabela 7, Figura 32A**) e compartimento tubulointersticial ($0,51 \pm 0,06$) (**Tabela 7, Figura 32B**), quando comparados aos controles ($0,11 \pm 0,06$; $0,27 \pm 0,03$, respectivamente).

A expressão da MAP quinase p-JNK (**Figura 33**) se manteve elevada nos compartimentos glomerular e tubulointersticial no córtex renal dos animais do grupo controle, durante o período analisado. Entre os grupos controle e experimental, não houve diferenças significativas na expressão de p-JNK glomerular (**Tabela 7, Figura 34A**). No entanto, a expressão desta MAP quinase foi maior no compartimento tubulointersticial (**Tabela 7, Figura 34B**) dos animais de 30 ($2,29 \pm 0,04$) dias de mães tratadas com losartan quando comparados aos controles ($1,20 \pm 0,14$).

A avaliação da expressão da MAP quinase p-p38 por *Western blot* mostrou que foi maior no córtex renal dos animais de 1 (**Figura 35**) e 30 (**Figura 36**) dias de mães submetidas ao tratamento com losartan quando comparados aos controles de mesma idade. Enquanto que, a expressão de receptores AT 1 diminuiu no córtex renal dos animais de 1 (**Figura 37**) e 30 (**Figura 38**) dias do grupo experimental quando comparados aos controles de mesma idade, e a expressão de AT 2 foi maior no córtex renal tanto dos animais de 1 (**Figura 39**) como de 30 (**Figura 40**) dias do mesmo grupo.

A avaliação do número de células apoptóticas pela técnica do TUNEL (**Figura 41**), evidenciou um maior número dessas células no córtex renal dos animais de 15 dias (**Figura 42**) do grupo experimental quando comparados aos controles de mesma idade.

Os dados de albuminúria mostram que os animais de 30 dias do grupo experimental apresentaram maior excreção urinária de albumina quando comparados aos controles de mesma idade (**Tabela 8**).

Tabela 4 – Volume de Líquido Ingerido em 24 horas e Consumo Diário de Ração pelas ratas dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) durante o período da gestação.

	Vol. Líq. Ingerido (mL)	Cons. de ração (g)
Controle 2	63,58 ± 4,54	30,48 ± 1,77
Experimental 2	73,53 ± 3,05	29,63 ± 1,09

Os dados são expressos como Média ± EPM.

Tabela 5 – Escore para α - SMA e fibronectina e número de células PCNA e All positivas por glomérulo nos animais de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%).

Idade (dias)	α - SMA	Fibronectina	Céls. PCNA +	Céls. All +
Controle 2				
1	1,14±0,16+++	1,86±0,18+++	8,40±0,41+++	1,40±0,18+++
7	0,78±0,10+++	1,80±0,09+++	6,23±0,47+++	0,31±0,05
15	0,07±0,02+++	0,99±0,09++	3,07±0,27	0,34±0,07
30	0,02±0,02	0,27±0,02	1,74±0,22	0,45±0,03
Experimental 2				
1	1,56±0,16+++	1,98±0,12+++	8,81±0,20+++	1,26±0,13+++
7	0,71±0,08	1,40±0,10	5,65±0,17	0,28±0,03
15	0,04±0,01	1,69±0,14+++**	4,40±0,19*	0,26±0,04
30	0,07±0,01	0,94±0,09**	4,40±0,72***	0,18±0,008

Os dados são expressos como Média ± EPM. +++ p < 0,001 (vs 30D do mesmo grupo); **p < 0,01 (vs Controle de mesma idade); *p < 0,05 (vs Controle de mesma idade); ***p < 0,001 (vs Controle de mesma idade).

Tabela 6 – Escore para α - SMA e número de células All positivas por área de 0,245mm² do compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais de 1, 7, 15 e 30 dias e escore para fibronectina e número de células PCNA positivas por área de 0,245 mm² do córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%).

	α -SMA		Céls.All+	
Idade	Controle	Experimental	Controle	Experimental
1D	1,72±0,09+++	1,40±0,09	12,59±0,81+++	14,19±0,64+++
7D	1,86±0,16+++	2,09±0,11+++	3,38±0,22++	1,76±0,19*
15D	0,64±0,11+	1,37±0,15**	3,07±0,26+	1,34±0,09*
30D	0,06±0,06	1,09±0,11***	0,88±0,09	0,29±0,03
	Fibronectina		Céls. PCNA+	
Idade	Controle	Experimental	Controle	Experimental
30D	0,33±0,04	1,28±0,09***	7,87±0,46	23,90±3,11***

Os dados são expressos como Média \pm EPM. +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++p<0,01 (vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); **p<0,01 (vs Controle de mesma idade), *p<0,05 (vs Controle de mesma idade).

Tabela 7 - Escore para p-ERK e p-JNK nos compartimentos glomerular e tubulointersticial do córtex renal dos animais de 1 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%).

Idade	p-ERK Glomérulos		p-ERK Tubulointersticial	
	Controle	Experimental	Controle	Experimental
1D	0,41±0,06++	0,24±0,05+	0,83±0,07+++	0,97±0,09+++
30D	0,11±0,06	0,47±0,06**	0,27±0,03	0,51±0,06*
Idade	p-JNK Glomérulos		p-JNK Tubulointersticial	
	Controle	Experimental	Controle	Experimental
1D	2,65±0,08	2,61±0,09	2,43±0,10+++	2,75±0,10+
30D	2,17±0,04	2,20±0,21	1,20±0,14	2,29±0,04***

Os dados são expressos como Média ± EPM. +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++p<0,01 (vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade), **p<0,01 (vs Controle de mesma idade), *p<0,05 (vs Controle de mesma idade).

Tabela 8 - Dados da albuminúria (mg/24h) dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%).

	Controle 2	Experimental 2
Albuminúria (mg/24h)	0,44 (0,36;0,82)	90,36 (74,81;155,30)**

Os dados de albuminúria são expressos como Mediana e percentil 25 e 75%. **p<0,01 (vs Controle de mesma idade).

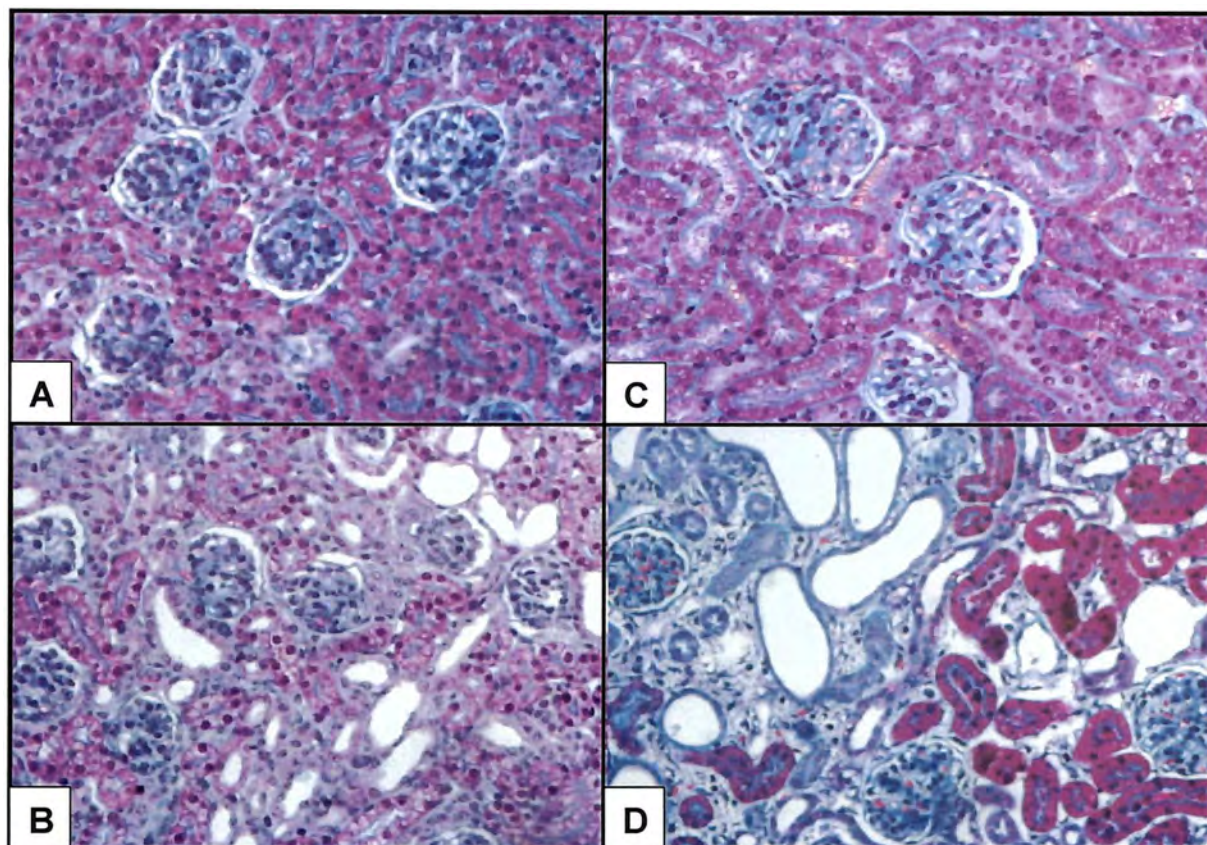


Figura 21 – Cortes histológicos do córtex renal de ratas de 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (A e C, respectivamente) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (B e D, respectivamente). Observar em D alargamento do compartimento tubulointersticial, dilatação e atrofia tubular e presença de infiltrado inflamatório.

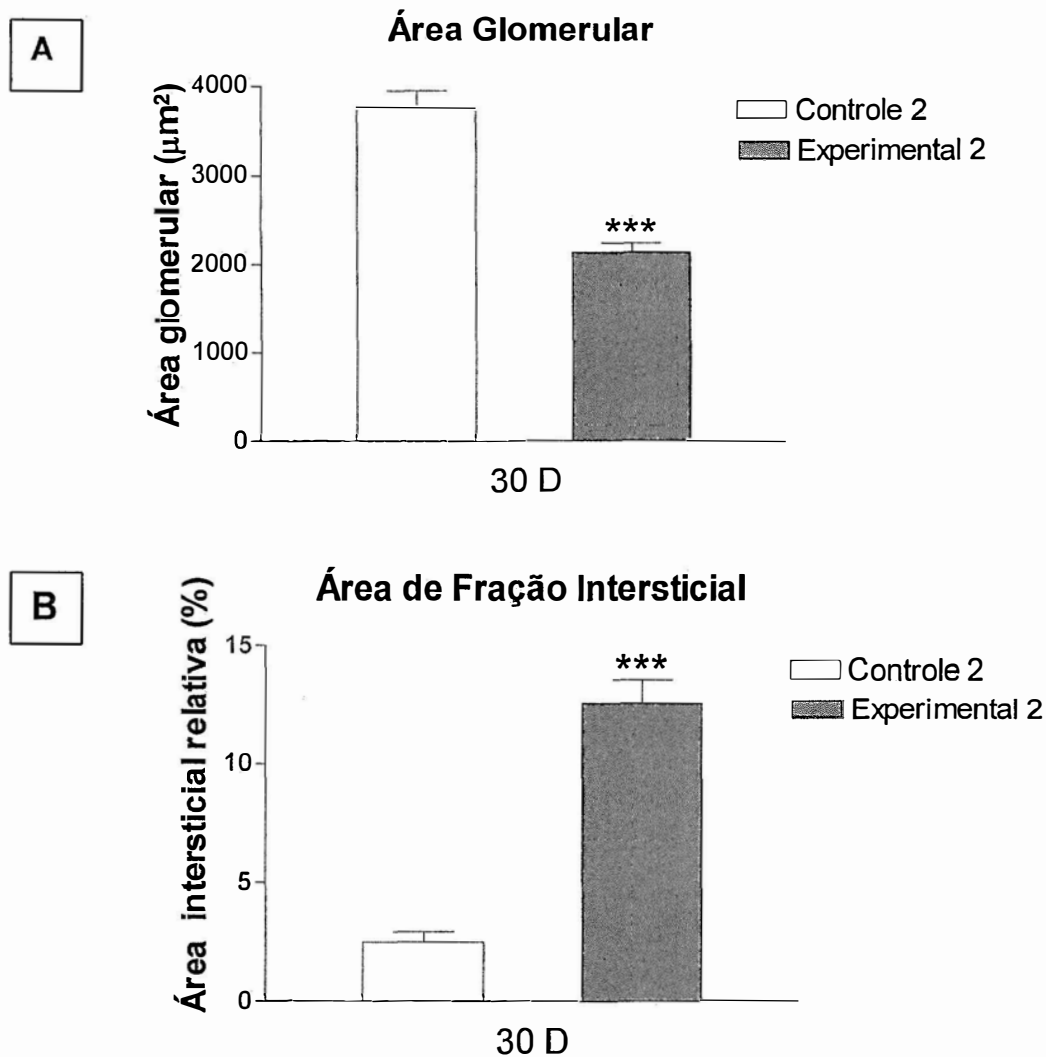


Figura 22 - Área glomerular em μm^2 (A) e área intersticial relativa (%) (B) do córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (vs. Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

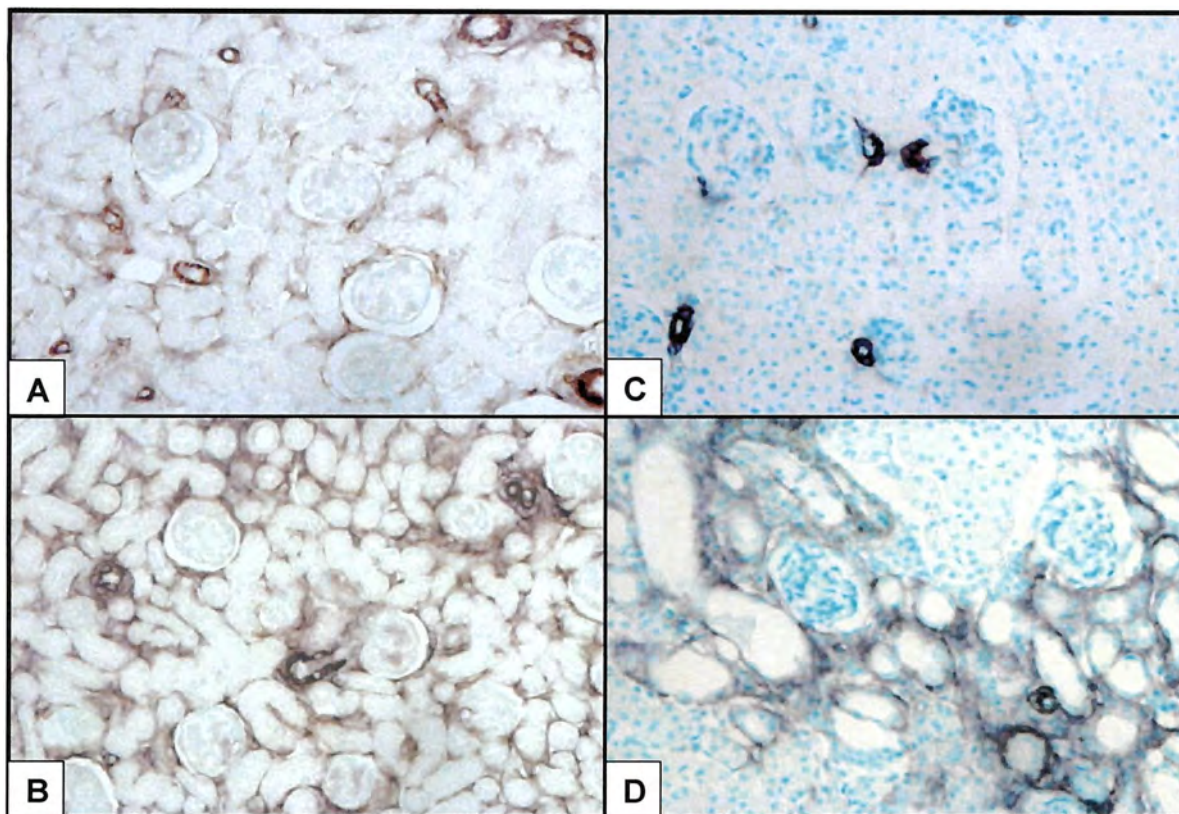


Figura 23 – Imunorreação para α -SMA no córtex renal de ratas de 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (**A e C**, respectivamente) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (**B e D**, respectivamente). Observar em B e D que a expressão de α -SM actina é maior no compartimento tubulointerstitial do córtex renal dos animais do grupo EXPERIMENTAL 2 quando comparados aos controles.

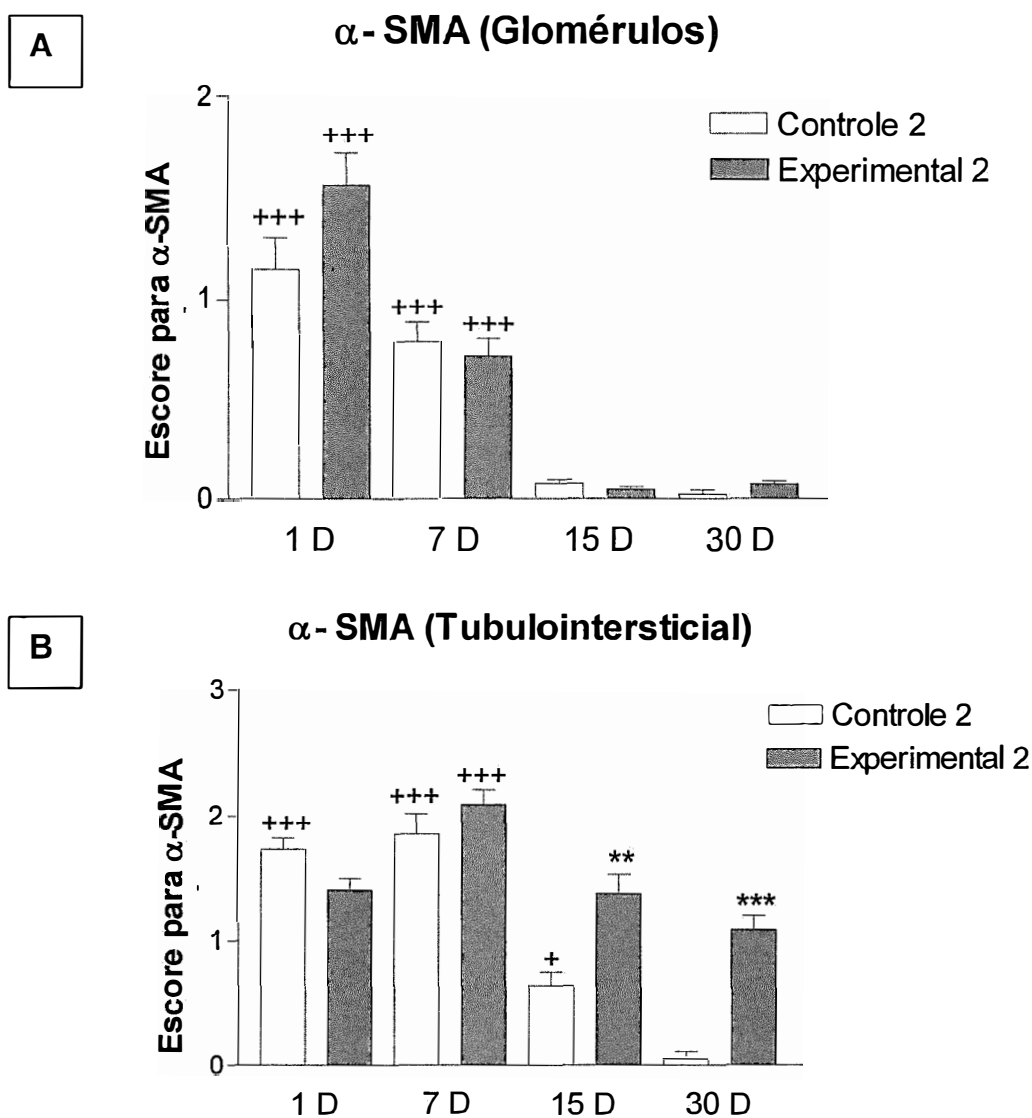


Figura 24 – Escore para α -SMA nos glomérulos (A) e por área de 0,245mm² do compartimento tubulointersticial (B) do córtex renal de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); **p<0,01 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

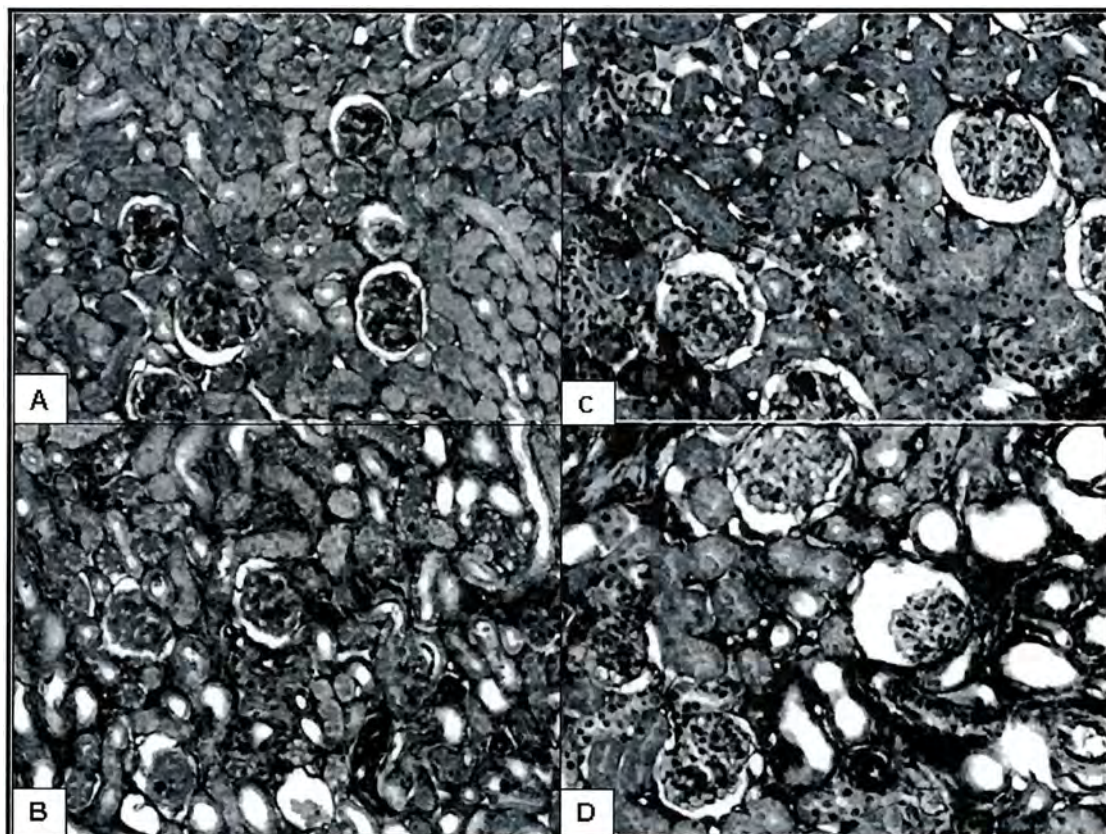


Figura 25 - Imunorreação para fibronectina no córtex renal de ratas de 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (**A e C**, respectivamente) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (**B e D**, respectivamente). Observar em D que a expressão de fibronectina no compartimento tubulointersticial dos animais do grupo EXPERIMENTAL 2 é maior que em C, quando comparados aos controles.

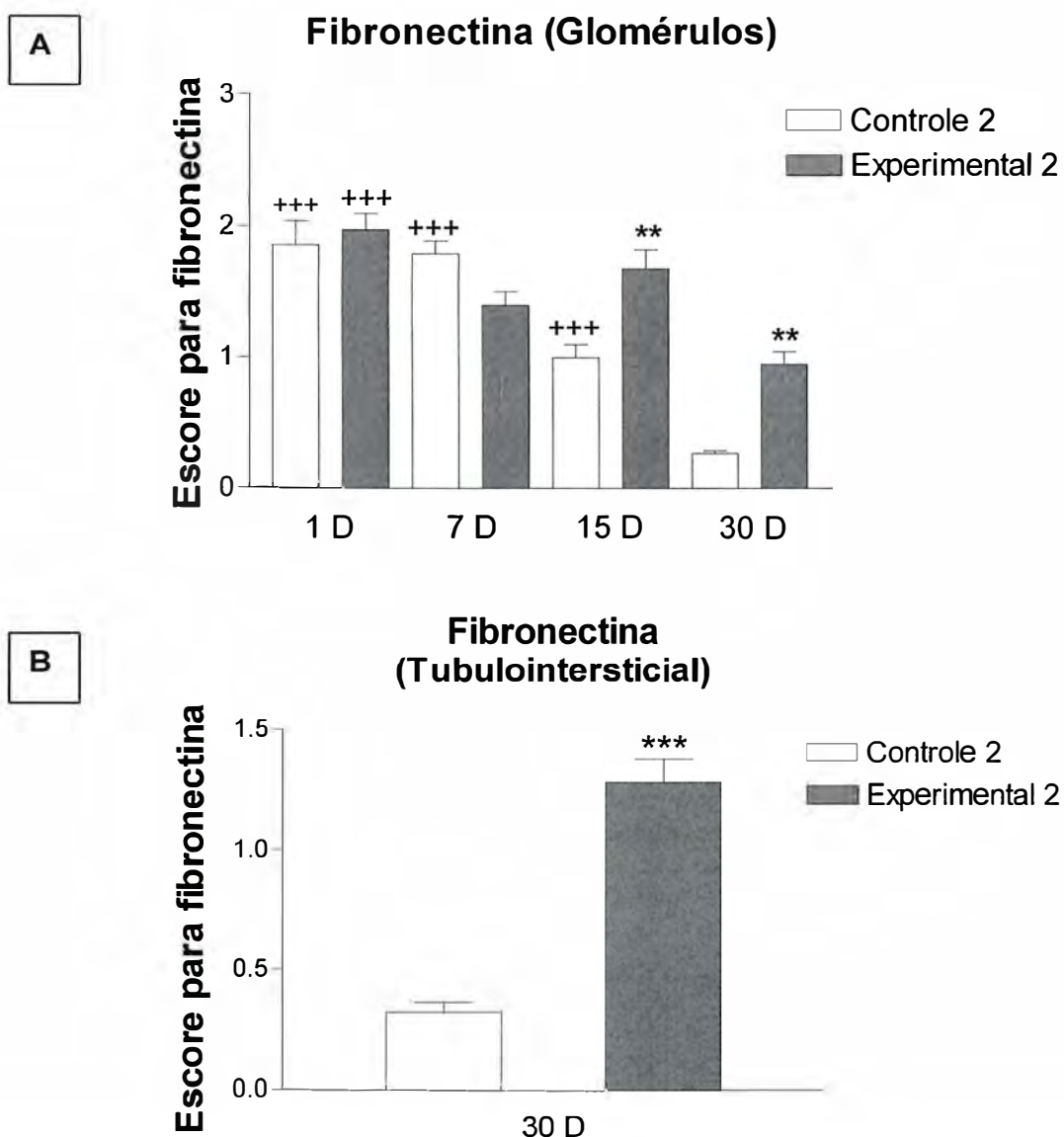


Figura 26 - Escore para fibronectina nos glomérulos (**A**) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (**B**) do córtex renal de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); **p<0,01 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey e Teste t com correção de Welch).

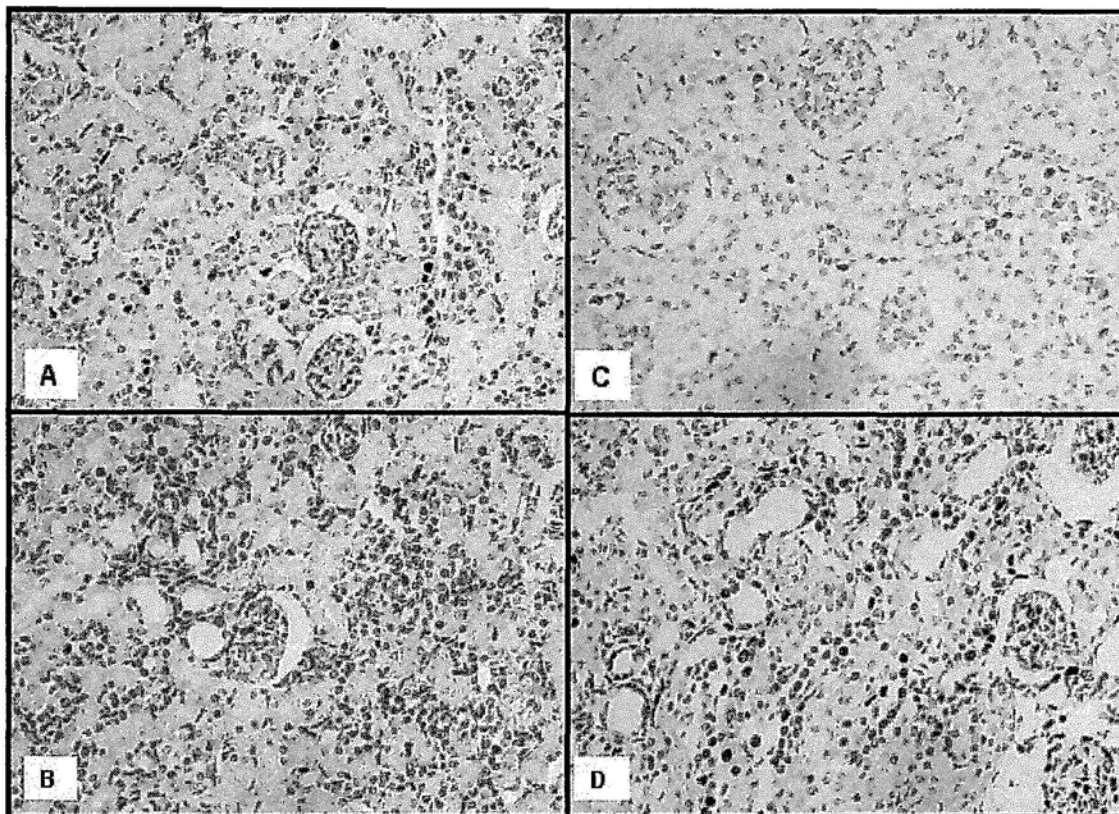


Figura 27 - Imunorreação para PCNA no córtex renal de ratas de 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (A e C, respectivamente) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (B e D, respectivamente). Observar que o número de células PCNA positivas por glomérulo e no compartimento tubulointersticial é maior nos animais de 30 dias do grupo EXPERIMENTAL 2 quando comparados aos controles de mesma idade.

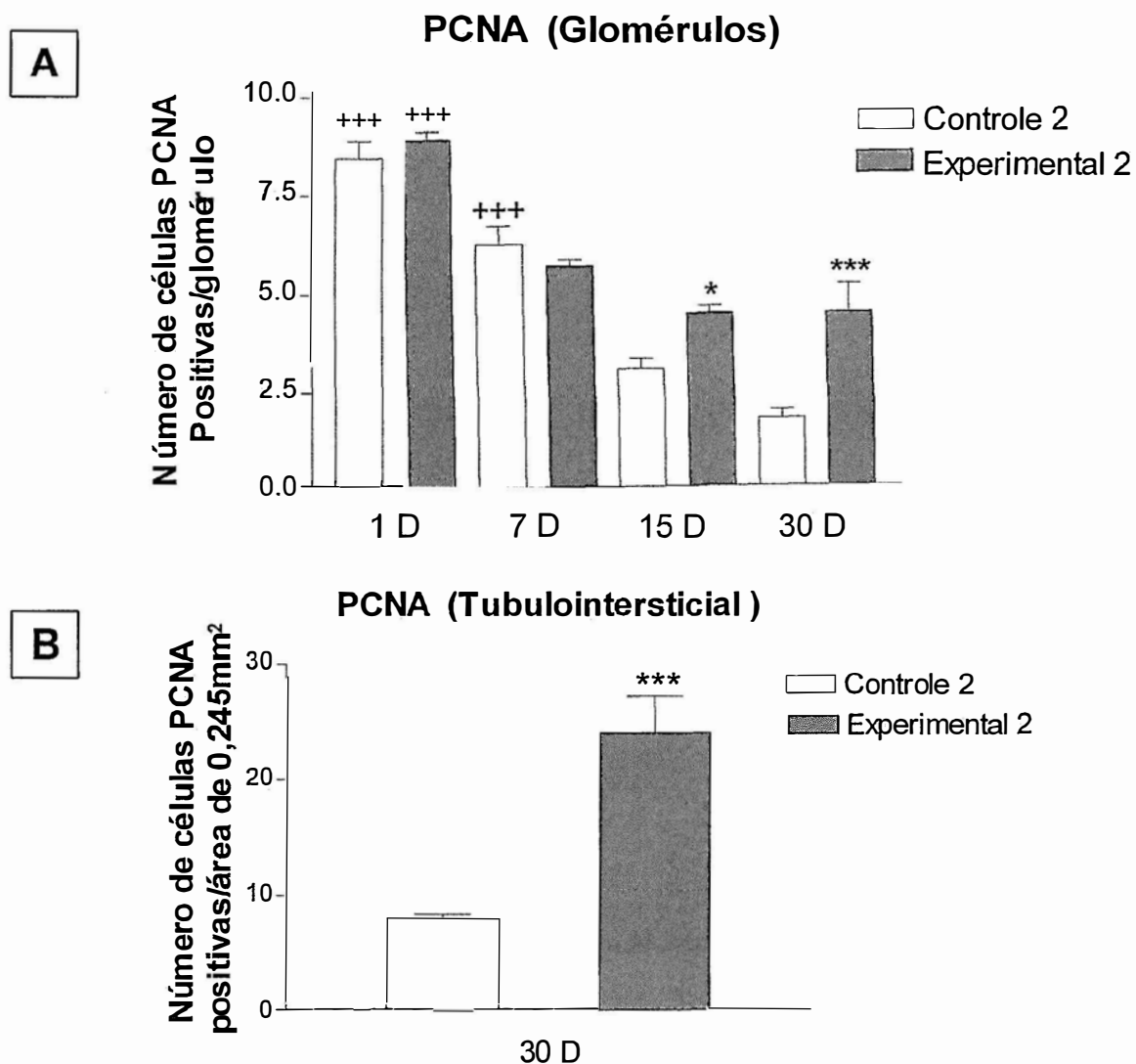


Figura 28 – Número de células PCNA positivas por glomérulo (**A**) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (**B**) de ratas de 1, 7 , 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey e Teste t com correção de Welch).

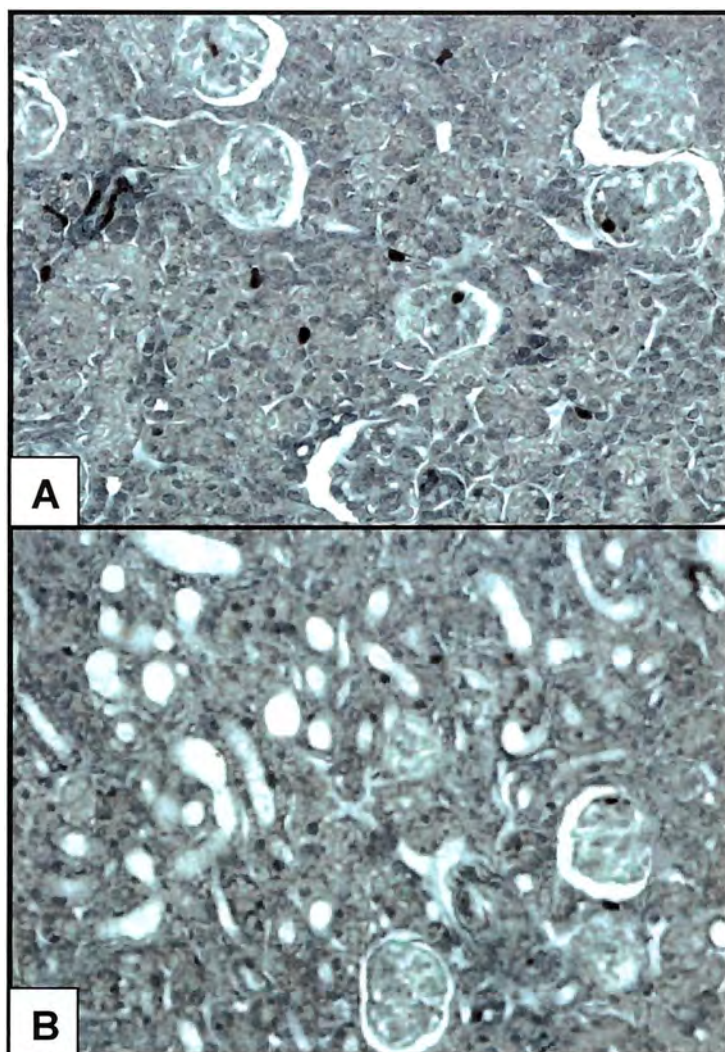


Figura 29 - Imunorreação para All no córtex renal de ratas de 15 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (**A**) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (**B**). Observar que o número de células All positivas é menor no compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais do grupo EXPERIMENTAL 2 quando comparados aos controles.

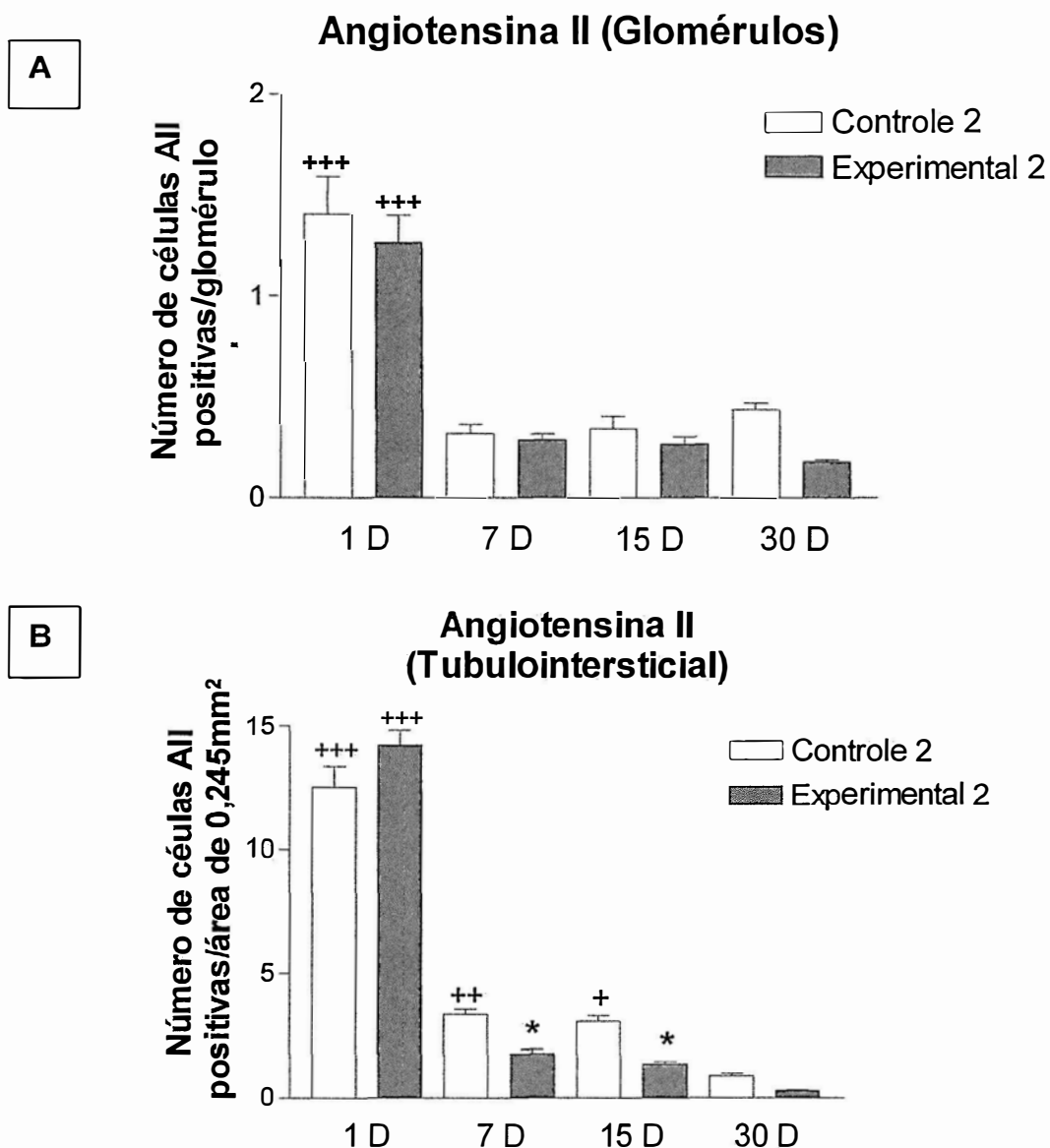


Figura 30 – Número de células AIi positivas por glomérulo (A) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (B) do córtex renal de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média ± EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++p<0,01 (vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

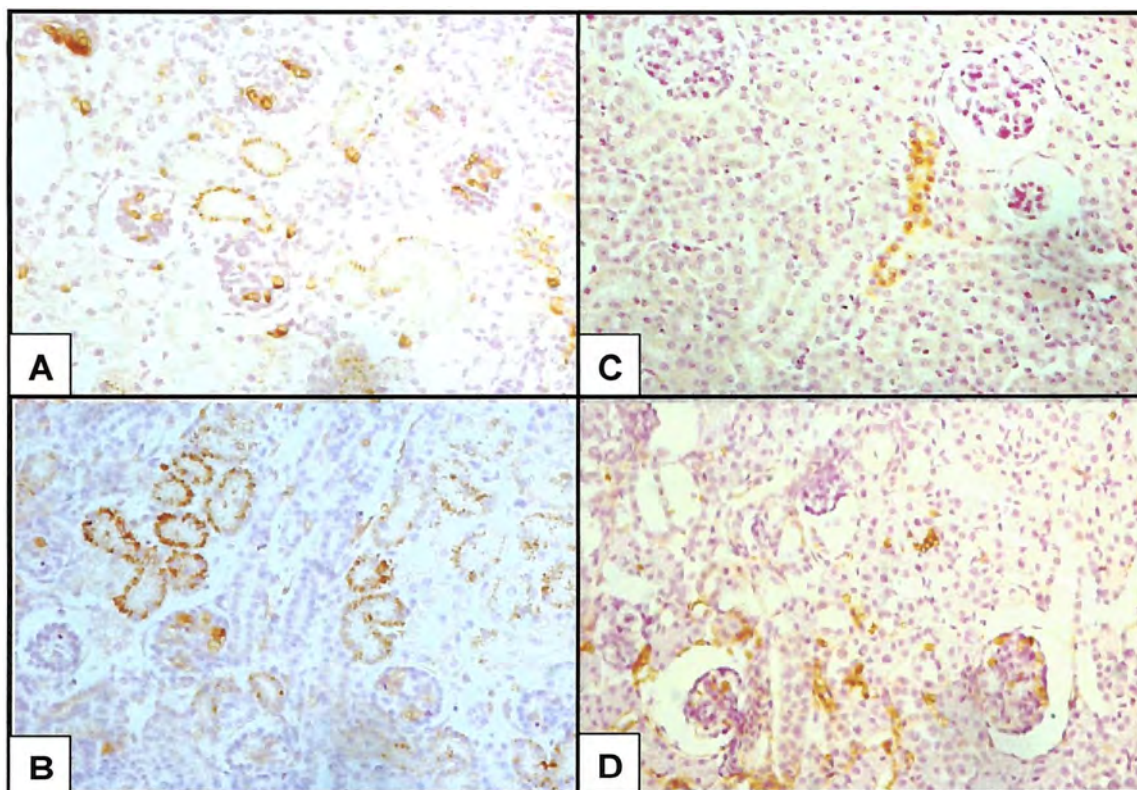


Figura 31 - Imunorreação para p-ERK no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias de idade dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (**A e C**, respectivamente) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (**B e D**, respectivamente). Observar que a reação é mais intensa em D do que em C na região tubulointerstitial.

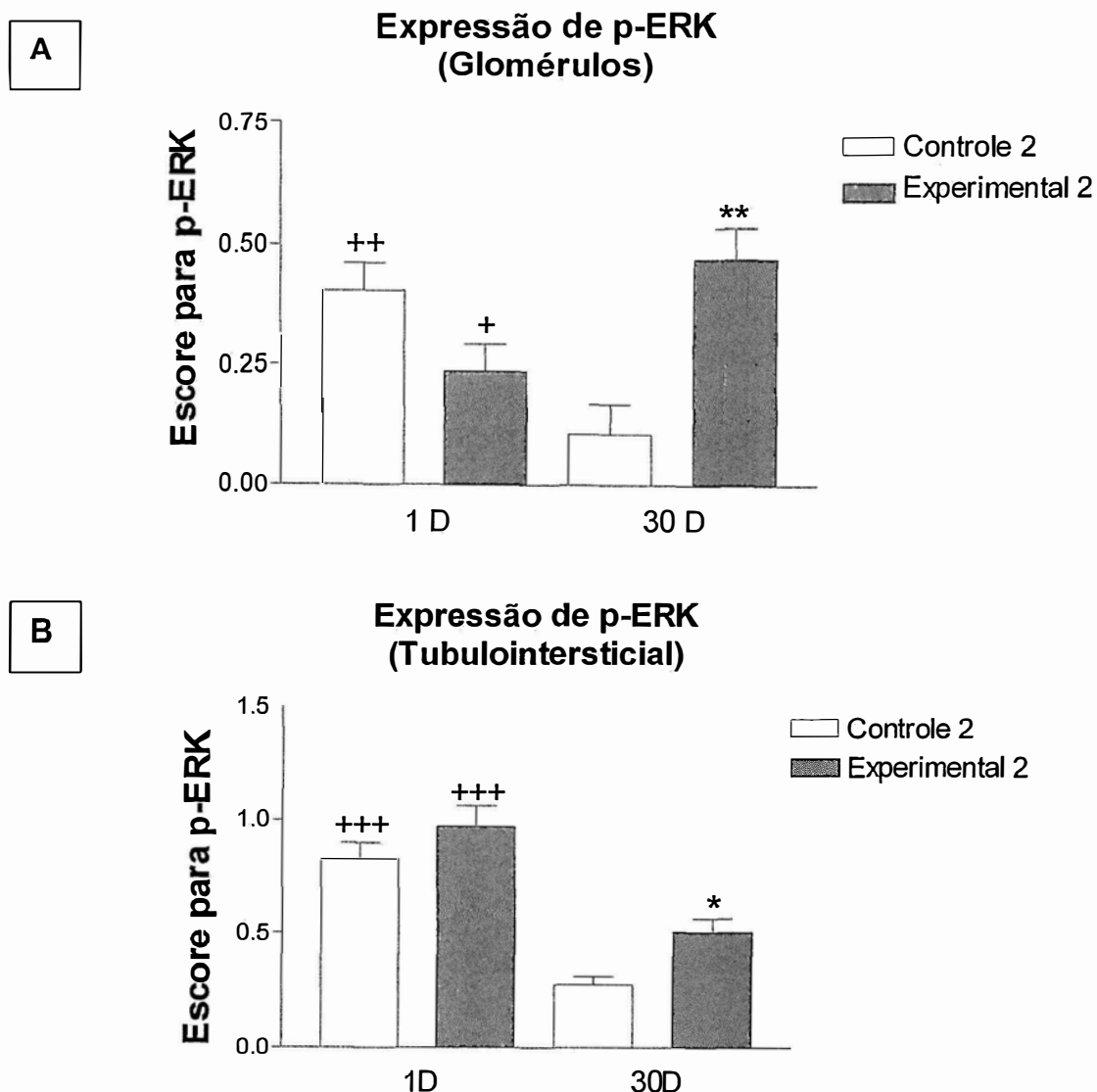


Figura 32 - Escore para p-ERK nos glomérulos (A) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (B) do córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) . Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++p<0,001 (vs 30 D do mesmo grupo); ++p<0,01 (vs 30 D do mesmo grupo), +p<0,05 (vs 30 D do mesmo grupo), **p<0,01 (vs Controle de mesma idade). *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

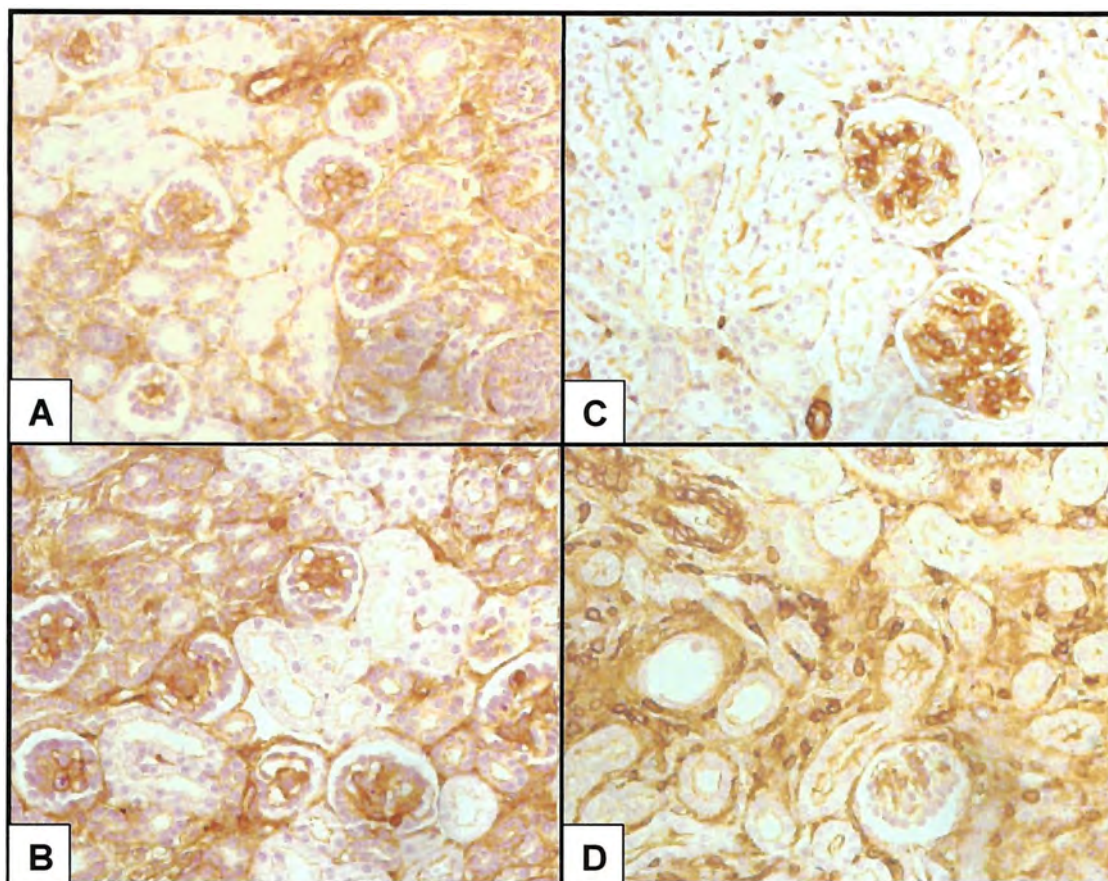


Figura 33 - Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias de idade dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (**A e C**, respectivamente) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (**B e D**, respectivamente). Observar que a reação é mais intensa em D do que em C na região tubulointersticial.

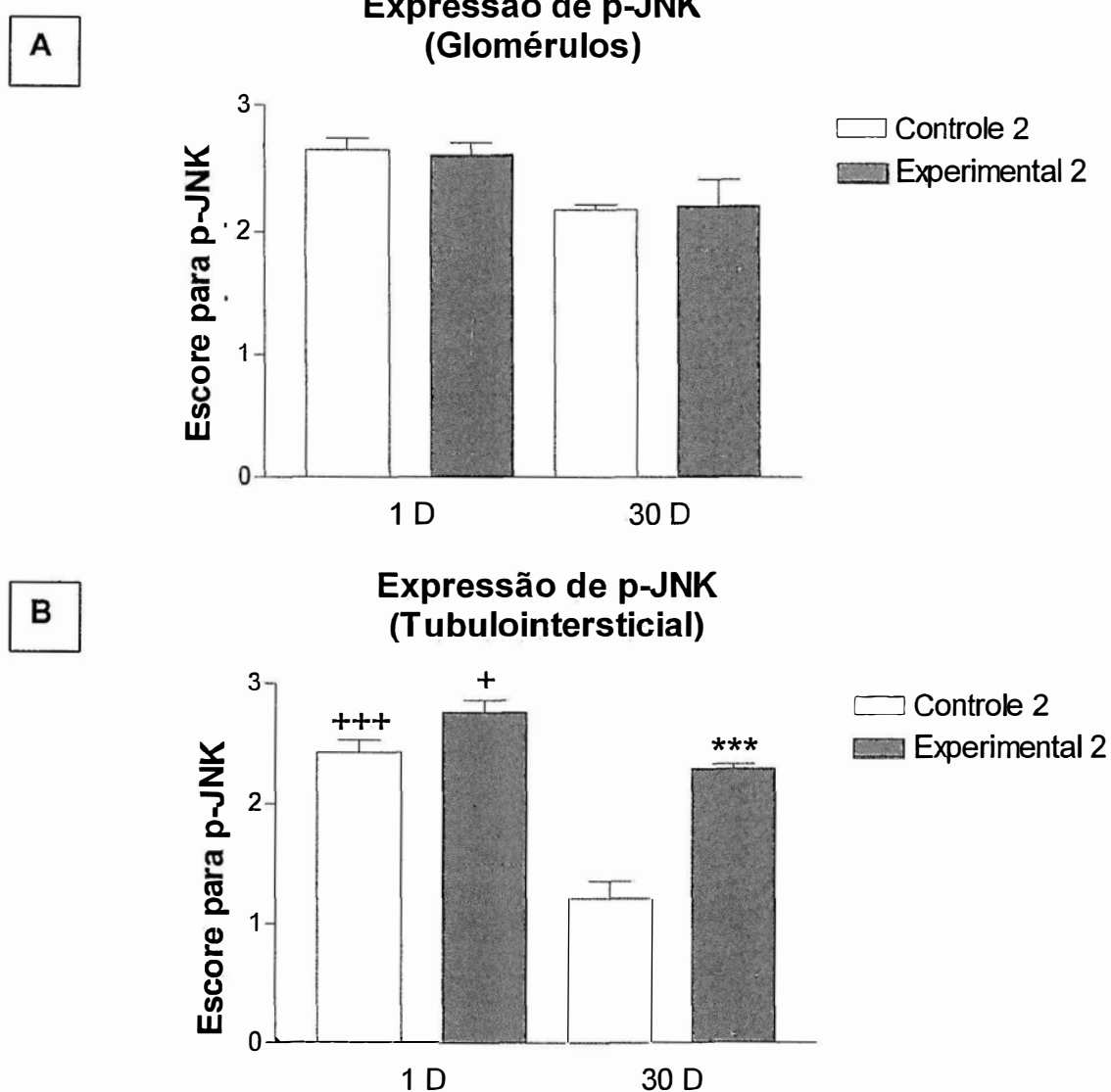


Figura 34 - Escore para p-JNK nos glomérulos (A) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (B) do córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média ± EPM; ; +++p<0,001 (vs 30 D do mesmo grupo); +p<0,01 (vs 30 D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs CONTROLE de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

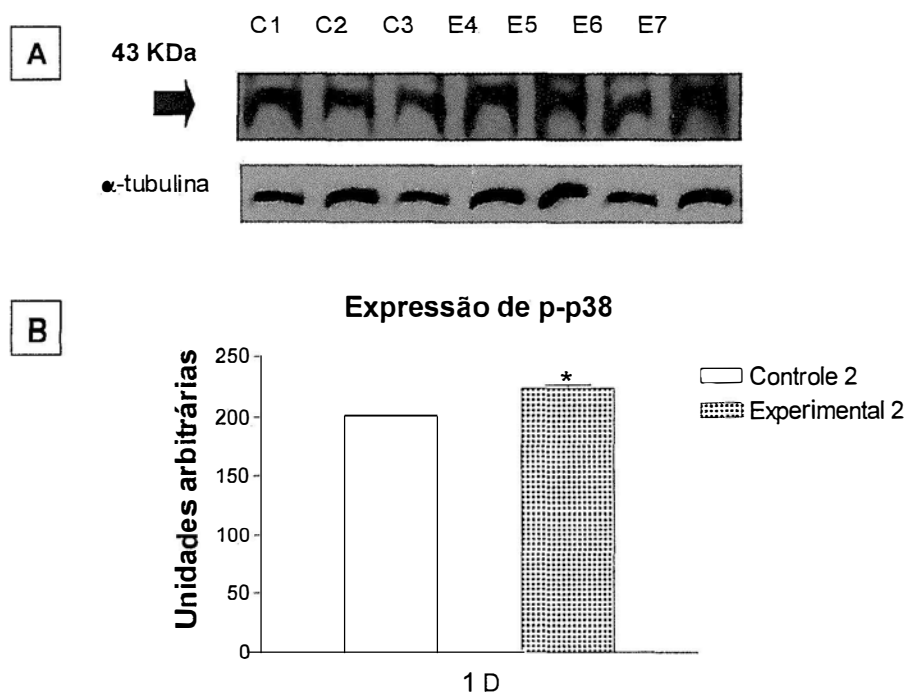


Figura 35 - Expressão da MAPK p-p38 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 1 dia dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (bandas 1 a 3) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (bandas 4 a 7). **(A)** A análise da densidade das bandas de 43 KDa mostrou um aumento significativo na expressão da MAPK p-p38 no córtex renal dos animais de 1 dia do grupo EXPERIMENTAL 2. **(B)** Os dados são expressos como Média ± EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

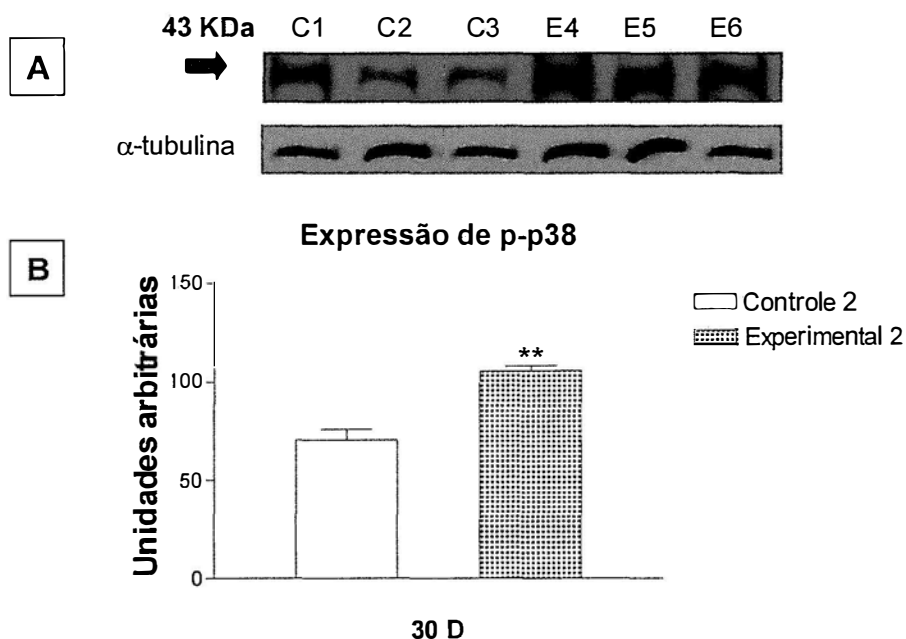


Figura 36 - Expressão da MAPK p-p38 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (bandas 1 a 3) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (bandas 4 a 6). **(A)** A análise da densidade das bandas de 43 KDa mostrou um aumento significativo na expressão da MAPK p-p38 no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo EXPERIMENTAL 2. **(B)** Os dados são expressos como Média ± EPM; ** $p < 0,01$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

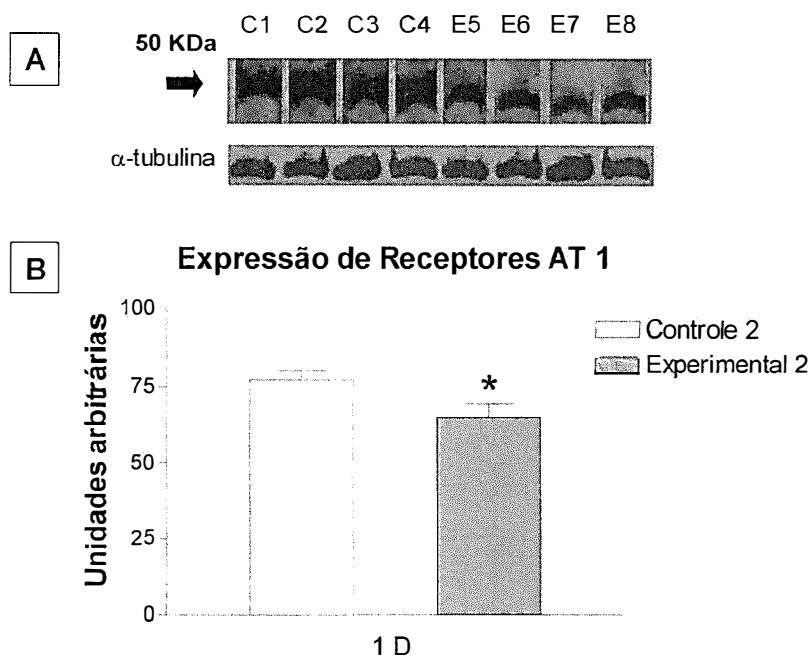


Figura 37 - Expressão de receptores AT 1 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 1 dia dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (bandas 1 a 4) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (bandas 5 a 8). **(A)** A análise da densidade das bandas de 50 KDa mostrou uma redução significativa na expressão de receptores AT 1 no córtex renal dos animais de 1 dia do grupo EXPERIMENTAL 2. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

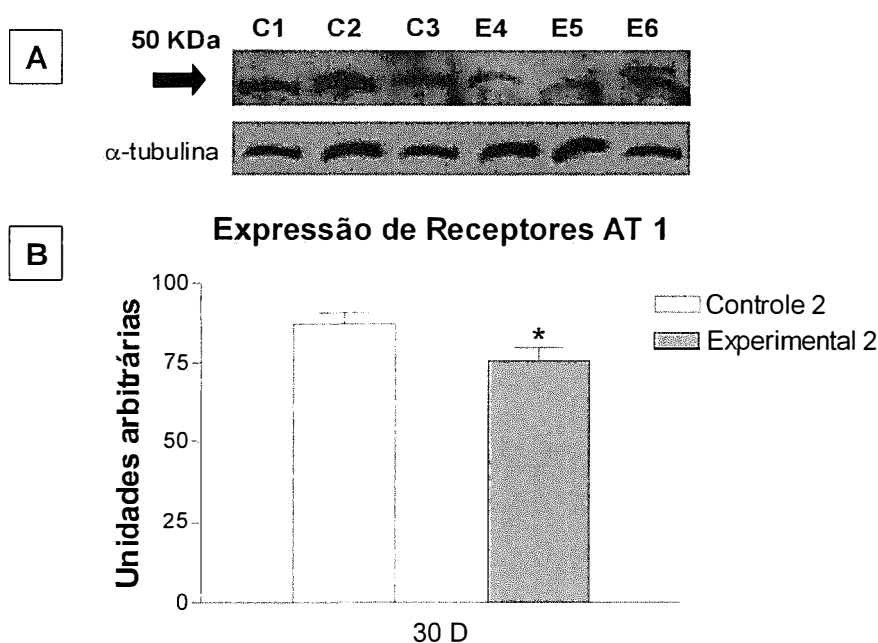


Figura 38 - Expressão de receptores AT 1 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (bandas 1 a 3) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (bandas 4 a 6). **(A)** A análise da densidade das bandas de 50 KDa mostrou uma redução significativa na expressão de receptores AT 1 no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo EXPERIMENTAL 2. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

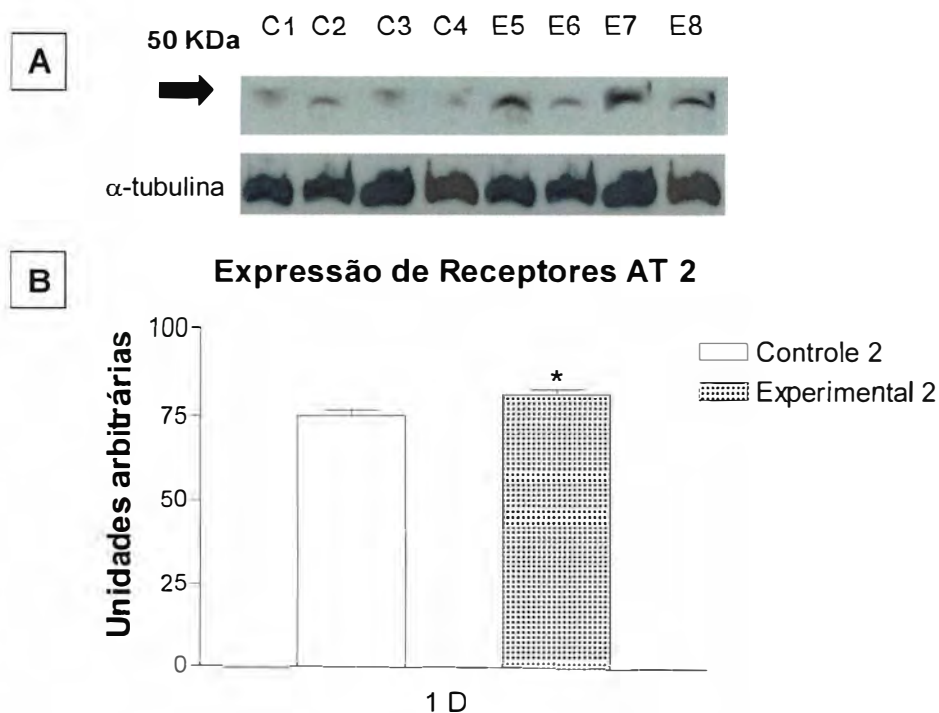


Figura 39 - Expressão de receptores AT 2 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 1 dia dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (bandas 1 a 4) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (bandas 5 a 8). **(A)** A análise da densidade das bandas de 50 KDa mostrou um aumento significativo na expressão de receptores AT 2 no córtex renal dos animais de 1 dia do grupo EXPERIMENTAL 2. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

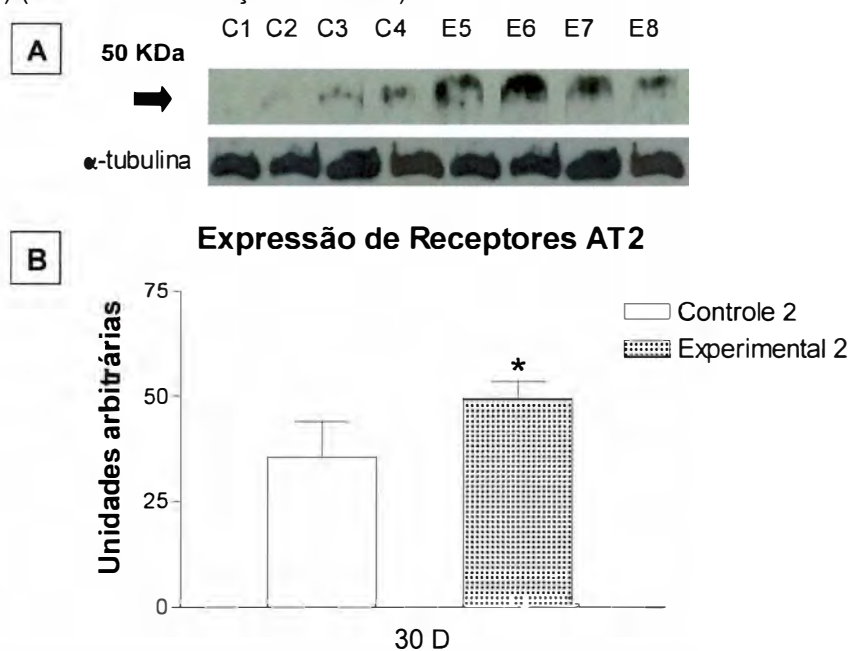


Figura 40 - Expressão de receptores AT 2 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (bandas 1 a 4) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (bandas 5 a 8). **(A)** A análise da densidade das bandas de 50 KDa mostrou um aumento significativo na expressão de receptores AT 2 no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo EXP. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

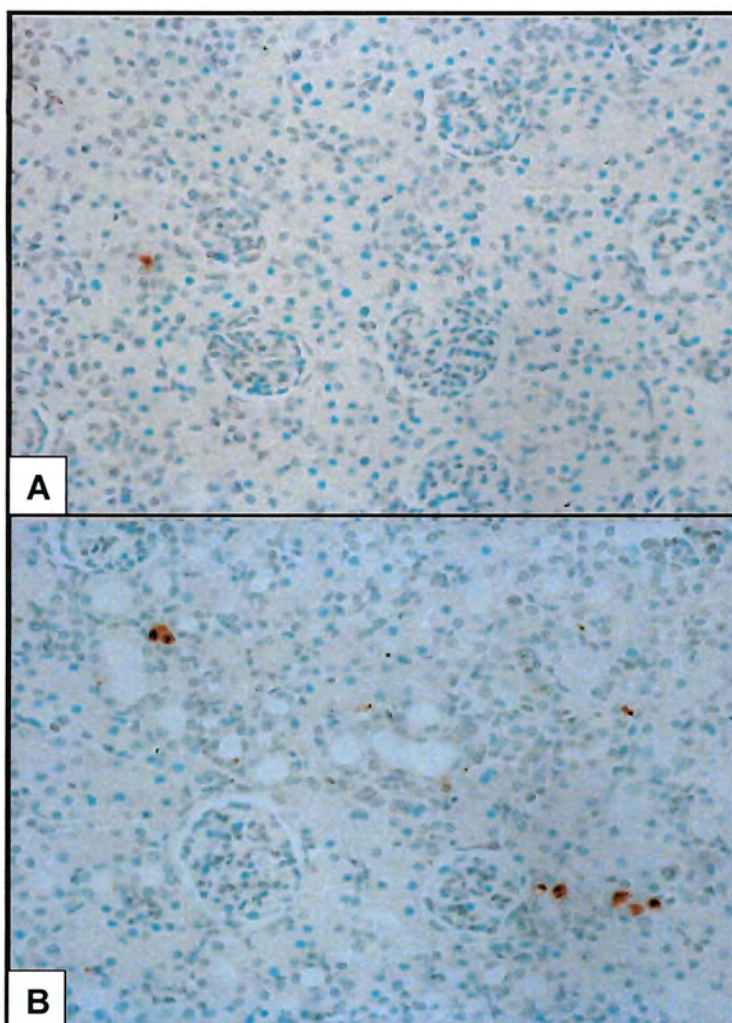


Figura 41 - Detecção de células TUNEL positivas no córtex renal de ratas de 15 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) (**A**) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%) (**B**). Observar em B que o número de células TUNEL positivas no córtex renal é maior nos animais do grupo EXPERIMENTAL 2 quando comparados aos controles de mesma idade.

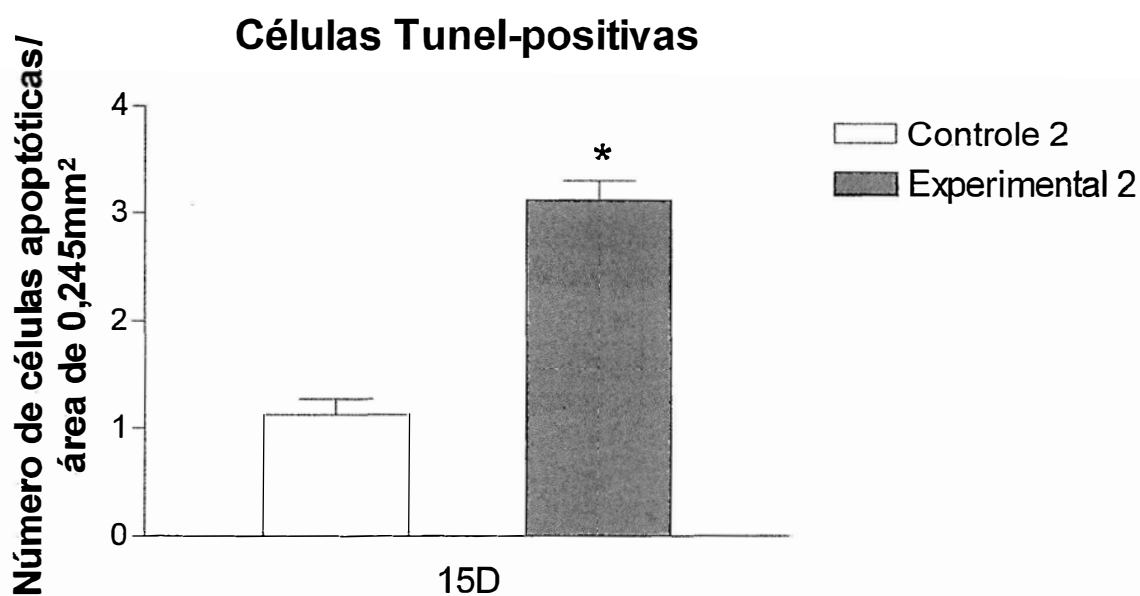


Figura 42 - Número de células TUNEL positivas por área de 0,245mm² do compartimento tubulointersticial do córtex renal de ratas de 15 dias dos grupos CONTROLE 2 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 2 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

Estudo 3 - Influência da exposição ao Losartan durante a amamentação no desenvolvimento renal pós-natal dos filhotes.

Análise Histológica e Morfométrica

A análise histológica do córtex renal (**Figura 43**) mostrou alterações como expansão do compartimento tubulointersticial, achatamento das células tubulares com dilatação e atrofia tubulares e presença de infiltrado inflamatório no compartimento tubulointersticial dos animais de 30 dias de mães tratadas com losartan durante a amamentação (**Figura 43B**). Essas alterações foram semelhantes às observadas nos animais de mães submetidas à exposição ao losartan durante a gestação e amamentação. A análise morfométrica mostrou que houve uma redução na área de tufo glomerular ($2117,25 \mu\text{m}^2 \pm 38,34$) (**Figura 44A**) e um aumento na área intersticial relativa ($17,39\% \pm 1,54$) (**Figura 44B**) do córtex renal dos animais de 30 dias do grupo Experimental quando comparados aos controles ($3715,96 \mu\text{m}^2 \pm 196,30$; $4,58\% \pm 0,71$, respectivamente). No entanto, não houve alterações significativas no número de glomérulos apresentados pelos animais de 30 dias dos grupos experimental ($3,23 \pm 0,10$) e controle ($3,82 \pm 0,24$).

Estudos Imunohistoquímicos

A expressão de α -SMA reduziu durante o processo de desenvolvimento renal pós-natal nos glomérulos de ambos os grupos (**Figura 45**). Contudo, essa redução não foi observada no compartimento tubulointersticial dos animais de mães tratadas com losartan. A expressão de α - SMA foi mais intensa nos glomérulos dos animais de 7 dias do grupo Experimental 3 ($0,77 \pm 0,10$) quando comparados aos controles ($0,27 \pm 0,05$) (**Tabela 9, Figura 46A**) e no compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais de 7 ($2,35 \pm 0,10$), 15 ($1,54 \pm 0,15$) e 30 dias ($1,19 \pm 0,17$) do grupo Experimental 3 quando comparados aos controles de mesma idade ($1,68 \pm 0,05$; $0,64 \pm 0,10$; $0,04 \pm 0,04$, respectivamente) (**Tabela 10, Figura 46B**).

A expressão de fibronectina reduziu durante o processo de desenvolvimento renal pós-natal nos glomérulos dos animais de ambos os grupos (**Figura 47**).

Entretanto, a expressão dessa proteína foi mais intensa nos glomérulos dos animais de 7 ($1,89 \pm 0,05$) e 15 dias ($1,25 \pm 0,12$) do grupo Experimental 3 quando comparados aos controles de mesma idade ($0,99 \pm 0,04$; $0,89 \pm 0,07$, respectivamente) (**Tabela 9, Figura 48A**), e no compartimento tubulointersticial dos animais de 30 dias ($1,24 \pm 0,10$) do grupo Experimental 3 quando comparados aos controles ($0,33 \pm 0,04$) (**Tabela 10, Figura 48B**).

Os nossos resultados mostram também que houve uma redução no número de células PCNA positivas durante o processo de desenvolvimento renal pós-natal nos glomérulos dos animais de ambos os grupos (**Figura 49**). Contudo o número de células PCNA positivas por glomérulo nos animais de 7 ($9,02 \pm 0,27$) e 15 dias ($5,51 \pm 0,15$) do grupo Experimental 3 foi maior que o observado nos animais controles de mesma idade ($6,02 \pm 0,27$; $3,13 \pm 0,25$, respectivamente) (**Tabela 9, Figura 50A**). O número de células PCNA positivas também foi maior no compartimento tubulointersticial dos animais de 30 dias ($14,34 \pm 1,09$) do grupo Experimental 3 quando comparados aos controles de mesma idade ($7,76 \pm 0,46$) (**Tabela 10, Figura 50B**).

O número de células All positivas por glomérulo ou por área de córtex renal, estava elevado nos animais de 1 e 7 dias de idade e reduziu no decorrer do desenvolvimento renal pós-natal nos animais de ambos os grupos (**Figura 51**). Contudo, o número de células All positivas foi menor no compartimento tubulointersticial dos animais de 7 ($2,27 \pm 0,23$) e 15 dias ($2,03 \pm 0,07$) do grupo Experimental 3 do que o observado nos animais controles de mesma idade ($4,13 \pm 0,20$; $3,41 \pm 0,24$, respectivamente) (**Tabela 10, Figura 52B**). Não houve diferenças significativas entre os dois grupos em relação ao número de células All positivas por glomérulo (**Tabela 9, Figura 52A**).

Não houve diferenças significativas na expressão de p-ERK (**Figura 53**) no compartimento tubulointersticial (**Tabela 11, Figura 54B**) dos animais de 1 e 30 dias dos grupos estudados, no entanto a expressão glomerular dessa MAP quinase foi maior nos animais de 30 dias do grupo experimental ($0,39 \pm 0,03$) quando comparados aos respectivos controles ($0,17 \pm 0,07$) (**Tabela 11, Figura 54A**).

A imunorreação para a MAP quinase p-JNK (**Figura 55**) evidenciou que a expressão de p-JNK não variou nos glomérulos (**Tabela 11, Figura 56A**) dos animais de ambos os grupos durante o desenvolvimento. Porém, a expressão de p-JNK (**Tabela 11, Figura 56B**) apresentou tendência a um aumento no compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais de 1 dia em relação aos de 30 dias do grupo controle. A expressão desta MAP quinase foi maior no compartimento tubulointersticial nos animais experimentais de 30 dias, quando comparados aos animais controles de mesma idade.

Os estudos de Western blot mostraram que no córtex renal dos animais de 30 dias de mães tratadas com losartan durante a amamentação, houve um aumento nas expressões de p-p38 (**Figura 57**) e de receptores AT 2 (**Figura 59**), porém não houve alterações significativas quanto à expressão de receptores AT1 (**Figura 58**), quando comparados aos controles de mesma idade.

Os dados de função renal evidenciaram um aumento na excreção urinária de albumina (mg/24Hs), uma diminuição na TFG ($0,26 \text{ mL/min} \pm 0,02$) e um aumento na excreção fracional de sódio ($0,02 \% \pm 0,001$) nos animais de 30 dias do grupo experimental quando comparados aos respectivos controles ($0,43 \text{ mL/min} \pm 0,03$; $0,01\% \pm 0,001$, respectivamente) (**Tabela 12**).

Tabela 9 - Escore para α - SMA e fibronectina no compartimento glomerular e número de células PCNA e All positivas por glomérulo nos animais de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%).

Idade (dias)	α - SMA	Fibronectina	Céls. PCNA +	Céls. All +
Controle 3				
1	1,15±0,16+++	1,86±0,18+++	8,49±0,37+++	1,51±0,17+++
7	0,27±0,05	0,99±0,04++	6,02±0,27+++	0,29±0,03
15	0,07±0,01	0,89±0,07+	3,13±0,25+	0,37±0,06
30	0,02±0,02	0,27±0,02	1,74±0,22	0,45±0,03
Experimental 3				
1	1,52±0,13+++	1,99±0,12+++	8,82±0,20+++	1,21±0,13+++
7	0,77±0,10+++**	1,89±0,05+++***	9,02±0,27+++***	0,21±0,02
15	0,03±0,02	1,25±0,12+*	5,51±0,15+++***	0,19±0,01
30	0,04±0,04	0,58±0,24	1,25±0,30	0,39±0,05

Os dados são expressos como Média \pm EPM. +++ p < 0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++p < 0,01 (vs 30D do mesmo grupo); +p < 0,05 (vs 30D do mesmo grupo); ***p < 0,001 (vs Controle de mesma idade); **p < 0,01 (vs Controle de mesma idade); *p < 0,05 (vs Controle de mesma idade).

Tabela 10 – Escore para α - SMA e células All positivas por área de 0,245mm² do compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais de 1, 7, 15 e 30 dias e escore para fibronectina e número de células PCNA positivas no compartimento tubulointersticial dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%).

Idade (dias)	α - SMA	Fibronectina	Céls. PCNA +	Céls. All +
Controle 3				
1	1,75±0,10+++			12,90±0,88+++
7	1,68±0,05+++			4,13±0,20++
15	0,64±0,10++			3,41±0,24+
30	0,04±0,04	0,33±0,04	7,76±0,46	0,83±0,11
Experimental 3				
1	1,40±0,09			13,73±0,71+++
7	2,35±0,10++++**			2,27±0,23*
15	1,54±0,15***			2,03±0,07*
30	1,19±0,17***	1,24±0,10***	14,34±1,09**	0,56±0,10

Os dados são expressos como Média \pm EPM. +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++p<0,01 (vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); **p<0,01 (vs Controle de mesma idade); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade).

Tabela 11 - Escore para p-ERK e p-JNK nos compartimentos glomerular e tubulointersticial do córtex renal dos animais de 1 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%).

Idade	p-ERK Glomérulos		p-ERK Tubulointersticial	
	Controle 3	Experimental 3	Controle 3	Experimental 3
1D	0,52±0,05++	0,45±0,05	0,99±0,07+++	0,95±0,09+++
30D	0,17±0,07	0,39±0,03*	0,29±0,05	0,41±0,05

Idade	p-JNK Glomérulos		p-JNK Tubulointersticial	
	Controle 3	Experimental 3	Controle 3	Experimental 3
1D	1,91±0,20	1,97±0,24	1,59±0,15	1,62±0,21+++
30D	2,24±0,10	1,96±0,10	1,20±0,14	2,91±0,09***

Os dados são expressos como Média ± EPM. +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++p<0,01 (vs 30D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade).

Tabela 12 - Dados da albuminúria (mg/24h), Taxa de Filtração Glomerular (TFG em mL/min) e Excreção Fracional de Sódio (FE sódio em %) dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%).

	Controle 3	Experimental 3
Albuminúria (mg/24h)	0,42 (0,37;0,59)	82,99 (74,31;114,70)**
TFG (mL/min)	0,43 ± 0,03	0,26 ± 0,02 **
FE sódio (%)	0,011± 0,001	0,020 ± 0,001**

Os dados de albuminúria são expressos como Mediana e percentil 25 e 75%. **p<0,01 (vs Controle de mesma idade); os outros dados são expressos como Média ± EPM. ** p<0,001 (vs. Controle de mesma idade).

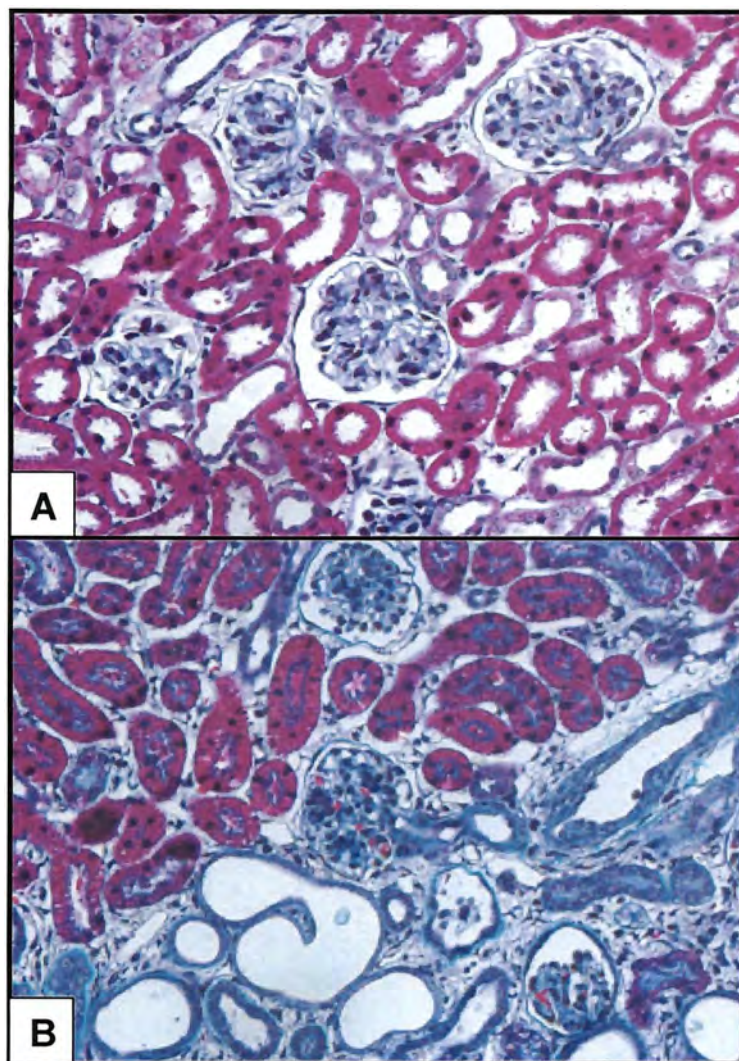


Figura 43 – Cortes histológicos do córtex renal de ratas de 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) (A) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%) (B). Observar em B dilatação e atrofia tubular e alargamento do compartimento intersticial com infiltrado inflamatório.

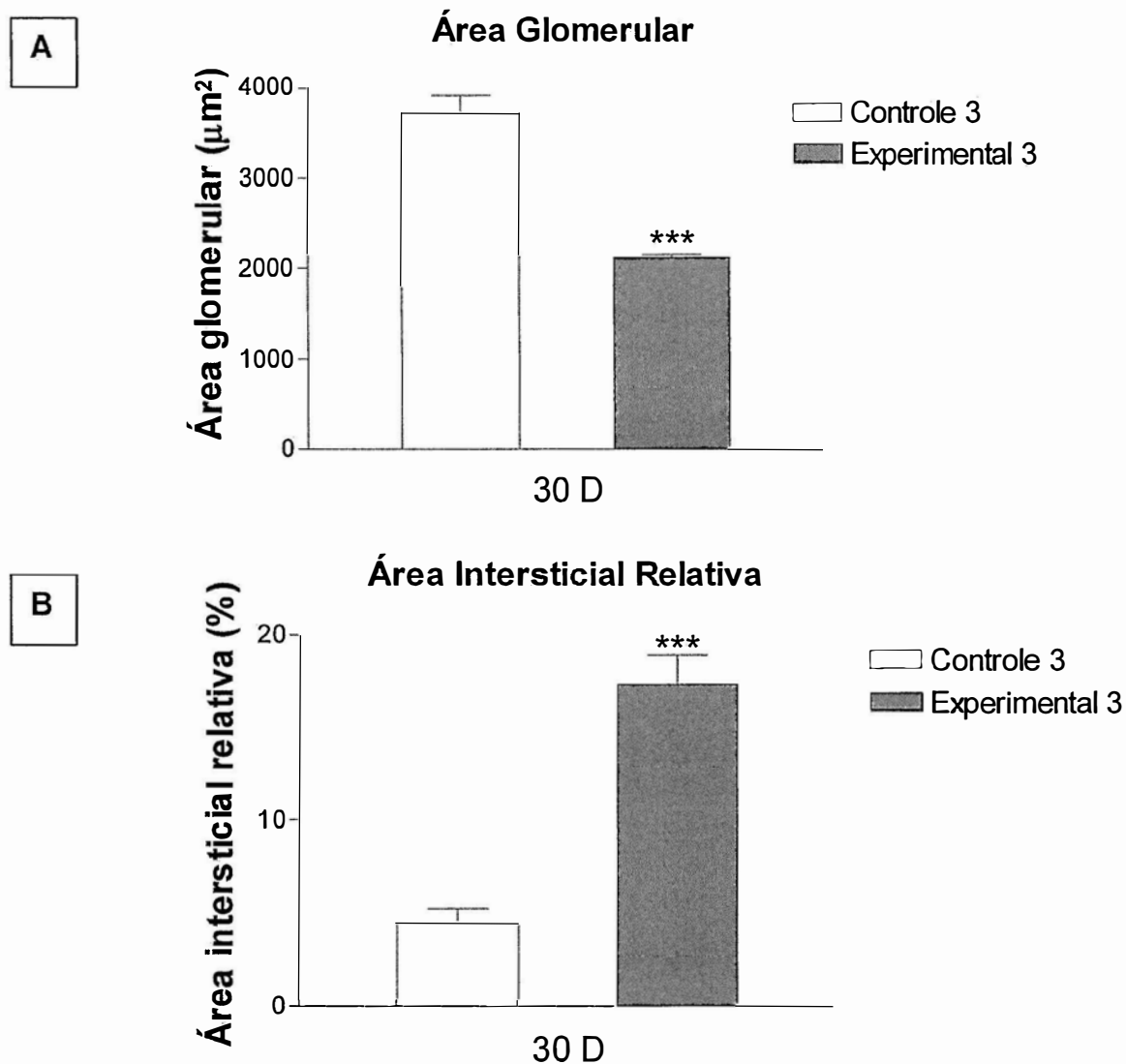


Figura 44 - Área glomerular em μm^2 (A) e área intersticial relativa (%) (B) do córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM. *** $p < 0,001$ (vs. Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

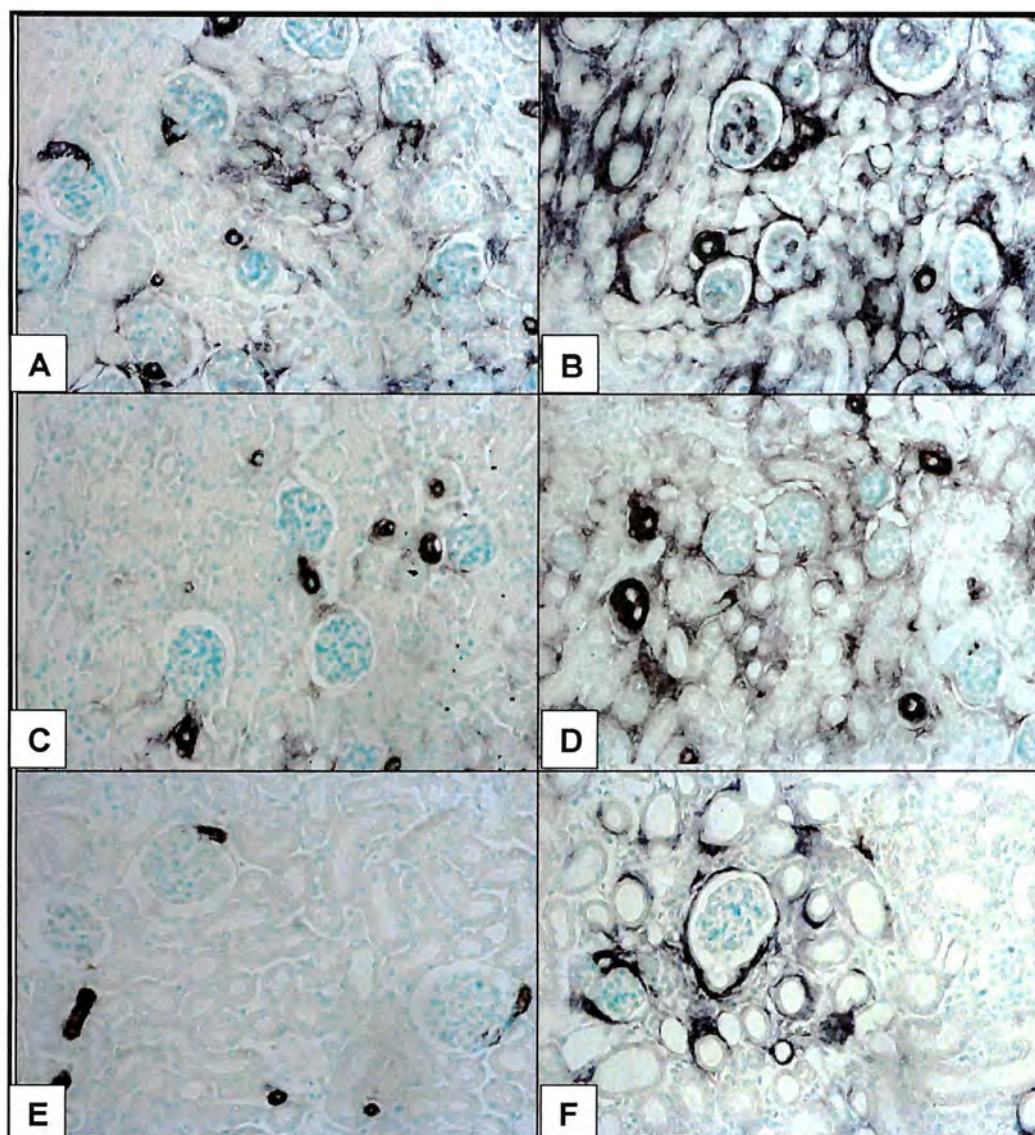


Figura 45 - Imunorreação para α -SMA no córtex renal de ratas de 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) (A, C e E, respectivamente) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%) (B, D e F, respectivamente). Observar em B, D e F que a expressão de α -SM actina é maior no compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais do grupo EXPERIMENTAL 3 quando comparados aos controles.

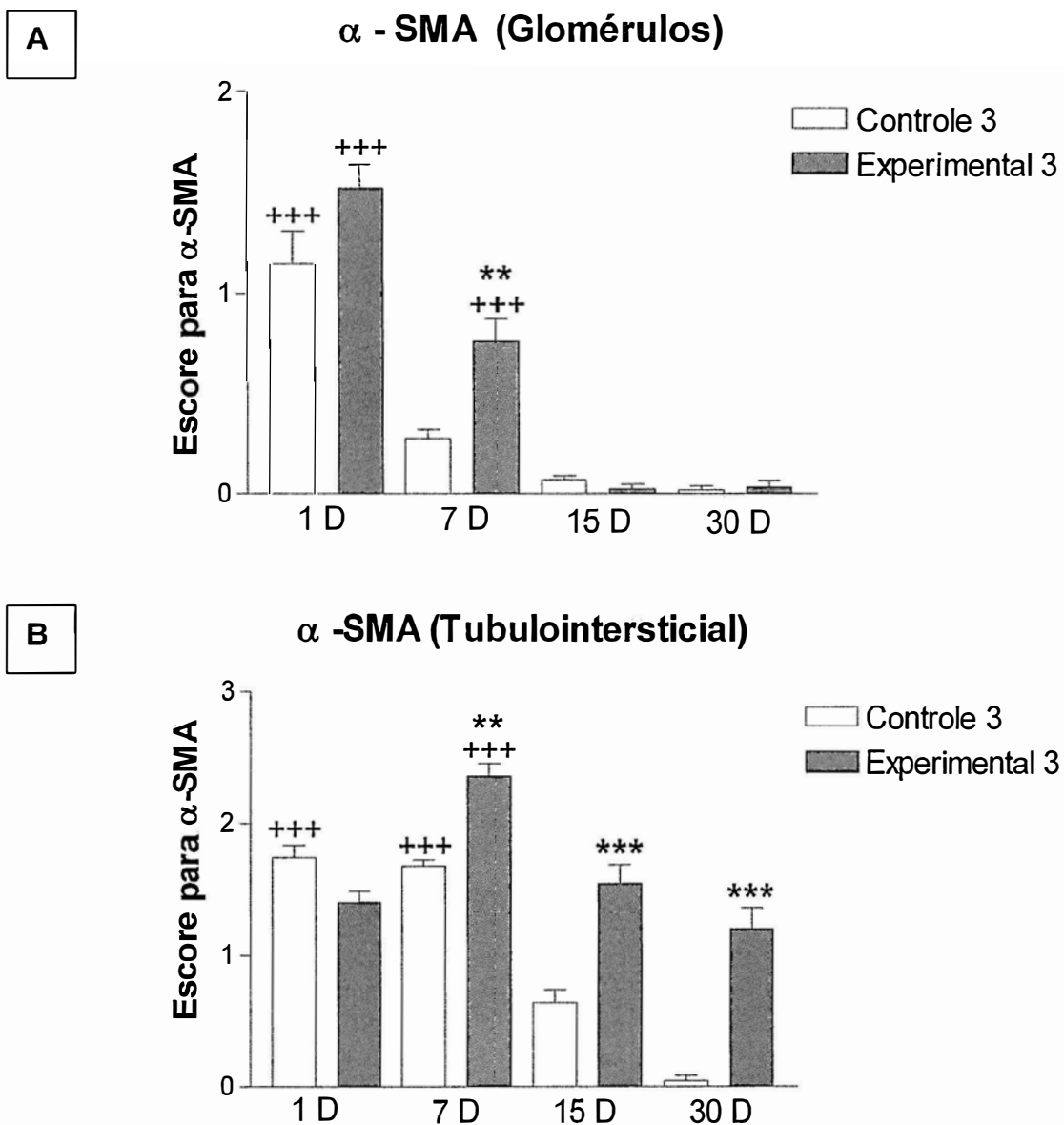


Figura 46 - Escore para α -SMA nos glomérulos (**A**) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (**B**) do córtex renal de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); **p<0,01 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

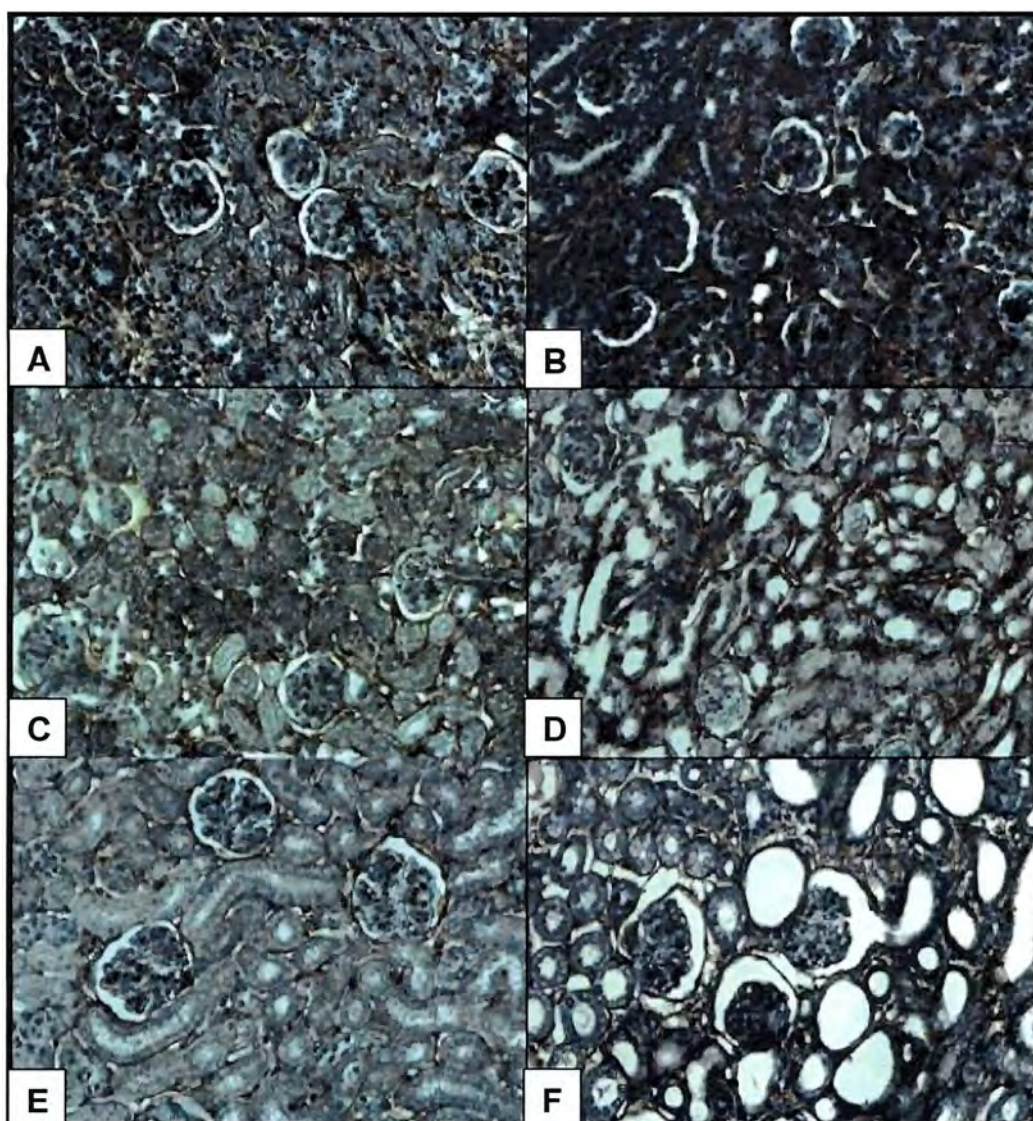


Figura 47 - Imunorreação para fibronectina no córtex renal de ratas de 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) (**A, C e E**, respectivamente) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%) (**B, D e F**, respectivamente). Observar em B, D e F que a expressão de fibronectina é maior no córtex renal dos animais do grupo EXPERIMENTAL 3 quando comparados aos controles.

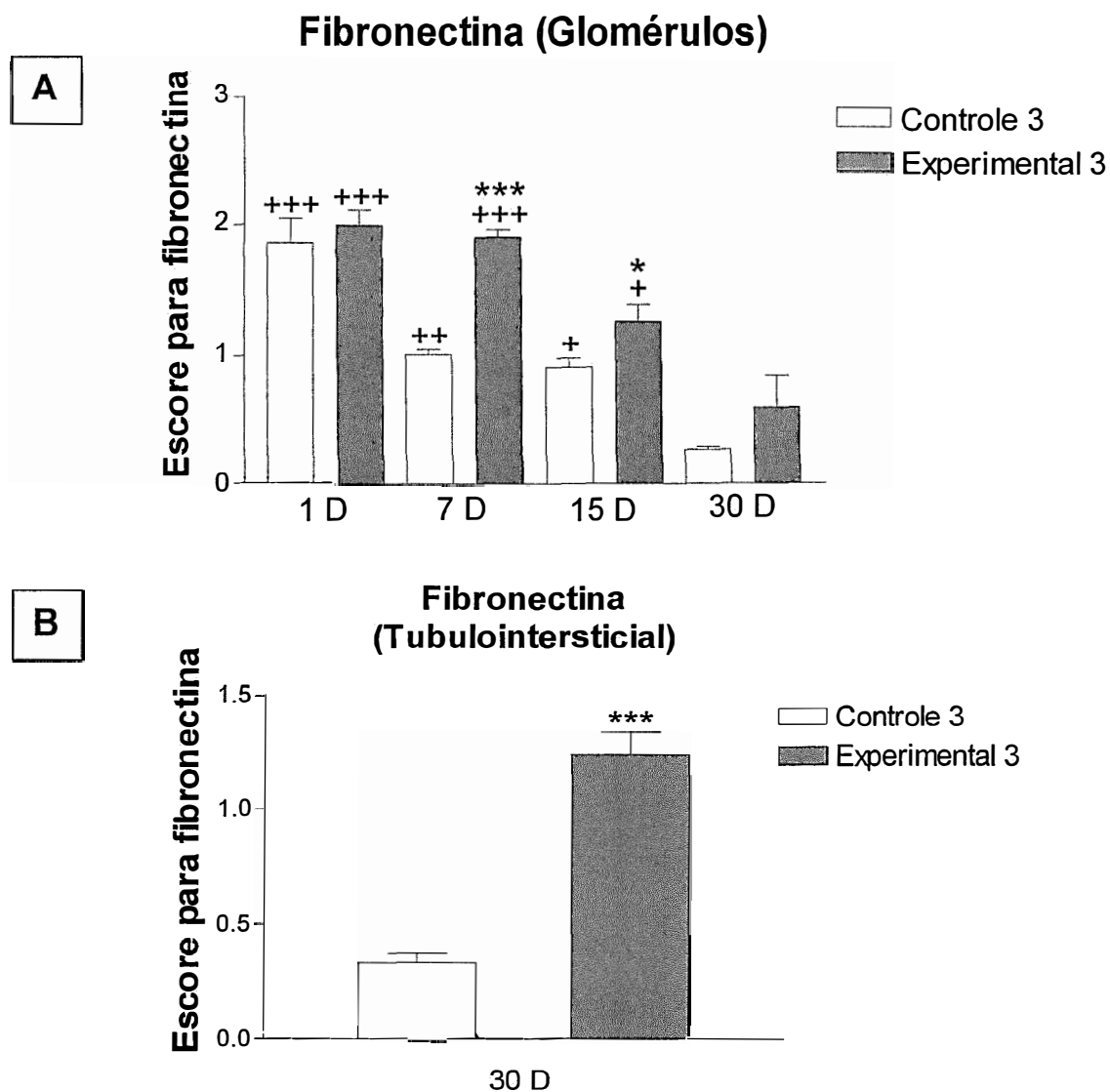


Figura 48 – Escore para fibronectina nos glomérulos (A) de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (B) de ratas de 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média ± EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo), ++p<0,01 (vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo) ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey e Teste t com correção de Welch).

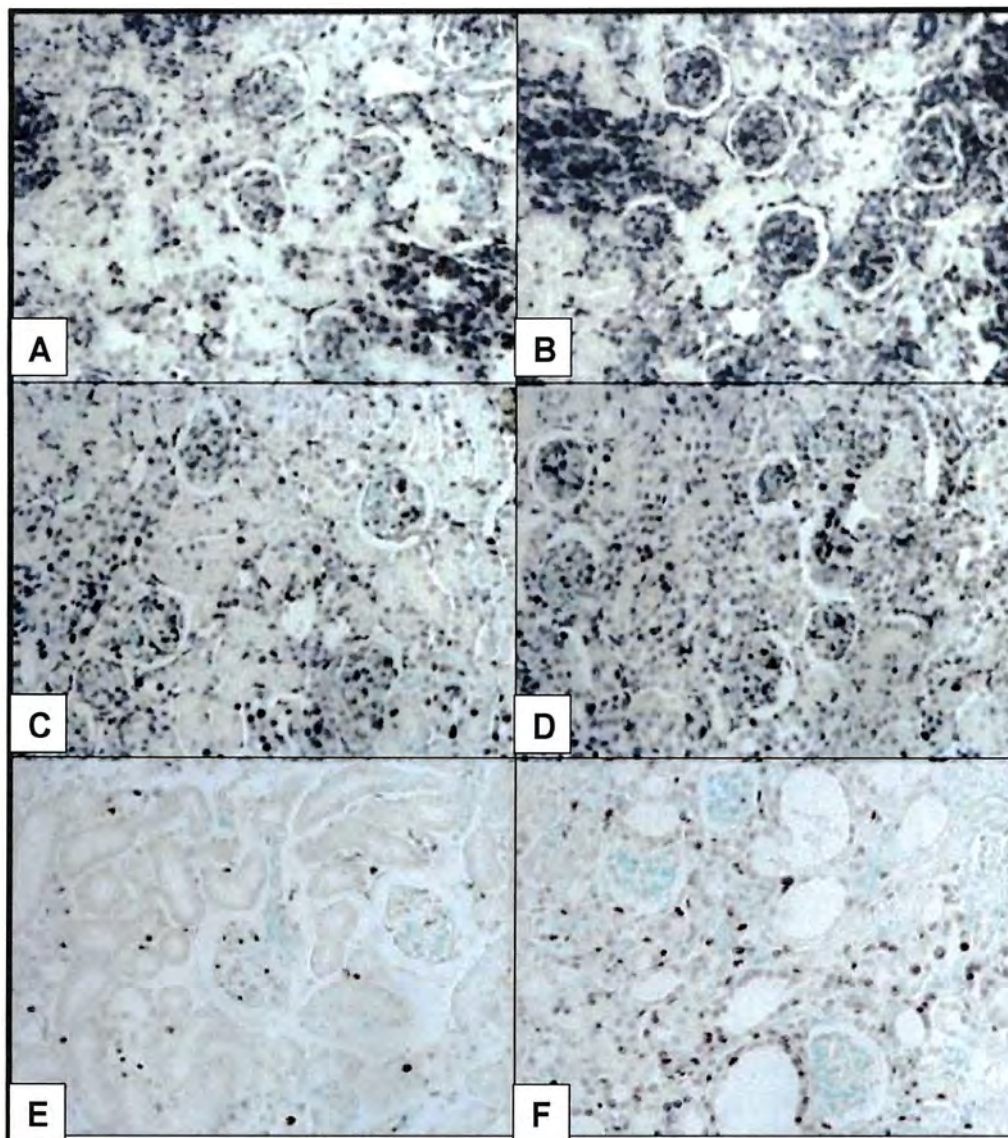


Figura 49 - Imunorreação para PCNA no córtex renal de ratas de 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) (A, C e E, respectivamente) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%) (B, D e F, respectivamente). Observar em B e D que o número de células PCNA positivas nos glomérulos e no compartimento tubulointersticial é maior nos animais do grupo EXPERIMENTAL 3 quando comparados aos controles, e em F que o número de células PCNA positivas na região tubulointersticial é maior que em E.

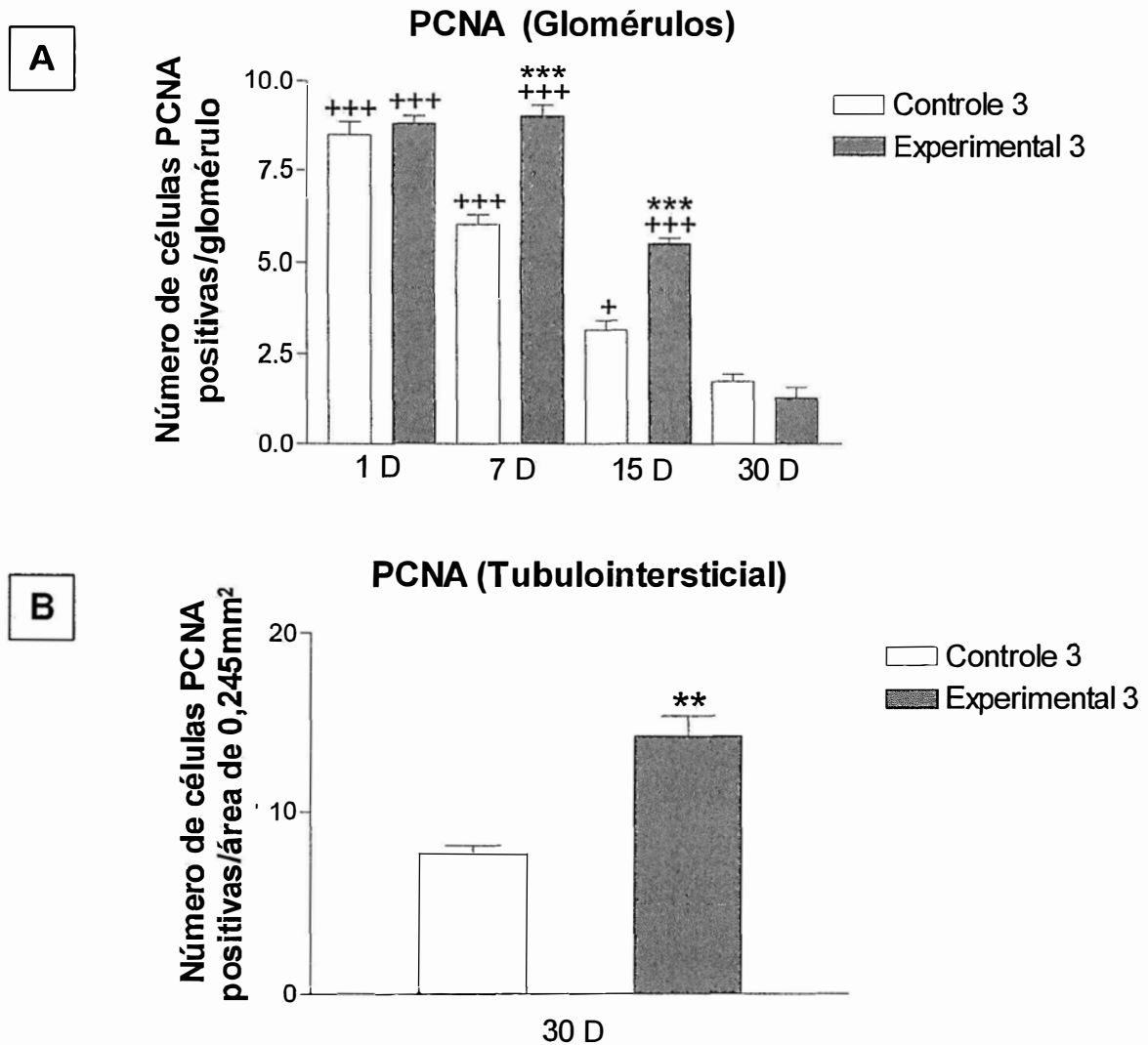


Figura 50 – Número de células PCNA positivas por glomérulo (A) de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias e por área de 0,245mm² do compartimento tubulointersticial (B) de ratas de 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média ± EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo) ***p<0,001 (vs Controle de mesma idade); **p<0,01(vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey e Teste t com correção de Welch).

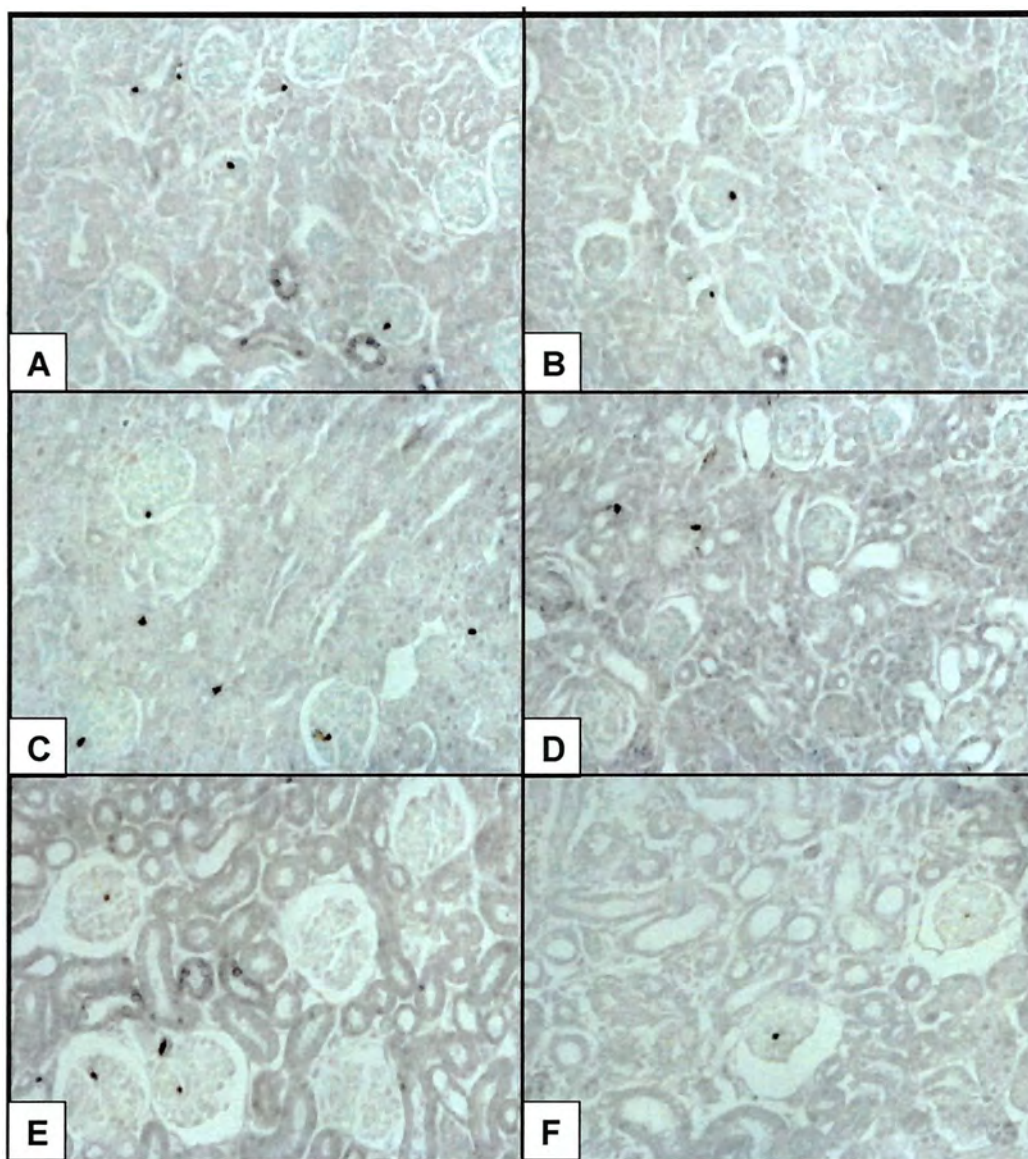


Figura 51 - Imunorreação para All no córtex renal de ratas de 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) (A, C e E, respectivamente) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%) (B, D e F, respectivamente). Observar em B e D que o número de células All positivas é menor no compartimento tubulointersticial do córtex renal dos animais do grupo EXPERIMENTAL 3 quando comparados aos controles.

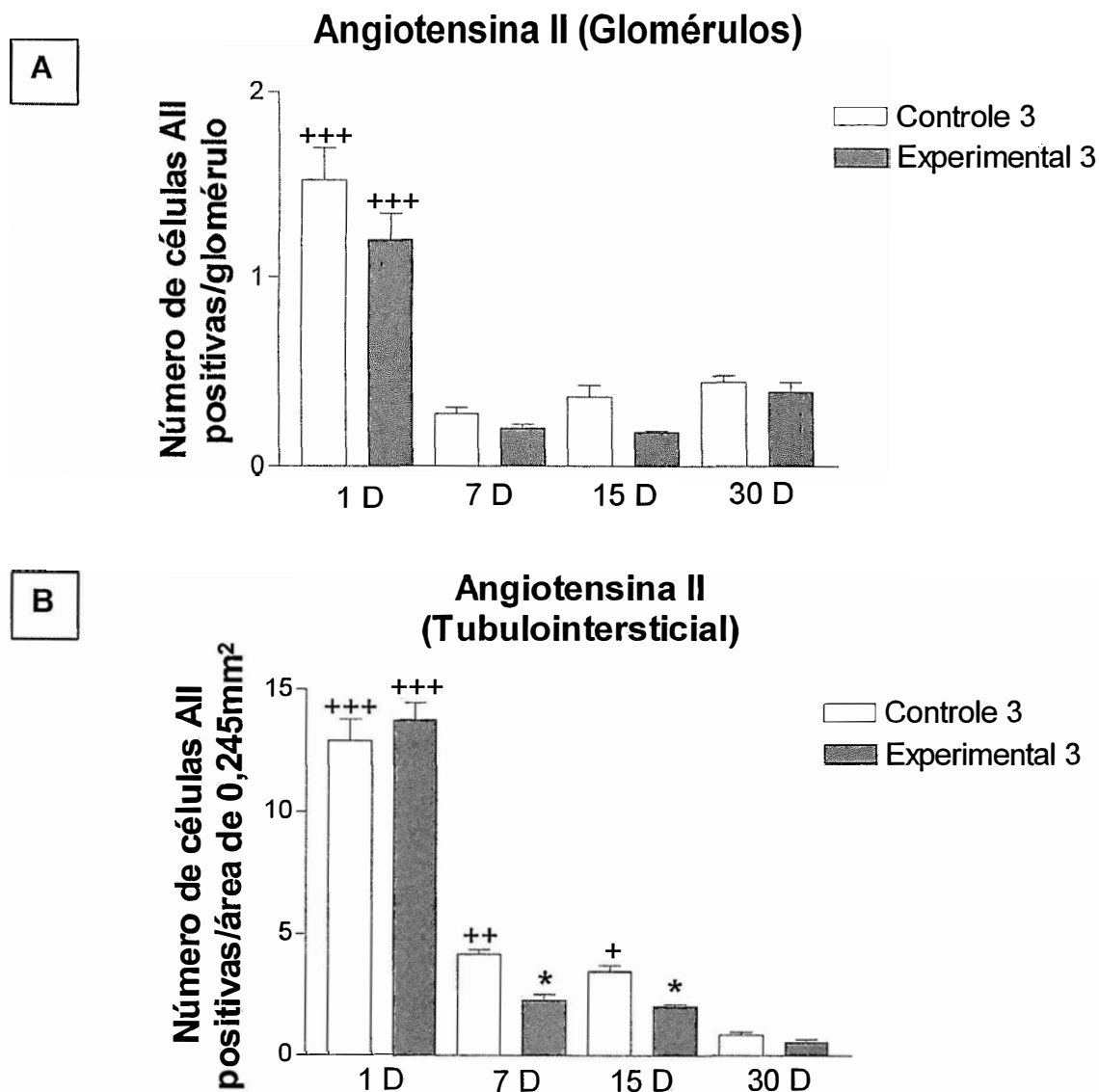


Figura 52 - Número de células All positivas por glomérulo (A) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (B) do córtex renal de ratas de 1, 7, 15 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++p<0,001 (vs 30D do mesmo grupo); ++p<0,01(vs 30D do mesmo grupo); +p<0,05 (vs 30D do mesmo grupo); *p<0,05 (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

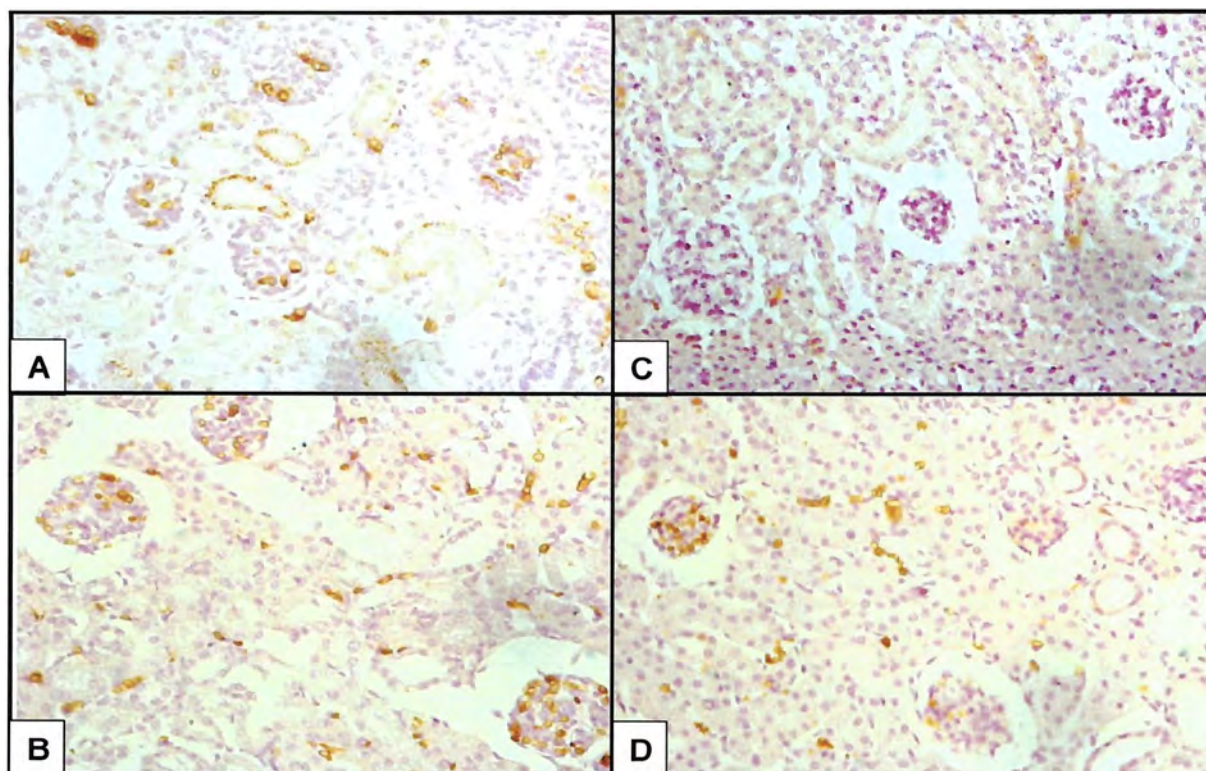


Figura 53 - Imunorreação para p-ERK no córtex renal de ratas de 1 e 30 dias de idade dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) (**A e C**, respectivamente) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%) (**B e D**, respectivamente). Observar que a reação é mais intensa em D do que em C.

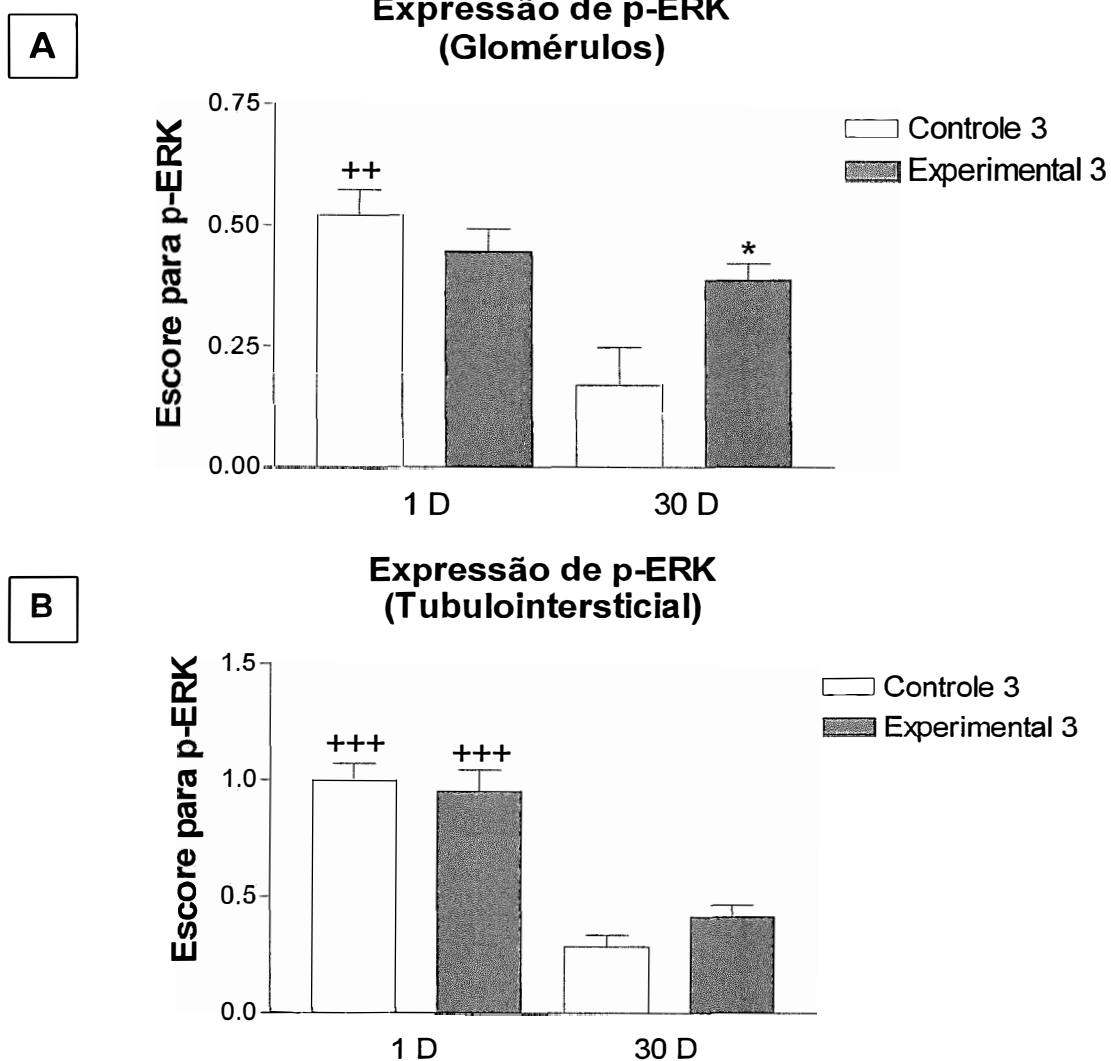


Figura 54 - Escore para p-ERK nos glomérulos (**A**) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (**B**) do córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM; +++ $p < 0,001$ (vs 30 D do mesmo grupo); ++ $p < 0,01$ (vs 30 D do mesmo grupo); * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

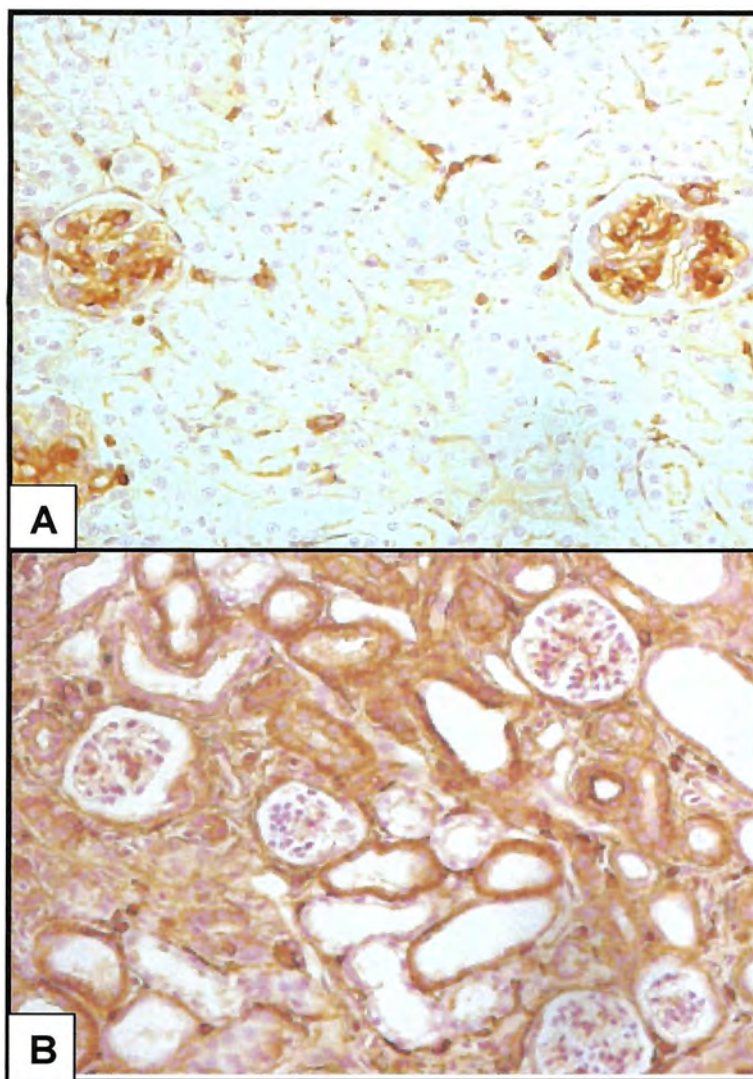


Figura 55 - Imunorreação para p-JNK no córtex renal de ratas de 30 dias de idade dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) (**A**) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%) (**B**). Observar que a reação é mais intensa em B do que em A no compartimento tubulointersticial.

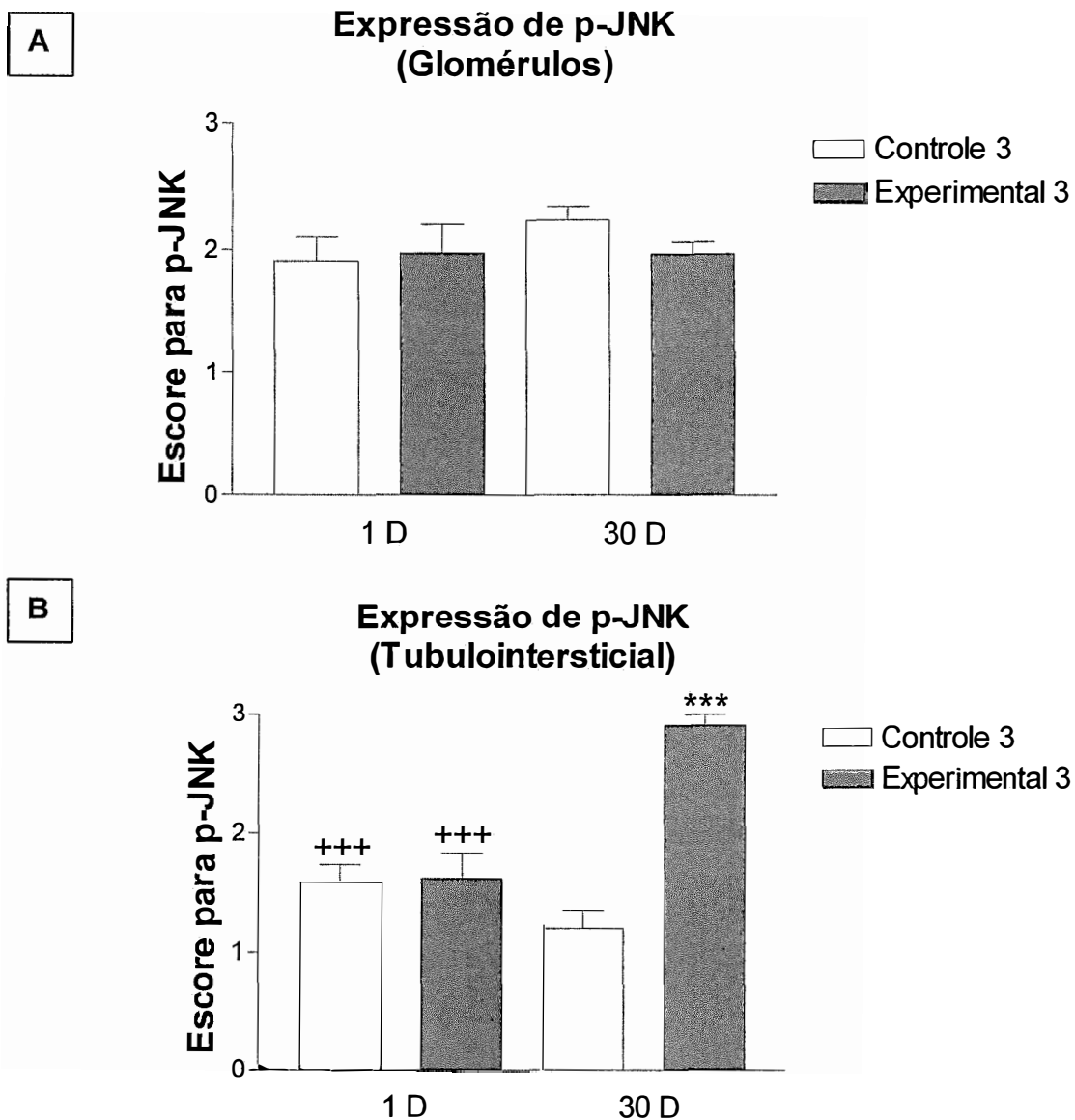


Figura 56 - Escore para p-JNK nos glomérulos (A) e por área de 0,245 mm² do compartimento tubulointersticial (B) do córtex renal de ratas de 1 e 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%). Os dados são expressos como Média \pm EPM. +++p<0,001 (vs 30 D do mesmo grupo), ***p<0,001 (vs controle de mesma idade) (ANOVA com pós-teste de Tukey).

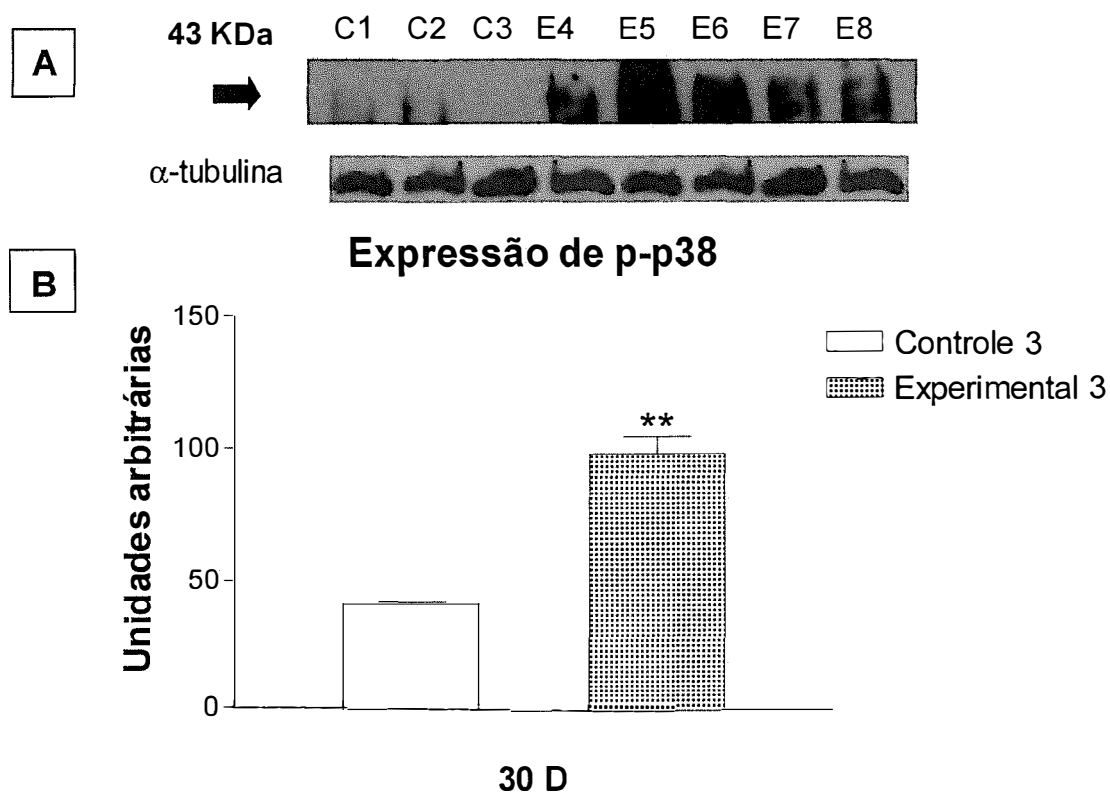


Figura 57 - Expressão da MAPK p-p38 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos CONTROLE 3 (Sacarose 2%) (bandas 1 a 4) e EXPERIMENTAL 3 (Losartan + sacarose 2%) (bandas 5 a 8). **(A)** A análise da densidade das bandas de 43 KDa mostrou um aumento significativo na expressão da MAPK p-p38 no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo EXPERIMENTAL 3. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; ** $p < 0,01$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

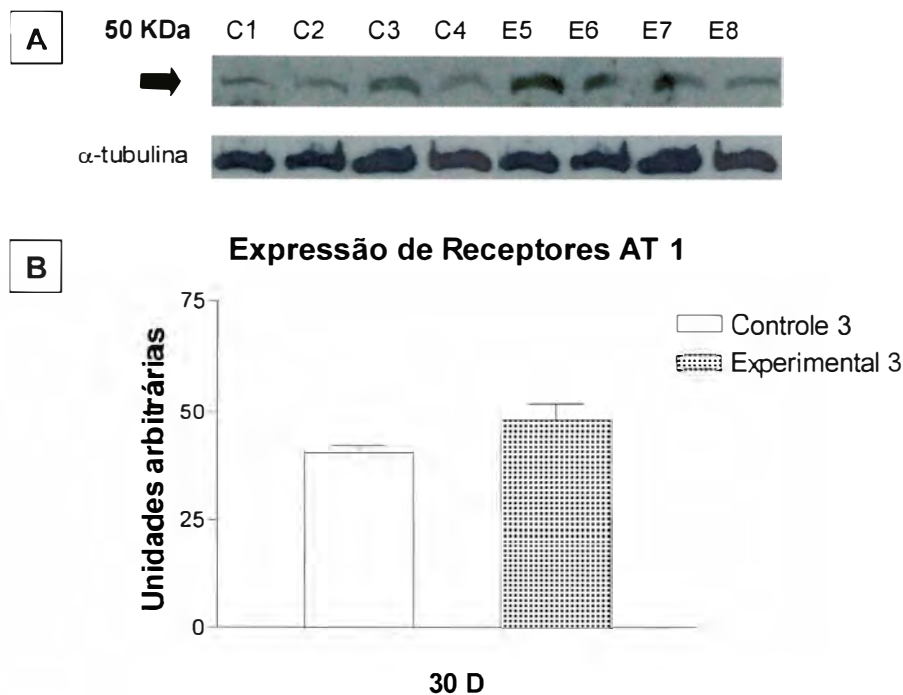


Figura 58 - Expressão de receptores AT 1 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos **CONTROLE 3** (Sacarose 2%) (bandas 1 a 4) e **EXPERIMENTAL 3** (Losartan + sacarose 2%) (bandas 5 a 8). **(A)** Não houve diferença significativa na expressão de receptores AT 1 entre os grupos analisados **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM (Teste t com correção de Welch).

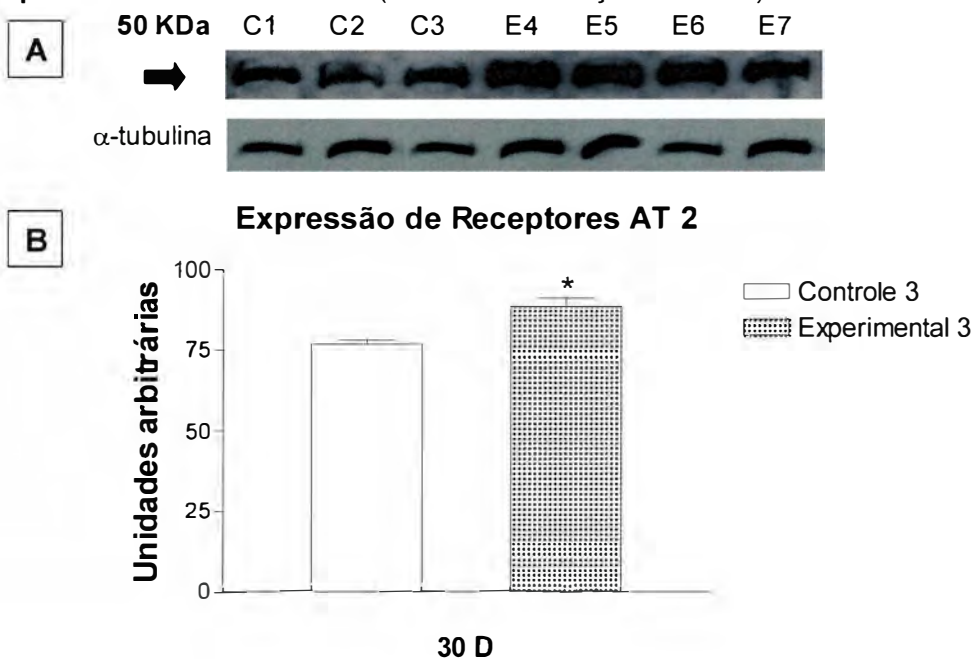


Figura 59 - Expressão de receptores AT 2 avaliada por *Western blot*, no córtex renal dos animais de 30 dias dos grupos **CONTROLE 3** (Sacarose 2%) (bandas 1 a 3) e **EXPERIMENTAL 3** (Losartan + sacarose 2%) (bandas 4 a 7). **(A)** A análise da densidade das bandas de 50 KDa mostrou um aumento significativo na expressão de receptores AT 2 no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo **EXPERIMENTAL 3**. **(B)** Os dados são expressos como Média \pm EPM; * $p < 0,05$ (vs Controle de mesma idade) (Teste t com correção de Welch).

Estudo 1 - Influência da dieta com elevado conteúdo de sal durante a gestação e amamentação no desenvolvimento renal pós-natal dos filhotes.

Diversos estudos têm mostrado que os rins de ratos recém-nascidos, ainda não estão totalmente desenvolvidos. O desenvolvimento glomerular só se completa em torno da 3 ou 4ª semana após o nascimento (Nigam et al, 1996). Reeves e colaboradores observaram glomérulos em diferentes fases de desenvolvimento, em animais de 1 e 7 dias de idade. Os glomérulos imaturos como as formações em vesículas e as formações em S, as quais neste estágio de desenvolvimento são avasculares, são encontradas predominantemente em regiões mais superficiais do córtex renal (área subcapsular ou zona nefrogênica) (Nigam et al, 1996; Reeves et al, 1978). Os nossos resultados de análise histológica, evidenciaram a presença de glomérulos em diferentes fases de evolução no córtex renal dos animais de 1 e 7 dias de idade, enquanto que os animais de 15 e 30 dias apresentaram os glomérulos em fase final de diferenciação.

Os resultados da imunorreação para α -SM-actina, uma proteína do citoesqueleto, evidenciaram uma reação intensa nos compartimentos glomerular e tubulointerstitial dos animais de 1 e 7 dias de idade. A expressão dessa proteína reduziu durante o processo de desenvolvimento renal, sendo que nos animais de 15 e 30 dias, a expressão de α -SM-actina se restringiu às paredes dos vasos e não diferia da observada em animais adultos. Esses resultados mostram que durante a fase de formação dos glomérulos, ocorre ativação das células mesangiais e fibroblastos intersticiais. O aumento na expressão de fibronectina e células PCNA positivas no córtex renal dos animais de 1 e 7 dias observado nesse trabalho, confirmam essa hipótese. A presença de reação para α -SM-actina nas células mesangiais e fibroblastos está relacionada com a transformação dessas células em miofibroblastos que são células potencialmente capazes de proliferarem e produzirem mais colágeno e outros componentes da MEC (Igotz et al, 1987; Johnson et al, 1991; Meguid El-Nahas et al, 1996). Em algumas situações patológicas, a expressão dessa proteína pode aumentar no córtex renal, e este aumento tem sido relacionado com a progressão da doença renal para fibrose

(Johnson et al, 1991, Alpers et al, 1992; Makino et al, 1996; Naruse et al, 1998; Naruse et al, 1999).

As imunorreações para PCNA e fibronectina evidenciaram aumento do número de células PCNA positivas e da expressão dessa proteína nos animais de 1 e 7 dias e uma redução com o desenvolvimento renal, sendo bastante discreta no córtex renal dos animais de 15 e 30 dias. Alguns estudos relatam um número elevado de células PCNA positivas na zona nefrogênica, durante os primeiros estágios da diferenciação glomerular epitelial, onde virtualmente todas as células das vesículas e dos glomérulos em forma de S estão se replicando ativamente (Marquez et al, 2002). Estudos de imunohistoquímica realizados com anticorpos anti-PCNA revelaram que esses anticorpos são capazes de identificar células na fase de divisão, além disso foi observada uma correlação significativa entre os índices de proliferação celular obtidos com anticorpos anti-PCNA e aqueles obtidos com anticorpos anti-BRDU, cuja expressão se restringe a fase S do ciclo celular (Coltrera et al, 1991; Weigerber et al, 1993; Connolly et al, 1993; Van Dierendonck et al, 1991; Lardelly et al, 1994).

A nefrogênese é regulada por fatores de crescimento (polipeptídeos), moléculas de adesão e componentes da MEC (Avner et al, 1990; Brenner et al, 1990; Wartiovaara et al, 1979). A formação da matriz representa um dos eventos chave na diferenciação dos glomérulos, seus principais componentes são: colágenos tipos III e IV, fibronectina, lamininas e proteoglicanas. A fibronectina é uma glicoproteína capaz de interagir com outras proteínas da matriz e proteínas associadas a células, podendo induzir modificações na adesão e migração celulares (Thiery et al, 1989; Yamada et al, 1991). Nos rins de animais adultos, a fibronectina está presente em todas as áreas intersticiais de nefros maduros assim como nos glomérulos (região mesangial) (Laitinen et al, 1991). No rim embrionário, durante a diferenciação mesenquimal e desenvolvimento epitelial de nefros maduros, ocorrem mudanças na localização e distribuição dessa glicoproteína (Laitinen et al, 1991; Wartiovaara et al, 1979). Nossos resultados evidenciaram que a expressão de fibronectina glomerular, é maior nos animais controles de 1 e 7 dias durante a diferenciação dos glomérulos.

A ativação de células mesangiais e fibroblastos durante a glomerulogênese pode estar sendo determinada pelo aumento da produção renal de All e/ou TGF- β (Kagami et al, 1994). Foi demonstrado em estudos anteriores que esses polipeptídeos são capazes de induzir modificações do fenótipo e da função das células renais e extrarrenais (Ignotz et al, 1987; Meguid El-Nahas et al, 1996). O aumento da expressão renal de angiotensinogênio, renina, ECA e receptores de All durante o desenvolvimento renal fetal e da vasculatura renal, sugere uma participação importante do SRA no processo de nefrogênese (Wallace et al, 1980; Wilson et al, 1996; Kotchen et al, 1972; Fiselier et al, 1983; Dzau et al, 1988; Olson et al, 1990; Gómez et al, 1989). Os resultados dos nossos estudos de imunohistoquímica evidenciaram um aumento da imunorreação para All nos animais de 1 e 7 dias de idade. O número de células All positivas foi maior nos compartimentos glomerular e tubulointersticial desses animais diminuindo durante o desenvolvimento renal. Nos animais de 15 e 30 dias, a expressão de All se restringiu ao aparelho justaglomerular. Esses achados mostram a presença de uma relação temporal entre a intensidade da expressão renal de All e a de α -SM-actina, fibronectina e PCNA, evidenciando a participação do SRA no desenvolvimento renal desses animais. Ray e colaboradores, adicionando All em cultura de células mesangiais fetais de humanos, observaram um aumento dose e tempo-dependentes na síntese de DNA bem como um aumento do número de células. Esse efeito mitogênico foi prevenido por antagonistas de receptores de All (Ray et al, 1991). Johnson e colaboradores observaram que após administração de All a ratos normais, ocorria um aumento da expressão de α -SM-actina, PCNA e colágeno IV nos compartimentos glomerular e tubulointersticial. Essas alterações estavam associadas com a presença de infiltrado inflamatório intersticial no córtex renal desses animais (Johnson et al, 1992).

A All pode estimular a produção de MEC pelas células mesangiais em cultura, pela indução do aumento na produção de TGF- β (Kagami et al, 1994). Experimentos anteriores realizados nesse laboratório mostraram que a produção renal de TGF- β está aumentada em ratos recém-nascidos quando comparados aos controles (Coimbra et al, 1994). Essa citocina influencia a proliferação e diferenciação de

vários tipos de células, e estimula a síntese de diversos componentes da MEC, tais como colágeno, fibronectina (Roberts et al, 1992; Igotz et al, 1987; Lyons et al, 1990; Rizzino et al, 1988; Roberts et al, 1990; Sporn et al, 1987; Coimbra et al, 1991) e proteoglicanas (Border et al, 1990) por fibroblastos, células mesangiais e epiteliais e além disso reduz a degradação da MEC (Edwards et al, 1987).

As ratas de 1 dia de mães submetidas à sobrecarga de salina durante o período de gestação e amamentação apresentaram uma redução na expressão de α -SM-actina tubulointersticial, fibronectina e PCNA glomerulares, quando comparadas aos animais controles de mesma idade. Essas alterações estavam associadas com uma redução da expressão de All no córtex renal desses animais. O número de células All positivas nos dois compartimentos, glomerular e tubulointersticial, dos animais de 1 e 7 dias do grupo experimental estava reduzido em relação ao do grupo controle de mesma idade. As mães que foram submetidas a elevada ingestão de sódio apresentaram aumento do volume urinário de 24 horas, bem como do volume de líquido ingerido em relação às mães controles, evidenciando um aumento do volume de líquido extracelular. A expansão de volume reduz a atividade do SRA, fato que pode estar contribuindo para as modificações na expressão de All, observadas no córtex renal dos animais de mães tratadas com salina. Não houve diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de sódio entre as mães de ambos os grupos, nem entre as osmolaridades plasmáticas das mesmas.

Tem sido observado que a inibição do SRA pela administração de inibidores da ECA ou de antagonistas de receptores AT 1 durante o desenvolvimento pós-natal em ratos, provoca anormalidades na estrutura e função renal (Friberg et al, 1994; McCausland et al, 1994). Nesse estudo, optamos por interferir no SRA, administrando salina às ratas grávidas, e constatamos que nos animais de 30 dias de idade do grupo experimental, houve um decréscimo na TFG quando comparados aos controles. Esses dados mostram que o tratamento das ratas grávidas com salina comprometeu a função renal dos animais de 30 dias do grupo experimental. Embora esses animais não tivessem apresentado redução do número de nefros funcionantes, a inibição do SRA pode estar interferindo com a fase final de

maturação dos glomérulos renais. Além disso, estes animais apresentaram níveis maiores de pressão arterial quando comparados aos controles. Estes dados demonstram que distúrbios ocorrendo durante a vida intrauterina, podem induzir alterações persistentes na biologia dos filhotes na vida adulta. Estudos anteriores demonstraram que a dieta elevada de sódio perinatal aumenta a pressão arterial e a retenção de sódio em ratos espontaneamente hipertensos (Nicolantonio et al, 1987)

O desenvolvimento renal é determinado por proliferação, diferenciação e apoptose. Existem evidências de que o sistema de MAP quinases pode participar do desenvolvimento renal (Choi et al, 2005). Omori e cols. verificaram, em estudos de immunoblot com homogenatos de rim e imunohistoquímica que ERK, p38 e MKP-1 têm sua expressão aumentada no rim embrionário. Por outro lado, JNK não foi detectado no rim dos fetos, tornando-se detectável sete dias após o nascimento, sendo mais abundante no rim adulto (40 dias). A expressão de ERK tem sido correlacionada com os processos maturacionais da nefrogênese e tubulogênese. Embora outros estudos tenham relacionado o p38 com a inibição da proliferação e indução de apoptose, Omori e cols constataram que a ativação do p38 estava mais relacionada com a proliferação, do que com apoptose em rins embrionários de ratos (Omori et al, 2000). Hida e colaboradores verificaram em cultura de células metanéfricas que a expressão de p38 e ERK estavam aumentadas no rim embrionário, sendo que o p38 é expresso de forma difusa e regular no rim embrionário (Fisher et al, 2001; Hida et al, 2002). Os resultados dos nossos estudos mostram que a expressão de p-ERK e p-p38 é maior no início do desenvolvimento renal pós-natal e diminui no decorrer deste processo, sugerindo que as MAP quinases p-ERK e p-p38 podem estar envolvidas com proliferação e diferenciação celular, contribuindo para o desenvolvimento renal. A expressão de p-JNK permaneceu elevada no córtex renal dos animais durante o desenvolvimento renal, não apresentando diferenças em relação aos animais de 30 dias.

Muitos dos efeitos da All são mediados pela cascata de MAP quinases (Kim et al, 1998; Kubo et al, 2001). Estudos realizados com cultura de células musculares lisas vasculares, mostraram que a All induz proliferação dessas células por ativar as vias ERK e JNK (Deguchi et al, 1999). Kim e cols no modelo de lesão arterial

verificaram que tanto os antagonistas de receptores AT1 como os inibidores da ECA reduzem significativamente a ativação de JNKs, evidenciando a relação entre AII e a ativação de MAP quinases (Kim et al, 1998). No nosso trabalho, verificamos que a interferência na atividade do SRA realizada pela administração de solução salina às ratas grávidas, provocou redução na expressão de p-ERK nos compartimentos glomerular e tubulointerstitial e na expressão de p-p38, no início do desenvolvimento renal pós-natal, ocorrendo portanto, uma associação temporal entre estas alterações e um menor número de células AII positivas presentes nestes compartimentos. Além disso, a expressão de p-p38 e p-JNK foi maior no córtex renal dos animais de 30 dias do grupo experimental quando comparados aos controles. O aumento da expressão dessas MAP quinases estava associado com o maior número de células apoptóticas no córtex renal destes animais, sugerindo que as MAP quinases p-p38 e p-JNK devem estar envolvidas com apoptose observada nas fases mais tardias do desenvolvimento renal. Essas alterações podem estar relacionadas com a redução da função renal observada nesses animais, e sugerem que devam estar ocorrendo modificações na fase de maturação dos glomérulos renais. Ying e colaboradores tratando ratos Sprague-Dawley de 28 dias de idade com dietas variadas em conteúdo de sal, constataram que dietas com 3% de sal são capazes de ativar a expressão das MAP quinases p-p38 e p-ERK (Ying et al, 2002).

Vários tipos de receptores de AII têm sido identificados em diferentes tecidos de mamíferos (Kambayashi et al, 1993; Mukoyama et al, 1993; Murphy et al; 1991), porém a maioria das ações da AII são mediadas pelos receptores AT 1 (Chiu et al, 1991; Gomez et al, 1994; Wong et al, 1992). Recientemente foi demonstrado que a expressão do gene para receptores AT1 (subtipo predominante no rim), é *upregulated* pela baixa ingestão de sódio (Du et al, 1995; Wang et al, 1997), sugerindo que a expressão desse tipo de receptor está relacionada com a homeostase de água e sal. As mudanças na densidade de receptores AT1 induzidas pela depleção de sódio foram associadas às mudanças nos níveis de RNAm para esses receptores, evidenciando um aumento da produção de receptores AT 1 nessa condição. Foi também demonstrado que a densidade de receptores para AII no túbulo proximal está aumentada com a depleção de sódio e que diminui com a

sobrecarga de sal (Douglas et al, 1987). Nos estudos de *Western blot*, observamos diminuição na expressão de receptores AT 1 e aumento na expressão de receptores AT 2 no córtex renal dos animais de 1 e 30 dias do grupo experimental quando comparados aos controles de mesma idade. Portanto, tanto a redução da expressão dos receptores AT1 como o aumento dos receptores AT2 podem estar contribuindo para as alterações observadas nos estudos de imunohistoquímica, na função renal e na pressão arterial desses animais.

A análise morfométrica realizada no córtex renal dos animais de 30 dias, cujas mães receberam sobrecarga de sal, não evidenciou alterações significativas na área glomerular, nem no número de glomérulos por campo. No entanto, as alterações observadas tanto na proliferação celular, citoesqueleto e matriz extracelular como nas expressões das MAP quinases, podem estar relacionadas à diminuição na expressão de receptores AT 1 e aumento de AT 2. A falta de estimulação do receptor AT 1 pode interferir com o balanço entre proliferação/apoptose através de diferentes vias (Nilsson et al, 2000 e 2003) provocando alterações no desenvolvimento renal.

Concluindo, os nossos resultados mostram que o aumento da ingestão de sódio durante o período de gestação e amamentação, provoca alterações na expressão de α -SM-actina, fibronectina e PCNA e no número de células em apoptose no córtex renal dos animais recém-nascidos. Essas alterações devem estar relacionadas com as modificações das expressões das MAP quinases (p-ERK, p-JNK e p-p38), AII e dos receptores AT 1 e AT 2 observadas nesses animais.

Estudos 2 e 3- Influência da exposição ao Losartan durante a gestação e amamentação ou somente na amamentação no desenvolvimento renal pós-natal dos filhotes

Vários estudos têm mostrado que o tratamento materno durante a gravidez com antagonistas de receptores AT 1, resulta em anormalidades renais irreversíveis como dilatação da pelve renal, edema das papilas renais, inflamação renal crônica nos filhotes e, sua administração prolongada pela lactação provoca elevados índices de mortalidade fetal (Spence et al, 1995). Os resultados dos nossos estudos histológicos mostram que o tratamento com losartan realizado durante a gestação e amamentação ou só no período de amamentação, provoca alterações importantes na estrutura renal dos filhotes como dilatação e atrofia tubular e expansão do compartimento intersticial detectadas no 15^o e 30^o dias após o nascimento. A mortalidade dos filhotes foi também bastante elevada (48%), principalmente a partir de 15 dias de idade nos animais do Estudo 2 (filhotes de mães tratadas com losartan durante a gestação e amamentação). Alterações semelhantes às descritas no nosso estudo também foram detectadas por diferentes autores, quando inibidores da ECA ou antagonistas de AT 1 eram administrados durante o período pós-natal (Friberg et al, 1994; McCausland et al, 1994; Tufro-McReddie et al, 1995; McCausland et al, 1996). Hilgers e colaboradores constataram que o desenvolvimento renal está mais susceptível aos efeitos do bloqueio do SRA principalmente durante os últimos 5 dias de gestação e as duas primeiras semanas de vida pós-natal (Hilgers et al, 1997).

Os resultados dos nossos estudos de imunohistoquímica evidenciaram aumento das expressões de α -SM actina, fibronectina e PCNA no córtex renal dos filhotes que persistiu durante o desenvolvimento, sendo constatado também nos animais de 30 dias de idade. Essas alterações foram mais evidentes no compartimento tubulointersticial nas áreas lesadas. A expressão de α - SM actina, uma proteína do citoesqueleto, é mais intensa nos glomérulos e capilares peritubulares durante o início do desenvolvimento renal pós-natal, e se restringe às paredes das artérias e arteríolas quando a maturação dessas estruturas está completa. No córtex renal de animais adultos, sua expressão se restringe às paredes

dos vasos (Johnson et al, 1991; Tufro-McReddie et al, 1994). Tem sido demonstrado que as células mesangiais, tubulares e intersticiais expressam sob condições patológicas, a proteína α -SMA e algumas proteínas de filamentos intermediários e, tornam-se capazes de proliferar e produzir mais colágeno e outros elementos da MEC (Ignotz et al, 1987; Johnson et al, 1991; Meguid El Nahas et al, 1996). Portanto, a ativação de células mesangiais e intersticiais deve estar contribuindo para proliferação celular, produção de matriz com alargamento do espaço intersticial, levando a dilatação e atrofia tubular. Essas alterações podem evoluir para fibrose renal com perda progressiva da função renal (Eddy et al, 1996; Eddy et al, 2000). Chen e colaboradores verificaram após a administração de losartan por dois dias em filhotes recém-nascidos, uma *down-regulation* de genes que codificam componentes do citoesqueleto e da MEC, o que pode levar a uma formação inadequada da MEC e distúrbios nas interações célula-célula e célula-matriz (Chen et al, 2004).

Embora não seja possível identificar o(s) fator(es) e o(s) possíveis mecanismos responsáveis pelo aumento de miofibroblastos nos animais submetidos a exposição ao losartan no período pré-natal, é possível que o aumento da expressão dos receptores AT2 associado com uma maior produção de Ang II durante o desenvolvimento renal, possa estar contribuindo para isso. Foi demonstrado que ativação das vias de MAP quinases pode ocorrer através de receptores AT2 (Kumar et al, 2004). O desbalanço observado nesse estudo entre as expressões dos receptores de Ang II, isto é aumento da expressão de receptores AT2 e redução de receptores AT1, pode ser responsável pelo menos em parte, por essas alterações observadas na estrutura renal. Os animais de 30 dias dos Estudos 2 e 3 apresentaram também alterações importantes na excreção urinária de albumina, além de diminuição na área glomerular e aumento da área intersticial relativa. Essas alterações também foram observadas por Barros e colaboradores, acompanhando filhotes de ratas tratadas com losartan durante a amamentação até 2 e 8 meses de idade. Os autores verificaram aumento da taxa de excreção urinária de albumina, aumento na infiltração de macrófagos e na área intersticial relativa do córtex renal. Observaram também, que filhotes de mães tratadas com losartan durante a amamentação, apresentavam nefropatia de caráter progressivo. Contudo, os

mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento e progressão da injúria renal precisam ainda ser esclarecidos (Barros et al, 2005).

O rim pode acumular ou seqüestrar All da circulação via endocitose mediada por receptores AT 1, além de produzir All a partir de substratos sistêmicos ou formados endogenamente, (Zhuo et al, 2002; Ingert et al, 2002; van Kats et al, 2001; Sadjadi et al, 2002; Thomas et al, 1996), em condições nas quais os níveis de All circulantes estão elevados e originam aumento dos níveis renais de All (Navar et al, 2001; Navar et al, 2002). Nos nossos estudos, a avaliação imunohistoquímica para All pode estar marcando também células onde a All se ligou a receptores AT 1 e este complexo foi internalizado, com isso o tratamento com antagonista de AT 1 diminuiu este processo em relação ao controle de mesma idade, o que pode ser constatado através do número de células All positivas reduzidas no córtex renal dos animais de 7 e 15 dias do grupo experimental 2 e 3 em relação aos respectivos controles.

Os estudos de *Western blot* que realizamos para avaliar a expressão de receptores AT 1 e AT 2, evidenciaram redução na expressão de receptores AT 1 e aumento na expressão de AT 2 no córtex renal dos animais de 1 e 30 dias do grupo experimental 2 e aumento de AT 2 nos animais experimentais do estudo 3, quando comparados aos controles. Esses dados estão de acordo com Johren e colaboradores que verificaram que o bloqueio de AT 1 aumenta os níveis plasmáticos de All, provocando aumento na expressão de AT2 (Johren et al, 2004), fato que poderia explicar pelo menos em parte, os resultados obtidos no nosso estudo.

O crescimento renal durante a nefrogênese é caracterizado por ativa proliferação celular, acompanhada por apoptose em grande escala (Coles et al, 1993). O bloqueio do receptor AT 1 pode interferir com o balanço entre proliferação/apoptose através de diferentes vias (Nilsson et al, 2000; Nilsson et al, 2003). Esse desequilíbrio pode estar ocorrendo no nosso modelo, pois verificamos também um aumento no número de células apoptóticas no córtex renal dos animais de 15 dias do grupo experimental 2 quando comparados aos respectivos controles. Esse aumento no número de células apoptóticas pode estar associado tanto à

redução na expressão de AT1 como ao aumento na expressão de AT2 no córtex renal desses animais. Akil e colaboradores após o bloqueio pré-natal de receptores AT 1 com losartan, constataram inibição do crescimento, atraso na maturação dos nefros, aumento da imunorreatividade para TGF- β , espessamento aumentado da membrana basal glomerular, bem como aumento da apoptose em estruturas tubulares em desenvolvimento (Akil et al, 2005). Em alguns modelos experimentais foi constatado que a proteinúria persistente é capaz aumentar a expressão de receptores AT 2 e levar a apoptose de células tubulares proximais (Tejera et al, 2004).

A expressão da MAP quinase p-JNK foi elevada durante todo o processo de desenvolvimento renal pós-natal nos glomérulos, mas reduziu no compartimento tubulointersticial durante este processo nos animais controles, diferente do observado por Omori e cols. Contudo, a expressão de p-JNK foi maior no compartimento tubulointersticial dos animais experimentais de 30 dias (Estudos 2 e 3) quando comparados aos controles de mesma idade. A expressão da MAP quinase p-p38 foi também maior no córtex renal dos animais de 1 dia do grupo experimental 2. A participação do JNK e p38 na embriogênese tem sido bastante investigada. A inibição de SEK 1, um ativador de p38 e JNK, resulta em morte embrionária antes do 14º dia de gestação (Yang et al, 1997, Ganiatsas et al, 1998). Estudos realizados com cultura de células musculares lisas vasculares, mostraram que a AII induz proliferação dessas células por ativar as vias ERK e JNK (Deguchi et al, 1999). Kim e cols no modelo de lesão arterial verificaram que tanto o antagonismo de receptores AT1 como a inibição da ECA, inibia significativamente a ativação de JNKs, confirmando a relação entre AII e a ativação de MAP quinases (Kim et al, 1998). Existem várias evidências de que o sistema de MAP quinases pode participar do desenvolvimento renal. Choi e colaboradores após realizarem o tratamento de ratos recém-nascidos com enalapril por 7 dias, observaram que as expressões de p-JNK 2 e p38 estavam aumentadas no rim dos animais tratados, além disso constataram aumento no número de células apoptóticas no mesmo período. No entanto, não encontraram alterações na expressão de p-ERK (Choi et al, 2005). No nosso estudo, verificamos um aumento significativo na expressão de p-ERK nos compartimentos

glomerular (Estudo 2 e 3) e tubulointerstitial (Estudos 2) dos animais experimentais de 30 dias em relação aos controles de mesma idade.

Concluindo, o tratamento com losartan durante a gestação e amamentação (Estudo 2) ou somente durante a amamentação (Estudo 3) provocou aumento na proliferação celular, de componentes da MEC, do citoesqueleto e no número de células em apoptose. Estas alterações foram acompanhadas por redução no número de células All positivas, diminuição na expressão de receptores AT 1 e aumento de AT 2 e também modificações importantes na estrutura renal que levaram à redução da TFG nos animais do Estudo 3. Existem algumas evidências experimentais mostrando que, para ocorrer o processo de desenvolvimento renal normal, faz-se necessário um equilíbrio entre as expressões de receptores AT 1 e AT 2. A All regula o crescimento, apoptose e diferenciação celular via receptores AT 2. Estes receptores podem contrabalançar os efeitos estimuladores de crescimento da All que são mediados por receptores AT1 aumentando a apoptose e/ou inibindo o crescimento e diferenciação celular (Johren et al, 2004). Portanto, a ativação inadequada desses receptores na presença de níveis renais elevados de All durante o desenvolvimento renal, podem levar a modificações na expressão das MAP quinases interferindo dessa forma no desenvolvimento renal pós-natal. A consequência disso é o aparecimento de modificações importantes na estrutura renal que podem levar a fibrose com perda progressiva da função renal.

VIII - Referências Bibliográficas

AKIL, I.; INAM, S.; GURCU, B.; NAZIKOGLU, A; OZBILGIN, K.; MUFTUOGLU, S. Histopathological and ultrastructural effects of Losartan on embryonic rat kidney. *Acta Histochemica*. 107 (4): 291-30, 2005.

AKHURST, R.J.; LEHNERT, S.A.;FAISNER, A.; DUFFIE, E. TGF- β in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development*, 108 (4): 645-656, 1990.

ALPERS, C.E.; SEIFERT, R.A.; JOHNSON, R.J.; BOWEN-POPE, D.F. Developmental patterns of PDGF B chain, PDGF receptor and α -actin expression in human glomerulogenesis. *Kidney Int*. 42: 390-399, 1992.

AVNER, E.D. AND SWEENEY, W.E. Polypeptide growth factors in methanephric growth and segmental nephron differentiation. *Pediatr. Nephrol*. 4: 372-377,1990.

BAGBY, S.P.; HOLDEN, W. Angiotensin II stimulates proliferation of aortic endothelial cells (abstract). *Clin. Res*. 36: 259, 1988.

BARROS, E.P.; TELES, F.; MALHEIROS, D.M.A.C.; ZATZ, R.; FUJIHARA, C.K. Characterization of a model of progressive nephropathy based on losartan treatment during lactation. *J. Am. Soc. Nephrol*. 16: 183A, TH-PO292, 2005.

BAUN, M.; QUIGLEY, R.: Postnatal Renal Development in Seldin, D.W.; Giebisch, G. *The kidney: Physiology and Pathology*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2000.

BOKEMEYER, D., OSTENDORF, T., KUNTER, U., LINDEMANN, M., KRAMER, H.J. & FLOEGE, J. Differential activation of mitogen-activated protein kinases in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol*. 11: 232-240, 2000.

BORDER, W.A.; OKUDA, S.; LANGUINO, L.R.; RUOSLAHTI, E. Transforming growth factor- β regulates production of proteoglycans by mesangial cells. *Kidney Int.* 37: 689-695, 1990.

BORDER, W.A.; NOBLE, N.A. Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N. Engl. J. Med.* 10:1286-1292,1994.

BRENNER, B.M. Determinants of epithelial differentiation during early nephrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1: 127-139,1990.

CAMPBELL-BOSWELL, M.; JR, A.L.R. Effects angiotensin II and vasopressin on human smooth muscle cells in vitro. *Exp. Mol. Pathol.* 35: 265-276, 1981.

CAREY, A.V.; CAREY, R.M.; GOMEZ, R.A. Expression of alpha-smooth muscle actin in the developing kidney vasculature. *Hypertension.* 19: II 168, 1992.

CHIU, A.T.; ROSCOE, W.A.; MCCALL, D.E.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. Angiotensin II-1 receptors mediate both vasoconstrictor and hypertrophic responses in rat aortic smooth muscle cells. *Receptor* 1: 133-140, 1991.

CHARBIT, M.; DÉCHAUX, M.; BLAZY, I. *et al.* Deleterious effects of inhibition of the renin-angiotensin system in neonatal rats. *Pediatr. Nephrol.* 9: 303-308, 1995.

CHEN, Y.; LASAITIENE, D.; GABRIELSSON, B.G.; CARLSSON, L.M.S.; BILLIG, H.; CARLSSON, B.; MARCUSSEN, N.; SUNG, X-F.; FRIBERG, P. Neonatal Losartan treatment suppresses renal expression of molecules involved in cell-cell and cell-matrix interactions. *J. Am. Soc. Nephrol.* 15: 1232-1243, 2004.

CHOI, B.M.; YOO, K.H.; BAE, I.S.; OH, M.H.; HONG, Y.S.; LEE, J.W.; KIM, S.K. Angiotensin II-converting enzyme inhibition modulates Mitogeni-Activated Protein

Kinase family expressions in the neonatal rat kidney. *Pediatr. Research*. 57 (1): 115-123, 2005.

CIUFFO, G.M.; VISWANATHAN, M.; SELTZER, A.M.; TSUTSUMI, K.; SAAVEDRA, S.M. Glomerular angiotensin II receptor subtypes during development of rat kidney. *Am. J. Physiol*. 265: F264-F271, 1993.

COIMBRA, T.M.; WIGGINS, R.C.; NOH, J.W.; MERRITT, S.; PHAN, S.H. Transforming growth factor- β production in antiglomerular basement disease in the rabbit. *Am. J. Pathol*. 138: 223-234, 1991.

COIMBRA, T.M.; SILVA, C.G.A.; LACHAT, J.J. Renal transforming growth factor beta 1 production in neonate rats. *Cell. Prolif*. 27: 669-675, 1994.

COLES, H.S., BURNE, J.F., RAFF, M.C. Large-scale normal cell death in the developing rat kidney and its reduction by epidermal growth factor. *Development*. 118: 777-784, 1993.

COLTRERA, M.D. & GOWN, A.M. PCNA/ Cyclin expression and BRDU uptake define different subpopulations in different cell lines. *J. Histochem. Cytochem*. 39: 23-30, 1991.

CONNOLLY, K.M. & BOGDANFLY, M.S. Evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as an endogenous marker of cell proliferation in rat liver: a dual stain comparison with 5-bromo-2 deoxyuridine. *J. Histochem*. 41: 1-6, 1993.

DEGUCHI, J.; MAKUUCHI, M.; NAKAOKA, T.; COLLINS, T.; TAKUWA, Y. Angiotensin II stimulates platelet-derived growth factor-B chain expression in newborn rat vascular smooth muscle cells and neointimal cells through Ras, extracellular signal-regulated protein kinase, and c-Jun N-terminal protein kinase mechanisms. *Circ. Res*. 85 (7):565-74, 1999.

DOUGLAS, J.G. Angiotensin receptor subtypes of the kidney cortex. *Am. J. Physiol.* 253: F1-F7, 1987.

DU, Y.; YAO, A.; GUO, D.F.; INAGAMI, T.; WANG, D.H. Differential regulation of angiotensin II receptors subtypes in rat kidney by low dietary sodium. *Hypertension.* 25: 872-877, 1995.

DZAU, V.J.; BURT, D.W.; PRATT, R.E. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Am. J. Physiol.* 255: F563- F573, 1988.

EDDY, A.A. Expression of genes that promote renal interstitial fibrosis in rats with proteinuria. *Kidney Int Suppl.* 54:S49-54. Review, 1996.

EDDY, A.A. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol.* 15 (3-4):290-301. Review, 2000.

EDWARDS, D.R.; MURPHY, G.; REYNOLDS, J.J.; WITHAM, S.E.; DOCKERTY, A.J.P.; ANGEL, P.; HEATH, J.K. Transforming growth factor- β modulates the expression of collagen and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* 7: 1899-1904, 1987.

FERNANDEZ, L.A.; TWICKLER, J.; MEAD, A. Neovascularization produced by angiotensin II. *J. Lab. Clin. Med.* 105: 141-145, 1985.

FISELIER, T.J.W.; LYNEX, P.; MONNENS, L.; VAN MUNSTER, P.; JANSEN, M.; PEER, P. Levels of renin, angiotensin I and II, angiotensin-converting enzyme and aldosterone in infancy and childhood. *Eur. J. Pediatr.* 141: 206A, 1983.

FISHER, C.E.;MICHAEL, L.;BARNETT, M.W.; DAVIES, J.A. ERK MAP kinase regulates branching morphogenesis in the developing mouse kidney. *Development.* 128: 4329-4338, 2001.

FOGO, A.; YOSHIDA, Y.; YARED, A.; ICHIKAWA, I. Importance of angiogenic action of angiotensin II in the glomerular growth of maturing kidneys. *Kidney Int.* 38: 1068-1070, 1990.

FORCE, T., BONVENTRE, J.V. Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension.* 31: 152- 161, 1998.

FRIBERG, P.; SUNDELIN, B.; BOHMAN, S.; BOBEK, A.; NILSSON, H.; WICKMAN, A.; GUSTAFSSON, H.; PETERSEN, J.; ADAMS, M.A.. Renin- angiotensin system in neonatal rats: induction of a renal abnormality in response to ACE inhibition or angiotensin II antagonism. *Kidney Int.* 45: 485-492, 1994.

FUEHR Y, KACZMARCZK Y, KRUTTGEN GD. Eine einfache colorimetrische methode zur inulin bestimmung fur nieren clearance-untersuchungen bei stoffwechselgesunden und diabetikern. *Klin. Wochnschr.* 33: 729-730, 1955

GANIATSAS, S.; KWEE, L.; FUJIWARA, Y.; PERKINS, A; IKEDA, T.; LABOW, M.A; ZON, L.I. SEK1 deficiency reveals mitogen-activated-protein kinase cascade cross-regulation and leads to abnormal hepatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 6881-6886, 1998.

GAVRIELI Y, SHERMAN Y, BEN-SASSON SA. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119 (3): 493-501, 1992.

GEISTERFER, A.A.T.; PEACH, M.J.; QUEENS, G.K. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ. Res.* 62: 749-756, 1998.

GOMEZ, R.A.; LYNCH, K.R.; STURGILL, B.C.; ELWOOD, J.P.; CHEVALIER, R.L.; CAREY, R.M.; PEACH, M.J. Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am. J. Physiol.* 257: F850-F858, 1989.

GOMEZ, R.A.; TUFRO-MCREDDIE, A.; EVERETT, A.D.; PENTZ, E.S. Ontogeny of renin and AT1 receptor in the rat. *Pediatr. Nephrol.* 7: 635-638, 1993.

GOMEZ, R.A. Angiotensin II receptors: relevance in development and disease states. *Exp. Nephrol.* 2: 259-268, 1994.

GRADY, E.F.; SECHI, L.A.; GRIFFIN, C.A.; SCHAMBERLAN, M.; KALINYAK, J.E. Expression of AT2 receptors in the development rat fetus. *J. Clin. Invest.* 88: 921-933, 1991.

HALL, P.A.; LEVISON, D.A.; WOODS, A.L.; YU CC, KELLOCK, D.B.; WATKINS, J.A.; BARNES, D.M.; GILLETT, C.E.; CAMPLEJOHN, R.; DOVER, R. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: the index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* 162: 285-294, 1990.

HAMAGUCHI, A., KIM, S., IZUMI, Y., ZHAN, Y., YAMANAKA, S. & IWAO, H. Contribution of extracellular signal-regulated kinase to angiotensin II-induced transforming growth factor- β 1 expression in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 34: 126- 131, 1999.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48, p.422-427, 1972.

HAYGEN, H.N. The determination of "endogenous creatinine" in plasma and urine. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 5, p. 48-57, 1953.

HEINE, U.I.; MUNOZ, E.F.; FLANDERS, K.C.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Colocalization the TGF- β 1 and collagen I and III, fibronectin and glucosaminoglycans during lung branching morphogenesis. *Development*. 109 (1): 29-36, 1990.

HIDA, M.; OMORI, S.; AWAZU, M. ERK and p38 MAP kinase are required for rat renal development. *Kidney Int*. 61: 1252-1262, 2002.

HILGERS, K.F.; NORWOOD, V.F.; GOMEZ, R.A. Angiotensin's role in renal development. *Semin. Nephrol*. 17(5): 492-501, 1997.

HILL, C.S; TREISMAN, R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 80: 199- 211, 1995.

HOMMA, T.; HOOVER, R.L.; ICHIKAWA, I; HARRIS, R.C. Angiotensin II induces hypertrophy and stimulates collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. *Clin. Res*. 38: 358A, 1990.

HORIUCHI, M., AKISHITA, M., DZAU, V.J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. *Hypertension*. 33: 613-621, 1999.

IGNOTZ, R.A.; ENDO, T.; MASSAGÉ, J. Regulation fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem*. 262: 6443-6446, 1987.

INGERT, C.; GRIMA, M; COQUARD, C.; BARTHELMEBS, M.; IMBS, J.L.. Contribution of angiotensin II internalization to intrarenal angiotensin II levels in rats. *Am. J. Physiol. Renal*. 283: F1003-F1010, 2002.

JOHNSON, R.J.; ILDA, H.; ALPERS, C.E.; MAJESKY, M.W.; SCHWARTZ, S.M. Expression of smooth cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. *J.Clin. Invest*. 87: 847-858, 1991.

JOHNSON, R.J.; ALPERS, C.E.; YOSHIMURA, A.; LOMBARDI, D.; PRITZL, P.; FLOEGE, J.; SCHWARTZ, S.M. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension*. 19 (5):464-74, 1992.

JOHREN, O.; DENDORFER, A.; DOMINIAK, P. Cardiovascular and renal function of angiotensin II type - 2 receptors. *Cardiovascular*. 62: 460-467, 2004.

KAGAMI, S.; BORDER, W.A.; MILLER, D.E.; NOBLE, N.A. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 93 (6): 2431-2437, 1994.

KAKUCHI, J.; ICHIKI, T.; KIYAMA, S.; HOGAN, B.L.; FOGO, A.; INAGAMI, T.; ICHIKAWA, I. Developmental expression of renal angiotensin II receptor genes in mouse. *Kidney Int.* 47: 140-147, 1995.

KAMBAYASHI, Y.; BARDHAN, S.; TAKAHASHI, K.; TSUZUKI, S.; INUI, H.; HAMAKUBO, T.; INAGAMI, T. Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* 268: 24543-24546, 1993.

KIM, S., IZUMI, Y., YANO, M., HAMAGUCHI, A., MIURA, K., YAMANAKA, S., MIYASAKI, H. & IWAO, H. Angiotensin blockade inhibits activation of mitogen-activated protein kinases in rat balloon-injured artery. *Circulation*. 97: 1731- 1737, 1998.

KLIEM V, JOHNSON RJ, ALPERS CE, YOSHIMURA, A.; COUSER, W.G.; KOCH, K.M.; FLOEGE, J. Mechanism involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. *Kidney Int.*, v. 49, p. 666-678, 1996.

KOSEKI, C.; HERZLINGER, D.; AL-AWQATI, Q. Apoptosis in metanephric development. *J. Cell Biol.* 119: 1327-1333, 1992.

KOTCHEN, T.A.; STRICKLAND, A.L.; RICE, T.W.; WALTERS, D.R. A study of renin-angiotensin system in newborn infants. *J. Pediatr.* 80: 938-946, 1972.

KUBO, T.; IBUSUKI, T.; CHIBA, S.; KAMBE, T.; FUKUMORI, R. Mitogen protein kinase activity regulation role of angiotensin and endothelin systems in vascular smooth muscle cells. *Europ. J. Pharmacol.* 411: 27-34, 2001.

KUMAR, D.; MENON, V.; FORD, W.R.; CLANACHAN, A.S.; JUGDUTT, B.I. Effect of angiotensin II type 2 receptor blockade on mitogen activated protein kinases during myocardial ischemia-reperfusion. *Mol. Cell Biochem.* 258 (1-2): 211-8, 2004.

LAITINEN, L.; VARTIO, T.; VIRTANEN, I. Cellular fibronectins are differentially expressed in human fetal and adult kidney. *Lab. Invest.* 64: 492-498, 1991.

LARDELLY, P.; PERENTS, E.; MEIER, G.; NAVARRO, N.; ETTLIN, R.A. Quantification of hepatocytic proliferation in the laboratory mouse. A comparative study using immunohistochemical detection of bromodeoxyuridine incorporation and proliferation cell nuclear antigen expression. *Exp. Toxicol. Pathol.* 46: 95-100, 1994.

LAURELL, C.B. Electroimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* (suppl. 124): 21-23, 1972.

LYONS, R.M.; MOSES, H.L. Transforming growth factors and the regulation of cell proliferation. *Eur. J. Biochem.* 187 : 467-473, 1990.

MaCDONALD, M.S.; EMERY, J.L. The late intrauterine and postnatal development of human renal glomeruli. *J. Anat.* 93: 331-340, 1959.

MAKINO, H.; KASHIHARA, N.; SUGYAMA, H.; KANAO, K.; SEKIKAWA, T.; OKAMOTO, K.; MAESHIMA, Y.; OTA, Z.; NAGAI, R. Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile proteins in diabetes. *Diabetes* 45: 488-495, 1996.

MARQUEZ, M.G.; CABRERA, I.; SERRANO, D.G.; SPEZIALE, N. Cell proliferation and morphometric changes in the rat kidney during postnatal development. *Anat Embryol.* 205 (5-6):431-40, 2002.

McCAUSLAND, J.E.; RYAN, G.B.; ALCORN, D. The effects of angiotensin converting enzyme inhibition on postnatal renal development in rats. *J. Hypertens.* 12(Suppl.3): 89, 1994.

McCAUSLAND, J.E.; RYAN, G.B.; ALCORN, D. Angiotensin converting enzyme inhibition in the postnatal rat results in decreased cell proliferation in the renal outer medulla. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23: 552-554, 1996.

MEGUID EL NAHAS, E.; MUCHANETA-KUBARA, C.; ZHANG, G-Z; ADAM, A. & GOUMENOS. Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. *Kidney Int.* 49: S23- S27, 1996.

MILLAN, M.A.; CARVALLO, P.; IZUMI, S-I.; ZEMEL, S.; CATT, K.J.; AGUILERA, G. Novel sites of expression of functional angiotensin II receptors in the late gestation fetus. *Science.* 244: 1340-1342, 1989.

MUKOYAMA, M.; NAKAJIMA, M.; HORIUCHI, M.; SASAMURA, H.; PRATT, R.E.; DZAU, V.J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. *J. Biol. Chem.* 268: 24539-24542, 1993.

MURPHY, T.J.; ALEXANDER, R.W.; GRIENGLING, W.W.; RUNGE, M.S.; BERNSTEIN, K.E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type- 1 angiotensin II receptor. *Nature London* 351: 233- 236, 1991.

NARUSE, K.; ITO, H.; MORIKI, T.; MIYASAKI, E.; HAYASHI, Y.; NAKAYAMA, H.; KİYOKU, H.; HIROI, M.; KURASHIGE, T.; ENZAN, H. Mesangial cell activation in the collagenofibrotic glomerulonephropathy: case report and review of the literature. *Virchows Arch.* 433: 183- 188,1998.

NARUSE, K.; FUJIEDA, M.; MIYASAKI, E.; HAYASHI, Y.; KURODA, N.; NAKAYAMA, H.; KİYOKU, H., HIROI, M.; KURASHIGE, T.; ENZAN, H. CD34 expression as a novel marker of transformed mesangial cells in biopsied glomerular diseases. *J. Pathol* 189: 105-111, 1999.

NARUSE, K.; FUJIEDA, M.; MIYASAKI, E.; HAYASHI, Y.; TOI, M.; FUKUI, T.; KURODA, N.; HIROI, M.; KURASHIGE, T.; ENZAN, H. An immunohistochemical study of developing glomeruli in human fetal kidneys. *Kidney Int.* 57: 1836-1846, 2000.

NAVAR, L.G.; MITCHELL, K.D.; HARRISON-BERNARD, L.M. Intrarenal angiotensin II augmentation in angiotensin II dependent hypertension. *Hypertens Res.* 23(4):291-301, 2001.

NAVAR, L.G.; HARRISON-BERNARD, L.M.; NISHIYAMA, A.; KOBORI, H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension.* 39: 316-322, 2002.

NICOLANTONIO RD, SPARGO S, MORGAN T.O. Prenatal high salt diet increases blood pressure and salt retention in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.* 14: 233-235, 1987.

NIGAM, S.K.; APERIA, A.C.; BRENNER, B.M. Development and maturation of the kidney. In: Brenner, B.M.; Rector, F.C. (editors): *The Kidney: Physiology and Pathology*. Philadelphia, WB Saunders, p 72-98, 1996.

NILSSON, A.B.; NITESCU, N.; CHEN, Y.; GURON, G.S.; MARCUSSEN, N.; MATEJKA, G.L.; FRIBERG, P. IGF-I treatment attenuates renal abnormalities induced by neonatal ACE inhibition. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279: R1050-R1060, 2000.

NILSSON, A.B.; FRIBERG, P.; BONQUIST, L.; LAISATIENE, D.; MARCUSSEN, N.; CHEN, Y. Growth hormone aggravates renal abnormalities induced by neonatal enalapril treatment. *Pediatr. Nephrol.* 18: 878-886, 2003.

NORWOOD, V.F.; HARRIS, J.M.; GOMEZ, R.A. Angiotensin II (All) receptors (AT-1 and AT-2) are developmentally regulated during early nephrogenesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* 5: 632A, 1994.

OLSON, AL.; PERLMAN, S.; ROBILLARD, J.E. Developmental regulation of angiotensinogen gene expression in sheep. *Pediatr. Res.* 28: 183-185, 1990.

OMORI, S., HIDA, M., ISHIKURA, K., KURAMOCHI, S., AWAZU, M. Expression of mitogen- activated protein kinase family in rat renal development. *Kidney Int.* 58: 27-37, 2000.

PELTON, R.W.; DICKINSON, M.E.; MOSES, H.L.; HOGAN, B.L.M. In situ hybridization analysis of TGF- β 3 RNA expression during mouse development: comparative studies with TGF- β 1 and β 2. *Development.* 110: 609-620, 1990.

RAY, P.E.; AGUILERA, G.; KOPP, J.B.; HORIKOSHI, S.; KLOTMAN, P.E. Angiotensin-II receptor-mediated proliferation of cultured human fetal mesangial cells. *Kidney Int.* 40: 764-771, 1991.

REEVES W.; CAULFIELD J.P.; FARQUHAR M.G. Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion and slit membranes in developing glomeruli. *Lab. Invest.* 39: 90-100, 1978.

RIZZINO, A. Transforming growth factor- β : Multiple effects on cell differentiation and extracellular matrices. *Dev. Biol.* 130: 411-422, 1988.

ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B. Transforming growth factor betas. In *Handbook of experimental pharmacology: Peptide growth factors and their receptors*. Edited by Sporn, M.B.; Roberts, A.B., Heidelberg, Springer-Verlag, vol. 95, pp 419-472, 1990.

ROBERTS, A.B.; MCCUNE, B.K.; SPORN, M.B. TGF- β : Regulation of extracellular matrix. *Kidney Int.* 41: 551, 1992.

ROMANO, L.A.; FERDER, L.; INSERRA, F.; ERCOLE, L.; GÓMEZ, R. Intraglomerular expression of α -smooth muscle actin in aging mice. *Hypertension.* 23: 889-893, 1994.

ROSENBERG, M.E.; CORREA-ROTTER, R.; PEREZ-CASTILLO, A.; HOSTETTER, T.H. Renin gene expression in the growing rat kidney (abstract). *Kidney Int.* 37: 358, 1990.

SADJADI, J.; PUTTAPARTHI, K.; WELBORN, M.B.; ROGERS, T.E.; MOE, O.; CLAGETT, G.P.; TURNAGE, R.H.; LEVI, M.; MODRALL, I.G. Upregulation of autocrine-paracrine rennin-angiotensin II systems in chronic renovascular hypertension. *J. Vasc. Surg.* 36: 386-392, 2002.

SCHMID, P.; COX, D.; BILBE, G.; MAIER, R.; MACMASTER, G.K. Differential expression of TGF- β 1, β 2 and β 3 genes during mouse embryogenesis. *Development.* 111: 117-130, 1991.

SINGHAL, P.C.; FRANKI, N.; HAYS, R.M. Angiotensin II induces actin synthesis in cultured mesangial cells. *Clin. Res.* 38: 401A, 1990.

SPENCE, S.G.; ALLEN, H.L.; CUKIERSKY, M.A.; MANSON, J.M.; ROBERTSON, R.T.; EYDELLOTH, R.S. Defining the susceptible period of developmental toxicity for the AT1 selective angiotensin II receptor antagonist Losartan in rats. *Teratology* 51: 367-382, 1995.

SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B.; WAKEFIELD, L.M.; CROMBRUGGHE, B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor beta. *J. Cell. Biol.* 105: 1039-1045, 1987.

STAMBE, C.; ATKINS, R.C.; HILL P.A., NIKOLIC-PATERSON D.J. Activation and cellular localization of the p38 and JNK MAPK pathways in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* 64: 2121-2132, 2003.

TAUBMAN, M.B.; BERCK, B.C.; IZUMO, S.; TSUDA, T.; ALEXANDER, R.W.W.; NADAL-GINARD, B. Angiotensin II induces of c-fos mRNA in aortic smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 264: 526-530, 1989.

TEJERA, N.; GOMEZ-GARRE, D.; LAZARO, A.; GALLEGO-DELGADO, J.; ALONSO, C.; BLANCO, J.; ORTIZ, A.; EJIDO, J. Persistent proteinuria up-regulates angiotensin II type 2 receptor and induces apoptosis in proximal tubular cells. *Am. J. Pathol.* 164: 1817-26, 2004.

THIERY, J.P.; DUBAND, J.L.; DUFOUR, S.; SAVAGNER, P.; IMHOF, B.A. Role of fibronectins in embryogenesis, in *Biology of Extracellular Matrix: Fibronectin*, edited by Mosher, DF, San Diego, Academic Press, Inc. pp 181-212, 1989.

THOMAS, W.G.; THEKKUMKARA, T.J.; BAKER, K.M. Molecular mechanisms of angiotensin II (AT 1a) receptor endocytosis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 23: S74-S80, 1996.

TUFRO-MCREDDIE, A.; HARRISON, J.K.; EVERETT, A.D.; GOMEZ, R.A. Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor gene expression in the rat. *J. Clin. Invest.* 90: 1-9, 1993.

TUFRO-MCREDDIE, A.; JOHNS, D.W.; GEARY, K.M.; DAGLI, H.; EVERETT, A.D.; CHEVALIER, R.L.; CAREY, R.M.; GOMEZ, R.A. Angiotensin II type 1 receptor: role in renal growth and gene expression during normal development. *Am. J. Physiol.* 266: F911-F918, 1994.

TUFRO-MCREDDIE, A.; ROMANO, L.M.; HARRIS, J.M.; FERDER, L.; GOMEZ, R.A. Angiotensin II regulates nephrogenesis and renal vascular development. *Am. J. Physiol.* 269: F110-F115, 1995.

VAN DIERENDONCK, J.H.; WIJSMAN, J.H.; KIJGER, R.; VAN DE VELDE, C.J. Cell-cycle related staining patterns of anti-proliferating cell antigen monoclonal antibodies. Comparison with Brd Urd labeling and Ki-67 staining. *Am. J. Pathol.* 138: 1165-1172, 1991.

VAN KATS, J.P.; SCHALEKAMP, M.A.; VERDOUW, P.D.; DUNCKER, V.J.; DANSER, H. Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production. *Kidney Int.* 60: 2311-7, 2001.

WALLACE, K.B.; HOOK, J.B.; BALIE, M.D. Postnatal development of the renin-angiotensin system in rats. *Am. J. Physiol.* 238: R432-R437, 1980.

WANG, D.H.; DU, Y.; ZHAO, H.W.; GRANGER, G.P.; SPETH, R.C.; DIPETTE, D.J. Regulation of angiotensin type 1 and its gene expression: Role in renal growth. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 193-198, 1997.

WARTIOVAARA, J.; LEIVO, I.; VAHERI, A. Expression of the cell surface-associated glycoprotein fibronectin in the early mouse embryo. *Dev. Biol.* 69: 247-257, 1979.

WEIGERBER, U.M.; BOEING, H.; NEMITZ, R.; RAEDSCH, R.; WALDHERR, R. Proliferation cell nuclear antigen (clone 19 A2) correlates with 5-bromo-2 deoxyuridine labeling in human colonic epithelium. *Gut* 34: 1587-1592, 1993.

WHITMARSH AJ ; DAVIS RJ, Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.*, 74: 589-607, 1996.

WILSON, T.A.; JR, J.M.A.; JUNO, C.J.; KASKEL, F.J.; PARTIN, J.S. Ontogeny of plasma renin activity in the Dahl rat model of essential hypertension. *J. Hypertension.* 4(Suppl.5):S23-S26, 1996.

WINAVER, J.; ABASSI, Z.; GREEN, J.; SKORECKI, K.L. Control of extracellular fluid volume and the pathophysiology of edema formation in Brenner B. M. *The Kidney.* 6th ed . Philadelphia,USA. W.B. Saunders Company, p 795-865, 2000.

WONG, P.C.; CHIU, A.T.; DUNCIA, J.V.; HERBLIN, W.F.; SMITH, J.V.; TIMMERMANS, P.B.M.W.M. Angiotensin II receptor antagonists and receptor subtypes. *Transmission Electron Microsc.* 3: 211-217, 1992.

WOOLF, A.S., WINYARD, P.J. Advances in the cell biology and genetics of human kidney malformations. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9: 1114-1125, 1998.

XIA, Z., DICKENS, M., RAINGEAUD, J., DAVIS, R.J., GREENBERG, M.E. Opposing effects of ERK and JNK- p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 270: 1326- 1331, 1995.

YAMADA, K.M. Fibronectin and cell surface interactions, in: *Cell Biology of Extracellular Matrix*, edited by Hay, ED, New York, Plenum Press, pp 111-146, 1991.

YANG, D.; TOURNIER, C.; WYSK, M.; LU, H.T.; XU, J.; DAVIS R.J.; FLAVELL, R.A . Targeted disruption of the MKK4 gene causes embryonic death, inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activation and defects in AP-1 transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 3004-3009, 1997.

YING, WZ; SANDERS, PW. Dietary salt intake activates MAP kinases in the rat kidney. *FASEB J.* Oct;16: 1683-4, 2002.

ZHUO, J.L.; IMIG, J.D.; HAMMOND, T.G. et al. Ang II accumulation in rat renal endosomes during Ang II-induced hypertension: role of AT (1) receptor. *Hypertension*. 39: 116-121, 2002.

IX- Artigo Publicado no Pediatric Nephrology

Ana Paula C. Balbi · Roberto S. Costa
Terezila M. Coimbra

Postnatal renal development of rats from mothers that received increased sodium intake

Received: 14 February 2003 / Revised: 26 May 2004 / Accepted: 27 May 2004 / Published online: 28 August 2004
© IPNA 2004

Abstract The newborn rat kidney is not fully developed until approximately 12 days after birth. Several lines of evidence suggest that angiotensin II (AII) participates in the postnatal development of the kidney. The aim of the present study was to analyze proliferating cell nuclear antigen (PCNA), fibronectin, α -smooth muscle-actin (α -SM-actin), and AII expression in renal cortex during development in rats born to mothers that received a normal (control) or increased (experimental) sodium intake during pregnancy. Ninety Wistar rats aged 1, 7, 15, and 30 days from the control and experimental groups were killed and the kidneys removed for histological and immunohistochemical studies. The results showed higher fibronectin, α -SM-actin, PCNA, and AII expression in the glomerular and tubulointerstitial areas of the renal cortex of 1- and 7-day-old animals, which decreased with renal development. The animals from the experimental group showed at 1 day of age a decrease in α -SM-actin, fibronectin, PCNA, and AII expression compared with controls of the same age ($P < 0.05$). In conclusion, our data show that increased sodium intake during pregnancy induces a reduction of α -SM-actin, fibronectin, and PCNA expression in the renal cortex tubulointerstitium and glomeruli of neonatal rats. These alterations may be related to the decrease of AII expression also observed in the renal cortex from these animals.

Keywords Renal development · Angiotensin II · Sodium intake · Cell proliferation · Extracellular matrix

Introduction

The nephrogenesis of rats begins on embryonic day 12 and is completed between 10 and 15 days after birth [1, 2]. Formation of the extracellular matrix (ECM) represents a key event in kidney cell differentiation [3, 4]. The principal components of the ECM are type IV and III collagen, fibronectin, laminins, and proteoglycans. Fibronectin is a glycoprotein that can interact with some proteins from cell or ECM, inducing changes in cellular migration and adhesion [4]. AII can stimulate the production of several ECM components by mesangial cells in culture [5].

Several lines of evidence show that the renin-angiotensin system (RAS) participates in renal development [6, 7, 8, 9, 10]. AII can act as a growth modulator of several cell types and tissues [6, 7]. Angiotensinogen expression in the rat kidney increases during late gestation and peaks during the newborn period, when it reaches considerably higher levels than in the adult. In the rat kidney, renin mRNA is detected from embryonic day 17 and continues to be high during late gestation [8]. Renin mRNA levels are approximately 20-fold and 10-fold higher, respectively, at 20 days of embryonic life and in newborns than in adults [9]. The renal AII content is several-fold higher in newborn rats and mice than in adults. There is also increased expression of AII receptors in neonatal rats [10].

The mRNA for type 1 AII receptor (AT1) is detected in the renal glomeruli of newborn rats during cellular proliferation and differentiation [11]. Increased type II AII receptor (AT2) was observed in the kidney during fetal life, followed by a decrease after birth, suggesting that AII can participate in cell differentiation [12]. It was recently demonstrated that gene expression for AT1 receptors (a subtype predominant in the kidney) is up-regulated after decreased sodium intake, suggesting that the

A. P. C. Balbi · T. M. Coimbra (✉)
Department of Physiology, Faculty of Medicine,
University of Sao Paulo,
Avenue Dos Bandeirantes 3900, Ribeirao Preto,
CEP-14049-900 Sao Paulo, Brazil
e-mail: tmcoimbr@fmrp.usp.br
Tel.: +55-16-6023021
Fax: +55-16-6330017

R. S. Costa
Department of Pathology, Faculty of Medicine,
University of Sao Paulo,
Avenue Dos Bandeirantes 3900, Ribeirao Preto,
CEP-14049-900 Sao Paulo, Brazil

expression of this receptor type is related to water and salt homeostasis [13].

The aim of the present study was to analyze cell phenotype modification and proliferation and ECM production during renal development in newborn rats from mothers that received a normal or increased sodium intake during pregnancy, and to assess the possible relationship between AII expression and immunohistochemical alterations in renal cortex. We also evaluated systolic blood pressure and renal function in 30-day-old rats.

Materials and methods

Animals and experimental protocol

Ninety female Wistar rats aged 1, 7, 15, and 30 days, born to 30 pregnant females weighing approximately 180 g, were used in this study. All rats were housed in rooms with controlled temperature about 25°C and a 12-h light/dark cycle. Food and water were supplied ad libitum. Pregnant females were carefully observed at the end of gestation to determine the exact birth date of the pups. During gestation and breast-feeding, 8 females received a normal sodium intake and 12 females received a 0.15 mol/l sodium chloride solution instead of water. After birth, pups were divided into the following groups: group 1 (control) rats aged 1 ($n=7$), 7 ($n=7$), 15 ($n=8$), and 30 days ($n=16$) from mothers that received a normal sodium intake and group 2 (experimental) rats aged 1 ($n=10$), 7 ($n=10$), 15 ($n=9$), and 30 days ($n=23$) from mothers that had an increased sodium intake. Newborn rats of each group were anesthetized with sulfuric ether and one kidney was removed and fixed in Bouin solution for 4 h and the other kidney was fixed in methacarn for 24 h. After fixation, the kidneys were rinsed in 70% ethanol and embedded in paraffin. Sections (3- μ m) of renal tissue were used for histological and immunohistochemical studies. All experimental procedures were conducted in accordance with our institutional guidelines.

Urine and plasma samples were collected from pregnant females at the beginning and end of pregnancy using metabolic cages and 24-h urine volume was measured. The samples were frozen for subsequent analysis of osmolality, sodium, and potassium. Liquid and food consumption and body weight variation during pregnancy were measured in mothers of both groups. The blood pressure of pregnant rats was measured at the beginning and at the end of pregnancy by the tail cuff method.

Histological and immunohistochemical analysis

Sections (3- μ m) of renal tissue from these animals were stained with Masson's trichrome for histological analysis. The number of glomeruli of 30-day-old animals from the control and experimental groups was determined per area of renal cortex measuring 0.245 mm². To analyze the planar glomerular area in renal sections, the outer edges of all glomerular tufts of each kidney were traced on a video screen, and the encircled areas were determined by computerized morphometry (Kontron Electronic System KS 300, Eching, Germany) [14].

The sections were incubated with the following antibodies for immunohistochemical studies: anti- α -SM-actin (Dako, Glostrup, Denmark), anti-fibronectin (Chemicon International, Temecula, Calif., USA), anti-AII (Peninsula Laboratories, San Carlos, USA) overnight at 4°C, and anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Sigma, St. Louis, Mo., USA) for 30 min at room temperature. The reaction product was detected with an avidin-biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingame, Calif., USA). The material was counterstained with methylgreen, dehydrated, and mounted. Nonspecific protein binding was blocked by incubation with 20% goat serum in phosphate-buffered saline

(PBS) for 20 min. Negative controls consisted of replacement of primary antibody with equivalent concentrations of normal rabbit IgG or mouse IgG for polyclonal and monoclonal antibodies, respectively. For evaluation of immunoperoxidase staining for fibronectin and α -SM-actin each grid field was graded semi-quantitatively and the mean score per kidney was calculated [14]. Each score reflected mainly changes in the extent, rather than the intensity, of staining and depended on the percentage of grid field showing positive staining: 0=absent or less than 5%; I=5%–25%; II=25%–50%; III=50%–75%; IV>75%. The semi-quantitative scoring system used to evaluate the immunohistochemical reaction is not only reproducible among different observers, but the results are highly correlated with those obtained by computerized morphometry [14, 15]. To obtain the numbers of AII- and PCNA-positive cells in the glomeruli and AII-positive cells in the cortical tubulointerstitium, all glomeruli and 30 grid fields from the renal cortical tubulointerstitium measuring 0.245 mm² were evaluated, and the mean counts per kidney were calculated.

Analysis of AT1 receptor expression

Whole cortical tissue from one kidney of 8 animals of each group aged 1 day was homogenized in 2 ml of Triton X-100 lysis buffer [50 mM TRIS-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] at 4°C. After incubation for 5 min, lysates were centrifuged at 4°C for 15 min at 10,000 g. The AT1 receptor in these samples was evaluated by Western blotting [16]. Renal protein was loaded at 100 μ g per well and separated on a 8% SDS-PAGE gel. Protein estimations were performed using the Hartree method [17]. Gels were electroblotted onto a nitrocellulose membrane, incubated for 4 h in 30 ml of blocking buffer (PBS, 5% skimmed milk), washed in buffer (PBS, 0.1% Tween 20, pH 7.6), and incubated with anti-AT1 (1/100) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA) in 5% bovine serum albumin (BSA) overnight at 4°C. Blots were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Dako) (1/2,000) for 1 h at room temperature. Membranes were washed and the membrane-bound antibody detected by Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) and captured on X-ray film. Densitometry analysis was performed using the Image Quant computerized program.

Renal function studies

Renal function was evaluated in 15 30-day-old animals born of mothers that received a higher salt intake during pregnancy and in 10 animals of the same age born of mothers that received a normal sodium intake. The animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of 170 mg/100 g urethane. The temperature was maintained at 37°C during the experiment. The femoral artery and vein were cannulated to collect blood samples and to inject fluids and the urinary bladder was cannulated to collect urine. The animals received a priming inulin dose of 12 mg/100 g followed by a maintenance dose of 42 mg/100 g per hour. After stabilization for about 60 min, urine was collected for a period of 90 min and blood was sampled at 45 and 90 min. Plasma and urine inulin was measured using the method of Fuehr et al. [18].

Statistical analysis

Data were submitted to analysis of variance with multiple comparisons by the Tukey test, with the level of significance set at $P<0.05$ for comparisons between analyzed parameters of the same group at different ages and Student's *t*-test with Welch's comparison for analysis of parameters between studied groups of the same age.

Table 1 Systolic blood pressure (SBP) and 24-h urine volume (V) at the beginning and end of pregnancy and body weight variation during pregnancy (Δ BW) and fluid ingestion (FI) of mothers that received a normal sodium intake (Control) or increased sodium intake (Exp) ^a

	SBP		V		Δ BW	FI
	(mmHg)		(ml/24 h)		(g)	(ml/24 h)
	Beginning	End	Beginning	End		
Control	132.3 \pm 4.1	121.2 \pm 2.5	11.6 \pm 0.9	13.1 \pm 1.7	78.7 \pm 13.5	48.6 \pm 3.6
Exp	135.5 \pm 5.2	127.7 \pm 1.9	28.0 \pm 1.8*	30.3 \pm 3.3*	136.4 \pm 13.9*	86.0 \pm 4.5*

* $P < 0.05$ vs. Control of the same age

^a Data are expressed as mean \pm SEM

Results

Urinary volume, blood pressure, body weight variation, food consumption, and fluid intake

Urine volume (24-h) and liquid intake was higher in pregnant females that received a high salt intake compared with pregnant females from the control group. The body weight was also higher in pregnant females from the experimental group compared with pregnant females from the control group. These results reflect an increase of extracellular fluid volume in mothers from the experimental group. The systolic blood pressure of pregnant females was measured at the beginning and end of pregnancy and was not different between both groups (Table 1).

Plasma levels of sodium and potassium and plasma osmolality were not different between pregnant females from the control and experimental groups. Food consumption was not different between mothers from the control and experimental groups (Table 2).

Table 2 Plasma sodium (Na^+) and potassium (K^+) levels, food consumption (FC, per animal/24 h) and plasma osmolality (P_{Osm}) of pregnant females submitted to normal sodium intake (Control) or increased sodium intake (Exp) ^a

	Na^+	K^+	FC	P_{Osm}
	(mEq/l)	(mEq/l)	(g)	(mosmol/kg H_2O)
Control	149.3 \pm 4.7	4.2 \pm 0.5	44.5 \pm 7.5	304.3 \pm 1.86
Exp	149.7 \pm 1.5	5.6 \pm 0.1	44.4 \pm 5.5	302.3 \pm 1.48

^a Data are expressed as mean \pm SEM

Histological and morphometric analysis

Histological analysis showed glomeruli in different stages of evolution in renal cortex from 1- and 7-day-old animals, while 15- and 30-day-old animals had glomeruli in the final stage of differentiation (Fig. 1A and B). There were no changes in the number of glomeruli per renal cortex area measuring 0.245 mm^2 in 30-day-old animals from the experimental group (4.09 \pm 0.21) compared with the control group (3.98 \pm 0.14) of the same age. Morphometric analysis did not show any alterations in the glomerular area of 30-day-old animals from the experi-

Fig. 1 Histological sections of renal cortex from 1- (A) and 30-day-old rats (B) (Masson trichrome). Immunolocalization of fibronectin in renal cortex from 1- (C) and 30-day-old rats (D) from mothers that received a normal sodium intake ($\times 280$)

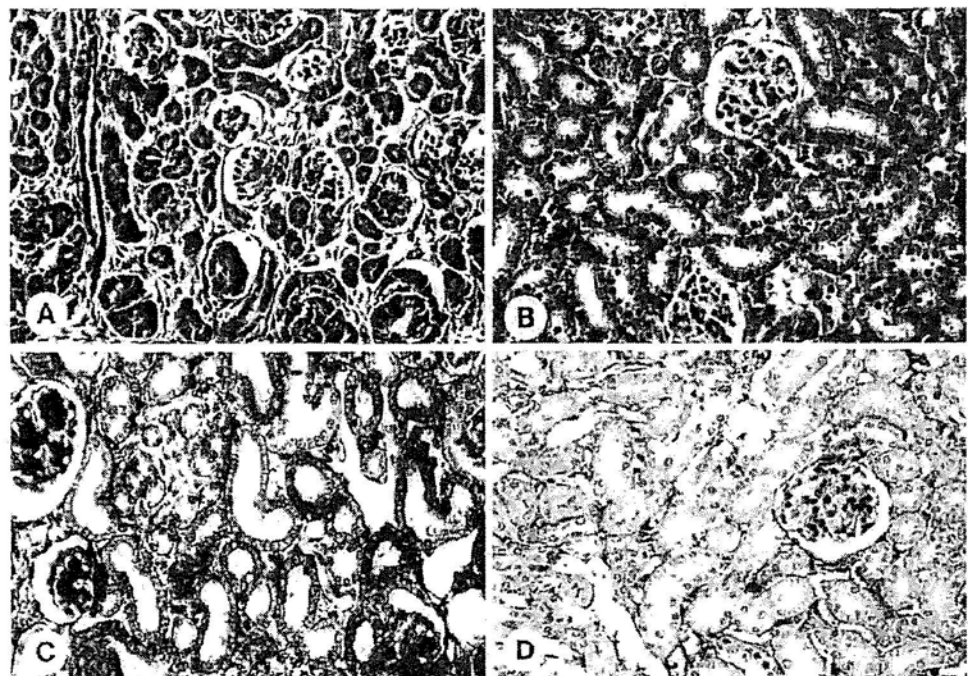


Table 3 Immunohistochemical data for the renal cortex tubulointerstitial compartment of rats born to mothers that received a normal (Control) or increased sodium intake (Exp) during pregnancy^a

Days	α -SM actin		Angiotensin II	
	Control	Exp	Control	Exp
1	2.22±0.16**	1.59±0.19* **	5.87±0.35**	4.27±0.42*, **
7	1.72±0.13**	1.54±0.11**	5.54±0.59**	4.74±0.75**
15	0.64±0.11**	0.49±0.10	3.79±0.65**	2.62±0.30
30	0.00	0.00	0.88±0.20	0.57±0.13

* $P < 0.05$ vs. Control of the same age, ** $P < 0.05$ vs. 30-day-old rats of the same group

^a Data are expressed as mean±SEM

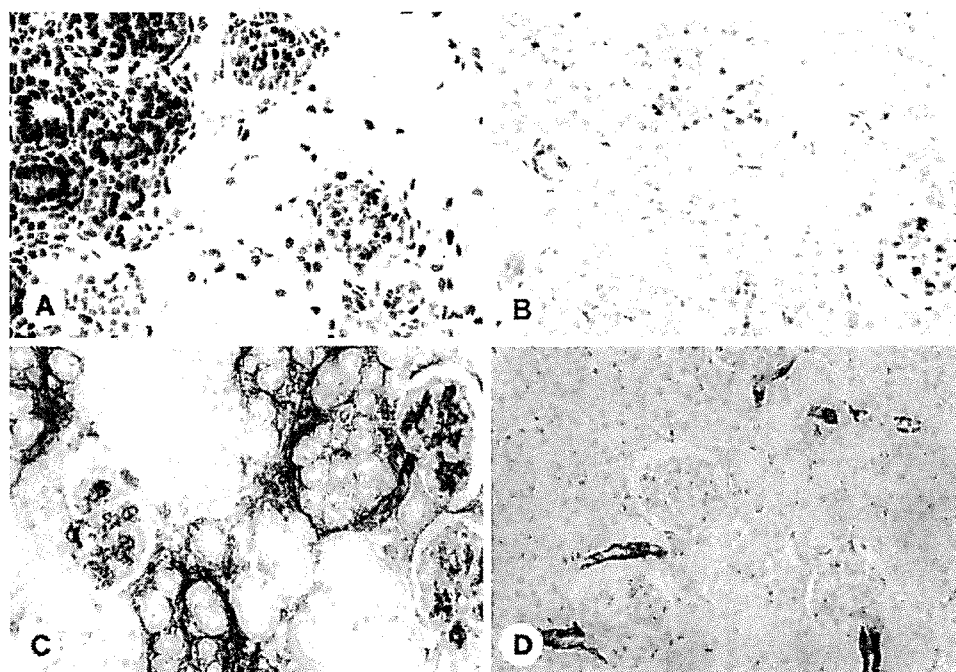
Table 4 Immunohistochemical data for the glomerular compartment of rats born to mothers that received a normal (Control) or increased sodium intake (Exp) during pregnancy (PCNA proliferating cell nuclear antigen, AII angiotensin II)^a

Days		1	7	15	30
α -SM actin	Control	1.67±0.12**	0.75±0.08**	0.05±0.02	0.00
	Exp	1.40±0.08**	0.57±0.10**	0.01±0.01	0.09±0.03
Fibronectin	Control	2.53±0.06**	1.83±0.10**	0.74±0.03	0.65±0.08
	Exp	2.10±0.12* **	1.74±0.05**	0.74±0.04	0.70±0.05
PCNA	Control	7.85±0.29**	4.71±0.54**	1.88±0.31	2.26±0.22
	Exp	4.99±0.59* **	3.30±0.18**	2.33±0.38	2.57±0.70
AII	Control	0.80±0.08**	1.07±0.21**	0.39±0.06	0.17±0.05
	Exp	0.39±0.07*	0.58±0.08*, **	0.29±0.03	0.14±0.04

* $P < 0.05$ vs. Control of the same age, ** $P < 0.05$ vs. 30-day -old rats of the same group

^a Data are expressed as mean±SEM

Fig. 2 Immunolocalization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (A and B) and α -SM-actin (C and D) in renal cortex from 1- (A and C) and 30-day-old rats (B and D) from mothers that received a normal sodium intake (×280). Note that the number of PCNA-positive cells in the tubulointerstitial and glomerular compartments is higher in A than in B and that the immunostaining for α -SM-actin is more intense in C than in D



mental group ($3,772 \mu\text{m}^2 \pm 116$) compared with the control animals of the same age ($3,757 \mu\text{m}^2 \pm 117$).

Immunohistochemical analysis

Staining for α -SM-actin in the glomerular and tubulointerstitial compartments of control rats was higher in 1-day-old animals compared with 30-day-old animals (Tables 3 and 4, Fig. 2C, D). The immunostaining for α -SM-actin was limited to arterial smooth muscle cells in the renal

cortex of 30-day-old animals (Fig. 2D). One-day-old animals whose mothers received a high salt intake during pregnancy showed a tendency to a decrease in glomerular α -SM-actin expression (1.40 ± 0.08) compared with control animals of the same age (1.67 ± 0.12) (Table 4). In the tubulointerstitial compartment (Table 3) there was a significant reduction in α -SM-actin expression in 1-day-old animals from the experimental group (1.59 ± 0.19) compared with 1-day-old animals from the control group (2.22 ± 0.16) ($P < 0.05$).

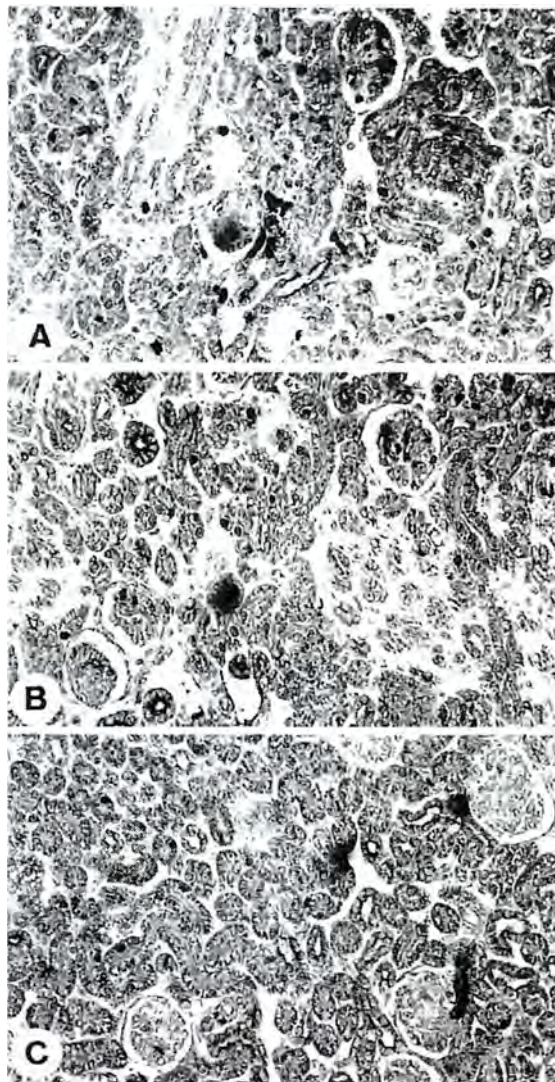


Fig. 3 Immunolocalization of angiotensin II (AII) in renal cortex from 1- (A), 7- (B), and 30-day-old rats (C) born to mothers that received a normal sodium intake ($\times 280$). The number of the AII-positive cells is higher in A and B than in C

In control animals, glomerular fibronectin expression was higher in 1-day-old rats than in 30-day-old rats (Table 4, Fig. 1C, D). A decrease in glomerular fibronectin expression was observed in 1-day-old experimental animals (2.1 ± 0.12) compared with the control animals of the same age (2.53 ± 0.06) ($P < 0.05$).

Table 5 SBP, glomerular area (GA), number of glomeruli (NG) per area measuring 0.245 mm^2 from renal cortex and glomerular filtration rate (GFR) of 30-day-old rats born to mothers that received a normal (Control) or increased sodium intake (Exp) during pregnancy^a

	SBP (mmHg)	GA (μm^2)	NG	GFR (ml/min per 100 g)
Control	126.2 ± 1.714	3.757 ± 117	3.978 ± 0.136	0.80 ± 0.07
Exp	$137.5 \pm 1.890^*$	3.772 ± 116	4.093 ± 0.211	$0.67 \pm 0.05^*$

* $P < 0.05$ vs Control of the same age

^a Data are expressed as mean \pm SEM

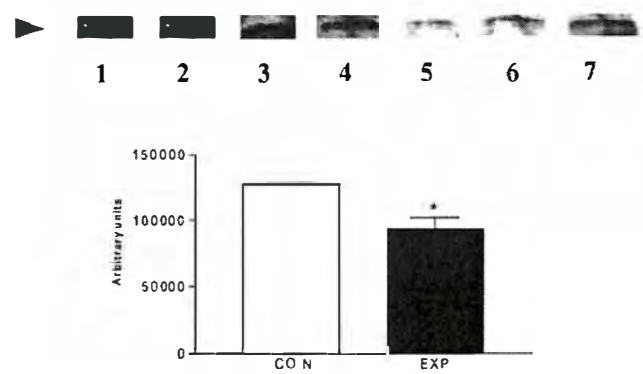


Fig. 4 AT1 protein expression in renal cortex of 1-day-old rat kidneys from mothers that received a normal sodium intake (bands 1–3) or increased sodium intake (bands 4–7) during pregnancy. Density analysis of 50-kDa bands showed a significant decrease in the level of AT1 in renal cortex from animals of the experimental group. * $P < 0.05$ versus control of the same age

The number of PCNA-positive cells per glomerulus was higher in 1- and 7-day-old control animals than in 30-day-old animals (Table 4, Fig. 2A, B). One-day-old animals from the experimental group (Table 4) also had a decrease in the number of PCNA-positive cells (4.99 ± 0.59) compared with control animals of the same age (7.85 ± 0.29) ($P < 0.05$).

The number of AII-positive cells was higher in the glomerular and tubulointerstitial compartments of the renal cortex of 1- and 7-day-old animals (Tables 3 and 4, Fig. 3A–C), while in 30-day-old animals the AII-positive cells were limited to the juxtaglomerular apparatus (Fig. 3C). The 1- and 7-day-old animals from the experimental group had a lower number of AII-positive cells per glomerulus (0.39 ± 0.07 , 0.58 ± 0.08 , respectively) compared with controls aged 1 (0.80 ± 0.080) and 7 days (1.07 ± 0.21) ($P < 0.05$) (Table 4). One-day-old animals whose mothers received a higher salt intake during pregnancy also had a reduced number of AII-positive cells in the cortical tubulointerstitial compartment ($4.27 \text{ cells}/0.245 \text{ mm}^2 \pm 0.42$) compared with controls of the same age ($5.87 \text{ cells}/0.245 \text{ mm}^2 \pm 0.35$) ($P < 0.05$) (Table 3).

AT-1 receptor analysis

Our data show that there was a decrease in AT-1 receptor in renal cortex from the 1-day-old animals of the experimental group ($P < 0.05$) (Fig. 4).

Renal function

Thirty-day-old animals whose mothers received an increased salt intake during pregnancy showed a decrease in glomerular filtration rate (GFR) ($0.67 \text{ ml/min per } 100 \text{ g} \pm 0.05$) compared with controls of the same age ($0.80 \text{ ml/min per } 100 \text{ g} \pm 0.07$) ($P < 0.05$) (Table 5).

Discussion

Our data showed increased α -SM-actin expression in the cortical, tubulointerstitial, and glomerular compartments from 1- and 7-day-old animals, followed by a decrease during renal development. These results show that mesangial cell and interstitial fibroblast activation occurs during kidney differentiation, as confirmed by the increased expression of fibronectin and PCNA in the renal cortex from 1- and 7-day-old animals. The activation of these cells may be at least in part due to an increase in renal AII production. Rats born from mothers that received a high salt intake presented at 1 day of age with a decrease of α -SM-actin, fibronectin, and PCNA expression in the renal cortex, as well a reduction in the number of AII-positive cells in glomerular and interstitial compartments compared with controls of the same age.

The α -SM-actin isoform is normally expressed by vascular smooth muscle cells, but interstitial fibroblasts and mesangial and tubular cells can also express this protein in a variety of renal diseases [19, 20, 21]. There is some experimental evidence suggesting that AII can induce this phenotypic modification of these cells [22, 23]. Chen et al. [23] reported that neonatal losartan treatment suppressed renal expression of α -SM-actin. The up-regulation of α -SM-actin synthesis by these cells is frequently associated with increased cell proliferation and ECM production [19, 24]. It has already been shown that human and rat fetal mesangial cells express α -SM-actin [25, 26] and that human fetal mesangial cells change their expression of this protein in the course of glomerular development [26]. During kidney development, a large-scale proliferation has been observed [27]. Therefore, changes in the renal expression of AII in animals born to mothers that received an increased sodium intake might affect renal cell proliferation and ECM production during postnatal development. Our results confirm this hypothesis, i.e., the increased sodium intake during the pregnancy provoked reductions of α -SM-actin, fibronectin, and PCNA in the renal cortex of neonatal rats. These alterations were related to a decrease in AII expression in the tubulointerstitial and glomerular compartments of the renal cortex. There was a temporal association suggesting a possible relationship between these factors. It has also been demonstrated that AII has important effects on cell growth and ECM production [23, 28]. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition reduced cell proliferation in medullary tubules in postnatal rats [29] and treatment of neonates with AT1 antagonists suppresses the renal expression of α -SM-actin [23].

It has been shown that AII can act as a growth modulator of several cell types and tissues and can stimulate the production of several components of ECM by mesangial cells in culture [5]. McCausland et al. [29] found that angiotensin enzyme inhibition in postnatal rat results in decreased cell proliferation in the renal outer medulla. Blocking the AT1 receptor led to abnormal cell-matrix interactions and matrix assembly during postnatal development [23]. The RAS activity is increased in neonatal rats and the activity of plasma renin and ACE increases during gestation and is higher in neonates than in adult rats [30]. The expression of AII receptors is also higher in neonatal rats [10].

Our results also showed that 30-day-old rats born to mothers that received a higher sodium intake had higher systolic blood pressures than controls. A decline in GFR was also observed in 30-day-old animals from this group. These data demonstrate that disturbances occurring during intrauterine life can induce persistent alterations in the biology of the pups in adult life. It has previously been reported that a high-salt prenatal diet increases blood pressure and salt retention in spontaneously hypertensive rats [31]. Silva et al. [32] and Hazon et al. [33] found that adult offspring from high-salt dams had higher blood pressure, an increased renal AII content, and an absence of plasma renin changes in responses to higher salt consumption [32]. We also observed a decrease in expression of AT-1 receptors in 1-day-old rats born to mothers that received a higher salt intake compared with controls of same age. Since kidney development is influenced by the RAS, possible functional changes in the RAS may occur in offspring due to the lower AII levels in response to a high-salt intake of dams during pregnancy. The higher blood pressure observed in 30-day animals of the experimental group may be consequence of this.

In conclusion, our data show that an increased sodium intake during pregnancy induces reductions of α -SM-actin, fibronectin, PCNA, and AII expression in the renal cortex of neonatal rats, interfering with renal development and renal function during adult life. There was a temporal association between the decrease of AII expression and the reduction of α -SM-actin, PCNA, and fibronectin expression in renal cortex, suggesting a possible relationship between these findings.

Acknowledgements The authors thank Cleonice G.A. da Silva, Erika Delloiagano, and Rubens Fernando de Melo for expert technical assistance. Ana Paula C. Balbi was a recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, DF, Brazil, fellowship, and Dr. Roberto Silva Costa and Dr. Terezila Machado Coimbra are recipients of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, DF, Brazil, fellowships. These results were presented in abstract form at the American Society of Nephrology Meeting, Philadelphia, Pa., November 2002.

References

1. Nigam SK, Aperia AC, Brenner BM (1996) Development and maturation of the kidney. In: Brenner BM, Rector FC (eds): *The kidney*. Saunders, Philadelphia, pp 72–98

2. Reeves W, Caulfield JP, Farquhar MG (1978) Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion, and slit membranes in developing glomeruli. *Lab Invest* 39:90–100
3. Roberts AB, McCune BK, Sporn MB (1992) TGF- β : regulation of extracellular matrix. *Kidney Int* 41:557–559
4. Thiery JP, Duband JL, Dufour S, Savagner P, Imhof BA (1989) Role of fibronectin in embryogenesis. In: Mosher DF (ed) *Biology of extracellular matrix: fibronectin*. Academic Press, San Diego, pp 181–212
5. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA (1994) Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93:2431–2437
6. Bagby SP, Kirk EA, Mitchell LH, O'Reilly MM, Holden WE, Stenberg PE, Bakke AG (1993) Proliferative synergy of angiotensin II and EGF in porcine aortic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 265:F239–F249
7. Fernandez LA, Twickler J, Mead A (1985) Neovascularization produced by angiotensin II. *J Lab Clin Med* 105:141–145
8. Gomez RA (1990) Molecular biology of components of the renin-angiotensin system during development. *Pediatr Nephrol* 4:421–423
9. Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ (1989) Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. *Am J Physiol* 257: F850–F858
10. Millan MA, Carvallo P, Izumi S, Zemel S, Catt KJ, Aguilera G (1989) Novel sites of expression of functional angiotensin II receptors in the late gestation fetus. *Science* 244:1340–1342
11. Tufro-McReddie A, Harrison JK, Everett AD, Gomez RA (1993) Ontogeny of type I angiotensin II receptor gene expression in the rat. *J Clin Invest* 91:530–537
12. Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE (1991) Expression of AT₂ receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88:921–933
13. Du Y, Yao A, Guo D, Inagami T, Wang DH (1995) Differential regulation of angiotensin II receptors subtypes in rat kidney by low dietary sodium. *Hypertension* 25:872–877
14. Coimbra TM, Janssen U, Gröne HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, Brabant G, Floege J (2000) Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney Int* 57:167–182
15. Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Couser WG, Koch KM, Floege J (1996) Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats. *Kidney Int* 49:666–678
16. Stambe C, Atkins RC, Hill PA, Nikolic-Paterson DJ (2003) Activation and cellular localization of the p38 and JNK MAPK pathways in rat crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int* 64:2121–2132
17. Hartree EF (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422–427
18. Fuehr Y, Kaczmarczk Y, Kruttgen GD (1955) Eine einfache colorimetrische Methode zur Inulin-Bestimmung für Nieren-Clearance-Untersuchungen bei Stoffwechselgesunden und Diabetikern. *Klin Wochenschr* 33:729–730
19. Alpers CE, Hudkins KL, Gown AM, Johnson RJ (1992) Enhanced expression of “muscle-specific” actin in glomerulonephritis. *Kidney Int* 41:1134–1142
20. El Nahas AM, Muchaneta-Kubara EC, Zhang G, Adam A, Goumenos D (1996) Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. *Kidney Int* 54:S23–S27
21. Geleileite TJ, Melo GC, Costa RS, Volpini RA, Soares TJ, Coimbra TM (2002) Role of myofibroblasts, macrophages, transforming growth factor-beta, endothelin, angiotensin-II, and fibronectin in the progression of tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. *J Nephrol* 15:633–642
22. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege J, Schwartz SM (1992) Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 19:464–474
23. Chen Y, Lasaitiene D, Gabrielsson BG, Carlsson LM, Billig H, Carlsson B, Marcussen N, Sun XF, Friberg P (2004) Neonatal losartan treatment suppresses renal expression of molecules involved in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Am Soc Nephrol* 15:1232–1243
24. Johnson RJ, Iida H, Alpers CE, Majesky MW, Schwartz SM, Pritzl P, Gordon K, Gown AM (1991) Expression of smooth muscle cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. Alpha-smooth muscle actin is a marker of mesangial cell proliferation. *J Clin Invest* 87:847–858
25. Carey AV, Carey RM, Gomez RA (1992) Expression of alpha-smooth muscle actin in the developing kidney vasculature. *Hypertension* 19 [Suppl]:168–175
26. Naruse K, Fujieda M, Miyasaki E, Hayashi Y, Toi M, Fukui T, Kuroda N, Hiroi M, Kurashige T, Enzan H (2000) An immunohistochemical study of developing glomeruli in human fetal kidneys. *Kidney Int* 57:1836–1846
27. Omori S, Hida M, Ishikura K, Kuramochi S, Awazu M (2000) Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development. *Kidney Int* 58:27–37
28. Hsueh WA, Do YS, Anderson PW, Law RE (1995) Angiotensin II in cell growth and matrix production. *Adv Exp Med Biol* 377:217–223
29. McCausland JE, Ryan GB, Alcorn D (1996) Angiotensin converting enzyme inhibition in the postnatal rat results in decreased cell proliferation in the renal outer medulla. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:552–554
30. Guron G, Friberg P (2000) An intact renin angiotensin system is a prerequisite for normal renal development. *J Hypertens* 18:123–137
31. Nicolantonio RD, Spargo S, Morgan TO (1987) Prenatal high salt diet increases blood pressure and salt retention in spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 14:233–235
32. Silva AA, Noronha IL, Oliveira IB de, Malheiros DMC, Heilmann JC (2003) Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 13:133–139
33. Hazon N, Parker C, Leonard R, Henderson IW (1988) Influence of an enriched sodium chloride regime during gestation and suckling and post-natally on the ontogeny of hypertension in the rat. *J Hypertens* 6:517–524

Ilustração da Capa: Fases do Desenvolvimento Glomerular (Reeves, W.; Caulfield, J.P.; Farquhar, M.G. Differentiation of epithelial foot processes and filtration slits: sequential appearance of occluding junctions, epithelial polyanion and slit membranes in developing glomeruli. *Lab. Invest.* 39: 90-100, 1978).