

**DÉBORA ROTHSTEIN RAMOS**

**Sobrecarga de sal durante a gestação : efeito  
sobre o sistema renina angiotensina sistêmico  
e renal da prole adulta de ratos Wistar**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
título de Doutor em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientadora: Dra. Luzia Naoko Shinohara Furukawa

São Paulo

2011

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

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

©reprodução autorizada pelo autor

Ramos, Débora Rothstein

Sobrecarga de sal durante a gestação : efeito sobre o sistema renina  
angiotensina sistêmico e renal da prole adulta de ratos Wistar / Débora Rothstein  
Ramos. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Nefrologia.

Orientadora: Luzia Naoko Shinohara Furukawa.

Descritores: 1.Renina 2.Cloreto de sódio 3.Cloreto de sódio na dieta  
4.Ambiente perinatal 5.Prole

USP/FM/DBD-249/11

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho a Deus, pois Ele é o doador da vida, guia todos os meus passos e me trouxe até aqui, muito obrigada.

Também dedico aos meus pais: Paulo Ramos e Zenir Lita Rothstein Ramos porque sempre estiveram ao meu lado mesmo vivendo tão longe, amo vocês.

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha orientadora Dra. Luzia NS Furukawa, por me aceitar como aluna, por toda a força, paciência, apoio durante os experimentos e principalmente, por ser uma mãe e amiga para mim. Muita coisa que aprendi nesses quatro anos foi graças a você. Muito obrigada por tudo.

Aos meus familiares, minhas irmãs Ana Paula, Bianca e Camila, aos amigos, por sempre estarem por perto quando precisei.

Agradeço a Ivone Braga de Oliveira, pela amizade, pelos conselhos, por ajudar nos experimentos sempre que precisei, e você também foi uma mãe para mim.

Ao meu namorado David Cardoso Maia, conheci você no meio do caminho, você me deu muita força e carinho para seguir em frente, muito obrigada!

Agradeço a Isis Akemi Katayama e a Dra. Karen LL Jang pela amizade, companheirismo, sem vocês no laboratório seria estranho e nunca esquecerei das nossas viagens aos congressos, sentirei falta.

Agradeço ao Prof. Dr. Rui Toledo de Barros e ao Prof. Dr. Roberto Zatz por terem me admitido no programa de pós-graduação.

Agradeço ao Prof. Dr. Joel C. Heimann por me aceitar em seu laboratório, primeiro como aluna de iniciação científica e depois como aluna de pós-graduação.

À Daniela Mirandola, Daniele Ferreira, Regiane Machado e os demais colegas do laboratório de Hipertensão Experimental, agradeço pelos momentos de descontração e apoio.

Aos colegas do LIM-16 pelo apoio.

Muito obrigada ao Walter Campestre pela ajuda e cuidado com os ratinhos, foram muito importantes para meu estudo.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro ao projeto e a bolsa de estudo..

“...virei outra vez, e vos levarei para mim mesmo,  
para que onde eu estiver estejais vós também.  
(Jesus Cristo)

## Sumário

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	11
3	MÉTODOS .....	13
3.1	Protocolo experimental 1.....	14
3.2	Medida do peso corpóreo.....	16
3.3	Medida da pressão arterial sistólica caudal - Pac .....	16
3.4	Teste de estímulo e inibição do sistema renina angiotensina.....	17
3.5	Avaliação da expressão gênica do mRNA da renina, COX-2 e nNOS por RT-PCR.....	18
3.5.1	Extração de RNA total .....	18
3.5.2	Síntese de DNA complementar por transcrição reversa (RT) .....	21
3.5.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do cDNA ..	22
3.5.4	Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado .....	23
3.6	Western blotting .....	25
3.7	Imunohistoquímica .....	27
3.7.1	Preparo do tecido renal .....	27
3.7.2	Silanização de lâminas.....	28
3.7.3	Reação de imunohistoquímica .....	29
3.8	Métodos analíticos .....	31
3.8.1	Medida da atividade da renina plasmática (ARP).....	31
3.8.2	Determinação da concentração de aldosterona sérica.....	32
3.8.3	Quantificação de atividade da renina no córtex renal (ARR) ..	32
3.9	Protocolo experimental 2.....	33
3.10	Análises estatísticas.....	34
4	RESULTADOS .....	35
4.1	Evolução ponderal e Pressão arterial caudal sistólica do grupo materno .....	36
4.2	Evolução ponderal da prole masculina.....	37

4.3	Pressão arterial sistólica caudal da prole adulta .....	38
4.3.1	PAC ao longo do crescimento .....	38
4.3.2	PAC após o teste de estímulo e inibição do SRA.....	39
4.4	Expressão gênica do mRNA da renina no rim .....	40
4.5	Atividade da Renina Plasmática (ARP) .....	41
4.6	Atividade de renina renal (ARR).....	42
4.7	Aldosterona sérica.....	43
4.8	Ciclooxigenase -2 no rim (COX-2 ).....	44
4.8.1	Expressão gênica do mRNA da COX-2.....	44
4.8.2	Expressão protéica da COX-2 .....	45
4.9	Oxido nítrico sintase neuronal (nNOS) renal.....	46
4.9.1	Expressão gênica do mRNA.....	46
4.9.2	Expressão protéica do nNOS .....	47
4.10	Grupo Materno e prole recém nascida .....	48
4.10.1	Grupo materno .....	48
4.10.1.1	Expressão gênica do mRNA da renina no rim .....	48
4.10.1.2	Atividade da Renina Plasmática (ARP) e renal (ARR) e aldosterona sérica.....	49
4.10.1.3	Expressão gênica e protéica da COX-2.....	50
4.10.1.4	Expressão gênica do mRNA e protéica da nNOS .....	51
4.10.2	Grupo recém-nascido .....	52
4.10.2.1	Peso corpóreo da prole masculina .....	52
4.10.2.2	Expressão gênica do mRNA da renina renal, atividade da renina plasmática (ARP), atividade da renina renal (ARR) e aldosterona sérica.....	53
4.10.2.3	Expressão gênica do mRNA e protéica da nNOS renal .....	54
4.10.2.4	Expressão gênica do mRNA e protéica da COX-2.....	55
5	DISCUSSÃO.....	56
6	CONCLUSÃO .....	66
7	ANEXOS.....	68
8	REFERÊNCIAS .....	81



## **Lista de abreviaturas**

ANGII- Angiotensina II

ARP- Atividade da renina plasmática

ARR- Atividade da renina renal

AT1/AT2 – Receptor de angiotensina

COX-1- Ciclooxygenase 1

COX-2 – Ciclooxygenase 2

ECA- Enzima conversora de angiotensina

eNOS- óxido nítrico sintase endotelial

HR- Dieta hipersódica

iNOS- Óxido nítrico sintase induzível

INTERSALT- International study of electrolyte excretion and blood pressure

INTERMAP- International population study on macronutrients and BP

mHR- Mães que receberam dieta hipersódica durante a gestação

mNR- Mães que receberam dieta normossódica durante a gestação

mRNA- Ácido ribonucléico mensageiro

NaCl – Cloreto de sódio

nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal

NO – Óxido nítrico

NR- Dieta normossódica

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAC- Pressão arterial caudal

PCR- Reação em cadeia da polimerase

pHR- Prole de mães que receberam dieta hipersódica durante a gestação

pNR- Prole de mães que receberam dieta normossódica durante a gestação

RIE- Radio imunoensaio

SRA- Sistema renina angiotensina

TGF- Taxa de filtração glomerular

WASH- World Action on Salt Health

## Resumo

Ramos DR. *Sobrecarga de sal durante a gestação: efeito sobre o sistema renina angiotensina sistêmico e renal da prole adulta de ratos Wistar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 88p.

O aporte de nutrientes ingerido pela mãe durante a gestação e o transporte dos nutrientes da placenta para o feto são essenciais para o crescimento fetal. A sobrecarga de sódio durante a gestação tem demonstrado ser um dos fatores responsáveis pela hipertensão na vida adulta da prole. Um estudo anterior em nosso laboratório demonstrou que além do aumento da pressão arterial, o sistema renina angiotensina (SRA) da prole de mães que receberam sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação, não respondeu adequadamente em resposta a um teste com dieta hipersódica. O SRA é importante para a homeostase e a manutenção de eletrólitos no organismo. As enzimas ciclooxigenase-2 (COX-2) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) interagem com o SRA. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da sobrecarga de sódio durante a gestação no SRA renal e sistêmico, COX-2 e nNOS da prole ao nascimento e na idade adulta. O grupo materno também foi investigado. Para tanto, ratas Wistar foram alimentadas com dieta normossódica (NS) ou hipersódica (HS) durante a gestação. Foram divididos em dois grupos: no primeiro grupo, foram estudados a mãe e o recém-nascido e no segundo grupo, a dieta foi trocada para NS ao nascimento independente da dieta materna e a prole masculina avaliada com 12 semanas de vida. A pressão arterial caudal (tcBP) foi medida na prole adulta e no grupo materno. Atividade da renina renal e plasmática, aldosterona sérica, expressão gênica da renina renal, COX-2, nNOS foram analisadas no rim da mãe, recém-nascido e na prole adulta avaliada após a administração de dieta NS, hipossódica (LS) ou hipersódica (HS) por 7 dias. A dieta hipersódica durante a gestação induziu: 1-) no grupo materno: maior pressão arterial e expressão protéica da COX-2 na medula renal, e diminuição da atividade da renina plasmática e renal e a aldosterona sérica; 2-) no grupo neonato: menor expressão do mRNA da COX-2 mRNA e maior expressão protéica de nNOS nos rins, e nenhuma diferença foi observada na aldosterona sérica, na atividade plasmática, renal, e expressão gênica da renina renal 3-) na prole adulta: a menor expressão gênica do mRNA de renina, atividade da renina plasmática e aldosterona sérica, maior atividade da renina renal, maior expressão gênica e protéica da COX-2 na medula renal e menor expressão gênica da nNOS no córtex renal. Foi observada uma resposta exacerbada da atividade da renina plasmática e renal após a administração das dietas HO ou HR. Em conclusão, a sobrecarga de sódio materna induz a ativação do SRA e da COX-2 na medula renal na prole adulta, tornando-as mais sensíveis ao sal. Essas características foram herdadas de fenótipo materno.

Descritores: 1.Renina 2.Sal 3.Ambiente perinatal 4.Prole

## Summary

Ramos DR. *Salt overload during perinatal life: effect on the systemic and local renin-angiotensin system in adult offspring Wistar rats* [thesis]. Sao Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 88p.

Maternal nutrient intake and its transportation from the placenta to the fetus are essential for fetal growth during pregnancy. The sodium overload during pregnancy has been shown to be one of the factors responsible for hypertension and disturbance of renin angiotensin system (RAS) in adulthood offspring. The RAS is important for homeostasis and maintenance of electrolytes in the body. The enzymes cyclooxygenase-2 (COX-2) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) interact with RAS, especially in renin release. The aim of this study was to evaluate effects of maternal sodium overload during pregnancy on renal and systemic RAS, COX-2 and nNOS of offspring at birth and in adult age. A mother group was also investigated. For this, female Wistar rats were fed normossódica (NS) or hipersódica (HS) diet during pregnancy. It was divided in two groups: as soon as offspring's birth one group was euthanized and studied the mother and new born. In second group, the diet was changed to NS diet independent of maternal diet after mother delivered and male offspring was studied at twelve weeks old. The tail cuff blood pressure (tcBP) of offspring and maternal group were evaluated. Plasma and renal renin activity, plasma aldosterone, gene expression of renal renin, COX-2, nNOS of mother, newborn and adult offspring were evaluated. The adult offspring RAS was evaluated after fed NS (control), low sodium (LS) or high sodium (HS) for 7 days. The high salt diet during pregnancy induced in 1) mother group: increased blood pressure and protein expression of COX-2 in renal medulla, and decreased plasma and renal renin activity and serum aldosterone. 2) newborn group: decreased gene expression of COX-2 mRNA and increased protein expression of nNOS in the kidney, and any difference was observed in serum aldosterone and plasma or renal renin activity or gene expression 3) adult offspring group: reduced gene expression of renin mRNA, plasma renin activity and serum aldosterone and increased renal renin. Also, increased gene and protein expression of COX-2 in the renal medulla and decreased nNOS gene expression in renal cortex. An exacerbated response of plasma or renal renin activity was observed after RAS stimulation or inhibition. In conclusion the maternal sodium overload induces an exacerbated response of the RAS and COX-2 activation in renal medulla in adult offspring. These characteristics were inherited from maternal phenotype.

Descriptors: 1.Renin activity 2.Salt overload 3.Perinatal environment  
4.Offspring

## **1 INTRODUÇÃO**

---

Ao longo dos anos, diversos pesquisadores têm demonstrado uma forte relação entre a alta ingestão de sódio e o risco de desenvolver doenças cardiovasculares <sup>1-3</sup>. Em 2005, foi fundada a “World Action on Salt Health” (WASH), com a missão de melhorar a saúde das populações em todo o mundo, incentivando a redução gradual da ingestão de sal. A intenção do WASH é encorajar as empresas de produtos alimentícios a reduzir a quantidade de sal e trabalhar com os governos de diferentes países destacando a importância da redução da ingestão de sal da população, e levar isto a todo o mundo <sup>4</sup>.

Brown IJ e colaboradores <sup>5</sup> compararam dois grandes estudos no qual avaliaram o consumo e excreção de sal da população de vários países, o INTERSALT (1985-1987) e INTERMAP (1996-1999). Os autores desta revisão concluíram que, o alto consumo de sódio continua a prevalecer e que iniciativas da saúde pública em conjunto com a indústria de alimentos, são urgentemente necessários para reduzir o consumo de sal, e conseqüentemente, aumentar a expectativa de vida, pois na maioria das populações, a ingestão diária de sal, é acima do recomendado, no qual, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é até 5g/dia <sup>6</sup>.

Um rápido comentário publicado por Havas S. e colaboradores, intitulado “The urgent need to reduce sodium consumption” <sup>7</sup>, confirma grande preocupação em relação a altos níveis de sal consumidos pelas

populações. Aproximadamente 16,7 milhões de pessoas no mundo anualmente morrem com doenças cardiovasculares, e que, em todas as populações, os progressivos aumentos da pressão arterial e a prevalência de hipertensão estão diretamente relacionados com a alta ingestão de sódio. Estes autores também citam outros dados importantes: em junho de 2006, “The American Medical Association” e “Science and Public Health” publicaram um relatório sobre os efeitos nocivos do consumo de sódio em excesso. Este relatório recomenda a redução mínima de 50% de sódio nos alimentos industrializados.

Baseado nisto, surgem algumas perguntas: as gerações futuras serão afetadas pelo aumento do consumo de alimentos com excesso de sal? Este consumo excessivo de sódio durante a gestação pode acarretar sérias consequências para a criança que está sendo gerada?

Partindo do princípio de que o aporte de nutrientes materno ingerido durante a gestação e o transporte dos nutrientes da placenta para o feto são essenciais para o crescimento fetal<sup>8-10</sup> é possível prever a importância da influência do ambiente perinatal sobre o desenvolvimento fetal e consequências na vida adulta

O estudo da influência do ambiente perinatal sobre o feto é denominado “programação fetal”. Esta é definida como resposta a uma alteração específica no período crítico do desenvolvimento fetal do organismo de um mamífero, resultando em modificações permanentes da estrutura, fisiologia e do metabolismo e, predispõe os indivíduos a desenvolverem doenças cardiovasculares, metabólicas e endócrinas quando adultos<sup>9,11,12</sup>.

Relacionado a esta temática, David Barker e outros pesquisadores<sup>9,10,13</sup> tem estudado a associação entre baixo peso ao nascimento e aumento da pressão arterial na vida adulta.

A sobrecarga de sódio durante a gestação tem demonstrado ser um dos fatores responsáveis pela hipertensão arterial na prole adulta, entretanto, o mecanismo pelo qual o ambiente perinatal desenvolve a hipertensão arterial na vida adulta ainda não está bem esclarecido. Estudos de Contreras e col.<sup>14,15</sup> demonstraram que ratos Sprague Dawley expostos à sobrecarga de sódio (3,0% NaCl) durante o período perinatal (gestação e lactação) e sua prole também recebendo sobrecarga de sódio desde o desmame até 30 e 60 dias de vida, apresentaram a pressão arterial elevada e persistente quando adultos. Swenson e colaboradores<sup>16</sup> sugeriram que a pressão arterial elevada encontrada na prole de mães que receberam dieta hipersódica durante a gestação e lactação, pode ser decorrente da ativação dos receptores para angiotensina II tipo 1 cerebrais com conseqüente aumento na atividade do sistema nervoso simpático encontrado nessa prole.

Em outro estudo Porter JP e colaboradores<sup>17</sup> limitaram a dieta hipersódica somente durante o período de gestação, e observaram que a pressão arterial não aumentou na prole masculina adulta, entretanto as proles femininas, quando submetidas a um estresse por contenção, foram mais sensíveis em responder a esse estímulo: apresentaram aumento da pressão arterial e levaram mais tempo para retornar aos níveis basais. Além disso, apresentaram maiores níveis de corticosterona plasmática quando comparados à prole, cujas mães receberam dieta normossódica.

A dieta hipersódica durante a gestação influencia o desenvolvimento cardíaco fetal. Ding Y e colaboradores <sup>18</sup> ofereceram uma dieta com 8% de NaCl a ratas Sprague-Dawley do 3° ao 21° dia da gestação, e observaram que ocorrem mudanças estruturais no coração dos fetos (21° dia) tais como, maior peso da massa cardíaca, miofibrilas desorganizadas, menor tamanho da mitocôndria, menor Angiotensina II (ANGII) e diminuição na concentração plasmática de ANGII na mãe e no feto .

Um estudo que mostra a probabilidade de transmissão fenotípicas da mãe para a prole é de Leandro SM e colaboradores <sup>19</sup>, no qual demonstraram que a atividade da renina plasmática está diminuída na terceira semana de gestação (19° dia) nas ratas que estavam recebendo dieta hipersódica. Também foram encontradas menor expressão gênica dos componentes do SRA e diminuição de angiotensina I e angiotensina II na placenta destes animais. Estes dados podem indicar que através da placenta, além de transferir nutrientes da mãe para o feto, a inibição do sistema renina angiotensina causada pela sobrecarga de sódio também pode ser transferida para a prole.

Em um trabalho recente do nosso laboratório, foi observado que as proles (machos e fêmeas) de mães que receberam sobrecarga de sódio durante a gestação e lactação apresentaram maior pressão arterial na vida adulta. Também, foi observada uma alteração no sistema renina angiotensina (SRA) nestas proles, no qual a atividade de renina plasmática não modulou, ou seja, a atividade da renina plasmática não diminuiu como esperado quando foram submetidas à dieta hipersódica, por uma semana. Já é



conhecido que excesso de sal inibe a atividade desta enzima e conseqüente inibição do sistema renina angiotensina aldosterona <sup>20</sup>.

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) é essencial para a manutenção da pressão arterial, na homeostase de fluidos e dos eletrólitos. Os diferentes conteúdos de sódio ingeridos são importante determinante para a secreção de renina <sup>21-23</sup>.

A renina aspartil-protease é a enzima chave, reguladora do sistema renina angiotensina aldosterona. Além da renina, que é produzida e liberada para a circulação principalmente pelas células justaglomerulares do rim, o sistema é formado de angiotensinogênio, enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensina I, II e seus receptores AT1, AT2. O angiotensinogênio produzido pelo fígado é clivado pela renina, formando o decapeptídeo angiotensina I. A ECA produzida principalmente pelo pulmão cliva a angiotensina I em octapeptídeo, a angiotensina II. Através do receptor AT1, a angiotensina II, é o principal efector deste sistema que causa vasoconstrição e estimula a produção e liberação da aldosterona pelo córtex da supra-renal <sup>21,24</sup>.

Além deste sistema circulante, atualmente é conhecido o SRA tecidual ou local. Este sistema está presente no rim, coração, cérebro, glândula adrenal, nos olhos, testículos e vasos, o que amplifica a ação da ANGII circulante, com importantes implicações para fisiologia e fisiopatologia de doenças cardiovasculares <sup>25</sup>.

A síntese e liberação da renina no rim são estimuladas principalmente pelo nervo simpático e com baixo conteúdo luminal de NaCl. Alguns estudos

mostram que as prostaglandinas produzidas pelas ciclooxigenases e o óxido nítrico também participam desta liberação. E essa é inibida pelo “feedback” negativo da angiotensina II, pressão arterial aumentada, sobrecarga de sal e expansão do volume corpóreo <sup>26-30</sup>.

Conforme citado acima, as prostaglandinas participam na síntese e liberação de renina. A ciclooxigenase (prostaglandina H sintase, COX) é a enzima-chave da biossíntese de prostaglandinas a partir do ácido aracdônico. A COX é encontrada em duas isoformas, COX-1 (forma constitucional) e COX-2 (forma induzível). Em rins de rato, o mRNA da COX-1 está presente nos podócitos glomerulares, na vasculatura renal, nas células mesangiais glomerulares e nos ductos coletores. Já o mRNA da COX-2 apresenta-se restrito a macula densa (MD), à porção espessa da alça de Henle cortical e às células intersticiais da medula renal <sup>31</sup>.

Em situações tais como restrição de sal <sup>28,29</sup>, inibição da enzima conversora da angiotensina I <sup>30</sup>, administração de diuréticos ou hipertensão renovascular experimental <sup>32</sup>, a atividade de renina plasmática encontra-se aumentada. Esse aumento é acompanhado de uma elevação significativa tanto da expressão do mRNA como da proteína da COX-2 nas células da macula densa e na porção ascendente espessa da alça de Henle <sup>33</sup>. Na medula renal, a sobrecarga de sal estimula a produção da COX-2, sendo importante para a manutenção do fluxo sanguíneo e na resposta natriurética na região medular <sup>30,32-34</sup>.

Cheng e colaboradores <sup>30</sup> verificaram que a inibição do receptor AT1, com losartan, ou da ECA com captopril, causam um aumento tanto na

expressão do mRNA como na proteína da COX-2 no córtex renal e esta por sua vez, um aumento na atividade da renina renal, plasmática e a expressão do mRNA da renina no córtex renal. E constataram que a inibição da COX-2 com o SC58236 bloqueou essa resposta, demonstrando que a renina é dependente COX-2.

Em animais “knockout” para COX-2 há inibição da renina na macula densa, o que ocorre também quando administrado o inibidor desta enzima em uma situação de restrição de sódio <sup>35</sup>, indicando que a COX-2 é essencial para a expressão gênica e produção de renina no córtex renal. Outro estudo com camundongos “knockout” para COX-2 confirmou o papel desta enzima na regulação da liberação de renina. Cheng HF e colaboradores <sup>36</sup>, sugeriram que a COX-1 parece não ter relação com liberação da renina mediada pela inibição da ECA, pois nesta situação mesmo na ausência do gene para COX-1 ocorre aumento da atividade plasmática e renal da renina.

Além das prostaglandinas, o óxido nítrico também tem papel importante na síntese e liberação de renina. O óxido nítrico (NO), é produzido a partir do substrato L-arginina e da enzima óxido nítrico sintase (NOS). São conhecidas três isoformas desta enzima: óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e a induzível (iNOS). As duas primeiras isoformas são constitutivas <sup>37</sup>.

O óxido nítrico presente nas células da mácula densa é devido a altas concentrações da isoenzima nNOS encontrado nesta região. Também é encontrado nos ductos coletores da medula renal que, uma vez liberado,

atenua a taxa de filtração glomerular (TFG) <sup>38</sup> e influencia na liberação de renina pelas células granulares <sup>39</sup>.

O NO produzido através da nNOs no rim é importante para a secreção de renina no córtex renal. O consumo de diferentes conteúdos de sal interferem na expressão da nNOs renal <sup>[42, 45]</sup>.

Na literatura é descrito que a expressão gênica e protéica da nNOS aumenta durante a restrição de sódio, acompanhando o aumento da renina, e esta é suprimida com a sobrecarga de sódio na região da macula densa do córtex renal <sup>37,38</sup>.

Roczniak e colaboradores <sup>40</sup> observaram que em ratos alimentados por três dias com dieta hipersódica (4% NaCl), a expressão protéica e do mRNA da nNOS estavam diminuídas no córtex e a expressão protéica aumentada no ducto coletor da medula renal; no entanto, o consumo da dieta hipersódica por três semanas, não foi observado diferença na expressão protéica, sugerindo que, com três dias, o sal produz um “upregulation” da nNOS transitório. Os sinais moleculares para estimulação da expressão protéica da nNOS não permanecem durante as 3 semanas com a dieta hipersódica, demonstrando que existe uma possível adaptação a elevados conteúdos de sal da dieta em longo prazo.

Quando a nNOS é inibida utilizando 7-nitroindazole (7-NI) por quatro semanas, os animais que receberam dieta normossódica e hipossódica apresentaram níveis elevados na pressão arterial, demonstrando claramente que a nNOS é importante para regulação da pressão <sup>41</sup>.

Um estudo recente com camundongos “knockout” para o gene da nNOS mostrou que a atividade plasmática e a expressão gênica de renina não aumentaram durante a restrição de sódio. Uma possível explicação é que a regulação da renina pelo NaCl no aparelho justaglomerular depende significativamente da geração local do NO pelo nNOS <sup>42</sup>.

Baseado nos estudos citados acima, a hipótese deste estudo foi verificar se sobrecarga de sódio materna durante a gestação interferiu nas vias das ciclooxigenases e do óxido nítrico que interagem com a síntese e liberação de renina no rim das mães e das proles ao nascimento e na vida adulta.

## **2 OBJETIVOS**

---

- 1- Avaliar os efeitos da sobrecarga de sal no período gestacional sobre a renina circulante e renal, assim como as enzimas ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintase neuronal nos rins da prole adulta e após testes de estímulo ou inibição do sistema renina-angiotensina.
  
- 2- Estudar o sistema renina angiotensina materno e da prole ao nascimento com o objetivo de verificar se as alterações do sistema renina angiotensina, COX-2 e óxido nítrico observados na prole adulta também são encontradas na mãe e na vida precoce da prole.

### **3 MÉTODOS**

---



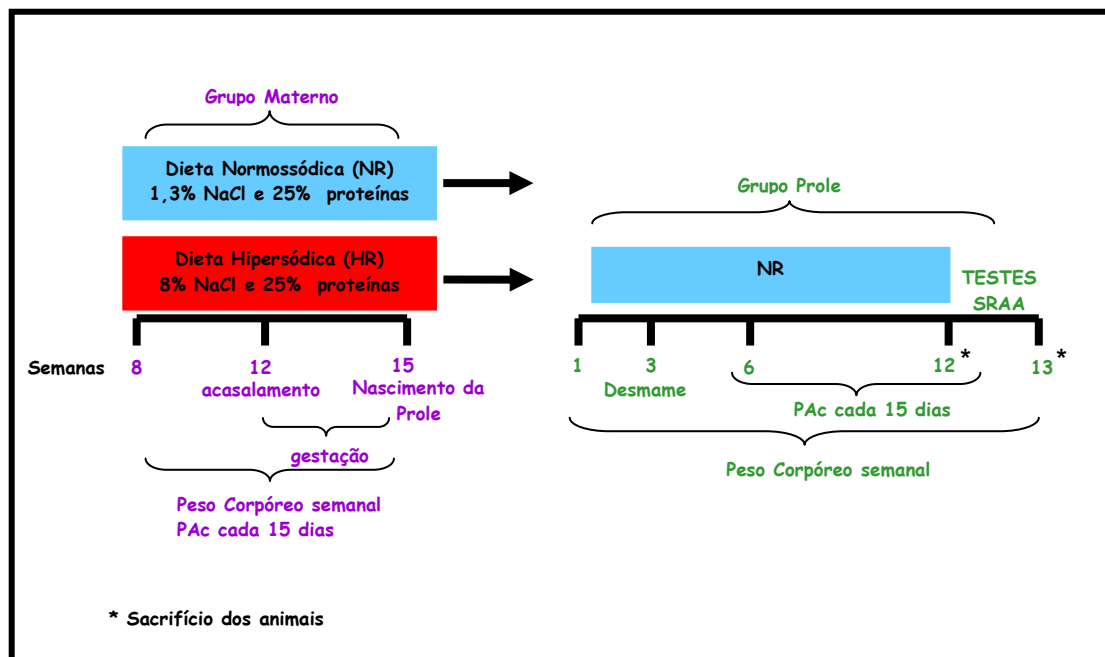
Os experimentos realizados neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob protocolo de pesquisa no. 0989/07 e 042/10.

### 3.1 Protocolo experimental 1

**Grupo materno:** Ratas fêmeas Wistar com oito semanas de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram acondicionadas em gaiolas de plástico (02 animais por gaiola), mantidas em ambiente climatizado a 22°C com ciclos alternados de 12 horas (claro e escuro), água e ração *ad libitum*. Estes animais foram divididos em dois grupos, os quais receberam, desde a 8ª semana de idade uma das seguintes dietas (Harlan/USA):

- normossódica - NR (1,3% NaCl e 25% de proteína),
- hipersódica - HR (8,0% NaCl e 25% de proteína).

Ao completarem 12 semanas de vida, estas ratas foram acasaladas com ratos machos Wistar alimentados com dieta normossódica (Nuvital/Curitiba/Brasil).



**Figura 1:** Protocolo experimental

A pressão arterial caudal das ratas fêmeas foi medida antes (11<sup>a</sup> semana), durante (13<sup>a</sup> e 14<sup>a</sup> semana) e após (16<sup>a</sup> e 17<sup>a</sup> semana) a gestação.

**Grupo prole:** Logo ao nascimento da prole, foram realizadas contagens do número total de filhotes, medida do peso corpóreo das proles e selecionados quatro fêmeas e quatro machos de cada mãe (8 filhotes no total), sendo excluídos os que tinham o maior e menor peso corpóreo. No entanto, apenas os machos foram utilizados neste estudo, enquanto que as fêmeas foram utilizadas por outro pesquisador de nosso laboratório. As mães passaram a consumir dieta normossódica (Nuvilab, Curitiba, PR – Brasil) logo após o nascimento das proles. Ao atingir a 3<sup>a</sup> semana de vida, as proles foram desmamadas.

A medida do peso corpóreo da prole masculina foi realizada semanalmente desde o 3<sup>o</sup> dia nascimento até a 12<sup>a</sup> semana de vida. A partir

da 6ª semana de vida, iniciou-se a medida de pressão arterial sistólica caudal (PAC) a cada duas semanas até a prole atingir a 12ª semana de idade.

Na 12ª semana de vida, as proles foram submetidas aos testes de estímulo ou inibição do sistema renina angiotensina para avaliar a atividade de renina plasmática e renal; aldosterona sérica; expressão gênica da  $\beta$ -actina, COX-2, nNOS e renina nas regiões cortical e medular do rim; e expressão protéica de nNOS e COX-2 que estão descritos a seguir em detalhes.

### **3.2 Medida do peso corpóreo**

A medida do peso corpóreo foi realizada por meio de balança digital específica para pesagem de animais (modelo AS5500, Marte Balança, São Paulo, Brasil).

### **3.3 Medida da pressão arterial sistólica caudal - Pac**

A medida da pressão sistólica caudal foi baseada no princípio da detecção da distensão do vaso arterial causada pelo pulso do sangue que flui através da cauda. Um sensor pizoelétrico altamente sensível detecta a distensão causada pelos pulsos e fornece um sinal que representa a relação da alteração ( $dP/dt$ ) do pulso que foi análogo a velocidade do pulso. O cuff de oclusão e o sensor de pulso foram colocados suavemente sobre a cauda

e a medida é realizada livre de movimento do animal. O aparelho utilizado foi da marca Kent Scientific Corporation, USA, modelo RTBP 2045.

A medida de PAc foi considerada como sendo a média de quatro aferições consecutivas.

### **3.4** Teste de estímulo e inibição do sistema renina angiotensina

Com o intuito de verificar se a sobrecarga de sódio materna influenciou o sistema renina angiotensina, as proles com 12 semanas foram divididas em três grupos e submetidas aos testes de inibição ou ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) por 7 dias:

- Grupo Controle: dieta normossódica (1,3% de NaCl e 25% de proteínas)
- Grupo HO (teste de estímulo do SRAA): dieta hipossódica (0,15% de NaCl e 25% de proteína)
- Grupo Hiper (teste de inibição do SRAA): dieta Hipersódica (8% NaCl e 25% de proteínas)

Ao final de cada teste, os animais foram submetidos à medida de PAc e eutanasiados por guilhotina. Amostras de sangue foram coletadas, separados o plasma ou soro e conservados a -20°C para a medida da atividade da renina plasmática e aldosterona sérica.

Os rins foram removidos e cortados no plano coronal e dissecados em região cortical e medular e conservados a -80°C. Para a realização dos seguintes experimentos: expressão gênica da renina, COX-2, nNOS e  $\beta$ -actina; Western Blotting para nNOS e imunohistoquímica para COX-2 e determinação de atividade de renina tecidual no córtex.

### **3.5 Avaliação da expressão gênica do mRNA da renina, COX-2 e nNOS por RT-PCR**

As expressões gênicas do mRNA da renina, COX-2 e nNOS no córtex e medula renais foram determinadas a partir do RNA total utilizando o método de transcrição reversa (RT) para a obtenção do DNA complementar (cDNA) seguido de sua amplificação por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR).

#### **3.5.1 Extração de RNA total**

O RNA total do córtex e medula renal foi extraído utilizando o reagente TRIzol (TRIzol reagent, Invitrogen). Para isto, foram pesadas 100 mg de tecido renal em tubo de plástico estéril. Em seguida foi adicionado 1,0 mL de TRIzol e homogeneizado em aparelho Ultra-Turrax (IKA Works Inc., modelo T-25, EUA). Todo o procedimento foi realizado sob gelo.

O homogenato foi transferido para um tubo de plástico livre de RNase e incubado por 5 min à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. Este homogenato foi centrifugado a 4°C por 10 min a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de plástico e foi adicionado 200 µL de clorofórmio para separação da amostra em fase orgânica e inorgânica. Esta solução foi agitada no vórtex por 15 segundos e incubada à temperatura ambiente por 2 min, sendo a seguir centrifugada a 4°C por 15 min, a 14.000 rpm. Após a centrifugação, a mistura separa em camada inferior-vermelha, fase do fenol clorofórmio; uma intermediária e a camada superior incolor, fase aquosa onde se encontra o RNA total.

A fase aquosa da camada superior foi transferida para outro tubo de plástico e foram acrescentados 500 µL de álcool isopropílico para precipitação do RNA total.

A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 min e centrifugada a 4°C por 10 min, a 14.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e o *pellet* formado no fundo do tubo foi lavado com 1,0 mL de etanol 75,% gelado. Novamente o material foi centrifugado a 4°C a 9.000 rpm por 5 min e o sobrenadante desprezado. Em seguida, os tubos foram centrifugados rapidamente com o objetivo de retirar o máximo do etanol que ficou retido após a inversão do tubo.

Para a solubilização do RNA, o *pellet* foi ressuspendido com 100 µL de água ultrapura (Milli-Q) e esta solução foi incubada em banho seco a 65°C por 10 min.

As amostras foram armazenadas em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  após a quantificação do RNA total e o teste de pureza.

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

Para o cálculo da pureza do RNA total foram usados os valores de densidade óptica da razão entre a leitura a 260 nm (que detecta RNA) e a leitura a 280 nm (que detecta proteína). O resultado aceitável deve estar entre 1,6 a 2,2.

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

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

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

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

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

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

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

Numa segunda etapa, foi acrescentado um *MIX* de soluções contendo 4 µL de tampão de reação da enzima transcriptase reversa 5X, 1 µL da mistura de dNTPs (2'-Deoxinucleotídeo 5'-trifosfato, 10 mM), 2,4 µL de cloreto de magnésio 25 mM; 6,6 µL de água Milli-Q e 1 µL da enzima transcriptase reversa Improm II. Após a adição deste *MIX*, as amostras foram levadas ao termociclador para desnaturação por 15 min a 70°C; anelamento por 5 min a 25°C e para extensão por 60 min a 42°C. O cDNA obtido foi então guardado em freezer -20 °C para amplificação dos genes de interesse por PCR.



### 3.5.3 Reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do cDNA

A reação de PCR foi realizada para quantificar os genes de renina receptores AT1 e AT2, COX-2, nNOS e beta-actina a partir do cDNA.

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

Foi preparado um tubo controle negativo contendo a solução *MIX* sem o cDNA com objetivo de detectar contaminação. Em seguida, as amostras e o controle negativo foram colocados no termociclador (marca Bio-Rad-DNAEngine®, Peltier Thermal Cycler) para a reação de PCR, onde a fase inicial de dissociação da fita molde de cDNA foi a 94° C por 3min, seguida de desnaturação a 94° C por 1 minuto, sendo que a temperatura de anelamento e o número de ciclos variou conforme o primer usado (tabelas 2). A extensão final foi realizada a 72° C por 10 minutos e em seguida foi resfriado a 4° C por tempo indeterminado. Ao término da reação no termociclador, as amostras foram retiradas e conservadas a -20° C até a realização da eletroforese em gel de agarose a 2%.

### 3.5.4 Eletroforese em gel de agarose do produto amplificado

Aos produtos obtidos da reação de PCR foi adicionado 2  $\mu\text{L}$  de solução de *Blue* RNA em cada amostra e depois, as mesmas foram aplicadas (20  $\mu\text{L}$  de amostra) em gel de agarose 2% em tampão TBE 1X (Trizma-base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2mM e pH 8,0) contendo brometo de etídio.

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

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

**Tabela 1:** Sequência dos primers utilizados no PCR

Gene	Sequência dos Primers
<b>β-actina</b>	(s) 5`TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG -3` (as) 5`TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT -3`
<b>Renina</b>	(s) 5`CATTACCAGGGCAACTTTTAC -3` (as) 5`TCATCGTTCCTGAAGGAATTC -3`
<b>nNOS</b>	(s) 5`GAATACCAGCCTGATCCATGGAACACC -3` (as) 5`CTCCAGGAGGGTGTCCACCGCATGCC -3`
<b>COX-2</b>	(s) 5`ACACTCTATCACTGGCATCC -3` (as) 5`GAAGGGACACCCTTTCACAT -3`

**Tabela 2:** Temperatura de anelamento (TM) e nº de ciclos dos primers utilizados no PCR

Gene	TM	Nº de ciclos	Fabricante
<b>β- actina</b>	<b>57,8°C</b>	35	<b>IDT, IA (USA)</b>
<b>COX-2</b>	<b>58,3°C</b>	40	<b>IDT, IA (USA)</b>
<b>Renina</b>	<b>51,5°C</b>	35	<b>IDT, IA (USA)</b>
<b>nNOS</b>	<b>71,9°C</b>	40	<b>IDT, IA (USA)</b>

### 3.6 Western blotting

A expressão protéica das enzimas COX-2 e nNOS foram quantificadas pela técnica de Western blotting. nas amostras do rim (córtex e medula) do grupo materno e o rim inteiro da prole recém-nascida.

Para a determinação da expressão protéica de nNOS, as amostras de rim (córtex e medula) do grupo materno e o rim inteiro da prole recém-nascida foram processadas da seguinte maneira: estas foram pesadas, e adicionado tampão de extração [100 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM EDTA, 10% glicerol, 1 mM DTT, 10% SDS na proporção 1:10 [peso/volume(g/mL)]. Antes da homogeneização, foi adicionado o inibidor de proteinase 1:10 [ peso/ volume (mg/uL) -SIGMA; Missouri, EUA] e em seguida centrifugadas à 10.000xg, 4°C . O sobrenadante foi separado, aliquotado e guardado no freezer -80°C.

As amostras (córtex e medula renal) para a determinação da expressão protéica COX-2 da prole adulta foram preparadas da seguinte maneira: as amostras foram pesadas, homogeneizadas em tampão (30 mM Tris-HCl, pH 8.0 e 100 µM PMSF) na proporção 1:9 [peso do tecido/volume]. A seguir o homogenato foi centrifugado à 10.000xg, -4°C. O sobrenadante foi transferido para tubos de policarbonato específicos para ultracentrífuga e centrifugado a 100.000xg por 1 hora para a obtenção dos microssomos, descrito por Harris RC e colab<sup>51</sup>. Os microssomos foram ressuspensos em tampão SDS e as alíquotas foram guardadas a -80°C.

A concentração de proteína das ambas amostras preparadas foram determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Cem microgramas de proteína (100ug) de cada amostra de homogenato misturada no tampão Laemmli2X [4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glicerol, 0.004% bromophenol blue, 0.125M Tris HCl] na proporção 1:1 (volume/volume), foram aplicadas nos *slots* do gel SDS – PAGE (sódio dodecilsulfato poliacrilamida) 12% e submetidas à eletroforese em cuba para mini-gel (BIO-RAD, Hercules CA, EUA).

Após este processo, as bandas de proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membranas de nitrocelulose 0,20 µm (BioAgency, Biotecnologia) por 30 minutos a 10 V. utilizando o trans-blot semidry (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Em seguida, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5% (Molico, em pó) diluído na solução Tris-tamponada (TBS ) por 3 horas. Após este procedimento, as membranas foram lavadas com uma solução Tris-tamponada com Tween (TBSt) e posteriormente incubadas com os seguintes anticorpos: coelho anti-camudongo nNOS/NOS Type 1 na diluição 1:2000 (BD Biosciences Pharmingen, USA),ou rabbit anti-COX-2 (murine, Cayman Chemical, MI, USA) na diluição 1:200, durante a noite a 4°C ou monoclonal anti-β-actina clone AC-15 (Sigma, Missouri, USA), diluição 1:5000, por 2h a temperatura ambiente. A seguir as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários ligados a peroxidase (HRP) anti-rabbit para nNOs e COX-2, diluição 1:5000 por 2 h a temperatura ambiente (código SC 2030, Santa Cruz, CA, USA) e anti-mouse para β-actina, diluição 1:5000 por 2h, temperatura ambiente (código P0206, Dako North América, CA, USA).

O complexo antígeno-anticorpo foi revelado utilizando o substrato quimioluminescente ECL (Amersham Biosciences, UK). A seguir, as bandas foram expostas aos filmes de raios-X (Kodak, São Paulo, Brasil ou Amersham Biosciences, UK Ltd). As quantificações das bandas foram feitas por meio do programa Scion image for Windows (Scion Corporation, USA).

### **3.7 Imunohistoquímica**

A proteína COX-2 no rim de proles recém nascidas, e das mães que receberam dieta NR e HR durante a gestação, foi quantificada através do método de imunohistoquímica.

#### **3.7.1 Preparo do tecido renal**

O rim obtido através eutanásia por guilhotina, foi cortado transversalmente e fixado em solução Dubosq-Brasil durante 40 minutos com a finalidade de conservação das estruturas. Em seguida, os rins permaneceram por 2 horas em solução de formol 10% em tampão fosfato 0,1M e para posterior processo de parafinização.

Os rins foram retirados da solução de formol 10% em tampão fosfato 0,1M e colocados em caixetas perfuradas e identificados. Em seguida, estas caixetas foram processadas por meio de processador automático de

tecidos (Jung-Histokinette 2000 Leica, Nussloch, Alemanha) por um período de 14 horas.

Neste processador, foram realizadas as seguintes etapas: desidratação dos tecidos passando sucessivamente em banhos de álcool com concentrações crescente: álcool 50%, álcool 70%, álcool 96% (2 banhos), álcool absoluto (2 banhos). Em seguida, a fase da diafanização, processo de tornar o tecido translúcido e permeável para a impregnação da parafina, que são banhos de xilol+álcool e 3 banhos de xilol. O processo de parafinização finalizou-se com 2 banhos em parafina fundida a 60°C. O material parafinado foi incluído em blocos e após a solidificação, foi mantido em temperatura ambiente.

Os blocos de parafina permaneceram 30 minutos no freezer a -20°C antes da realização do corte. Foram realizados cortes de 3 a 4 µm de espessura utilizando micrótomo (Reichert Jung Supercort 2065 Leica, Nussloch, Alemanha) com navalhas descartáveis. Estes cortes foram colocados sob lâminas de vidro previamente revestidas de silano 2,0%. Estas lâminas permaneceram em estufa (Fabbe-Primar, São Paulo, Brasil) a 60°C por 2 horas e, em seguida, as mesmas foram armazenadas e conservadas a 4°C.

### **3.7.2 Silanização de lâminas**

A silanização das lâminas de vidro foi realizada antes de receber os cortes dos tecidos. Para isso, as lâminas foram previamente lavadas com detergente neutro não iônico 2,5% e secadas. As lâminas foram

mergulhadas por 5 minutos em acetona e em seguida na solução de silano 2,0% em acetona [3-aminopropil] trietoxisilane (Sigma, Chemical Co, St Louis, EUA) por 2 minutos. Para a retirada do excesso da solução de silano, as lâminas passaram por 2 banhos de acetona por 10 segundos, seguidos por 2 banhos em água destilada por 10 segundos. As lâminas foram inclinadas sobre papel-toalha e secas em estufa a 60° C por 30 minutos.

### **3.7.3 Reação de imunohistoquímica**

Antes da realização da técnica de imunohistoquímica, as lâminas passaram por um processo de desparafinização. Após 30 minutos em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol durante 9 minutos, por 3 vezes. A seguir, as mesmas foram mergulhadas em álcool absoluto por 5 minutos, 2 vezes, seguida de álcool 96% por 3 minutos, 2 vezes e finalmente água destilada por 5 minutos. Finalizado este processo, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS) pH7,6. A solução TBS foi preparada misturando-se Tris HCl 0,5M (Serva, Heidelberg, Alemanha) pH7,6 acrescida de cloreto de sódio 0,15M (Merck, Darmstadt, Alemanha), na proporção de 1:10.

Após desparafinização as lâminas foram levadas a panela a vapor por 30 minutos para exposição antigênica. Inicialmente, foi feito um bloqueio de avidina endógena por 15 minutos seguido de um bloqueio da biotina endógena por 15 minutos (Vector, Burlingame, EUA). Após este



procedimento, foi realizado também bloqueio inespecífico com caseína (Dako North América, CA, USA), durante 30 minutos.

Após estes bloqueios, os cortes foram submetidos à incubação com anticorpo primário policlonal anti-rabbit COX-2 na diluição de 1:20, por aproximadamente 20 horas, 4°C, em câmara úmida. Ao final deste período, as lâminas foram lavadas em TBS durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com uma solução de anticorpo secundário anti-rabbit 1:1000 (Vector, Burlingame, EUA) por 45 min. Depois de novas lavagens com TBS as lâminas foram e incubadas com o complexo ABC/AP (Alkaline Phosphatase Rabbit IgG AK-5001 - Vector) por 30 min.

Para a visualização da positividade das células foi utilizado um substrato cromogênico preparado à base do corante “fast red”. Para esta revelação, as lâminas foram então incubadas com o substrato composto de 2 mg de naftol AS-MX-fosfato (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) dissolvido em 200 µl de dimetilformamida (Merck, Darmstadt, Alemanha), acrescido de 9,8 ml de uma solução Tris-tamponada a 0,1M Ph = 8,2 e 10 mg do corante “fast red” (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA). Para bloquear a fosfatase alcalina endógena foram adicionados 20 µl de levamisol 1M (Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA). Este substrato foi então filtrado utilizando-se um filtro comercial de porosidade 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil).

As lâminas foram contra-coradas com o corante hemalumbre de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha). A reação imunohistoquímica foi protegida com lamínulas utilizando gelatina glicerinada Kaiser (Merck, Darmstadt, Alemanha) previamente aquecido.

A quantificação da COX-2 no córtex, medula renal e no rim total do recém-nascido, foi realizada sob microscópio óptico com aumento de 200x. Para a contagem no córtex renal do rato adulto, foi quantificado o número de células da macula densa positiva (com marcação para a COX-2) em 50 glomérulos (macula densa +/-50 glomérulos).

Na medula renal, foram quantificadas as células positivas em 25 campos (número de células positivas/número de campos x fator de correção 16,6 = cel/mm<sup>2</sup>), e no rim do neonato as células positivas foram quantificadas em 20 campos (número de células positivas/número de campos x fator de correção 16,6 = cel/mm<sup>2</sup>).

### **3.8 Métodos analíticos**

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

Dois mililitros (2 mL) de sangue foram coletados após a decapitação em tubos de ensaio contendo anticoagulante (32 µl de EDTA 3,8%, pH 5,5 por 1 mL de sangue) sob gelo. Após centrifugação, o plasma foi armazenado à -20 °C até o seu processamento. A ARP foi medida pelo método de radioimunoensaio (RIE) utilizando “kit” comercial da marca DiaSorin (código CA-1533, MN, USA).

### 3.8.2 Determinação da concentração de aldosterona sérica

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

### 3.8.3 Quantificação de atividade da renina no córtex renal (ARR)

Cinquenta miligramas (50 mg) de fragmento de córtex renal foram adicionados a 1mL de solução fisiológica NaCl 0,9% gelada para homogeneização. O homogenato foi centrifugado 1.100 g à  $4^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (modelo CR 21, Hitachi, Tokyo, Japan).

A seguir, o sobrenadante foi separado e ajustado a uma concentração de 0,5 mg/mL com tampão pH 7,4 [dissodium EDTA 15 mM, 2,3 dimercaprol 5 mM e 8-hidroxyquinolina 3,5 mM].

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

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

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

### 3.9 Protocolo experimental 2

Com objetivo de entender os resultados encontrados na prole adulta, foi proposto estudar o sistema renina angiotensina materno e a prole na vida precoce (ao nascimento). Portanto, foi utilizado o mesmo protocolo experimental da prole adulta, porém as mães e a prole foram estudadas logo após o nascimento destas.

Dentro das vinte quatro horas após o nascimento das proles, foram realizadas a medida do peso corpóreo individual e contagem da prole. Em seguida, tanto a prole como a mãe foram eutanasiadas por guilhotina. As amostras de sangue foram coletadas, separados o plasma ou soro e conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para a medida da atividade da renina plasmática e aldosterona sérica.

Os rins maternos foram removidos e cortados no plano coronal e dissecados em região cortical e medular ou realizado o corte transversal. A região cortical do rim esquerdo, e medular do rim esquerdo e direito, e os rins das proles recém nascidas foram guardados separadamente e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para a realização dos seguintes experimentos: expressão gênica do mRNA de renina,  $\beta$ -actina, COX-2 e nNOS pelo método de RT-PCR ; expressão protéica de nNOS por Western Blotting; quantificação de proteína COX-2 por imunohistoquímica e determinação de atividade de renina renal.

### 3.10 Análises estatísticas

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. A distribuição de Gaussian foi testada antes dos testes. O teste t de Student foi utilizado com a análise de correção de Welch. O Two-Way ANOVA foi usado para analisar a interação entre tempo e tratamento, com pós-teste de Bonferroni. A significância estatística foi estabelecida para  $p < 0,05$ . Estas análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad 4.00 para Windows (Graph Pad Software, San Diego, CA, EUA).

## **4 RESULTADOS**

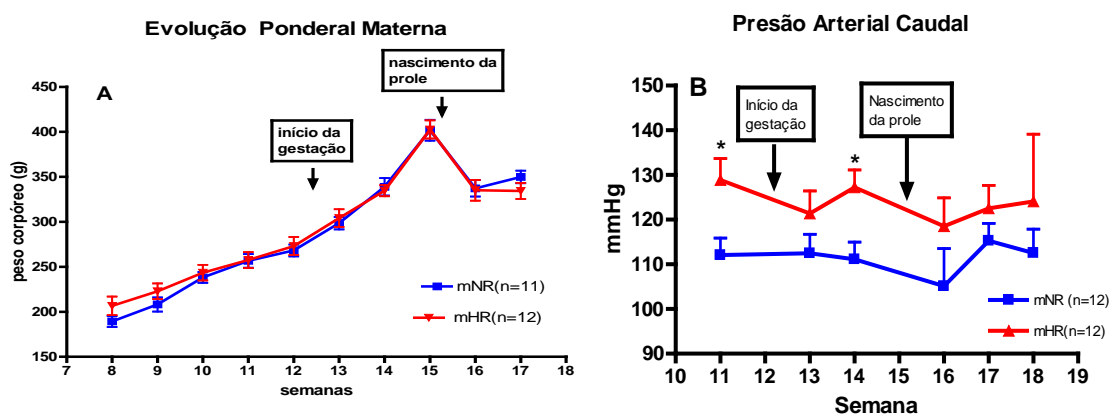
---

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro-padrão da média ( $\pm$ EPM) e representados em figuras e tabelas. Tabelas correspondentes às figuras encontram-se no item 7.

#### 4.1 Evolução ponderal e Pressão arterial caudal sistólica do grupo materno

A evolução ponderal materna não foi diferente entre as dietas ao longo do estudo. Entretanto, observou-se maior ganho de peso corpóreo materno em ambos os grupos na 15ª semana de gestação (semana do nascimento da prole), seguido de um declínio (figura 2 A, tabela 3).

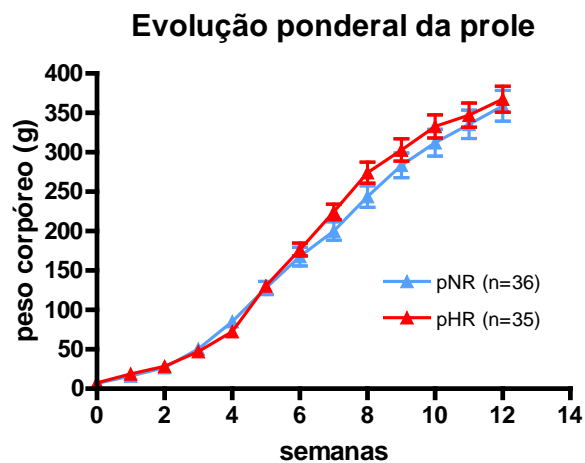
A pressão arterial caudal foi maior na 11ª e 14ª semana no grupo materno da dieta HR comparada ao grupo de dieta NR (Figura 2 B, Tabela 4).



**Figura 2.** Evolução ponderal (A) e pressão sistólica caudal (B) materna. As mães receberam dieta mNR (normossódica, 1,3%NaCl), ou mHR (hipersódica 8,0%NaCl) da 8ª a 15ª semana. Após o nascimento da prole, todas as mães passaram a receber dieta normossódica. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Two way-ANOVA)

## 4.2 Evolução ponderal da prole masculina

A evolução ponderal não foi diferente entre as proles, cujas mães receberam dieta NR e HR (Figura 3; Tabela 5).



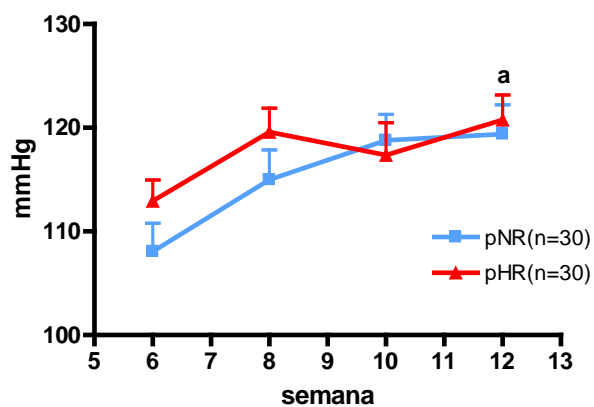
**Figura 3** - Evolução ponderal das proles cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR), e hipertônica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Two way-ANOVA)



### 4.3 Pressão arterial sistólica caudal da prole adulta

#### 4.3.1 PAc ao longo do crescimento

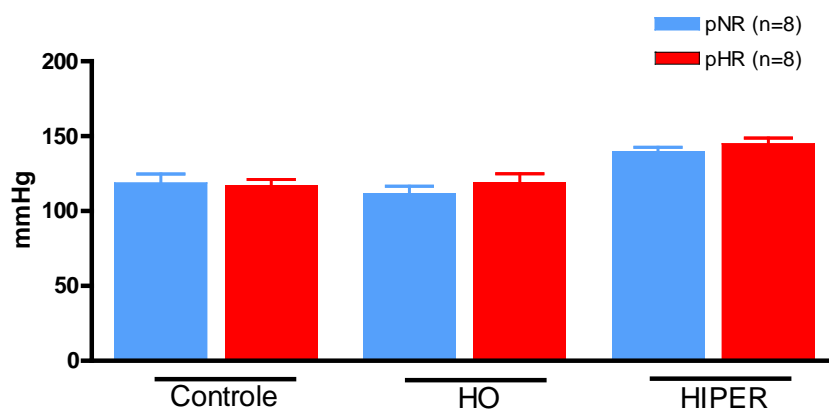
A pressão arterial caudal na prole NR (pNR) foi maior na 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana comparado com a 6<sup>a</sup> na mesma dieta. Na prole HR (pHR), a pressão arterial caudal foi maior na 8<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana comparada com a 6<sup>a</sup> na mesma dieta (Figura 4, Tabela 6).



**Figura 4.** Pressão arterial sistólica caudal das proles cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (NR) e hipersódica (HR). Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Two way-ANOVA).

#### 4.3.2 PAc após o teste de estímulo e inibição do SRA

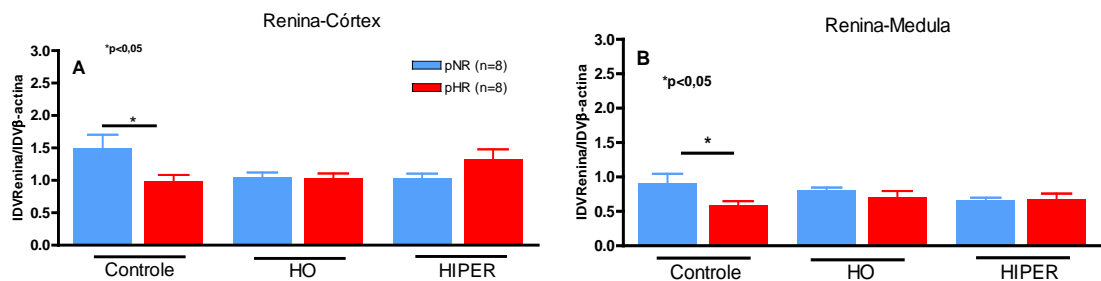
A PAc não foi diferente entre os grupos antes e após os testes. (Figura 5, Tabela 7). Este resultado indica que a sobrecarga de sódio materna não influenciou a regulação da pressão arterial da prole.



**Figura 5:** Pressão sistólica caudal do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test T- student).

#### 4.4 Expressão gênica do mRNA da renina no rim

No grupo controle da prole adulta, a expressão gênica da renina no córtex renal foi significativamente menor na prole pHR quando comparada à prole pNR tanto no córtex e na medula renal (Figura 6A, Tabela 8 e Figura 6B, Tabela 9 respectivamente). Após os testes nenhuma diferença foi observada entre as proles. Estes resultados sugerem que o sistema renina angiotensina renal das proles pHR foi influenciado pela dieta materna, pois estas proles não receberam em nenhum momento a dieta hipersódica desde o nascimento.

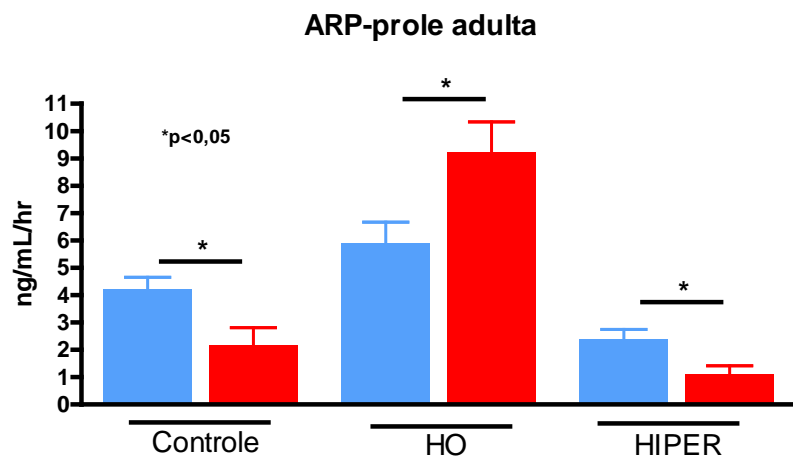


**Figura 6:** Expressão gênica da renina no córtex (A) e medula (B) renal do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test T- student)

## 4.5 Atividade da Renina Plasmática (ARP)

No grupo controle, a atividade da renina plasmática (ARP) foi menor na prole pHR comparado à prole pNR. Após o teste de estímulo (HO), a ARP foi significativamente maior na prole pHR comparado a pNR. E no teste de inibição (HIPER), a prole pHR apresentou a ARP significativamente menor comparado a pNR (Figura 7, Tabela 10).

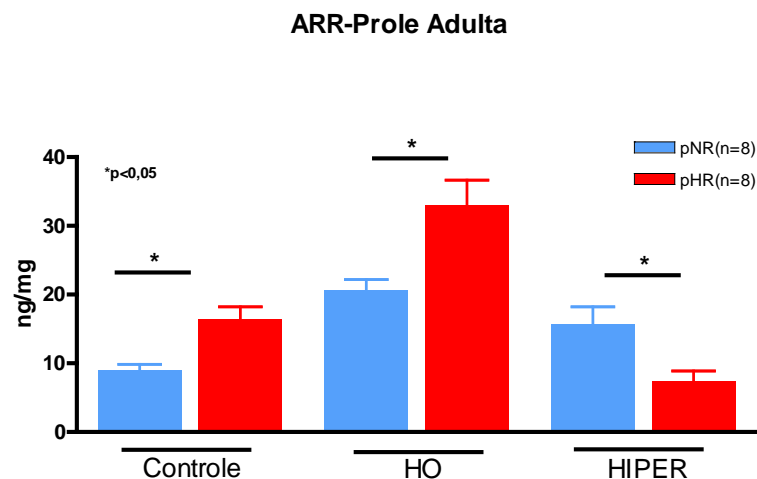
Assim como a expressão gênica da renina renal, a atividade da renina plasmática da prole pHR provavelmente foi influenciada pela sobrecarga de sódio materna. Também foi possível observar de que a prole pHR apresentou uma resposta exacerbada frente a estímulo ou inibição do SRA possivelmente estes também são efeitos da dieta hipersódica materna.



**Figura 7:** Atividade da renina plasmática do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test T- student)

#### 4.6 Atividade de renina renal (ARR)

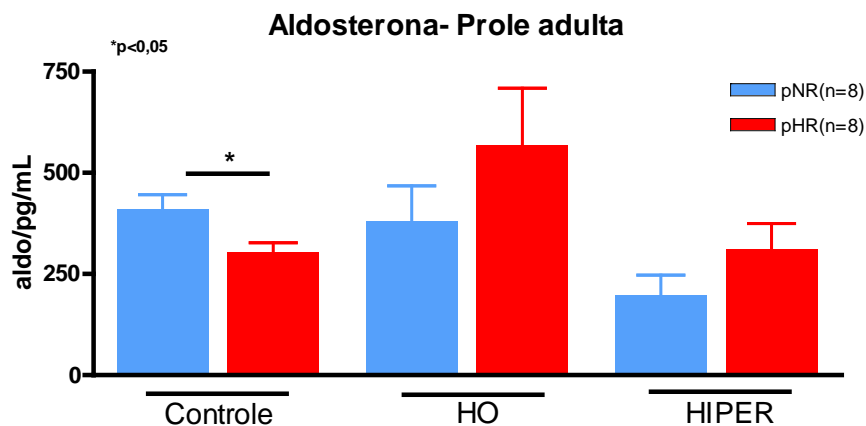
A atividade da renina renal (ARR) foi significativamente maior nas proles adultas pHR quando comparadas à prole pNR do grupo controle. Após o teste de estímulo (HO), ARR foi significativamente maior e menor após teste de inibição (HIPER) na prole pHR comparada a pNR (figura 8, tabela 11). Diferente da expressão gênica da renina e da ARP, a atividade da renina renal da prole pHR foi maior no grupo controle. Entretanto, após os testes de estímulo ou inibição do SRA, a atividade da renina renal respondeu de forma similar atividade da renina plasmática.



**Figura 8:** Atividade da renina renal do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test T- student)

## 4.7 Aldosterona sérica

A concentração de aldosterona sérica foi menor na prole pHR comparado à prole pNR do grupo controle. Após os testes de estímulo (HO) ou inibição (HIPER), a concentração de aldosterona sérica não foi diferentes entre as proles (Figura 9, Tabela 12). De acordo com a literatura, a aldosterona é regulada pelo sistema renina angiotensina, conseqüentemente, encontrará diminuída pela dieta hipersódica, portanto, pode-se inferir que a dieta hipersódica materna também pode ter influenciado na regulação de aldosterona sérica nestas proles.



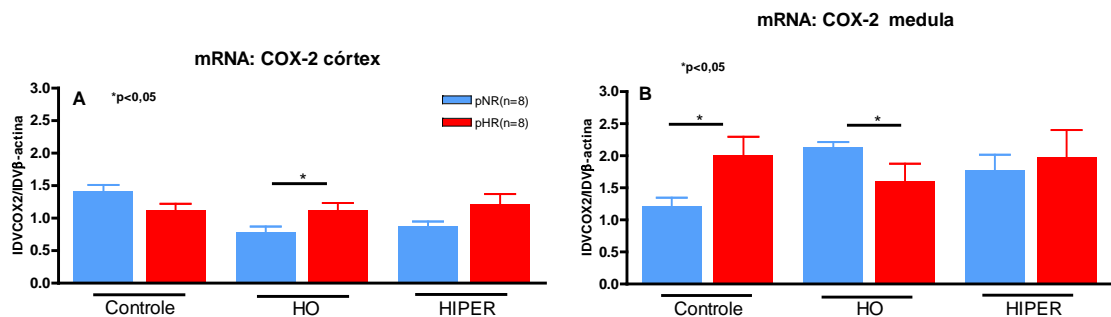
**Figura 9:** Aldosterona sérica do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test T- student)

## 4.8 Ciclooxygenase -2 no rim (COX-2)

### 4.8.1 Expressão gênica do mRNA da COX-2

A expressão gênica da COX-2 no córtex renal não foi diferente entre as proles no grupo controle. Após o teste de estímulo (HO), a expressão gênica do mRNA da COX-2 foi maior quando comparado a pNR (Figura 10 A, Tabela 13).

Já na medula renal, a expressão gênica do mRNA da COX-2 foi significativamente maior na prole pHR comparado a pNR do grupo controle. (Figura 10B, Tabela 14).



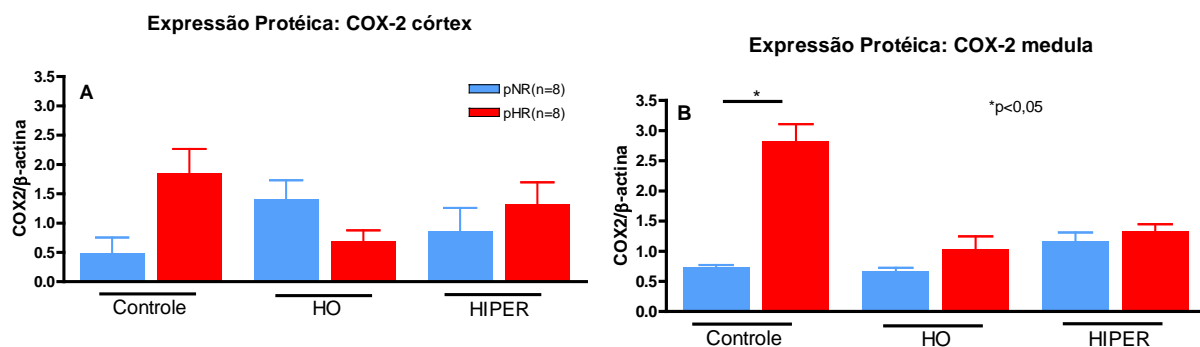
**Figura 10:** Expressão gênica (A e B) da ciclooxygenase-2 (COX-2) do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test T- student)

#### 4.8.2 Expressão protéica da COX-2

A expressão protéica da COX-2 no córtex renal não foi diferente tanto no grupo controle como após os testes (figura 11A, tabela 15).

Na medula renal, a expressão protéica da COX-2 foi significativamente maior na prole pHR comparada à prole pNR grupo controle. (figura 11B, tabela 16).

Apesar da expressão gênica e a atividade da renina diminuída no grupo controle da pHR, a COX-2 não diminuiu conforme esperado no córtex renal do deste grupo, porém na região medular a COX-2 aumentou, pois a dieta hipersódica aumenta a expressão da COX-2 na medula renal, porém, lembrando novamente, que em nenhum momento os animais do grupo controle receberam a dieta hipersódica, somente as mães durante a gestação, demonstrando novamente a clara influencia da dieta materna na sua descendencias.



**Figura 11:** Expressão protéica (A e B) da ciclooxygenase-2 (COX-2) do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (One way-ANOVA e Test T- student)

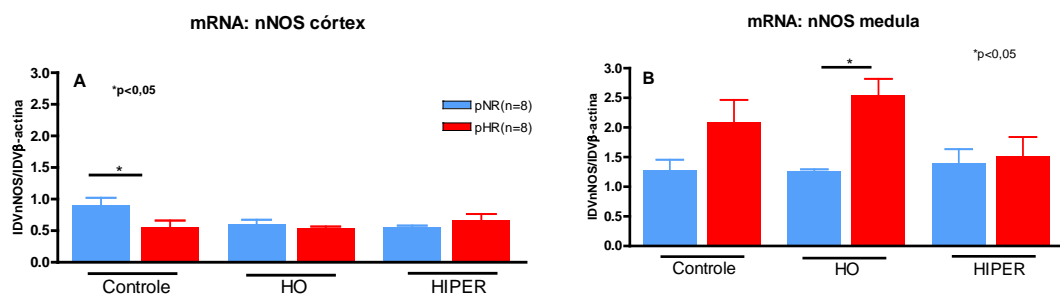


## 4.9 Óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) renal

### 4.9.1 Expressão gênica do mRNA

A expressão gênica do mRNA da nNOS no córtex renal foi significativamente menor na prole pHR comparado a pNR no grupo controle. Após os testes de estímulo (HO) e de inibição (Hiper) do SRA, nenhuma diferença foi observada entre as proles (Figura 12A, Tabela 17).

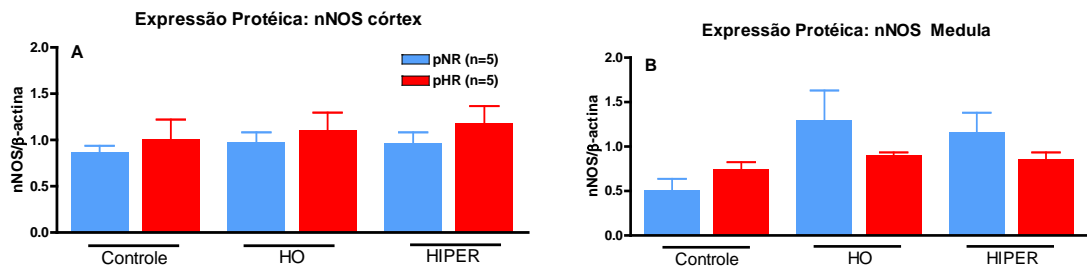
Na medula renal, a expressão gênica do mRNA da nNOS não foi diferente entre as proles do grupo controle, entretanto esta expressão foi significativamente maior após os teste de estímulo (HO) comparado à prole pNR (Figura 12B, Tabela 18).



**Figura 12:** Expressão gênica (A e B) da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test T- student)

#### 4.9.2 Expressão protéica do nNOS

Não foi observada nenhuma diferença da expressão protéica da nNOS no rim entre as proles (Figura 13 A e B; tabela 19,20).



**Figura 13:** Expressão protéica (A e B) da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) do grupo controle e após os testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA das proles masculinas adultas, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test T- student)

## 4.10 Grupo Materno e prole recém nascida

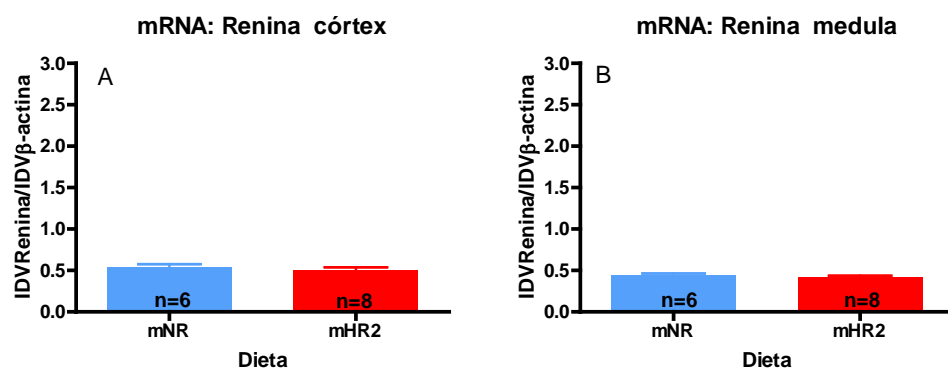
Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos das proles adultas, julgou-se necessário avaliar o sistema renina angiotensina, COX-2 e a nNOS das mães e das proles recém nascidas masculina. Para tanto, ambas, mães e proles, foram eutanasiadas dentro das primeiras 24hs após o nascimento das mesmas.

A seguir estão descritos os resultados obtidos.

### 4.10.1 Grupo materno

#### 4.10.1.1 Expressão gênica do mRNA da renina no rim

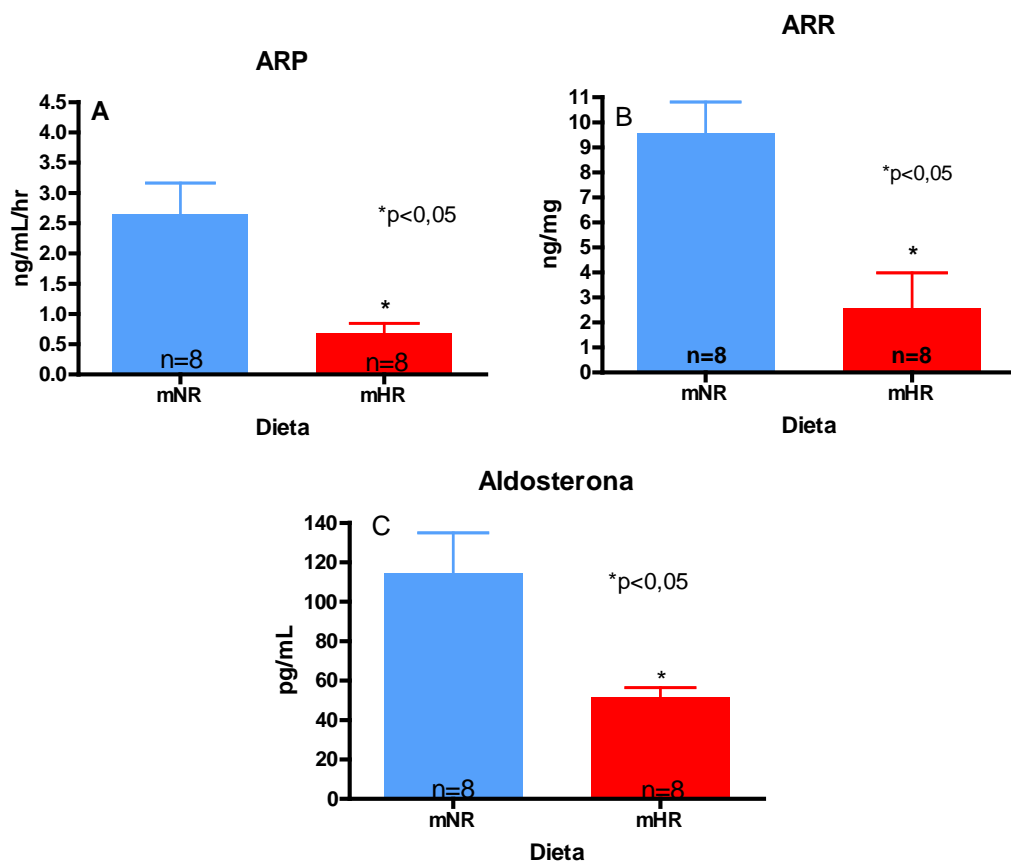
No grupo materno a expressão gênica da renina não foi diferente entre as dietas. (Figura 14, Tabela 21)



**Figura 14:** Expressão gênica do mRNA da renina no córtex (A) e na medula (B) renal do grupo materno submetidos à dieta normossódica (NR) e hipersódica (HR). Valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test-t student)

#### 4.10.1.2 Atividade da Renina Plasmática (ARP) e renal (ARR) e aldosterona sérica

A ARP das mães (figura 15A) que receberam a dieta HR durante a gestação foi menor ( $0,67 \pm 0,2$  ng/mL/hr) comparado às mães que receberam dieta NR ( $2,65 \pm 0,5$  ng/mL/hr). A ARR também foi significativamente menor na mHR ( $2,56 \pm 1,42$  ng/mg/hr) comparado a mNR ( $9,55 \pm 1,2$  ng/mg/hr) (figura 15 B). Da mesma maneira, a aldosterona sérica também foi significativamente menor na mHR ( $51,63 \pm 4,7$  pg/mL) comparado a mNR ( $114,2 \pm 20$  pg/mL), representado na figura 15 C.

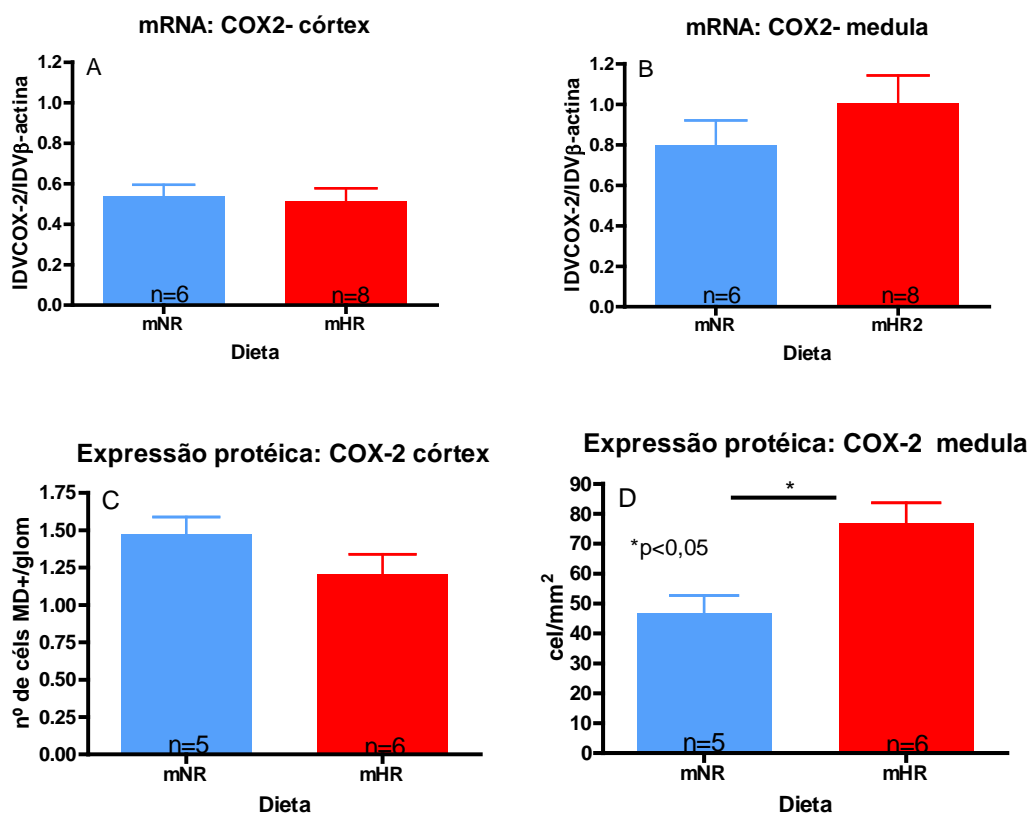


**Figura 15:** Atividade da renina plasmática (A), atividade da renina renal (B) e concentração de aldosterona sérica (C) do grupo materno submetido à dieta normossódica (NR) e hipersódica (HR). Valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (test-t student)

#### 4.10.1.3 Expressão gênica e protéica da COX-2

A expressão gênica do mRNA da COX-2 no córtex e na medula renal não foi diferente entre os grupos maternos (figura 16 A e B, tabela 21).

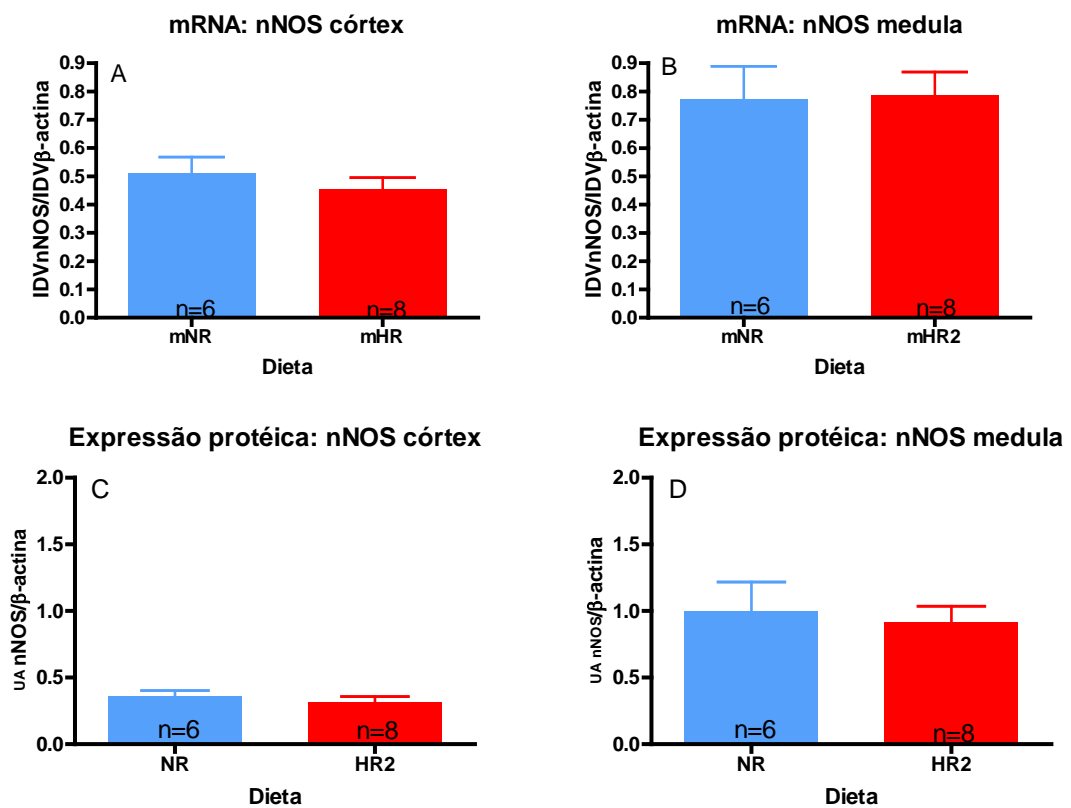
Quanto à expressão protéica, realizada por imunohistoquímica, não foi diferente entre os grupos no córtex renal. Já na medula, esta expressão foi significativamente maior na mHR comparado ao grupo mNR (Figura 14 C e D, Tabela 22).



**Figura 16:** Expressão gênica do mRNA da COX-2 (A, B) e protéica (C, D) renal do grupo materno submetidos à dieta normossódica (NR) e hipersódica (HR). Valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test-t student)

#### 4.10.1.4 Expressão gênica do mRNA e protéica da nNOS

Nenhuma diferença foi observada na expressão gênica (Figura 17 A e B, Tabela 21) e protéica de nNOS renal (Figura 17 C e D, Tabela 22) entre os grupos maternos.

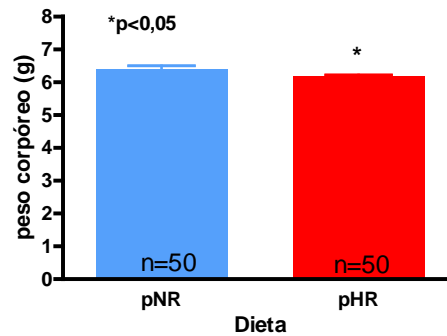


**Figura 17:** Expressão gênica (A e B) e protéica (C e D) da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) do grupo materno submetidos à dieta normossódica (NR) e hipersódica (HR). Valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Test-t student)

## 4.10.2 Grupo recém-nascido

### 4.10.2.1 Peso corpóreo da prole masculina

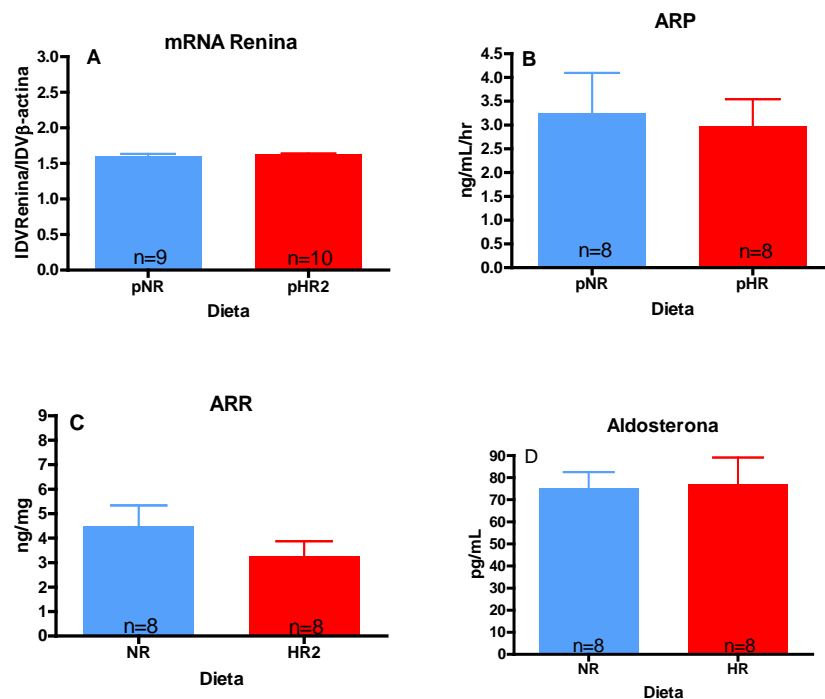
O peso corpóreo da prole ao nascimento (nas primeiras 24hs de vida) foi menor na prole de mães que receberam sobrecarga de sódio durante a gestação ( $6,18 \pm 0,04$  g) comparada com a pNR ( $6,41 \pm 0,09$  g) – figura 18.



**Figura 18.** Peso ao nascimento das proles cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR), e hipersódica (pHR) durante a gestação. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (Two way-ANOVA)

#### 4.10.2.2 Expressão gênica do mRNA da renina renal, atividade da renina plasmática (ARP), atividade da renina renal (ARR) e aldosterona sérica

A expressão gênica do mRNA da renina, ARP, ARR e a concentração da aldosterona sérica da prole recém nascida não foi diferente entre os grupos (Figura 19 A-D, Tabela 23).

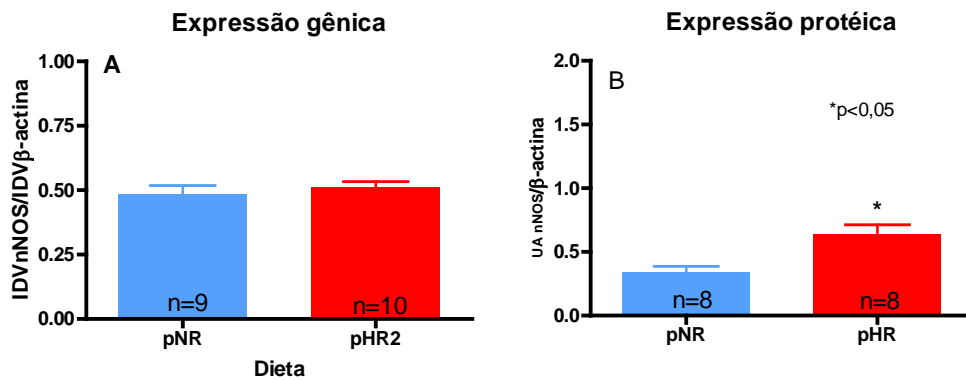


**Figura 19:** Expressão gênica do mRNA da renina no rim (A); atividade da renina plasmática - ARP (B); atividade da renina renal - ARR (C) e aldosterona sérica (D) das proles recém-nascidas cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR). Valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Test-t student



#### 4.10.2.3 Expressão gênica do mRNA e protéica da nNOS renal

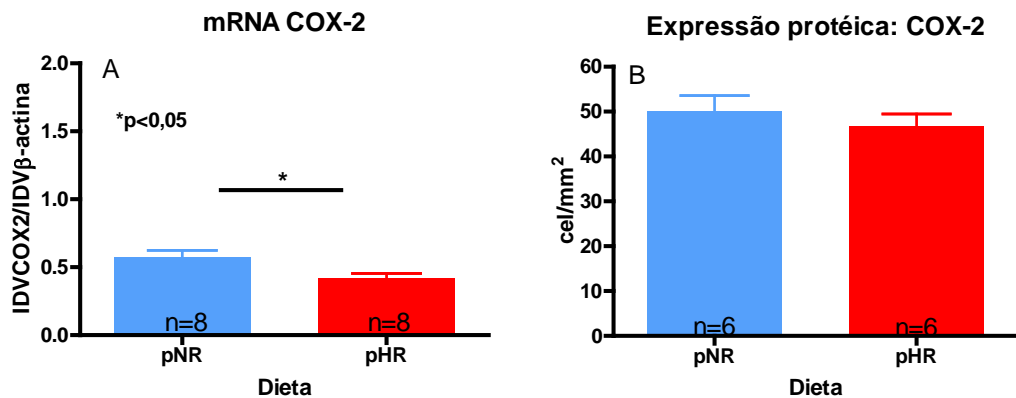
A expressão gênica do mRNA da nNOS não foi diferente entre as proles (pNR  $0,49 \pm 0,03$ ; pHR  $0,51 \pm 0,02$  nNOS/IDV $\beta$ -actina - Figura 20 A), porém, a expressão protéica (figura 20 B) foi maior na pHR ( $0,637 \pm 0,05$  IDVnNOS/IDV $\beta$ -actina) comparado a pNR ( $0,342 \pm 0,07$  IDVnNOS/IDV $\beta$ -actina).



**Figura 20:** Expressão gênica do mRNA (A) e protéica (B) da nNOS da prole masculina recém nascida, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR). Valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Test-t student

#### 4.10.2.4 Expressão gênica do mRNA e protéica da COX-2

A expressão gênica do mRNA da COX-2 (figura 21 A) foi significativamente menor na pHR ( $0,418 \pm 0,04$  IDVCOX-2/IDV $\beta$ -actina) comparado a pNR recém-nascida ( $0,571 \pm 0,05$  IDVCOX-2/IDV $\beta$ -actina). A expressão protéica da COX-2 não foi diferente entre as proles (pNR  $50,08 \pm 3,5$  e pHR  $46,62 \pm 2,84$  cel/mm<sup>2</sup> - figura 21 B).



**Figura 21:** Expressão gênica do mRNA (A) e protéica (B) da COX-2 da prole masculina recém nascida, cujas mães foram submetidas à dieta normossódica (pNR) e hipersódica (pHR). Valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Test-t student

## **5 DISCUSSÃO**

---

Neste estudo, a pressão arterial sistólica foi maior nas mães que receberam dieta hipersódica durante a gestação. Porém, não foi observado aumento da pressão arterial na prole adulta tanto no grupo controle e após a sobrecarga de sódio por uma semana. Esse resultado está de acordo com um estudo recente de Porter e colaboradores<sup>17</sup> no qual demonstraram que a dieta hipersódica administrada em ratas durante a gestação não aumentou a pressão arterial e a frequência cardíaca nas proles masculinas e femininas adultas.

O resultado deste estudo sugere que a sobrecarga de sal durante a gestação não é suficiente para programar a hipertensão na vida adulta. Porém, quando sobrecarga de sal é estendida até o período de lactação, este parece ser o desencadeador da hipertensão na fase adulta, pois um estudo anterior do nosso laboratório, no qual a sobrecarga de sal oferecida até a lactação (além do período gestacional) observou-se maior pressão arterial na prole masculina e feminina adulta de ratos Wistar<sup>20</sup>.

No presente estudo foi avaliado se o sistema renina angiotensina e aldosterona da prole adulta sofreu influência da dieta materna durante a vida intra-uterina, uma vez que este sistema participa de forma importante na regulação da pressão arterial, do volume extracelular e da excreção e manutenção dos eletrólitos<sup>43</sup>. Mudanças do conteúdo de sal na dieta interferem na atividade deste sistema, no qual a dieta hipersódica diminui e a

hipossódica aumenta a atividade desse sistema <sup>45,46</sup>. Entretanto para correlacionar e esclarecer os resultados encontrados da prole adulta foi proposto investigar também o SRA da mãe e da prole ao nascimento.

Foi observado que o sistema renina angiotensina tanto renal como sistêmico das proles recém nascidas de mães que receberam a dieta hipersódica durante a gestação não foi diferente das proles de mães que receberam a dieta normossódica. O sistema renina angiotensina (SRA) é importante para o desenvolvimento renal, e os componentes deste sistema estão ativos no rim durante a vida fetal <sup>47,48</sup>. Provavelmente, devido a esta fase ativa do SRA, não foi possível observar o efeito da dieta materna nos recém-nascidos. Entretanto, um resultado oposto é mostrado num estudo, no qual as ratas durante a gestação receberam sobrecarga salina na água de beber (0,15 mol/L), a prole destas, com um dia de vida apresentou menor concentração de angiotensina II (ANG II) e menor expressão protéica do receptor da ANG II (AT1) no rim, concluindo que esta alteração poderá interferir no desenvolvimento renal <sup>49</sup>.

Já na fase adulta, esta prole apresentou a expressão gênica da renina renal, atividade da renina plasmática, e a aldosterona sérica menores. Estes resultados são diferentes da prole ao nascimento. Provavelmente, esta mudança pode-se atribuir as alterações que ocorre ao longo do desenvolvimento do animal, pois o SRA diminui após a fase da maturação do rim <sup>47,48</sup>, entretanto a dieta hipersódica materna durante a gestação contribuiu de uma maneira que a diminuição do sistema fosse significativa na prole adulta. Estes resultados sugerem a influência da dieta materna

durante a gestação, pois em nenhum momento após o nascimento, esta prole recebeu a sobrecarga de sódio na dieta.

Como os resultados da prole adulta mostram evidências da influência materna, as mães também foram analisadas logo após o nascimento da prole. Foi observado de que a expressão gênica da renina não foi diferente, porém, as atividades da renina plasmática e renal e a aldosterona sérica foram menores comparados às mães normossódicas.

Frente aos resultados obtidos das mães, os recém nascidos e das proles adultas, é possível entender que as alterações da renina observadas nas proles adultas, foram transmitidas durante a vida intra-uterina através da circulação materna induzida pela dieta hipersódica, decorrentes da troca de nutrientes via placenta durante a vida fetal, e não através do mRNA da renina materna.

No estudo de Leandro SM e colaboradores <sup>19</sup> realizado em nosso laboratório, foi encontrada menor expressão gênica dos componentes do SRA e menor concentração de ANGI e ANGI<sup>II</sup> na placenta dos fetos, cujas mães receberam dieta hipersódica durante a gestação. Estes dados, junto com os resultados do presente estudo, podem indicar que através da placenta, além de transferir nutrientes da mãe para o feto <sup>50</sup>, a inibição do sistema renina angiotensina materna causada pela sobrecarga de sódio também foi transferida para a prole.

Sendo assim, essas expressões fenotípicas observadas nas proles adultas, similares ao que foi encontrado nas mães, podem ser atribuídas ao fenômeno de “predictive adaptive response” descrito por Gluckman e

Hanson, baseado na hipótese do “Thrifty phenotype”<sup>44</sup> que se refere à habilidade da interação de genes e o ambiente em diferentes estágios no ciclo da vida. Esses autores propuseram que quando há alterações no ambiente intrauterino, por exemplo, restrição de nutrientes ou concentração alta de glucocorticóides, o feto se adaptará para ter chances de sobrevivência. Essas adaptações são muitas vezes reversíveis, contudo, se as alterações no ambiente persistem, o feto será obrigado a fazer adaptações irreversíveis que podem ser ou não imediatamente benéficas, mas que se manifestarão na vida adulta tardia. Dessa maneira o feto estará preparado para enfrentar, por exemplo, baixa disponibilidade de alimentos ou níveis altos de estresse.

Um resultado que nos chamou atenção neste estudo, foi a maior atividade da renina renal na prole adulta, uma vez que a renina circulante, e a expressão gênica de mRNA da renina estavam diminuídas no grupo controle. O esperado seria a menor atividade da renina no rim desta prole, cuja mãe recebeu sobrecarga de sódio. Este aumento da atividade da renina no rim nesta prole pode ser devido a maiores concentrações de ANGII no rim desses animais evidenciado pelo estudo de Silva e colaboradores<sup>20</sup>. Na literatura é descrito que a atividade da renina no rim é atribuída à síntese e armazenamento, enquanto que no plasma representa a liberação da renina<sup>45</sup>. Dessa forma, pode-se inferir que a sobrecarga de sódio materno durante a gestação interferiu no mecanismo de síntese e armazenamento, diminuindo a liberação de renina, para o plasma e aumentando a atividade da renina no rim na prole adulta do grupo controle.

No presente estudo, observamos que as proles adultas, cujas mães receberam dieta hipersódica, responderam de forma esperada, aumentando ou diminuindo a atividade da renina tanto no plasma como no rim, quando submetidas ao teste de estímulo ou inibição do sistema renina angiotensina, por uma semana. Entretanto foi observado que esta resposta aos testes estava exacerbada nestas proles. Uma possível explicação para este resultado é que a sobrecarga de sódio materna durante a gestação modificou a resposta da atividade de renina, tornando os animais mais sensíveis frente a estímulo ou inibição do sistema renina angiotensina. Todavia, não é possível prever se esta sensibilidade aumentada será benéfica na vida tardia destes animais.

Além da renina, foi verificado neste estudo, se as vias das ciclooxigenases e o do óxido nítrico também poderiam sofrer influência da sobrecarga de sódio materna, uma vez que estas duas enzimas também atuam no SRA.

As prostaglandinas derivadas das ciclooxigenases (COX-2) regulam o tônus vascular e a homeostase de sal e água no rim de mamíferos<sup>31</sup>. Os estudos existentes demonstram que a resposta da COX-2 frente à sobrecarga de sal na região medular é diferente da região cortical<sup>51</sup>. Um estudo realizado em ratos Sprague-Dawley que receberam sobrecarga de sódio (8,0% NaCl) por 14 dias, demonstrou que a expressão gênica e protéica da COX-2 aumenta na região medular, especialmente nos ductos coletores<sup>52</sup>. Nesta região, a COX-2 é importante para o balanço de sódio e também para manter a pressão sanguínea, pois as prostaglandinas



produzidas pela COX-2 modulam a absorção epitelial de sódio na região ascendente e nos ductos coletores. Quando a COX-2 é inibida, aumenta a retenção de sódio na medula além de comprometer o fluxo sanguíneo medular. Porém na região cortical é observado o oposto, menor expressão gênica e protéica da COX-2 durante a sobrecarga e maior durante a restrição de sal, no qual, as prostaglandinas provavelmente protegem a filtração glomerular do impacto dos agentes vasoconstritores formados em resposta a depleção de volume devido à restrição de sódio <sup>51</sup>.

Entretanto, no presente estudo foi possível demonstrar que a dieta hipersódica durante a gestação levou ao aumento da expressão protéica da COX-2 no grupo materno e na prole masculina adulta, e um aumento da expressão gênica e protéica da COX-2 na região medular, porém na região cortical nenhuma diferença foi encontrada tanto nas mães quanto na prole adulta.

Na prole recém-nascida a expressão gênica da COX-2 foi menor, pois a dieta hipersódica materna possivelmente levou a supressão da COX-2 nestes animais (neonatos), uma vez que, a sobrecarga de sal diminui e expressão desta enzima no córtex renal <sup>51</sup>. Porém não existem estudos relacionando sobrecarga salina materna e COX-2 renal em recém-nascidos. Possivelmente pode ser devido à sobrecarga salina na dieta materna, mas não podemos afirmar qual o mecanismo envolvido nesta alteração e mais estudos são necessários para elucidar os resultados. Entretanto, mais uma vez, pode-se confirmar a influência da dieta materna na prole adulta, uma

vez que ambos responderem da mesma maneira na região medular, quando avaliada a expressão protéica.

Estudos mostram que a expressão gênica e protéica COX-2 é atenuada pela angiotensina II. Cheng e colaboradores, demonstraram que a administração de um inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA) aumenta a expressão gênica e protéica da COX-2, sugerindo uma ação direta da ANGII que causa “dowregulation” da COX-2 no córtex renal<sup>53</sup>. Em outro estudo, quando oferecida somente dieta hipossódica o SRA é ativado, portanto, a ANGII aumenta, no qual pode induzir a menores níveis de COX-2 na região do córtex renal<sup>51</sup>.

A diminuição da expressão gênica da COX-2 na medula renal após o teste HO pode ser atribuída ao aumento da ANGII induzido pela dieta hipossódica, observado pela atividade da renina renal aumentada. O mesmo resultado não foi observado na prole de mães que receberam a dieta normossódica, portanto, podemos inferir de que essas proles (pHR) são mais sensíveis a responder os estímulos.

Na região cortical após o teste HO a expressão gênica da COX-2 foi maior, diferente dos dados da literatura citados acima, porém, provavelmente este resultado pode ter sido influenciado pela sobrecarga de sódio materna. Quando avaliada a expressão protéica, tanto no córtex como na medula renal, essas diferenças não foram encontradas, talvez uma semana de dieta hipossódica não seja suficiente para alterar a expressão protéica das proles, ou que possíveis fatores pós - transcricionais foram influenciados pela dieta hipersódica materna.

No rim, o óxido nítrico exerce importantes funções na regulação da hemodinâmica renal, natriurese pressórica, inibição da reabsorção de sódio tubular e “feedback” tubuloglomerular <sup>54</sup>.

Estudos mostram que a isoforma óxido nítrico sintase neuronal, a nNOS, também é importante na regulação da liberação de renina, pois animais “knockout” para nNOS apresentaram uma falha na liberação de renina na macula densa, quando esta é estimulada com restrição de sódio <sup>42</sup>.

Os dados do presente estudo demonstraram que a sobrecarga de sódio materna induziu a uma menor expressão gênica do mRNA da nNOS renal da prole masculina adulta. Este resultado está de acordo com a literatura, no qual descreve que expressão gênica de nNOS no córtex renal acompanha a diminuição da expressão gênica da renina frente a uma sobrecarga de sódio <sup>55</sup>. Conforme discutido anteriormente, a expressão gênica da renina, tanto no córtex como na medula, também estava diminuída nestas proles. Ni & Varziri <sup>56</sup> demonstraram que em ratos normotensos, a expressão protéica da nNOS está diminuída tanto na região cortical como medular após três semanas de dieta hipersódica. Portanto, a expressão gênica diminuída de nNOS no córtex renal da prole adulta indica que a prole possivelmente recebeu influência da dieta hipersódica materna durante a gestação, apesar de que nas mães, nenhuma diferença foi observada na expressão da nNOS.

Devido a menor expressão gênica de mRNA de nNOS no córtex renal da prole adulta, provavelmente causada pela sobrecarga de sódio materno, nenhuma alteração foi encontrada nos testes tanto de estímulo como de

inibição do SRA, enquanto que na prole pNR observou-se uma diminuição da expressão gênica nos testes realizados. Já a expressão protéica de nNOS nas proles adultas (pNR e pHR) e nas mães nenhuma diferença foi encontrada. Porém, a expressão protéica da nNOS foi maior na prole recém-nascida pHR. A nNOS é importante para o desenvolvimento do rim, assim como a renina<sup>57</sup>, e essa alteração, possivelmente, foi influenciada pela dieta materna, porém ao longo da vida essa diferença desaparece. Estudos adicionais serão necessários para elucidar este mecanismo.

Em resumo, a sobrecarga de sódio durante a gestação:

1. Diminuiu a atividade da renina plasmática (ARP) e renal assim como a aldosterona plasmática no grupo materno.
2. Induziu a menor expressão gênica da COX-2 e maior expressão protéica da nNOS no rim da prole recém nascida.
3. Não modificou a pressão arterial da prole na vida adulta.
4. Induziu a menor expressão gênica da renina, da atividade da renina plasmática e da aldosterona sérica, com exceção da atividade da renina renal que foi maior na prole adulta. Após os testes de estímulo ou inibição do SRA, a expressão gênica da renina, ARP, respondeu de forma significativa a estes testes.
5. Induziu a maior expressão gênica como a protéica da COX-2 na medula renal na prole adulta. E após o teste de estímulo (HO), a expressão gênica da COX-2 foi maior no córtex e menor medula renal.
6. Induziu a expressão gênica de nNOS no córtex renal. Após o teste de estímulo (HO), a expressão gênica foi maior na medula renal.



1. A sobrecarga de sódio materno durante a gestação: a) induz a menor atividade do sistema renina angiotensina, e ao mesmo tempo, maior sensibilidade ao responder a estímulos ou a inibição do sistema renina angiotensina na prole masculina adulta. b) ativa a ciclooxigenase-2 no rim da prole adulta.
2. Estas modificações observadas na prole masculina adulta, provavelmente foram características herdadas do fenótipo materno, no qual foi possível demonstrar que a expressão gênica da renina da prole adulta foi modulada pela atividade da renina plasmática e renal materna, e não pela expressão gênica.
3. Respondendo as perguntas citadas na introdução: Este consumo excessivo de sódio durante a gestação pode acarretar sérias conseqüências para a criança que está sendo gerada? Pode-se supor que sim, o excesso de sal pode afetar as gerações futuras, e ser um dos mecanismos responsáveis pela hipertensão essencial, porém, mais estudos serão necessários.



**Tabela 3.** Evolução ponderal materna (g) da 8ª a 17ª semana de vida

<b>Dieta</b>	<b>NR (n=12)</b>	<b>HR (n=12)</b>
<b>semana</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Peso (g)</b>
8	189,26 ± 6,13	206,58 ± 10,30
9	208,14 ± 7,79	222,78 ± 8,75
10	238,15 ± 6,03	243,54 ± 8,67
11	256,61 ± 7,52	257,52 ± 8,82
12	268,16 ± 6,58	273,05 ± 10,11
13	298,53 ± 6,88	304,12 ± 9,81
14	338,93 ± 9,68	334,61 ± 6,19
15	401,80 ± 11,54	402,67 ± 10,10
16	337,22 ± 9,12	335,03 ± 11,48
17	349,89 ± 6,94	334,30 ± 8,95

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da media (One Way ANOVA). As mães receberam dieta NR (normossódica, 1,3% de NaCl ),ou HR (hipersódica 8,0%de NaCl) da 8ª a 15ª semana de gestação.



**Tabela 4:** Pressão arterial sistólica caudal (PAC) materna antes, durante e após a gestação

<b>Dieta</b>	<b>NR (n=12)</b>	<b>HR (n=12)</b>
semana	PAC (mmHg)	PAC (mmHg)
11	112,09 ± 3,78	128,85* ± 4,84
13	112,46 ± 4,26	121,39 ± 5,03
14	111,11 ± 3,88	127,21** ± 3,93
16	105,12 ± 8,40	118,52 ± 6,35
17	115,26 ± 3,90	122,54 ± 5,13
18	112,54 ± 5,36	124,06 ± 15,08

Os valores são expressos como média ± erro padrão da media (One Way ANOVA). As mães receberam dieta NR (normossódica, 1,3% de NaCl) ou HR2 (hipersódica 8,0% de NaCl) da 8ª a 15ª semana de vida. A pressão arterial caudal sistólica foi medida da 11ª a 18ª semana de vida. \*p<0,05 vs 11ª NR. \*\*p<0,05 vs 14ª NR. A letra n representa o número de animais utilizados no experimento.

**Tabela 5:** Evolução ponderal (g) das proles masculinas, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação. As proles receberam dieta normossódica, independente da dieta que as mães receberam

<b>Dieta</b>	<b>pNR (n=36)</b>	<b>pHR (n=35)</b>
semana	Peso (g)	Peso (g)
0	6,81 ± 0,39	7,46 ± 0,31
1	16,21 ± 1,09	18,84 ± 0,87
2	26,89 ± 1,42	28,64 ± 1,58
3	50,64 ± 2,70	47,33 ± 2,85
4	85,15 ± 5,79	72,37 ± 3,83
5	127,81 ± 8,20	130,55 ± 6,935
6	167,67 ± 11,72	176,52 ± 8,18
7	200,15 ± 11,74	224,33 ± 9,90
8	243,80 ± 13,54	274,12 ± 13,34
9	283,47 ± 15,654	302,91 ± 14,21
10	312,21 ± 17,04	332,89 ± 14,76
11	335,41 ± 17,971	347,25 ± 15,41
12	358,98 ± 19,39	367,37 ± 16,50

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados nos experimentos.

**Tabela 6:** Pressão arterial sistólica caudal (mmHg) das proles da 6<sup>a</sup> a 12<sup>a</sup> semana de vida, cujas mães receberam respectivamente dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

<b>PROLE</b>	<b>pNR (n= 36)</b>	<b>pHR (n=35)</b>
semana	PAC (mmHg)	PAC (mmHg)
6	108,1 ± 2,72	112,9 ± 2,02
8	115,0 ± 2,88	119,6 ± 2,30
10	118,8 ± 2,49	117,4 ± 3,13
12	119,4 ± 2,82	120,8 ± 2,40

Os valores estão expressos como média ± erro padrão da media (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados nos experimentos

**Tabela 7:** Pressão arterial sistólica caudal (mmHg) das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRAA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

<b>TESTE</b>	<b>pNR</b>	<b>pHR</b>
<b>Controle</b>	118,7 ± 6,05 (n=7)	117,0 ± 4,01 (n=15)
<b>HO</b>	112,0 ± 4,59 (n=14)	119,2 ± 5,8 (n=6)
<b>HIPER</b>	140,3 ± 2,30 (n=5)	145,0 ± 3,8 (n=9)

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

**Tabela 8:** Expressão do mRNA da renina (IDVrenina/IDV $\beta$ -actina) no córtex renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRAA, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

TESTE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	1,50 $\pm$ 0,20 (n=8)	0,98 $\pm$ 0,10* (n=8)
<b>HO</b>	1,05 $\pm$ 0,07 (n=8)	1,03 $\pm$ 0,07 (n=10)
<b>HIPER</b>	1,03 $\pm$ 0,07 (n=10)	1,33 $\pm$ 0,15 (n=9)

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra n representa o número de animais utilizados no experimento. \*p<0,05 vs pNR controle.

**Tabela 9:** Expressão do mRNA da renina (IDVrenina/IDV $\beta$ -actina) na medula renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA de restrição (HO) e sobrecarga (HIPER) de sódio, cujas mães receberam dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

TESTE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	0,91 $\pm$ 0,14 (n=8)	0,59 $\pm$ 0,06* (n=8)
<b>HO</b>	0,80 $\pm$ 0,05 (n=8)	0,71 $\pm$ 0,09 (n=10)
<b>HIPER</b>	0,66 $\pm$ 0,04 (n=9)	0,67 $\pm$ 0,09 (n=8)

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra n representa o número de animais utilizados no experimento. \*p<0,05 vs pNR controle.

**Tabela 10:** Atividade de renina plasmática (ng/mL/hr) das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	4,22±0,43 (n=11)	2,16±0,65*
<b>HO</b>	5,91±0,75 (n=8)	9,22±1,00*
<b>HIPER</b>	2,38±0,36 (n=10)	1,12±0,30*

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra n representa o número de animais utilizados no experimento.  $p < 0,05$  vs respectivo teste.

**Tabela 11:** Atividade da renina renal (ng/mg/hr) das proles do grupo controle e dos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRAA, cujas mães receberam, as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

TESTE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	9,02±0,84 (n=8)	16,42±1,78*
<b>HO</b>	20,63±1,55 (n=8)	32,98±3,69*
<b>HIPER</b>	15,64±2,57 (n=10)	7,34±1,55*

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra n representa o número de animais utilizados no experimento.  $p < 0,05$  vs respectivo teste.

**Tabela 12:** Aldosterona sérica (pg/mL) das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	410,0±38,8 n=10	302,0±24,9* n=9
<b>HO</b>	380,0±87,6 n=8	568,5±140,4 n=10
<b>HIPER</b>	195,8±51,57 n=6	311,1±63,45 n=8

Os valores são expressos em média ± erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento. \*p<0,05 vs pNR controle.

**Tabela 13:** Expressão do mRNA da COX2 (IDVCOX-2/IDVβ-actina) no córtex renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	1,41±0,10 n=8	1,13±0,10 n=8
<b>HO</b>	0,78±0,09 n=8	1,12±0,11 n=10
<b>HIPER</b>	0,88±0,07 n=10	1,21±0,16 n=9

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

**Tabela 14:** Expressão do mRNA da COX2 (IDVCOX-2/IDV $\beta$ -actina) na medula renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	1,22 $\pm$ 0,13 n=8	2,00 $\pm$ 0,30* n=7
<b>HO</b>	2,13 $\pm$ 0,09 n=8	1,59 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup> n=10
<b>HIPER</b>	1,76 $\pm$ 0,25 n=9	1,98 $\pm$ 0,42 n=8

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento. \* $p < 0,05$  vs pNR controle, <sup>a</sup> $p < 0,05$  vs pNR HO.

**Tabela 15:** Expressão protéica da COX2 (COX-2/ $\beta$ -actina) no córtex renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	0,49 $\pm$ 0,26 n=4	1,50 $\pm$ 0,46 n=4
<b>HO</b>	1,41 $\pm$ 0,32 n=6	0,70 $\pm$ 0,18 n=5
<b>HIPER</b>	0,86 $\pm$ 0,39 n=5	1,32 $\pm$ 0,37 n=5

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

**Tabela 16:** Expressão protéica da COX2 (UACOX-2/UA $\beta$ -actina) na medula renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	0,74 $\pm$ 0,03 n=5	2,83 $\pm$ 0,28* n=4
<b>HO</b>	0,67 $\pm$ 0,05 n=4	1,03 $\pm$ 0,22 n=5
<b>HIPER</b>	1,18 $\pm$ 0,14 n=4	1,33 $\pm$ 0,12 n=5

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento. \*p<0,05 vs pNR controle.

**Tabela 17:** Expressão do mRNA da nNOS (IDVnNOS/IDV $\beta$ -actina) no córtex renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	0,90 $\pm$ 0,12 n=8	0,55 $\pm$ 0,10* n=8
<b>HO</b>	0,60 $\pm$ 0,08 n=8	0,53 $\pm$ 0,03 n=10
<b>HIPER</b>	0,56 $\pm$ 0,03 n=10	0,67 $\pm$ 0,10 n=9

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento. \*p<0,05 vs pNR controle.



**Tabela 18:** Expressão do mRNA da nNOS (IDVnNOS/IDV $\beta$ -actina) na medula renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	1,27 $\pm$ 0,18 n=8	2,08 $\pm$ 0,39 n=8
<b>HO</b>	1,26 $\pm$ 0,03 n=8	2,53 $\pm$ 0,29* n=10
<b>HIPER</b>	1,40 $\pm$ 0,27 n=10	1,52 $\pm$ 0,32 n=8

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (One Way ANOVA). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento. \*p<0,05 vs pNR HO.

**Tabela 19:** Expressão da protéica da nNOS (UANOS/UA $\beta$ -actina) no córtex renal renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	0,087 $\pm$ 0,07 n=6	1,01 $\pm$ 0,21 n=6
<b>HO</b>	0,98 $\pm$ 0,19 n=6	1,10 $\pm$ 0,19 n=6
<b>HIPER</b>	0,97 $\pm$ 0,12 n=6	1,19 $\pm$ 0,18 n=6

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

**Tabela 20:** Expressão da proteína da nNOS (UAnNOS/UA $\beta$ -actina) na medula renal renal das proles do grupo controle e nos testes de estímulo (HO) e inibição (HIPER) do SRA, cujas mães receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

PROLE	pNR	pHR
<b>Controle</b>	0,51 $\pm$ 0,13 n=6	0,74 $\pm$ 0,08 n=6
<b>HO</b>	1,30 $\pm$ 0,33 n=6	0,90 $\pm$ 0,04 n=6
<b>HIPER</b>	1,16 $\pm$ 0,22 n=6	0,86 $\pm$ 0,07 n=6

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

**Tabela 21:** Expressão da gênica do mRNA da renina, nNOS e COX-2 no córtex e medula renal renal das mães que receberam as dietas normossódica (mNR) ou hipersódica (mHR) durante a gestação.

mRNA	mNR (n=6)		mHR (n=8)	
	Córtex	Medula	Córtex	Medula
Renina (IDVrenina/ IDV $\beta$ -actina)	0,50 $\pm$ 0,60	0,41 $\pm$ 0,010	43 $\pm$ 0,010	0,39 $\pm$ 0,020
nNOS (IDVnNOS/ IDV $\beta$ -actina)	0,51 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,12	0,45 $\pm$ 0,04	0,79 $\pm$ 0,08
COX-2 (IDVCOX2/ IDV $\beta$ -actina)	0,54 $\pm$ 0,06	0,80 $\pm$ 0,12	0,51 $\pm$ 0,06	1,01 $\pm$ 0,14

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (test-t student). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento

**Tabela 22:** Expressão protéica da nNOS (UANOS/UA $\beta$ -actina) e COX-2 (córtex: n° de cel. MD +/glomérulo e medula: cel/mm<sup>2</sup>) no córtex e medula renal renal das mães que receberam as dietas normossódica (mNR) ou hipersódica (mHR) durante a gestação

Expressão protéica	mNR		mHR	
	Córtex	Medula	Córtex	Medula
nNOS <sup>a</sup>	0,36±0,04	0,99±0,22	0,31±0,04	0,92±0,12
COX-2 <sup>b</sup>	1,47±0,12	46,75±5,91	1,20±0,14	76,58±7,08*

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (test-t student). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento. <sup>a</sup>western blotting e <sup>b</sup>imunohistoquímica. \*p<0,05 vs mNR medula COX-2.

**Tabela 23:** Expressão gênica do mRNA da renina, atividade da renina plasmática (ARP), atividade da renina renal (ARR) e aldosterona sérica das proles recém-nascidas de mães que receberam as dietas normossódica (pNR) ou hipersódica (pHR) durante a gestação

Variáveis	pNR	pHR
mRNA – Renina (IDVrenina/IDV $\beta$ -actina)	0,49±0,03 (n=9)	0,51±0,02 9(n=10)
ARP (ng/mL/hr)	3,25±0,84(n=8)	3,00±0,56(n=8)
ARR (ng/mg/hr)	4,49±0,085(n=8)	3,24±0,64(n=8)
Aldosterona sérica (pg/mL)	75,21±7,28(n=8)	76,89±12,3(n=8)

Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (test-t student). A letra **n** representa o número de animais utilizados no experimento.

## **8 REFERÊNCIAS**

---

- 1- Beilin LJ. Dietary salt and risk factors for cardiovascular disease. *Kidney Int Suppl.* 1992; 37:S90-6.
- 2- Miura K, Okuda N, Turin TC, Takashima N, Nakagawa H, Nakamura H, Yoshita K, Okayama A, Ueshima H, Nippon DATA80 research group. Dietary salt intake and blood pressure in representative Japanese population: baseline analyses of NIPPON DATA80. *J Epidemiol.* 2010; 20 Suppl 3:S524-30.
- 3- Drake SL, Lopetcharat K, Drake MA. Salty taste in dairy foods: can we reduce the salt? *J Dairy Sci.* 2011; 94(2):636-45.
- 4- WASH – world action on salt health. Disponível em: <http://www.worldactiononsalt.com>.
- 5- Brown IJ, Tzoulaki I, Candeias V, Elliott P. Salt intakes around the world: implications for public health. *Int J Epidemiol.* 2009; Jun 38(3):791-813.
- 6- Review and updating of current WHO recommendations on salt/sodium and potassium consumption [World Health Organization] 2011, Geneva-Switzerland.
- 7- Havas S, Dickinson BD, Wilson M. The urgent need to reduce sodium consumption. *JAMA.* 2007; Sep 26;298(12):1439-41.
- 8- Eriksson JG, Forsén TJ, Kajantie E, Osmond C, Barker DJ. Childhood growth and hypertension in later life. *Hypertension.* 2007; Jun 49(6):1415-21.

- 
- 9- Godfrey KM and Barker DJ. Fetal nutrition and adult disease. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71(5 Suppl): p. 1344S-52S.
  - 10- Barker DJ, Osmond C, Forsen TJ, Kajantie E, Eriksson JG. Maternal and social origins of hypertension. *Hypertension.* 2007; 50(3): p. 565-71.
  - 11- Nijland MF, Nathanielsz PW, Prenatal origins of adult disease. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008; 20(2): p. 132-8.
  - 12- Nuyt AM. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond).* 2008; 114(1): p. 1-17.
  - 13- Langley-Evans S, Gardner D, and Welham SJ. Intrauterine programming of cardiovascular disease by maternal nutritional status. *Nutrition,* 1998; 14(1): p. 39-47.
  - 14- Contreras RJ. Differences in perinatal NaCl exposure alters blood pressure levels of adult rats. *Am J Physiol.* 1989; 256(1 Pt 2): p. R70-7.
  - 15- Contreras RW, Henderson RDL, Curtis JC. High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats. *Physiol Behav.* 2000; 71(1-2): p. 173-81.
  - 16- Swenson SJ, Speth RC, Porter JP. Effect of a perinatal high-salt diet on blood pressure control mechanisms in young Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286(4): p. R764-70.
  - 17- Porter JP, King SH, Honeycutt AD, Prenatal high-salt diet in the Sprague-Dawley rat programs blood pressure and heart rate hyperresponsiveness to stress in adult female offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 293(1): p. R334-42.

- 
- 18- Ding Y, Lv J, Mao C, Zhang H, Wang A, Zhu L, Zhu H, Xu Z. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes. *Journal of hypertension*. 2010; 28:1290-7.
- 19- Leandro SM, Furukawa LN, Shimizu MH, Casarini DE, Seguro AC, Patriarca G, Coelho MS, Dolnikoff MS, Heimann JC. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin-angiotensin system. *Physiol Behav*. 2008. 95(1-2): p. 145-51.
- 20- da Silva AA, de Noronha IL, de Oliveira IB, Malheiros DM, Heimann JC. Heimann. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2003; 13(3): p. 133-9.
- 21- Kurtz A, Wagner C. Cellular control of renin secretion. *J Exp Biol*. 1999; 202(Pt 3): p. 219-25.
- 22- Tran HA, Schwartzbard A, Weintraub HS. Role of RAAS Inhibition in the Prevention of Cardiovascular Disease. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*. 2011 Apr 15. [Epub ahead of print].
- 23- Ruster CW. Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17(11): p. 2985-91.
- 24- Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med*. 2008; Sep; 264(3):224-36.
- 25- Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med*. 2008; 86(6): p. 615-21.
- 26- Patterson ME, Mullins JJ, Mitchell KD. Renoprotective effects of neuronal NOS-derived nitric oxide and cyclooxygenase-2 metabolites in transgenic

- rats with inducible malignant hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008; 294(1): p. F205-11.
- 27- Blantz RC, Deng A, Lortie M, Munger K, Vallon V, Gabbai FB, Thomson SC. The complex role of nitric oxide in the regulation of glomerular ultrafiltration. *Kidney Int*. 2002; 61(3): p. 782-5.
- 28- Harding P, Sigmon DH, Alfie ME, Huang PL, Fishman MC, Beierwaltes WH, Carretero OA. Cyclooxygenase-2 mediates increased renal renin content induced by low-sodium diet. *Hypertension*. 1997; 29(1 Pt 2): p. 297-302
- 29- Harris RC, Breyer MD. Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 281(1): p. F1-11.
- 30- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Miyazaki Y, Ichikawa I, McKanna JA, Harris RC. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest*. 1999; 103(7): p. 953-61.
- 31- Breyer MD, Harris RC. Cyclooxygenase 2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2001; 10:89-98.
- 32- Wang JL, Cheng HF, Harris RC. Cyclooxygenase-2 inhibition decreases renin content and lowers blood pressure in a model of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1999; 34(1): p. 96-101.
- 33- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest*. 1994; 94(6): p. 2504-10.
- 34- Jensen BL, Kurtz A. Differential regulation of renal cyclooxygenase mRNA by dietary salt intake. *Kidney Int*. 1997; 52(5): p. 1242-9.



- 
- 35- Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, Harris RC. Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001; 280(3): p. F449-56.
- 36- Cheng HF, Wang SW, Zhang MZ, McKanna JA, Breyer R, Harris RC. Prostaglandins that increase renin production in response to ACE inhibition are not derived from cyclooxygenase-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002; Sep;283(3):R638-46.
- 37- Ollerstam A, Persson AE. Macula densa neuronal nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res*. 2002; 56(2): p. 189-96.
- 38- Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HH. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(24): p. 11993-7.
- 39- Castrop H, Schweda F, Mizel D, Huang Y, Briggs J, Kurtz A, Schnermann J. Permissive role of nitric oxide in macula densa control of renin secretion. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2004; 286(5): p. F848-57.
- 40- Roczniak A, Zimpelmann J, Burns KD. Effect of dietary salt on neuronal nitric oxide synthase in the inner medullary collecting duct. *Am J Physiol*. 1998; 275(1 Pt 2): p. F46-54.
- 41- Ollerstam A, Skøtt O, Ek J, Persson AE, Thorup C. Effects of long-term inhibition of neuronal nitric oxide synthase on blood pressure and renin release. *Acta Physiol Scand*. 2001; 173, 351-8.
- 42- Sällström J, Carlström M, Jensen BL, Skøtt O, Brown RD, Persson AE. Neuronal nitric oxide synthase-deficient mice have impaired renin release but normal blood pressure. *Am J Hypertens*. 2008; 21(1): p. 111-6.

- 
- 43- Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med.* 2008; Sep 264(3):224-36.
- 44- Predictive adaptive responses and human evolution. Gluckman PD, Hanson MA, Spencer HG. *Trends Ecol Evol.* 2005; Oct:20(10):527-33.
- 45- Ingert C, Grima M, Coquard C, Barthelmebs M, Imbs JL. Effects of dietary salt changes on renal renin-angiotensin system in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002; 283(5): p. F995-1002.
- 46- He FJ, MacGregor GA. Salt, blood pressure and the renin-angiotensin system. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2003; 4(1): p. 11-6.
- 47- Distribution of renin mRNA and its protein in the developing kidney. Gomez RA, Lynch KR, Sturgill BC, Elwood JP, Chevalier RL, Carey RM, Peach MJ. *Am J Physiol.* 1989; Nov;257(5 Pt 2):F850-8.
- 48- Renin-Angiotensin System Genes in Kidney Development. Harris JM, Gomez RA. *Microsc Res Tech.* 1997; Nov 1;39(3):211-21.
- 49- Postnatal renal development of rats from mothers that received increased sodium intake. Balbi AP, Costa RS, Coimbra TM. *Pediatr Nephrol.* 2004; Nov 19(11):1212-8.
- 50- The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. Wells JC. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2007; Feb:82(1):143-72.
- 51- Yang T, Singh I, Pham H, et al. Regulation of cyclooxygenase expression in the Kidney by dietary salt intake. *Am J Physiol Renal Physiol.* 1998; 43: F481-9.
- 52- Ye W, Zhang H, Hillas E, Kohan DE, Miller RL, Nelson RD, Honeggar M, Yang T. Expression and function of COX isoforms in renal medulla:

- evidence for regulation of salt sensitivity and blood pressure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2006; 290(2): p. F542-9.
- 53- Cheng HF, Wang JW, Zhang MZ. Angiotensin II attenuates renal cortical cyclooxygenase-2 expression. *Journ. Clinic. Invest.* 1999; 103(7), 953-61.
- 54- Mount PF, Power DA. Nitric oxide in the kidney: functions and regulation of synthesis. *Acta Physiol (Oxf).* 2006; 187(4): p. 433-46.
- 55- Singh I, Grams M, Wang WH, Yang T, Killen P, Smart A, Schnermann J, Briggs JP. Coordinate regulation of renal expression of nitric oxide synthase, renin, and angiotensinogen mRNA by dietary salt. *Am J Physiol.* 1996; 270(6 Pt 2): p. F1027-37.
- 56- Ni Z, Vaziri ND, Effect of salt loading on nitric oxide synthase expression in normotensive rats. *Am J Hypertens.* 2001; 14(2): p. 155-63.
- 57- Ratliff B, Rodebaugh J, Sekulic M, Dong KW, Solhaug M. Nitric oxide synthase and renin-angiotensin gene expression and NOS function in the postnatal renal resistance vasculature. *Pediatr Nephrol.* 2009; Feb;24(2):355-65. Epub 2008 Oct 3.